# การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อซาลโมเนลล่าโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา สำหรับเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

สุดารัตน์ ศรีส่ง

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2567

# การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อซาลโมเนลล่าโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา สำหรับเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

สุดารัตน์ ศรีส่ง

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2567

# MOLECULAR TYPING OF *SALMONELLA* SPP. FOR EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE IN NORTHERN THAILAND

SUDARAT SRISONG

A Thesis Submitted to University of Phayao

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Biotechnology

May 2024

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อซาลโมเนลล่าโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
สำหรับเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

ของ สุดารัตน์ ศรีส่ง

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

---------- ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีวัลย์ บำรุงไทย)

---------- ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤษชัย พูลเจริญ)

---------- กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร)

---------- คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก)

**เรื่อง:** การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อซาลโมเนลล่าโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา สำหรับเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

**ผู้วิจัย:** สุดารัตน์ ศรีส่ง, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566

**อาจารย์ที่ปรึกษา:** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤษชัย พูลเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร

**คำสำคัญ:** Salmonella spp., rapid Salmonella serotype typing, HRM–PCR, CRISPR 1, CRISPR 2

## บทคัดย่อ

*Salmonella* spp. จัดเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ซึ่งก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร หรือที่เรียกว่า Gastroenteritis การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการหา serotype ของเชื้อ *Salmonella* spp. (*Salmonella* typing) อย่างงรวดเร็วโดยใช้เทคนิคโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ HRM–PCR CRISPR 2, verulotype analysis และ CRISPER 1 ร่วมกับ CRISPR 2 รวมถึงศึกษาลักษณะการแพร่กระจายของ *Salmonella* spp. (*Salmonella* transmission routes) ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดพะเยา การศึกษาประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการ *Salmonella* typing โดยวิธี HRM–PCR ใช้ primer 3 ชนิด (*fli*B, *gyr*B, *ycf*Q) พบว่าการประเมินหา *Salmonella* serotype จากผู้ป่วยจำนวน 43 ตัวอย่างสามารถระบุ *Salmonella* serotype ที่มีการกระจายมากที่สุดคือ *S.* 4,5,12:i:– จำนวน 16 อย่าง, *S.* Enteritidis จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *S.* Stanley จำนวน 3 ตัวอย่างตามลำดับ และในการระบุ *Salmonella* serotype ด้วยวิธีการ HRM–PCR จำเป็นต้องมี Standard control *Salmonella* ที่ทราบ serotype จากวิธี conventional serotyping) เพื่อให้ได้รูปแบบ HRM ที่จำเพาะต่อ *Salmonella* serotype นอกจากนี้พบว่า 8 ตัวอย่าง (Unknown) มีลักษณะ HRM patterns เฉพาะตัว แต่ไม่สามารถระบุ *Salmonella* serotype ได้ และไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่างได้เนื่องจากรูปแบบ HRM patterns ใกล้เคียงกัน ส่วนวิธี CRISPR 2 และ verulotype analysis เพื่อตรวจสอบตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 59 ตัวอย่างจากผู้ป่วยจำนวน 43 ตัวอย่าง และจากสัตว์ 16 ตัวอย่างโดยวิเคราะห์จากรูปแบบความแตกต่างของ MLVA 5 แบน และขนาดของ CRISPR 2 (500–2,000 bps) จำนวน 1 แบนจาก Agarose gel electrophoresis พบว่า *S.* 4,5,12:i:–, *S.* Typhimurium *S.* Enteritidis และ *S.* Derby มีรูปแบบ MLVA ขนาดของ CRISPR 2 ที่จำเพาะแต่ *S.* Weltevraden และ *S.* Stanley มี 2 ขนาด CRISPR 2 ที่แตกต่างกัน โดย การวิเคราะห์ 8 ตัวอย่าง (unknown ; HRM–PCR) จำเป็นต้องทำการ sequencing CRISPR 2 (CRISPR 2 fragments) และ เปรียบเทียบกับข้อมูลขนาดของ ของ WGS ที่ทราบ *Salmonella* serotype (Insilco analysis) ผลการวิเคราะห์ *Salmonella* serotypes ตรงกับวิธีมาตรฐาน (Conventional serotyping) และจากการวิเคราะห์ Virulence gene (7 genes) สามารถแยก S. 4,5,12:i:– ได้ 2 รูปแบบ (Subtypes) โดยดูที่ความแตกต่างของการพบ sopE1 gene ในจีโนม ซึ่งพบว่ามี sopE1 จำนวน 8 ตัวอย่าง และไม่มี sopE1 จำนวน 10 ตัวอย่าง และวิธีการสุดท้ายการประเมินความแตกต่างของ CRISPER 1 ร่วมกับ CRISPR 2 ในรูปแบบเจล และการทำนายขนาด DNA fragments ของ CRISPER 1 ร่วมกับ CRISPR 2 (In silico analysis) โดยใช้โปรแกรม WGS (Mega 6) ร่วมกับโปรแกรม CRISPR Cas Finder พบว่าแถบ DNA ส่วน CRISPER 1 และ CRISPR 2 จากการทดลองจริงมีความสอดคล้องกับขนาดของ CRISPER 1 และ CRISPR 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ WGS จาก Public database มาตรฐาน งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าวิธี CRISPER 1 ร่วมกับ CRISPR 2 เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ *Salmonella* serotype เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมีความง่ายในการปฏิบัติการ ง่ายในการอ่าน และวิเคราะห์ผล ใช้เวลาน้อย และราคาต่ำ

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

**Title:** MOLECULAR TYPING OF *SALMONELLA* SPP. FOR EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE IN NORTHERN THAILAND

**Author:** Sudarat Srisong, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2023

**Advisor:** Assistant Professor Kritchai Pooncharean Co-advisor Assistant ProfessorSupaporn Passorn

**Keywords:** Salmonella spp. rapid Salmonella serotype typing HRM-PCR CRISPR 1 CRISPR 2

## ABSTRACT

*Salmonella* spp. is classified as human pathogenic bacteria that cause disease in the gastrointestinal tract or Gastroenteritis. This study aims to develop a rapid process for determining *Salmonella* serotypes *(Salmonella* typing) using various molecular techniques, HRM-PCR, CRISPR 2 and virulotype analysis and CRISPER 1 and CRISPR 2 for the study of the characteristics of *Salmonella* distribution in northern Thailand especially phayao province. This study performed and assessed the efficiency of three rapid *Salmonella* typing processes. HRM-PCR process using triplex primer (*flj*B, *gyr*B, *ycf*Q) to evaluate *Salmonella* serotype of 43 clinical samples were able to determine the most salmonella prevalence as *S.* 4,5, 12:i:- (n=16), *S.* Enteritidis (n=5) and *S.* Stanley (n= 3). To identify *Salmonella* serotypes, the HRM method needs the standard control (identified *Salmonella* serotypes by conventional serotyping) to generate unique HRM patterns for each *Salmonella* serotype. Moreover, eight samples showing unique HRM patterns characterized as unknown but five samples could not be analyzed because they produced similar HRM patterns. The second method, CRISPR 2 and virulotype analysis, was performed to evaluate the differences in CRISPR 2 combined with MLVA (5 genes) and Virulence genes (7 genes) in agarose gel patterns. The method was performed to characterize 59 samples which were from 43 clinical patients and 16 from an animal origin. The analyzation based on specific DNA band pattern of MLVA (n=5) and one fragment of CRISPR 2 (500-2,000 bps) on agarose gel electrophoresis. Results showed *S.* 4,5, 12:i:-, *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis and *S.* Derby generated quite a similar MLVA pattern with a specific CRISPR 2 size, but *S.* Weltevraden and *S.* Stanley generated different CRISPR 2 DNA fragment sizes. Then eight unknowns from HRM-PCR method were characterized by identifying CRISPR 2 sequences and compared the size of CRISPR 2 fragments with WGS data from known *Salmonella* serotypes as well as with conventional method. Using CRISPR 2 with Virulence genes (7 genes), two subtypes of *S.* 4,5, 12:i:- were analyzed with the differences in acquisitions of sopE1 gene as with sopE1 (n=8) and without *sop*E1(n=10). The third method is to evaluate the differences between CRISPER 1 and CRISPR 2 using agarose gel electrophoresis to predict *Salmonella* serotypes. The positive controls or the predicted sizes of DNA fragments of CRISPER 1 and CRISPR 2 (In silico analysis) were obtained using the WGS program (Mega 6) along with the CRISPR Cas Finder program. Results showed that CRISPER 1 and 2 method could identify *Salmonella* serotypes based on the unique DNA band patterns of CRISPER 1 and 2 loci. Moreover, experimental data from CRISPR 1 and 2 fragments in agarose gel CRISPR 1 and 2 fragments were corresponded to those from analyzed data from WGS obtained from public database (enterobase.com). Finally, CRISPER 1 and 2 method was the best candidate for *Salmonella* serotyping because this method is simple and cost a little.

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

# กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษชัย พูลเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่งที่กรุณามอบทุนการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา และชี้แนะแนวทางในการเรียนรู้ ให้คำแนะนำตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีวัลย์ บำรุงไทย ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง และคำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์และนักวิทยาศาสตร์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการขับเคลื่อนงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา แม่นม ที่เป็นแรงสนับสนุนให้ข้าพเจ้า ขอบคุณเพื่อนร่วมชั้นของข้าพเจ้าที่คอยช่วยกันในทุก ๆ เรื่อง รวมถึงขอขอบคุณตัวข้าพเจ้าเอง และขอขอบคุณทุกคนที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจเสมอมาจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลในวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจนำองค์ความรู้ไปต่อยอดในอนาคตต่อไป

สุดารัตน์ ศรีส่ง

# สารบัญ

**หน้า**

# สารบัญตาราง

**หน้า**

# สารบัญภาพ

**หน้า**

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

เชื้อ *Salmonella* spp. จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ก่อโรคสำคัญในระบบทางเดินอาหารเป็นสาเหตุของการเกิดโรค Gastroenteritis สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ ส่วนใหญ่การติดเชื้อ *Salmonella* spp. จะพบสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก และสัตว์เลื้อยคลาน โดยเชื้อจะอยู่ในลำไส้ของสัตว์ที่เป็นพาหะและแพร่กระจายไปสู่สัตว์อื่น ๆ ทั้งนี้มนุษย์เองสามารถได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. จากการรับประทานอาหารที่ไม่ผ่านสุขลักษณะ เช่น เนื้อวัวดิบ เนื้อหมู หรือเนื้อไก่ที่มีการปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตหรือขนส่ง

เชื้อ *Salmonella* spp. เมื่อแบ่งตามความรุนแรงแล้วจะแบ่งออกได้สองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่ง คือ กลุ่มไทฟอยด์ (Typhoidal *Salmonella* spp.) เชื้อในกลุ่มนี้จะก่อให้เกิดโรคในมนุษย์เท่านั้น กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มไม่ใช่ไทฟอยด์ (Non-typhoidal *Salmonella* spp.) เชื้อในกลุ่มนี้จะก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ และสัตว์จึงทำให้มีการแพร่กระจายเป็นวงกว้าง ซึ่งอัตราการป่วยจากการติดเชื้อ *Salmonell*a spp. จากข้อมูลของสำนักระบาดวิทยากระทรวงสาธารณสุขปี พ.ศ. 2546-2551 พบมากที่สุดในภาคเหนือคิดเป็น 47% จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยจังหวัดพะเยาอยู่ลำดับที่ 5 ที่พบผู้ป่วยติดเชื้อรองมาจากจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และน่าน โดยร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัว คือ เด็กทารก และเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี (สำนักงานระบาดวิทยากระทรวงสาธารณะสุข, 2551) และจากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของสถาบันวิจัยสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ปี พ.ศ. 2562 พบข้อมูลการติดเชื้อ *Salmonella* spp. จากโรงพยาบาลจำนวน 92 แห่งพบว่ามีผู้ป่วยเป็นจำนวน 8,354 ราย ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่จะดื้อยา Ceftriaxone Cefoperazone/Sulbactam และ Ceftazdime สูงถึง 89.5% 89.4% และ 87.1% โดยการติดเชื้อในโรงพยาบาลจังหวัดพะเยาปี พ.ศ. 2560 พบว่ามีการติดเชื้อจำนวน 376 ราย และเชื้อมีอัตราการดื้อยา Cefoperazone/Sulbactam สูงถึง 94.7% Cefotaxime 84.2% Ceftriaxone 81.4% และ Ceftazdime 79.1 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2562) เมื่อพิจรณาจากข้อมูลเบื้องต้นแล้วภาคเหนือถือว่าพบผู้ป่วยที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ค่อนข้างสูง แต่วิธีการตรวจรักษาในโรงพยาบาลค่อนข้างช้า

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ของโรงพยาบาลในปัจจุบันไม่มีการวิเคราะห์หาซีโรไทป์ของเชื้อ เนื่องด้วยกระบวนการตรวจสอบมีความยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานานประมาณ 5–7 วันเป็นอย่างต่ำ (คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยจะใช้ข้อมูลเฉพาะชนิดเชื้อและข้อมูลการดื้อยาของเชื้อที่ได้จากเทคนิคทางจุลชีววิทยาเท่านั้น จึงต้องการพัฒนากระบวนการตรวจสอบซีโรไทป์พร้อมทั้งการหายีนดื้อยาให้มีความรวดเร็วขึ้น และลดความยุ่งยากลง โดยจะใช้เทคนิคทางอณูชีวิทยามาช่วยในการวิเคราะ ซึ่งใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิค High resolution melting real-time PCR (HRM-PCR) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาเนื่องจากได้ข้อมูลของเชื้อทันต่อการรักษาของแพทย์ ส่งผลให้เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อให้มีมากขึ้น

**1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

1. พัฒนากระบวนการหาซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. (*Salmonella* typing) โดยใช้เทคนิคโมเลกุลอย่างรวดเร็ว

2. ศึกษาลักษณะการแพร่การะจายของ *Salmonella* spp. (*Salmonella* transmission routes) ของ *Salmonella* serotype จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยารามในปี พ.ศ. 2015–2017

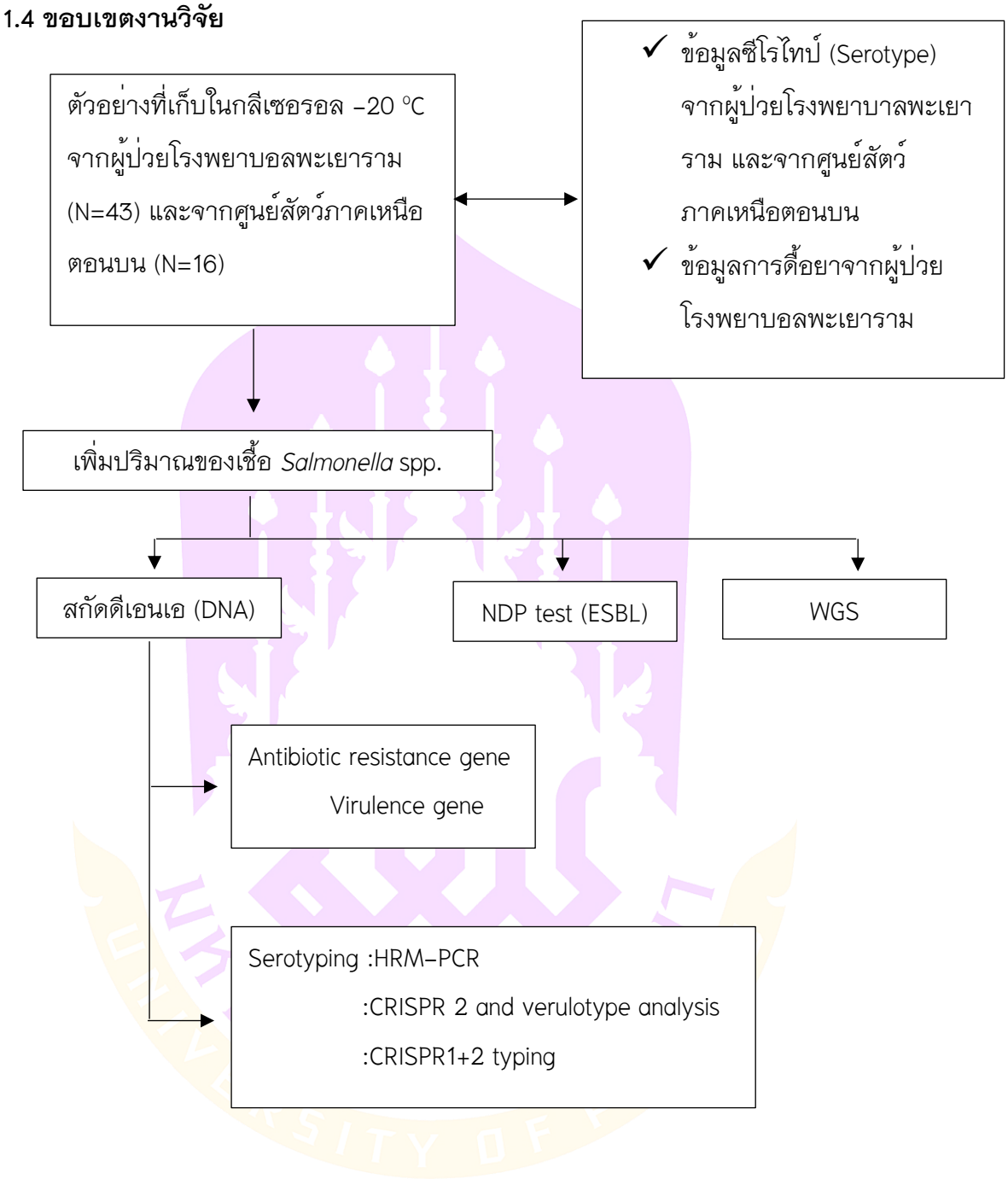
**1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย**

1. สามารถพัฒนากระบวนการตรวจสอบหาซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ในเวลาอันรวดเร็ว

2. สามารถบ่งชี้ถึงซีโรไปท์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีการแพร่กระจายมากที่สุดในปัจจุบันจากภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

3. สามารถใช้ข้อมูลของ Virulence gene เพื่อบ่งชี้ *Salmonella* subtype ที่มีการกระจายสูงในภาคเหนือ

**1.4 ขอบเขตงานวิจัย**



**1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. สามารถระบุซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้อย่างรวดเร็ว

2. สามารถบ่งชี้ถึงกลไกการกระจายของ *Salmonella* serotype ที่สำคัญจากสัตว์สัตวเศรษฐกิจ

3. ได้ข้อมูลซีโรไทป์ และการดื้อยาอย่างรวดเร็วของเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อปรับปรุงกระบวนการรักษาให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

4. สามารถนำเทคนิคทางอณูวิทยาในการศึกษากลไกการแพร่กระจายไปใช้ศึกษากับเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ได้จากแหล่งอื่น ๆ ได้ เช่น จากน้ำ จากอาหาร และสิ่งแวดล้อม

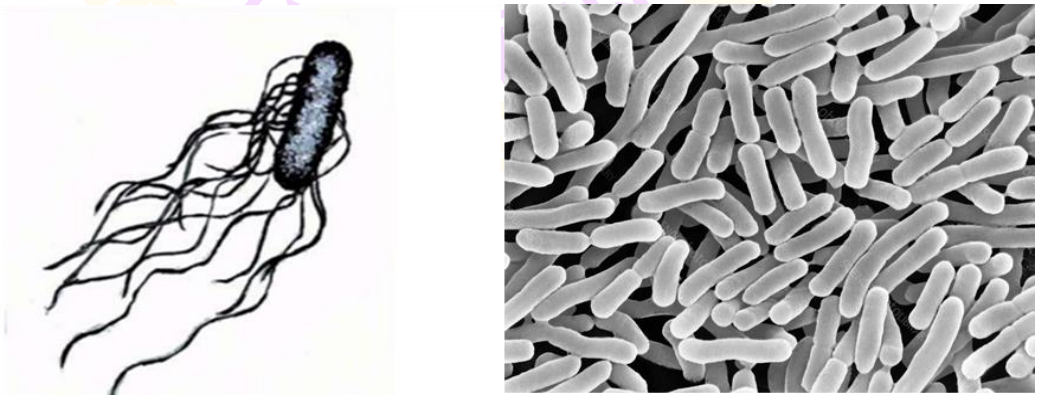
# บทที่ 2

# เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

## 2.1 สกุล (genus) *Salmonella* spp. และ จุลชีววิทยาของ *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Theobald Smith นักแบคทีเรียชาวอเมริกันในปีคริสต์ศักราช 1885 ซึ่งแยกเชื้อได้จากสุกรที่ป่วยและชื่อสกุล *Salmonella* spp. ถูกตั้งให้เป็นเกรียรติแก่ Deniel E Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกันซึ่งดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการในเวลานั้น แต่เมื่อเวลาผ่านไปก็ค้นพบสายพันธ์ใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นจึงเกิดความยุ่งยากในการเรียกชื่อ ซึ่งในปีคริสต์ศักราช 1926 Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมกันจัดทำหนังสือ Kauffmann–White scheme เพื่อเป็นหลักเกณฑ์ลักษณะการแยกแอนจิเจนของ *Salmonella* spp. และใช้เป็นเกณฑ์ในการการตั้งชื่อ *salmonella* สายพันธ์ต่าง ๆ ในปัจจุบัน (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2540; นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

*Salmonella* spp. เป็นชื่อสกุล (Genus) ของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลารอบเซลล์ (Peritrichous flagella) มีขนาดประมาณ 0.7–1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0–5.0 ไมโครเมตร (วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. 2556) สามารถเจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถพบได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในลำไส้ของสัตว์ ซึ่งสัตว์ที่ได้รับเชื้อเชื้อ *Salmonella* spp. มีทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ (Carries) โดยทั่วไปเมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อจากจะมีอาการที่แสดงออกคือ ท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ เบื่ออาหาร มีไข้สูง หนาวสั่น และปวดศรีษะ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)



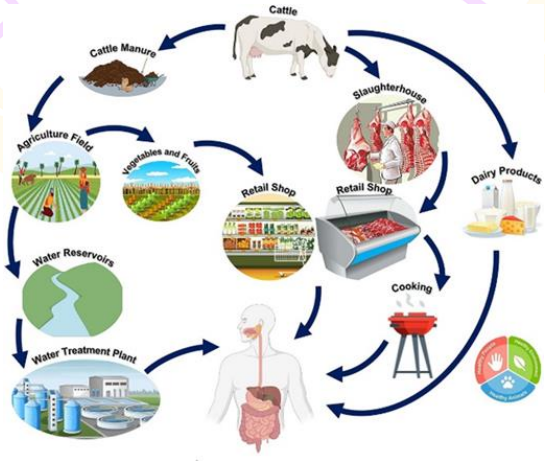
**ภาพที่ 1 ลักษณะของเชื้อ *Salmonella* enterica ใต้กล้อง SEM**

**ที่มา:** Science Photo Library (SPL). 2018

**2.2 โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonoses)**

โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonoses) หมายถึงโรคติดต่อตามธรรมชาติระหว่างมนุษย์และสัตว์ โรคที่พบในมนุษย์ 80% เป็นโรคที่ติดต่อได้ระหว่างคนและสัตว์ โดยเฉพาะในปัจจุบันนิยมนำสัตว์เลี้ยงมาไว้ในครอบครองกันมากขึ้นทั้งสุนัข แมว กระต่าย นก หนู และสัตว์เลื้อยคลาน รวมทั้งผู้ที่ทำงานในแวดวงปศุสัตว์ เกษตรกรรมมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อทั้งไวรัส แบคทีเรีย รา รวมทั้งปรสิตของสัตว์ โดยทั่วไปมีเชื้อก่อโรคที่เกิดจากไวรัส เช่น โรคพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) โรคไข้เลือดออกไวรัสเดงกี (Dengue virus ) และโรคไข้หวัดนก (Influenza avian) โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรคฉี่หนู (Leptospira) โรคที่เกิดจากรา เช่น โรคเชื้อราจากผิวหนังแมว (Microsporum canis) และโรคที่เกิดจากปรสิต โปโตซัว เช่น โรคพยาธิปากขอ (Ancylostoma ceylanicum) (โรงพยาบาลศิริราช ปิยมหาราชการุณย์, 2565)

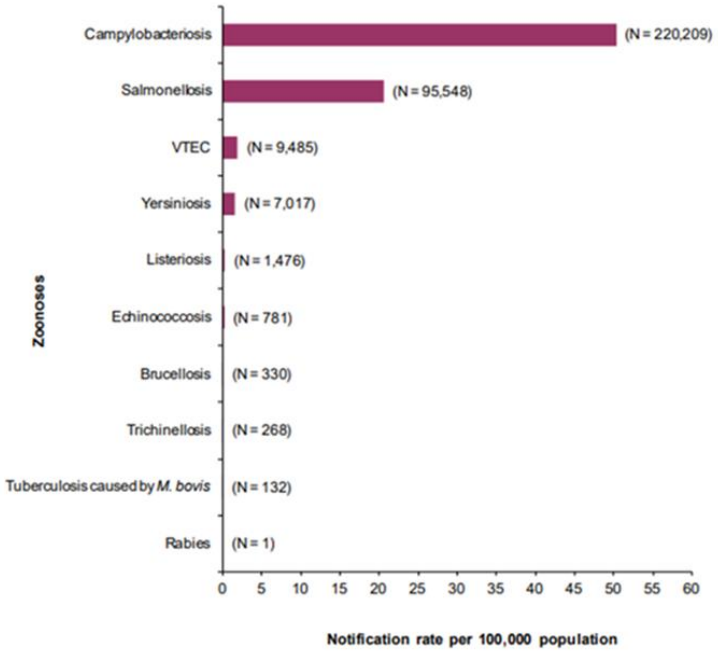
*Salmonella* spp. จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ การติดเชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน (Varma JK et al. 2005; Ali S & Alsayeqh AF. 2022) มีบางส่วนปนเปื้อนออกมาจากอุจจาระ และอาจพบในน้ำ ดิน รวมไปถึงเนื้อสัตว์สด เมื่อเกิดการติดเชื้อ *Salmonella* spp. จะส่งผลให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ที่เรียกว่า “Gastroenteritis” ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของอาการเจ็บป่วย และการเสียชีวิตทั่วโลกพบมากเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี (Majowicz SE. 2010) มนุษย์สามารถรับเชื้อจากการรับประทานน้ำ ไข่ นม หรือเนื้อสัตว์ที่มีเชื้อปนเปื้อนจำนวนมาก ($10^6$–$10^8$ เซลล์ต่อกรัม) สาเหตุสำคัญที่เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถแพร่กระจายเป็นวงกว้างได้ (อ.นพ. ชัยวรรธน์ ประดิษฐ์ทองงาม, 2567) ดังภาพที่ 2




**ภาพที่ 2 การกระจายตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. จากแหล่งธรรมชาติสู่มนุษย์**

**ที่มา:** Ali S & Alsayeqh AF. 2022

ข้อมูลในปัจจุบันบ่งชี้ถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารมีความสำคัญมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งเชื้อก่อโรคจากสัตว์สู่คนที่สำคัญทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร โดยเชื้อ ที่พบมาก คือ *Salmonella* spp. ซึ่งอยู่เป็นลำดับที่สองตามงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสัตว์ปีกในกลุ่มสหภาพยุโรปพบมากในอัตรา 20–25คน ต่อประชากร 100,000 คน (Antillés Silva & Noelia. 2014) ดังภาพที่ 3

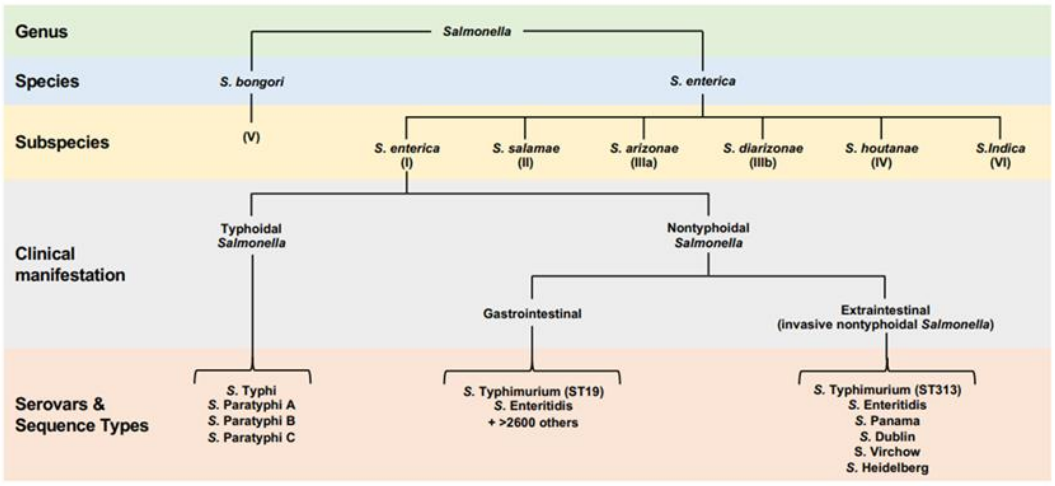



**ภาพที่ 3 อัตราการก่อโรคของเชื้อติดต่อจากสัตว์สู่คนในสหภาพยุโรปปี 2011**

**ที่มา:** Antillés Silva & Noelia. 2014

### 2.3 การจัดกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* spp. ตามหลักชีววิทยา

*Salmonella* spp. คือ genus จัดอยู่ใน Family Enterobactericeae โดยจะแบ่งได้เป็น 2 สปีชี (Species) ประกอบไปด้วย *Salmonella* bongori (*S.* bongori) และ *Salmonella* enterica (*S.* enterica) โดย *S.* bongori มี 23 ซีโรวาร์ และ S. enterica มีไม่น้อยกว่า 2,500 ซีโรวาร์ (C. Löfström. 2016) โดยแบ่งออกเป็น 6 สปีชีย่อย (subspecies) (ภาพที่ 4) ซึ่ง *S.* enterica เป็นสปีชีที่สำคัญของการก่อโรคในมนุษย์ และสัตว์ โดย *S.* bongori ที่อยู่อาศัยของเชื้อตามธรรมชาติจะพบในสัตว์เลือดเย็นที่เป็นโรคและสิ่งแวดล้อมทั่วไป ส่วน *S. enterica* subsp. Enterica (*S.* enterica) จะพบในสัตว์เลือดอุ่นที่เป็นโรค (Pegues DA,Ohl ME, & Miller SI.2005) โดย *S.* Enterica สามารถแบ่งตามอาการและความรุนแรงของโรคออกได้เป็นสองกลุ่ม คือ Typhoidal *Salmonella* spp. และ Non–typhoidal *Salmonella* spp. ดังภาพที่ 4




**ภาพที่ 4 การจัดกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* spp.**

**ที่มา:** C. Löfström. 2016

## 2.4. การจำแนก *Salmonella* ในทางระบาดวิทยา

*Salmonella* spp. สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ และยังสามารถพบได้ในลำไส้ของสัตว์ต่าง ๆ ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคได้ ถ้ามนุษย์ได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. จากแหล่งดังกล่าวจะทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ และการแบ่งกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* spp. ตามลักษณะการอยู่อาศัยในโฮสต์สามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2540)

2.4.1. โฮสต์เป็นมนุษย์

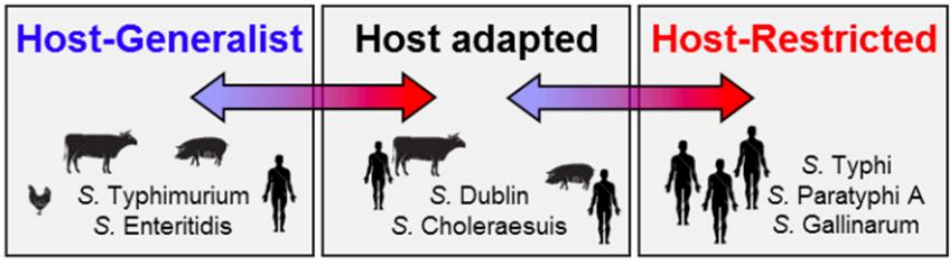
*Salmonella* spp. กลุ่มนี้สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้เท่านั้น โดยจะติดต่อจากมนุษย์สู่มนุษย์ โดยเชื้อ *Salmonella* spp. สามารถผ่านผนังลำไส้เข้าสู่ระบบเลือดของมนุษย์ทำให้โรคมีความรุนแรงสูงได้แก่ *S.* Typhi ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ (Typhoid fever) ซึ่งเป็นซีโรไทป์ที่มีความรุนแรงมากที่สุด ส่วน *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B และ *S.* Paratyphi C ทำให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อย (Paratyphoid fever)

2.4.2. กลุ่มที่ปรับตามโฮสต์

*Salmonella* spp. กลุ่มนี้มักติดเชื้อได้ในสัตว์ที่มีการจำเพาะ โดยเชื้อจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ ตัวอย่างเช่น *S.* Choleraesuis พบได้แค่ในสุกร *S.* Pullorum พบได้ในไก่ เป็นต้น (ตารางที่ 1) โดยเชื้อในกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งในมนุษย์ และสัตว์ซึ่งแพร่กระจายเป็นวงแคบ

2.4.3. กลุ่มที่ไม่จำกัดโฮสต์

*Salmonella* spp. กลุ่มนี้สามารถดำรงอยู่ได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น หมู ไก่ มนุษย์ และสามารถแพร่กระจายเป็นวงกว้าง เช่น *S.* Typhimurium *S.* Enteritidis




**ภาพที่ 5 กระบวนการปรับตัวของโฮสต์และกลุ่มอาการของโรค**

**ที่มา:** Antillés Silva & Noelia. 2014

**ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาการการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในโฮสต์ต่าง ๆ**

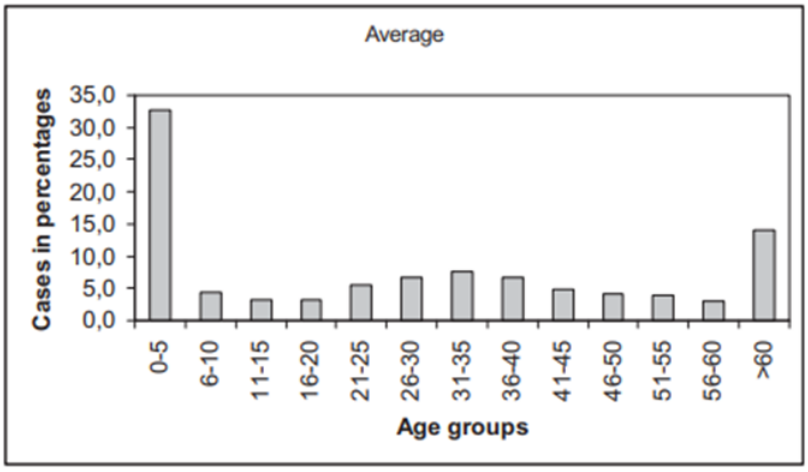
| *Salmonella* serotype | ชนิดสัตว์ | อาการทางคลินิก |
|---|---|---|
| *S.*Typhimurium | มนุษย์ และสัตว์ | ลำไส้อักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด |
| *S.*Dublin | โค กระบือ | ลำไส้อักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด |
| *S.*Pullorum | ไก่ | โรคขี้ขาว ทำให้เกิดโรคท้องเสีย |
| *S.*Gallinrum | นก | โรค Fowl typhoid ทำให้เกิดโรคท้องเสีย |
| *S.*Enteritidis | สัตว์ปีก | สัตว์ปีกมักไม่ค่อยแสดงอาการ |
| | สัตว์อื่นๆ | ท้องเสีย |
| *S.*Enteritidis | มนุษย์ | อาหารเป็นพิษ |
| *S.*Brandenburg | แกะ | แท้ง |

**ที่มา:** ดัดแปลงจากระเบียบกรมปศุสัตว์, 2553

## 2.5 กลไกลการแพร่ระบาดของ *salmonella* spp. จากสัตว์สู่คน

*Salmonella* spp. พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในลำไส้ใหญ่ของสัตว์บางชนิด โดยสัตว์ดังกล่าวเป็นได้ทั้งสัตว์เศรษฐกิจ สัตว์เลี้ยง หรือแม้กระทั้งสัตว์ในธรรมชาติ ซึ่งส่วนมากพบเชื้อได้จากธรรมชาติซึ่งเมื่อสัตว์ติดเชื่อก็จะส่งต่อเชื้อสู่กัน แต่ถ้าเป็นในรูปแบบของฟาร์มเมื่อมีการติดเชื้อหรือปนเปื้อนของเชื้อจากแหล่งอาการเพียงเล็กน้อยก็จะแพร่กระจายเป็นวงกว้างในฟาร์มได้โดยเชื้ออาจจะมาสู่ผู้ป่วยได้ผ่านการรับประทานที่มีการปนเปื้อน

ปัจจุบันกระบวนกระผลิตเนื้อสัตว์เพื่อนำมาบริโภคถูกนำมาทำเป็นธุรกิจซึ่งก็คือการทำฟาร์มปศุสัตว์ ซึ่งถ้าฟาร์มปศุสัตว์ ได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. เพียงเล็กน้อยก็สามารถระบาดไปทั่วฟาร์มได้ และเมื่อเชื้อ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนกับผลิตภัณฑ์ที่นำออกจำหน่ายต่อผู้บริโภค โดยผู้บริโภคจะได้รับเชื้อผ่านการนำเนื้อสัตว์มาประกอบอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการปรุงสุก หรือการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp.ในผักและผลไม้มาจากการปนเปื้อนของมูลสัตว์ที่นำมาทำเป็นปุ๋ย หรือเชื้อที่กระจายในแหล่งน้ำ ซึ่งส่งผลให้การแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp. สามารถกระจายจากธรรมชาติ สัตว์ สัตว์เศรษฐกิจ ผัก ผลไม้มาสู่ผู้บริโภคและวนเป็นวัฏจักรได้ ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อส่วนใหญ่มีอาการไม่ค่อยรุนแรงซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงอายุ 0–5 ปี และในช่วงมากกว่า 60 ปี ขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญ (Hendriksen & R. S. 2010) ดังภาพที่ 6

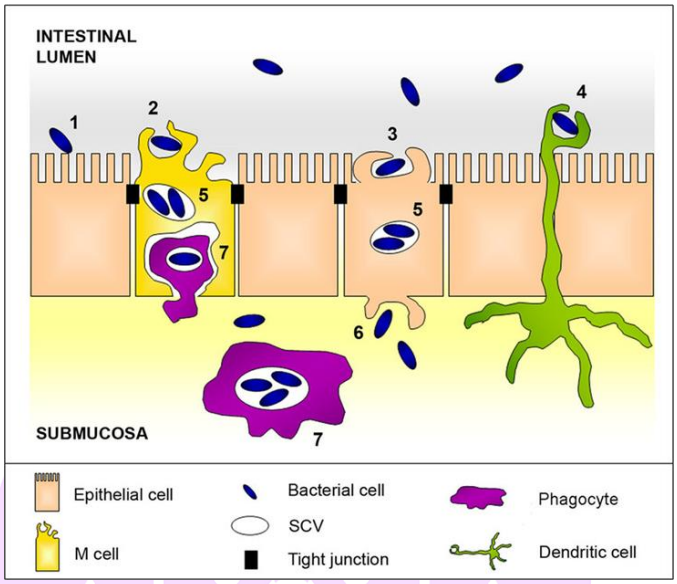



**ภาพที่ 6 ช่วงอายุของผู้ป่วยจาก Salmonellosis ในประเทศไทยช่วงปี ค.ศ. 2002–2007**

**ที่มา:** Hendriksen & R. S. 2010

## 2.6. กระบวนการติดเชื้อ *Salmonella* spp.

การก่อโรคของเชื้อ *Salmonella* spp. เกิดจากการที่เชื้อ สามารถจับหรือแทรกตัวจับกับผนังเยื่อหุ้มเซลล์ลำไส้ใหญ่ และเชื้ออาจถูกนำเข้าไปสู่เซลล์ลำไส้ใหญ่โดยกระบวนการฟาโกไทรโตซิส ทำให้เซลล์มีโอกาสเล็ดรอดเข้าไปในระบบเลือดได้ ซึ่งจะส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงแต่ทั้งนี้ *Salmonella* serotype ที่ต่างกัน จะมีความสมารถดังกล่าวที่ต่างกันส่งผลให้ความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยแสดงออกต่างกัน (Anna Fàbrega & Jordi Vila. 2013) ดังภาพที่ 7




**ภาพที่ 7 การติดเชื้อ *Salmonella* spp.**

**ที่มา:** Anna Fàbrega & Jordi Vila. 2013

## 2.7. อาการและความรุนแรงของผู้ได้รับเชื้อ *Salmonella* spp.

การติดเชื้อ *Salmonella* spp. จะแสดงออกของอาการความรุนแรงที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากความแตกต่างของ S*almonella* serotype ซึ่งถ้าแบ่งตามลักษณะของกลุ่มอาการของผู้ติดเชื้อ *Salmonella* spp. จะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม

2.7.1. กลุ่มไทฟอยด์ (Typhoidal *Salmonella* spp.)

*S.* Typhi เป็นกลุ่มของเชื้อที่ก่อโรคเฉพาะมนุษย์เท่านั้น ซึ่งการติดเชื้อของผู้ป่วยจะเกิดในระบบทางเดินอาหาร และเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อสามารถเข้าสู่ระบบเลือดได้ จะแสดงอาการที่รุนแรงมากขึ้น นั้นก็คือ ท้องเสียรุนแรง ไข้สูงยาวนาน มีผื่นแดงขึ้น อาจถึงขั้นติดเชื้อในกระแสเลือดได้ เรียกอาการป่วยนี้ว่า ไข้ไทฟอยด์หรือไข้รากสาดน้อย (Typhoid fever) โดยแพทย์จะเรียกอาการดังกล่าวว่า Enteric fever และมีอีกโรคที่อาการใกล้เคียงกันแต่ความรุนแรงน้อยกว่าโดยเกิดจากการติดเชื้อ *S.*Paratyphi A, B, C (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)

2.7.2 กลุ่มไม่ใช่ไทฟอยด์ (Non–typhoidal *Salmonella* spp.)

เชื้อกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเกิดอาการท้องเสียปกติ โดยมีแค่บาง serotype ที่สามารถก่อให้เกิดความรุนแรงได้ โดยอาการทั่วไปจากต่างลักษณะของกลุ่มไทฟอยด์ (Typhoidal *Salmonella* spp.) อย่างชัดเจน ซึ่งเรียกกลุ่มอาการนี้ว่ากลุ่มไม่ใช่ไทฟอยด์ (Non–typhoidal *Salmonella* spp., NTS) ซึ่งจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2556)

2.7.2.1 *Non–invasive*

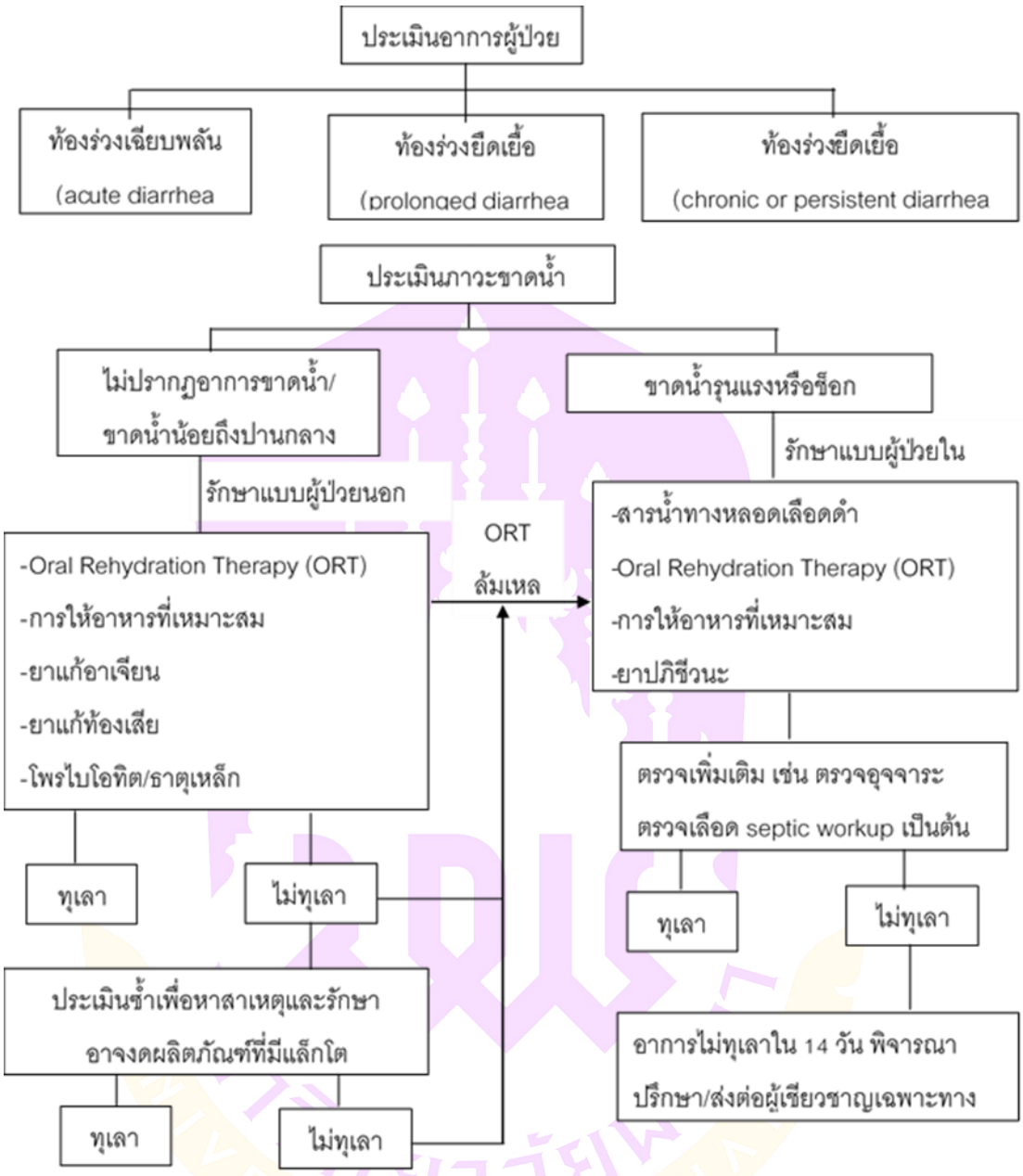
จัดเป็นกลุ่มของเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียเป็นหลัก โดยเชื้อจะถูกนำเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อย หรือกรณีเด็กทารกมักมีอาการแสดงออกรุนแรงมากกว่าผู้ใหญ่ เนื่องจากเด็กมีระบบภูมิคุ้มกันต่ำกว่าผู้ใหญ่ ซึ่งการติดเชื้อมาจากเชื้อมีคุณสมบัติที่ทนต่อกรดในกระเพาะได้ ส่วนใหญ่เชื้อกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า “Gastroenterit”

2.7.2.2 *Invasive*

จัดเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการอื่นที่รุนแรงร่วมด้วย เช่น มีการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมอง กระดูก ปอด และข้อ ในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการรุนแรงอาจจะเกิดภาวะช็อก และเสียชีวิตได้ เนื่องจากเชื้อมีความสามารถแทรกตัวข้ามผ่านผนังลำไส้ใหญ่เข้าสู่ระบบเลือด การติดเชื้อเกิดขึ้นจาก Salmonella serotype บางชนิด เช่น S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis

**2.8. แนวทางการรักษาการติดเชื้อ *Salmonella* spp.**

ผู้ติดเชื้อ *Salmonella* spp. กรณีมีร่างกายมีความแข็งแรงส่วนใหญ่อาการจะไม่รุนแรงและสามารถหายได้เอง แต่กรณีในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือภูมิคุ้มกันต่ำ เช่นเด็กทารกหรือ ผู้สูงอายุ การแสดงอาการของโรคจะมีความรุนแรงกว่ามาก โดยอาการเริ่มแรกของผู้ป่วยคืออาการท้องร่วง (acute diarrhea) ซึ่งจะมีภาวะการถ่ายอุจจาระเหลวออกมาในปริมาณมากหรือประมาณ 3 ครั้ง/วัน โดยเบื้องต้นแพทย์จะประเมินความรุนแรงของอาการท้องร่วง จากนั้นก็จะทำการรักษาโดยการจ่ายยาที่เหมาะแก่อาการผู้ป่วย เช่น จ่ายยาแก้ท้องเสียชนิดน้ำ (สมาคมกุมารเวชศาสตร์ทางเดินอาหารและตับ, 2562) ได้แก่ Racecadotril หรือ Diosmectite (ในเด็กอายุ 2 ปีขึ้นไป) แต่เมื่อผู้ป่วยมีภาวะขาดน้ำรุนแรงหรืออาการช็อกแพทย์จะพิจารณาใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มเติม เช่น ยากลุ่ม fluoroquinolones (ciprofloxacin, norfloxacin) ดังภาพที่ 8




**ภาพที่ 8 แผนภูมิการประเมินกระบวนการรักษาผู้ป่วยโดยแพทย์ผู้รักษา**

**ที่มา:** สมาคมกุมารเวชศาสตร์ทางเดินอาหารและตับ. 2562

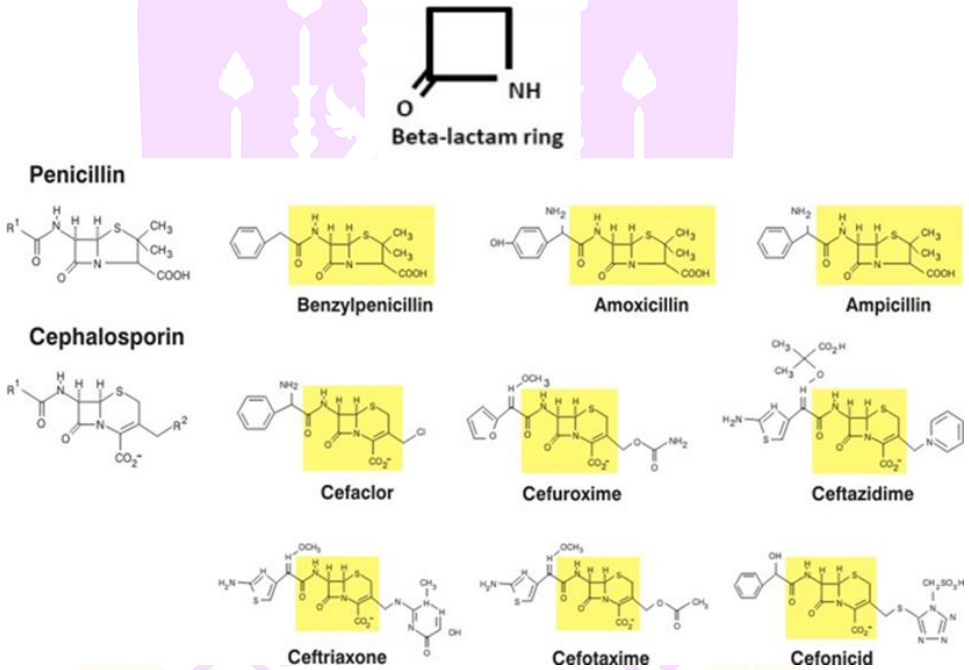
### 2.9. วิธีการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ คือ สารเคมีที่สามรถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ ปัจจุบันการรักษาการติดเชื้อของ *Salmonella* spp. แพทย์นิยมใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Beta-lactams โดยยากลุ่ม Beta-lactams คือยากลุ่มที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ มีโครงสร้างสำคัญ คือส่วน

วงแหวน Beta–lactams (Beta–lactams ring) เป็นวงแหวน 4 อะตอม (ศ.เกียรติคุณ พญ.นลินี อัศวโภคี, ศ.นพ.ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร และพ.อ.ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, 2550) ดังภาพที่ 9

การออกฤทธิ์ของยากลุ่ม Beta–lactams โดยยาเข้าจับกับ Penicillin–Binding Protein (PBP) และยับยั้งสร้างสาย Peptidoglycan (Fahd K. 2002) การออกฤทธิ์ของยามีผลเฉพาะต่อเซลล์ในระยะแบ่งตัวที่จำเป็นต้องมีการสร้างผนังเซลล์ทำให้ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ และเซลล์ตายในที่สุด

ยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วยยากลุ่ม Penicillin's, Cephalosporin's, Cephamycins, Monobactams, Carbapenems (ภาพที่ 9) (Acc. Chem. Res. 1984) ซึ่งปัจจุบันแพทย์นิยมให้ยาในกลุ่ม Cephalosporin ดังภาพที่ 9




***ภาพที่ 9 โครงสร้าง Beta–lactam ring และโครงสร้างยาในกลุ่มต่าง ๆ ของ Beta–lactam***

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Fahd K. 2002

### 2.10. ปรากฏการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp.

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. คือ การที่เชื้อ *Salmonella* spp. มีความสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance) (Travers K., & Michael B. 2002) กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ 4 ประเภท (ศ.เกียรติคุณ พญ.นลินี อัศวโภคี, ศ.นพ.ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร และพ.อ.ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, 2550)

1. การสร้างเอนไซม์ทำลายยาปฏิชีวนะ: แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์มายับยั้งทำลาย หรือเปลี่ยนแปลงกลไกลการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเพื่อไม่ให้ออกฤทธิ์โดยจับกับสารตั้งต้น (substrat) ทำให้ยานั้นไม่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญและพบบ่อยมากที่สุด เช่นยากลุ่มเบต้าแลคแตม

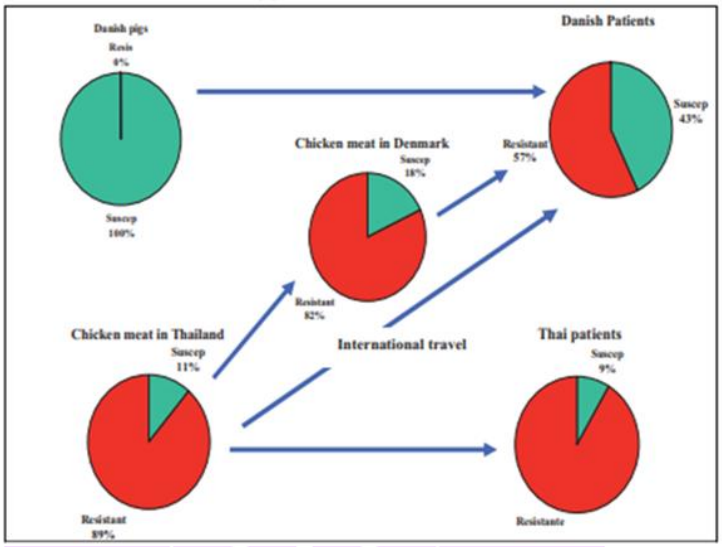
2. การเพิ่มขึ้นของ Active efflux: เป็นกลไกที่เซลล์แบคทีเรียจะมีการใช้ปัมพ์ (Pump) ซึ่งอยู่บริเวณผนังเซลล์ในการขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์มากขึ้น

3. การเปลี่ยนแปลงกลุ่มโปรตีนเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ: โดยจะเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มเป้าหมาย เพื่อหลบเลี่ยง

4. การทำงานของยาปฏิชีวนะของกลุ่มเป้าหมาย เช่นกลุ่มคิโนโลน

5. การเปลี่ยนแปลงกลไกล (Pathway) คือการที่เชื้อแบคทีเรียสร้างกลไกลขึ้นมาใหม่เพื่อชดเชยกลไกลเก่าที่ใช้งานไม่ได้

ตัวอย่างการแพร่กระจายของ *S.* Schwarzengrund ที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะในประเทศเดนมาร์ก และสหรัฐอเมริกาซึ่งพบว่าการปนเปื้อนส่วนใหญ่มาจากเนื้อไก่ที่มาจากประเทศไทยและมาจากการนำเข้าผลิตภัณฑ์อาหารจากประเทศไทยซึ่งภายในประเทศเดนมาร์ก และสหรัฐอเมริกาไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. และเมื่อประชาชนในประเทศเดนมาร์กและสหรัฐอเมริกานำวัตถุดิบจากประเทศไทยมาเตรียมอาหารการแพร่ของเชื้อก็เกิดขึ้นในประเทศดังกล่าวได้ ดังภาพที่ 10




**ภาพที่ 10 การแพร่กระจายของ *S.* Schwarzengrund ที่ปนเปื้อนในอาหารเพื่อการส่งออกจากประเทศไทยสู่ประเทศเดนทาร์ และสหรัฐอเมริกา**

**ที่มา:** Hendriksen. & R. S. 2010)

รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ หนึ่งการดื้อยาต้านจุลชีพชนิดเดียว (Single antimicrobial resistance) คือ การที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาเพียงชนิดเดียว โดยเชื้อสามารถปรับตัวให้ทนต่อฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ และเจริญเติบโตได้ทำให้ผู้ป่วยยังแสดงอาการของโรค แพทย์จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนการรักษาโดยการเลือกใช้ยาชนิดอื่นที่สามารถกำจัดเชื้อได้ และสองการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (Multidrug resistance) คือ การที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาอย่างน้อย 3 ชนิดขึ้นไป ซึ่งอาจเป็นกลุ่มยากลุ่มเดียวกันหรือต่างกลุ่มกันก็ได้ เช่น ยา Aminoglycoside, Carbapenem, Cephalosporin, Beta-lactam plus beta-lactamase inhibitor, Quinolone โดยการดื้อปฏิชีวนะเกิดจากที่เชื้อมียีนดื้อยาอยู่ในโครมโมโซฒ พลาสมิด หรือ ในโครงสร้างของอินทีกอน (Integron) (คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ. 2558)

ลักษณะการดื้อยาแบบ ESBL ซึ่งย่อมาจากคำว่า “Extended Spectrum Beta-Lactamase” คือความสามารถของเชื้อในการดื้อ Beta-lactam หลายชนิด เนื่องด้วยเชื้อดังกล่าวมีเอนไซม์ Beta-lactamase ที่สามารถทำลาย Beta-lactams ring ได้ ซึ่งการจัดกลุ่มของเอนไซม์ Beta-lactamase ที่ใช้ในปัจจุบันมี 2 ระบบ ได้แก่ การจัดกลุ่มตามระบบของ Bush (Bush-Jacoby-Medeiros) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (group 1-4) ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี และความสามารถในการออกฤทธิ์ (Bush K., Jacoby GA., & Medeiros AA. 1995) และการจัดกลุ่มตามคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาหรือ

โครงสร้างในระดับโมเลกุลซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (Molecular class A–D) (ตารางที่ 2) โดยรูปแบบการดื้อยาที่พบมาก คือ รูปแบบ Amber class ในกลุ่ม A รูปแบบ Bush–Jacoby Mcdeiros group ในกลุ่ม 2b ซึ่งจะพบยีน TEM, SHV, CTX เป็นต้น

**ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มของ Beta– lactamase**

| Ambler class | Bush-Jacoby Medeiros group | Active site | Enzyme type | Host organisms | Substrates |
|---|---|---|---|---|---|
| A | 2b, 2be, 2br, 2c, 2e, 2f | Serine | Broad-spectrum $\beta$-lactamases (TEM, SHV)<br>ESBL (TEM, SHV, CTX-M) | Enterobacteriaceae and nonfermenters | Ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins |
| | | | Carbapenemases (KPC, GES, SME) | | All $\beta$-lactams |
| B | 3 | Zinc-binding thiol group | Carbapenemases (VIM, IMP) | Enterobacteriaceae and nonfermenters | All $\beta$-lactams |
| C | 1 | Serine | AmpC cephamycinases (AmpC) | *Enterobacter* species *Citrobacter* species | Cephamycins, 3rd-generation cephalosporins |
| | | | AmpC cephamycinases (CMY, DHA, MOX FOX, ACC) | Enterobacteriaceae | Cephamycins, 3rd-generation cephalosporins |
| D | 2d | Serine | Broad-spectrum $\beta$-lactamases (OXA) ESBL (OXA) | Enterobacteriaceae and nonfermenters | Oxacillin, ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins All $\beta$-lactams |
| | | | Carbapenemases (OXA) | | |

**ที่มา :** Saini et al. 2012

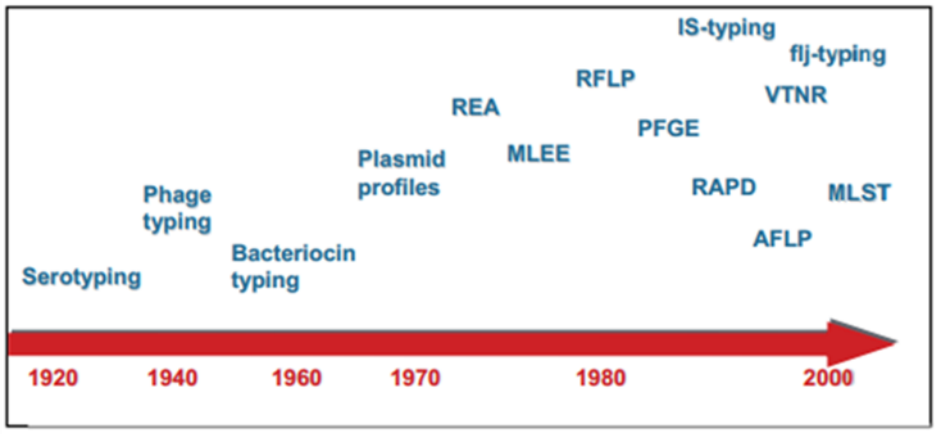
## 2.11. ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคและ Virulence gene

เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอินเฟค ทำให้การอินเฟคมีความรุนแรงสูงขึ้น ยีนที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค Virulence gene หรือ Vir genes เป็นยีนที่ทำให้แบคทีเรียสามารถทำลายผนังเซลล์ของลำไส้ และเข้าสู่ร่างกายมนุษย์และสัตว์ จึงเป็นผลทำให้ก่อให้เกิดโรค โดยยีนส่วนใหญ่จะรวมตัวกันอยู่ที่ *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) ซึ่งประกอบด้วยหลาย SPI โดย SPI สามารถเคลื่อนที่ไปที่บริเวณอื่นได้ และบางส่วนของ Virulence gene อยู่บริเวณพลาสมิด (plasmid)

## 2.12. วิวัฒนาการของการจำแนกสายพันธ์ของ *Salmonella* spp. ( Evolution of *Salmonella* typing and subtyping)

การจำแนกความแตกต่างของ *Salmonella* spp. ในระดับสายพันธ์ (*Salmonella* serotype) เริ่มมีความสำคัญมากขึ้นในทางระบาดวิทยาและการเฝ้าระวังโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. เนื่องจากกระบวนการการจำแนกความแตกต่างของ *Salmonella* serotype ที่ต่างกันที่มีประสิทธิภาพสูง และรวดเร็ว จะช่วยติดตามกระบวนการระบาดของโรค และสามารถติดตามแนวโน้มการดื้อยาปฏิชีวนะที่สัมพันธ์กับ *Salmonella* serotype ที่แตกต่างกันได้

**วิวัฒนาการของการใช้วิธีการต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ และแยกเชื้อต่าง ๆ**




**ภาพที่ 11 วิวัฒนาการของเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp.**

**ที่มา:** Hendriksen, & R. S. 2010

การวิเคราะห์เพื่อหาซีโรไทป์ (Serotype) เริ่มต้นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1920 โดยวิธีการที่ใช้ในช่วงเริ่มต้นเรียกว่าวิธี Serotyping เป็นการใช้แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะทำปฏิกิริยากับแอนติเจน วิธีที่การดังกล่าวเป็นที่นิยมและแพร่หลายมากในการจำแนกสายพันธ์ของ *Salmonella* spp. แต่วิธีการยังมีข้อจำ เนื่องจากมีการใช้จำนวนแอนติบอดีที่สูง และวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก จึงได้มีการพัฒนาวิธีการในการจำแนกสายพันธ์ของ *Salmonella* spp. ต่อมาเช่นการ Phage typing ซึ่งเป็นการใช้ความจำเพาะของไวรัสแบคทีเรีย (bacteriophage) กับตัวรับ (phage receptor) หรือ Plasmid profiles เพื่อดูความแตกต่างของ plasmid แสดงในภาพที่ 11

เทคนิคการวิเคราะห์ทางอณูวิทยาโมเลกุลถูกนำมาใช้มากขึ้น เช่น MLST เพื่อจำแนกสายพันธ์ของ *Salmonella* spp. ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความสามารถในการจำแนกที่สูงและเร็วกว่า ซึ่งเทคนิคดังกลล่าววิธีการดังกล่าววิเคราะห์ความแตกต่างของดีเอนดี โดยจะส่งผลให้แบ่ง *Salmonella* spp. แต่กระนั้นผลการวิเคราะห์ต้องสอดคล้องกับกระบวน Serotyping

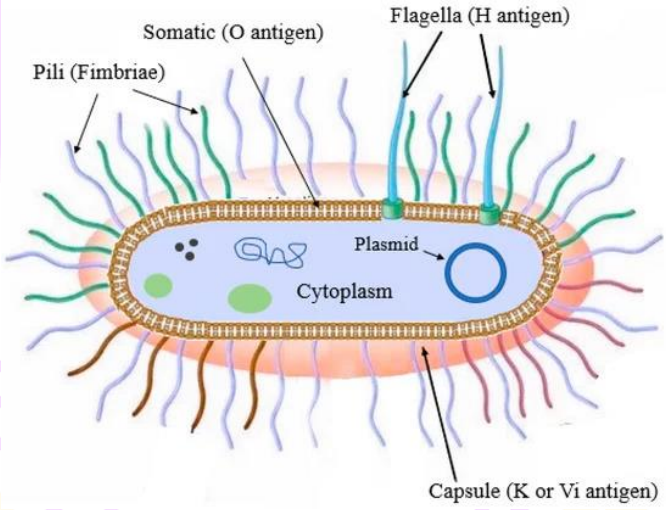
## 2.13 การจำแนกสายพันธ์ของเชื้อ *Salmonella* spp.

การจำแนกสายพันธ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ การจำแนกสายพันธ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotype) และการจำแนกสายพันธ์ (Genotype) โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

1.) การจำแนกสายพันธ์ของ Salmonella spp. โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotype classification) คือการจำแนกชนิดนี้จะใช้ความแตกต่างบนผิวเซลล์ของ *Salmonella* spp. ซึ่งมีแอนติเจนอยู่ 3 ชนิด ดังภาพที่ 12

1.1) Somatic antigen (O antigen) คือสารชีวเคมีที่อยู่ด้านนอกเซลล์ มีสารประกอบชนิด Lipopolysaccharide (LPS) อยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ O antigen เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน (Heat stable) ทั้งนี้ O antigen แบ่งเป็น 64 groups (Serogroups)

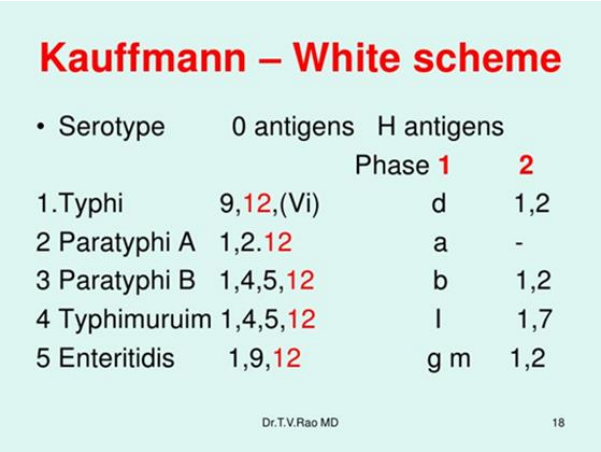
1.2) Flagella antigen หรือ H antigen ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน ซึ่ง H antigens แบ่งเป็น Phase 1 และ Phase 2 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย capsular antigen (V antigen) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่บอกถึงความรุนแรงของเชื้อ และเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ มีหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะหรือจับกับพื้นผิวที่ป้องกันเซลล์จากอันตรายแต่ไม่ทนต่อความร้อน




**ภาพที่ 12 แอนติเจนบนผิวของเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* spp.**

**ที่มา:** Teklemariam AD et al. 2023

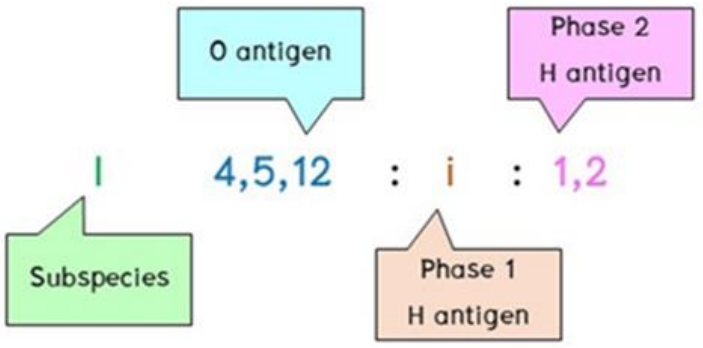
การเขียนตามรูปแบบสัญลักษณ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยจะเขียนตามหลักการของ Kauffmann–White scheme ซึ่งจะเขียนตามรูปแบบของ O antigens และ H antigens (Michel Y Popoff et al. 2004)




**ภาพที่ 13 การเขียนชื่อเชื้อตามแบบสัญญาลักษณ์ของเชื้อ *Salmonella* spp.**

**ที่มา:** Suraj Dhara. 2019

ตัวอย่าง เช่น การเขียนชื่อของ *Salmonella* Typhimurium โดยตำแหน่งจะบ่งบอกถึง Subspecies และตำแหน่งต่อมาจะบ่งบอกถึง O antigens ตามด้วยทวิภาค (:) และจะเป็นตำแหน่งของ Phase 1 H antigens ตัวด้วยทวิภาค (:) สุดท้ายจะเป็นตำแหน่งของ Phase 2 H antigens (ภาพที่ 14)




**ภาพที่ 14 การเขียนชื่อของ *Salmonella* Typhimurium**

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Suraj Dhara. 2019

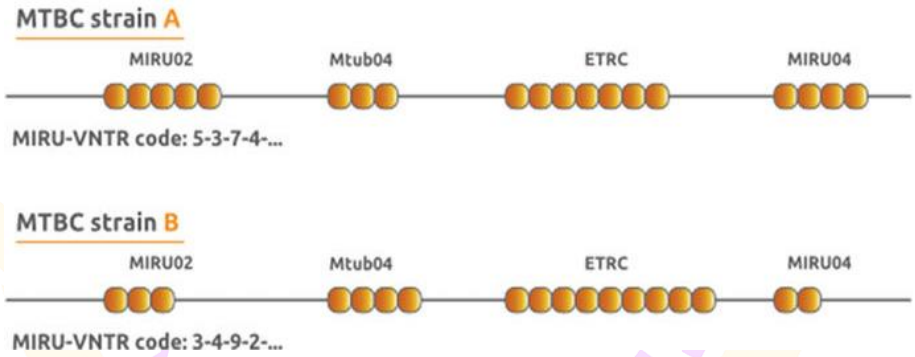
2. การจำแนกสายพันธ์ของ Salmonella โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (Genotyping classification) คือการวิเคราะห์ในส่วนของจีโนมิก DNA โดยใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน

2.1) เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งใช้เทคนิค PCR คือ กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะต่อเชื้อ เช่น invA โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และ ไพเมอร์ที่จำเพาะ (Specific primer)

2.2) Multiple Locus Variable–number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

การวิเคราะห์ซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งวิธี MLVA เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวน Variable–number Tandem Repeat หรือ VNTR ซึ่ง VNTR คือตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำ ๆ กัน จำนวนสั้น ๆ (ภาพที่ 15) โดยเทคนิคจะวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของ VNTR รวม Capillary Electrophoresis (CE) ถ้ารูปแบบการเรียงตัวของ VNTR เหมือนกันก็คือซีโรไทป์เดียวกัน (Jenkins, et al., 2010)

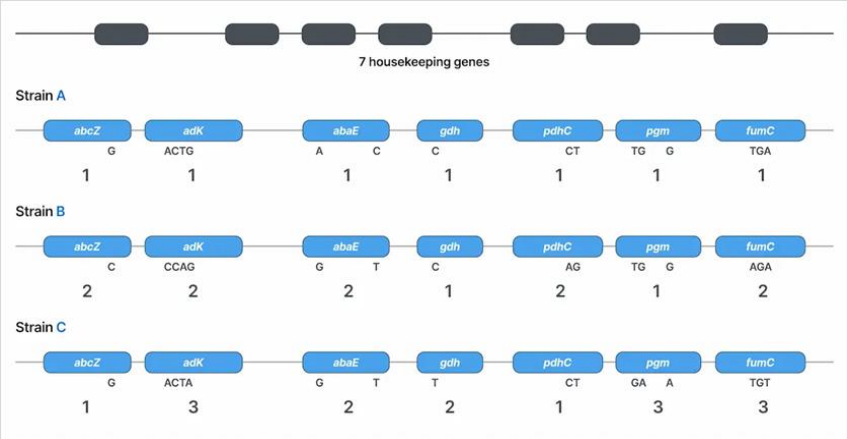



**ภาพที่ 15 ตัวอย่างการเรียงตัวของ VNTR**

**ที่มา:** Adrian Muwonge, et al., 2019

2.3) Multilocus Sequence Typing (MLST): การวิเคราะห์ซีโรไทป์ (Serotype)

MLST อาศัยความแตกต่างของลำดับ Sequence ของ 7 ยีนพื้นฐาน (Housekeeping Genes) ของเชื้อ ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ความใกล้ชิดของสายพันธุ์และใช้ในการระบุแหล่งการแพร่กระจาย ของเชื้อก่อโรค ข้อได้เปรียบที่สำคัญของวิธี MLST กับวิธีทางโมเลกุลประเภทอื่นคือ สามารถเปรียบเทียบ ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่ศึกษากับสายพันธุ์อื่นจากทั่วโลกได้โดยผ่านฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ตตัวอย่างของ MLST (ภาพที่16)

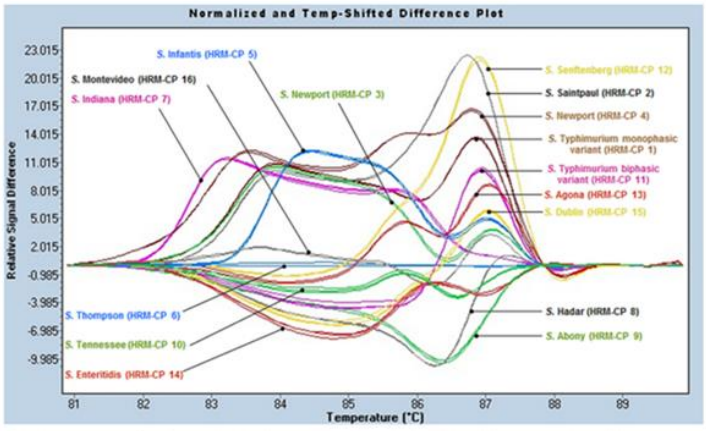



**ภาพที่ 16 Multilocus Sequence Typing (MLST)**

**ที่มา:** BioMérieux SA, et al., 2024

2.4) High resolution melting real–time PCR (HRM–PCR)

กระบวนการตรวจสอบ Serotype โดย Melting Temperature ของชิ้น DNA ที่จำเพาะต่อเชื้อ โดยสังเกตุจาก Melting Temperature ของส่วน DNA ดังกล่าว โดยใช้สารเรืองแสงเพื่อตรวจสอบปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้น ดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละชนิดจะมี melting temperature เฉพาะตัว หรือถูกแสดงเป็น peak ของกราฟระหว่าง Tm (X axis) และ Fluorescent intensity (Y axis) ที่มีความจำเพาะต่อ serotype ต่าง ๆ เช่น การใช้กระบวน HRM–PCR ดังภาพที่ 17




**ภาพที่ 17 กราฟ HRM–PCR (High resolution melting real–time PCR)**

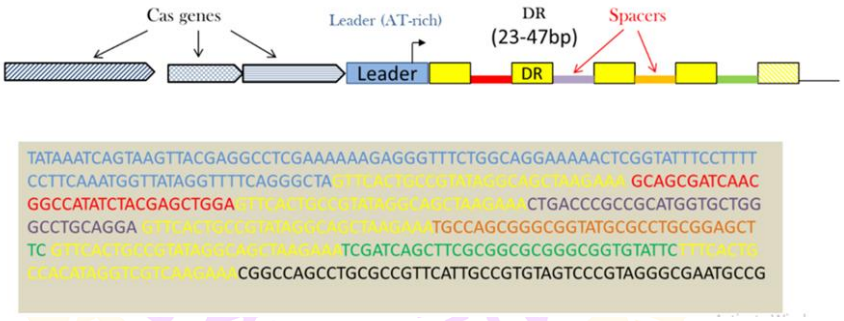
**ที่มา:** Poonchareon, et al., 2019b

2.5) Whole genome sequencing (WGS)

คือการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยจะได้ DNA sequencing ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด พร้อมทั้งข้อมูลการดื้อ ซึ่งสามารถหายีนดื้อยาได้ มีความละเอียดสูงวิธีการนี้จึงถูกจัดว่าเป็นการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ

**2.14. การไทป์ และซับไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. (Typing and subtyping) โดยใช้เทคนิค Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)**

CRISPR คือ กลไกลการทำงานหรือการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของแบคทีเรีย โดยปกติแล้วในแบคทีเรียจะมีการสร้างเอนไซม์ Cas อยู่ตลอดเวลา แต่จะไม่ทำงาน จะทำงานก็ต่อเมื่อมีสิ่งมากระตุ้น เช่น ไวรัส เข้ามาในแบคทีเรีย และตัวที่ส่งสัญญาให้เอนไซม์ Cas ทำงานก็คือ spacers โดยเอนไซม์ Cas1 และ Cas2 ไปตัดส่วนดีเอนเอของสิ่งแปลกปลอม ถ้าเป็นไวรัสที่ไม่เคยเจอก็จะนำส่วนของดีเอนเอมาเก็บไว้ในส่วนที่เรียกว่า Spacers เพื่อที่ว่าถ้าเจออีกครั้งก็จะทำการทำลายสิ่งแปลกปลอมนั้นได้ทันที (Makarova KS, et al., 2020; Kaminski, et al., 2021) ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ส่วน (ภาพที่ 18) คือ ส่วนที่หนึ่ง Cas genes ส่วนที่สอง Direct repeat (DR) เป็นส่วนที่มีลำดับเบสเหมือนกันมีขนาดประมาณ 23–47 bp และส่วนที่สาม Spacers (CRISPR–Cas++. 2021)




**ภาพที่ 18 องค์ประกอบของ CRISPR**

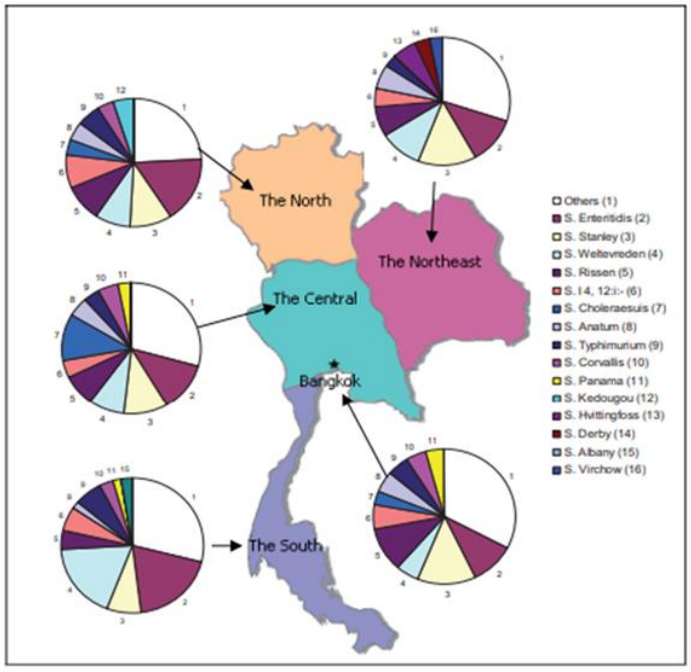
**ที่มา:** CRISPR–Cas++. 2021

**2.15. การแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. จัดเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ซึ่งมีอุบัติการณ์สูงทั่วโลกโดยจะทำให้เกิดโรค Gastroenteritis (Majowicz, et al., 2010) เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุอันดับต้น ๆ ในหลายประเทศที่ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตเพิ่มขึ้นจากโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร (Cohen ML., & Tauxe RV. 1986) พบว่าในแต่ละปีทั่วโลกจะมีผู้ป่วยจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ประมาณ 80.5 ล้านคน

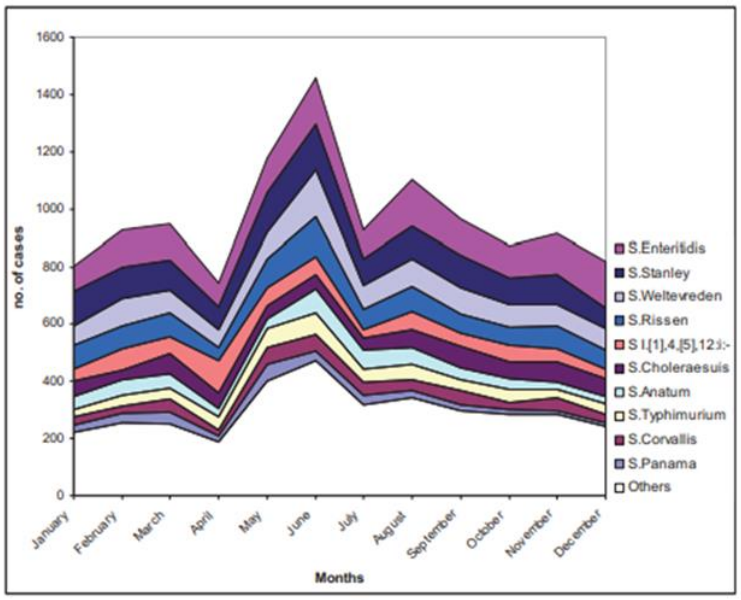
การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาล และเสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อจากการรับประทานอาหาร (Scallan E. et al., 2011) ซึ่งซีโรไทป์ที่มีการแพร่กระจายมากที่สุดในยุโรป และอเมริกา และมีแนวโน้มจะพบมากขึ้นในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกา และแปซิฟิกตะวันตก คือ *S.* Typhimurium (Herikstad H., Motarjemi Y., & Tauxe R. 2002) ในขณะซีโรไทป์ที่พบมากในประเทศไทย *S.* Weltevreden รองลงมาเป็น *S.* Enteritidis เช่นเดียวกับประเทศมาเลเซีย (Bangtrakulnonth, et al., 2004)

ประเทศไทยในปี พ.ศ. 2545–2550 พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp. ในทุกภูมิภาค โดยพบ *S.* Enteritidis และ *S.* Stanley เป็นอันดับหนึ่งสองของการกระจายตัว (ภาพที่ 19) และพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเข้ารับรักษาในช่วงมิถุนายนสูงที่สุด (ภาพที่ 20)




**ภาพที่ 19 การกระจายตัวของซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย**

**ที่มา:** Hendriksen, & R. S. 2010)




**ภาพที่ 20 อัตราการพบผู้ป่วยของประเทศในปี 2545-2550**

**ที่มา:** Hendriksen, & R. S. 2010

*Salmonella* spp. นอกจากจะก่อโรคในมนุษย์แล้วเชื้อ *Salmonella* spp. ยังก่อปัญหาต่อทางด้วยเศรษฐกิจด้วย เนื่องจากในปัจจุบันมีการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์ที่นำมาปริโรคในประเทศหรือแม้กระทั่งเนื้อสัตว์ส่งออกไม่ว่าจะเป็นในเนื้อหมู เนื้อไก่ หรือแม้กระทั่งเนื้อวัว โดยแต่จะภูมิภาคหรือประเทศต่าง ๆจะพบซีโรวาร์ที่ต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่ ดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 3 อันดับซีโรวาร์ที่เกี่ยวข้องกับหมู วัว และไก่ที่พบเยอะในแต่ละประเทศ ปี 2002–2007**

| Source | Country | Serovars | Percentages |
|---|---|---|---|
| Pork | Canada | S.Typhimurium (30.4%) | 30.40% |
| | Nine European countries | S.Typhimurium (37.6%) | 37.60% |
| | The United States | S.Infantis (27.8%) | 27.80% |
| | The United Kingdom | S.Typhimurium (69.7%) | 69.70% |
| | Thailand | S.Anatum(36.8%) | 36.80% |
| **Source** | **Country** | **Serovars** | **Percentages** |
| Cattle | The United Kingdom | S.Dublin | 59.00% |
| | The United States | S.Montevideo | 23.40% |
| | Tunisia | S.Enteritidis | 69.00% |
| | Denmark | S.Dublin | 68.20% |
| | Czoch Rep | S.Typhimurium | 38.90% |
| | Ireland | S.Typhimurium | 34.30% |
| | Italy | S.Typhimurium | 27.30% |
| | Netherlands | S.Dublin | 63.60% |
| **Source** | **Country** | **Serovars** | **Percentages** |
| Chicken | Canada | S.Kentucky | 43.10% |
| | The United Kingdom | S.Enteritidis | 18.80% |
| | Eleven European countries | S.Kentucky | 17.50% |
| | The United Kingdom | S.Enteritidis | 18.80% |

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Hendriksen, & R. S. 2010

การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในภาคเหนือพบสุกรร้อยละ 48.14 พบรองลงมาคือในไก่ร้อยละ 33.33 (ฌาณพรรธน์ ศรีธาดา, 2559) กรณีทางภาคใต้พบการปนเปื้อนของเชื้อในสุกรร้อยละ 63.16 และพบในเนื้อไก่ร้อยละ 64.61 (จารัส พูลเกื้อ, 2561) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอัตราการปนเปื้อนเชื้อในประเทศไทยมีอัตราที่สูง ดังนั้นการรับประทานอาหารควรทำให้ถูกสุขลักษณะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อที่มาจากเนื้อสัตว์

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Nutrient broth (OXOID)

2) MacConkey agar (HIMEDIA)

3.1.2. สารเคมี

1) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1) 10X Tris–Borate–EDTA (TBE) buffer pH 8.3

1.2) CTAB/NaCl solution

1.3) Lysozyme

1.4) 10% SDS/proteinase K

1.5) NaCl

1.6) Chloroform/isoamyl alcohol

1.7) Isopropanol

1.8) Ethanol

2) สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ESBL

2.1) Phenol red powder

2.2) Cefotaxime

2.3) NaCl pH 7.8

2.4) B–PERII

2.5) 1X TE buffer

2.6) น้ำกลั่น

3) สารเคมีสำหรับทำ PCR

3.1) 5x Blend Master Mix Buffer (Solis BioDyne)

3.2) น้ำที่ปราศจาก DNase (Invitrogen)

4) สารเคมีสำหรับ run gel

4.1) Agarose gel

4.2) TAE buffer

4.3) ViSafe Red Gel Stain (Vivantis)

4.4) 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne)

4.5) 6X Loading dye (VIVANTIS)

3.1.3. เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเลี้ยงเชื้อ

1.1) Erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml และ 500 ml

1.2) จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (NEST®)

1.3) ไม้จิ้มฟัน

1.4) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (Memmert)

2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Memmert)

2.3) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Eppendorf รุ่น 5430)

2.4) เครื่องเขย่าผสม (Vortex) (Bionen)

3) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Real Time Multiplex PCR

3.1) เครื่อง Real Time PCR (BIO-RAD)

3.2) เครื่อง PCR (Applied Biosystems รุ่น Veriti)

3.3) 6 wells – white strip (BIO-RAD)

4) อุปกรณ์ทั่วไป

4.1) Microcentrifuge tube (NEST®)

4.2) ไมโครปิเปต ขนาด 10 µl 200 µl และ 1000 µl (DISCOVERY COMFORT)

4.3) ทิป (ขนาด 10 µl 200 µl และ 1000 µl) ( NEST®)

4.4) Centrifuge tube ขนาด 50 ml (NEST® )

4.5) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo)

4.6) ชุดสำหรับ run gel

**ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา**

| Primer | Gene | Sequence (5' ⟶ 3') | Size of PCR-product(bp) | Primer concentration (pmol/µl) | Annealing (°C) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **CRISPR 1 Monoplex** | | | | | | |
| 74F | CRISPR 2 loci | GTRGTRCGGATAATGCTGCC | Variable | 0.2 | 61 | 58 |
| 74R | | CGTATTCCGGTAGATBTDGATGG | | 0.2 | | |
| **CRISPR 2 Monoplex** | | | | | | |
| 75F | CRISPR 2 loci | GAGCAATACYYTRATCGTTAACGCC | Variable | 0.2 | 59 | 58 |
| 75R | | GTTGCDATAKGTYGRTRGRATGTRG | | 0.2 | | |
| **Multiplex 1 fljB gyrB and ycfQ genes (HRM-rt PCR)** | | | | | | |
| 21F | fljB | GTGAAAGATACAGCAGTAACAACG | 170 | 0.075 | 60 | 58 |
| 21R | | CAAAGTACTTGTTATTATCTGCG | | 0.075 | | |
| 22F | gyrB | AAACGCCGATCCACCCGA | 171 | 0.1 | | |
| 22R | | TCATCGCCGCACGGAAG | | 0.075 | | |
| 23F | ycfQ | GCCTACTCTCTATGCGGAATTCAC | 241 | 0.075 | | |
| 23R | | GATATCGCGCGAGGAGGCG | | | | |
| **Multiplex 2** | | | | | | |
| 86F | ECMLV1 | TCCCTGGACAAACCAGGACTG | 162-1,597 | 0.1 | 55 | 58 |
| 86R1 | | CGTGCGGACTTATGAGAAAG | | 0.1 | | |
| 86R2 | | CGTGCGGGCTTATGAAAAAG | | 0.5 | | |
| 87F | ECMLV2 | GAAACAGGCCCAGGCTACAC | 575-869 | 0.05 | | |
| 87R | | CTGGCGCTGGTTATGGGTAT | | 0.05 | | |
| 88F | ECMLV3 | TTCAGGAAATGGATAAAGTAGT | 616-1,157 | 0.8 | | |
| 88R | | GGGAGTATGCGGTCAAAAGC | | 0.8 | | |
| 89F | ECMLV4 | ACAACCGGCTGGGGCGAATCC | 413-539 | 0.05 | | |
| 89R | | GTCAGCAAATCCAGAGAAGGCA | | 0.05 | | |
| 90F | ECMLV5 | GCGGCGCTGAAGAAGAAAGC | 375-438 | 0.05 | | |
| 90R | | CTCCCGGCAGGCGAAGCATTGT | | 0.05 | | |

**ตารางที่ 4 (ต่อ)**

| Primer | Gene | Sequence (5' 3') | Size of PCR-product(bp) | Primer concentration (pmol/µl) | Annealing (°C) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Multiplex 3** bcfC; Bovine colonization factor, fimbrial usher, csgA; Major fimbrial subunit of thin curled fimbriae and agfA; Aggregative fimbria A | | | | | | |
| S6F | bcfC_f | CAGCTTTTCATGACGCGATA | 241 | 0.4 | 58 | 59 |
| S6R | bcfC_r | CAATGTCTCTGGTTGCGAGA 0.4 | | 0.4 | | |
| S7F | csgA_f | GGATTCCACGTTGAGCATTT | 212 | 0.4 | | |
| S7R | csgA_r | CGGAGTTTTTAGCGTTCCAC | | 0.4 | | |
| S8F | agfA_f | GGATTCCACGTTGAGCATTT | 312 | 0.4 | | |
| S8R | agfA_r | GTTGTTGCCAAAACCAACCT | | 0.4 | | |
| **Uniplex 1 invA** location; Chromosome, Function Enables the bacteria to invade cells | | | | | | |
| InvA_f | InvA | GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA | 284 | 0.125 | | 59 |
| InvA_r | | GCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGA | | 0.125 | | |
| **Uniplex 2 sopE1** location; Cryptic bacteriophage, Function ; Translocated T3SS effector protein | | | | | | |
| S3F | sopE1_f | CGGGCAGTGTTGACAAATAAAG | 422 | 0.4 | 58 | 59 |
| S3R | sopE1_r | TGTTGGAATTGCTGTGGAGCT | | 0.4 | | |
| **Uniplex 3 gipA 1** location; Gifsy- 1bacteriophage, Function; Peyer's patch-specific virulence factor | | | | | | |
| S4F | gipA_f | ACGACTGAGCAGGCTGAG | 518 | 0.4 | 58 | 59 |
| S4R | gipA_r | TTGGAAATGGTGACGGTAGAC | | 0.4 | | |
| **Uniplex 4 sodC1** location; Gifsy-2bacteriophage, Function; periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase | | | | | | |
| S5F | sodC1_f | CCAGTGGAGCAGGTTTATCG | 424 | 0.4 | 58 | 59 |
| S5R | sodC1_r | GGTGCGCTCATCAGTTGTTC | | 0.4 | | |

## 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1. การคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 59 ตัวอย่าง โดยได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยาราม จำนวน 43 ตัวอย่างที่ทราบอยู่แล้วว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. และเก็บตัวอย่างจากสัตว์ที่มีอาการจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 16 ตัวอย่าง (ไก่ 5 หมู 11 แพะ 1) ในระหว่างเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2558 ถึงเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2560 จากทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

คณะกรรมการจริยธรรม มหาวิทยาลัยพะเยาได้อนุมัติให้มีการรวบรวมและคัดแยกเชื้อ *Salmonella* spp. (อนุมัติฉบับที่ 57 02 04 0020) และเก็บตัวอย่างจากสัตว์ซึ่งเป็นไปตามมาตราฐานจริยธรรมโดยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการการดูแลและใช้สัตว์ประจำมหาวิทยาลัย (IACUC) ตามโครงการเลขที่ 62-02-04-001

**ตารางที่ 5 แหล่งที่มาของตัวอย่างที่นำมาศึกษา**

| Number | ID | Source | Place | Serotyping | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Conventional typing | HRM-PCR | WGS | |
| 1 | 1 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 2 | 4 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 3 | 5 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 4 | 9 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 5 | 23 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 6 | 25 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 7 | 35 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 8 | 38 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 9 | 49 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 10 | 52 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 11 | 125 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 12 | 131 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 13 | 133 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 14 | 145 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 15 | 246 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 16 | 254 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 17 | 262 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | • | |
| 18 | 312 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 19 | 316 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 20 | 345 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 21 | 350 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 22 | 378 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 23 | 392 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 24 | 393 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 25 | 394 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 26 | 402 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 27 | 411 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | | Unknown |
| 28 | 412 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 29 | 413 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 30 | 443 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | • | • | | Unknown |
| 31 | 444 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |
| 32 | 450 | Hospitalized patient | Phayao Ram hospital | | • | | |

**ตารางที่ 5 (ต่อ)**

| number | ID | Source | Place | Serotyping | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Conventional typing | HRM-PCR | WGS | |
| 33 | 454 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 34 | 458 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 35 | 466 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 36 | 474 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 37 | 475 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 38 | 482 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 39 | 483 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 40 | 484 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 41 | 487 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 42 | 495 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 43 | 497 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 44 | en6 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 45 | en8 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 46 | en11 | Nan | Minced pork | | • | | |
| 47 | en13 | Chiang Mai | Minced pork | | • | | |
| 48 | en17 | Lampang | Minced pork | | • | | |
| 49 | en18 | Lampang | Minced pork | | • | | |
| 50 | en21 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 51 | en26 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 52 | L7 | Lampang | Swine | • | | | |
| 53 | L8 | Lampang | Swine | • | | | |
| 54 | L10 | Chiang Mai | Chicken | • | | | |
| 55 | L12 | Phrae | Chicken | • | | | |
| 56 | L17 | Lampang | Chickens | • | | | |
| 57 | L24 | Chiang Rai | Meat Chicken | • | | | |
| 58 | L27 | Chiang Rai | Chickens | • | | | |
| 59 | L28 | Chiang Rai | Goat | • | | | |

3.2.2. การทดสอบ Extended–Spectrum Beta–Lactamases (ESBL) (NDP test)

เอ็นไซม ESBL พบในแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ มีฤทธิ์ย่อยสลายยากลุ่ม Beta–lactam ได้หลายชนิด เช่น Penicillin, Oxyimino Cephalosporin (3$^{nd}$generation cephalosporin) และ Aztreonam

เชื้อถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร NB broth และบ่มไว้ที่ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสออก (Supernatant) ล้างด้วย 1X TE buffer ประมาณ 700 µl ทำการเขย่า (Vortex) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก (Supernatant) จากนั้นทำการเติม B–PERII ปริมาตร 100 µl ทำการเขย่า (Vortex) และเติม Solution R + Cefotaxime 100 µl และอ่านผล (ผลบวก คือ สารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลือง)

3.2.3. การสกัดดีเอ็นเอ

1) การเตรียมเชื้อ

เชื้อ *Salmonell*a spp. ถูกนำออกจากตู้ –20 °C มาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาณ 1,000 µl และบ่มที่ตู้ incubator 37 °C นาน 16–18 ชั่วโมง (Overnight) จากนั้น Streak ลงใน plate ที่มีอาหาร MacConkey agar นำไปบ่มที่ตู้ Incubator 37 °C นาน 16–18 ชั่วโมง (Overnight incubation) และจากนั้นนำโคโลนีเดียวใน plate ไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 1,000 µl ในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml (เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อซาลโมเนลลาที่จะนำไปสกัดดีเอ็นเอ) แล้วนำไปบ่มที่ตู้ Incubator 37 °C นาน 16–18 ชั่วโมง (Overnight incubation)

2) การปั่นล้างเซลล์

เชื้อจากการเลี้ยงเซลล์ถูกนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง(Supernatant) และล้างตะกอนเซลล์โดยใช้ 1X TE buffer ปริมาณ 600 µl พร้อมเขย่า (Vortex) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 rpm นาน 3 นาที และเทส่วนใสทิ้ง (Supernatant)

3) การแตกเซลล์

ตะกอนเซลล์จากขั้นตอนแรกถูกนำมาเติม 1X TE Buffer ปริมาณ 400 µl และบ่มที่ 80 ºC เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 10 mg/ml lysozyme ปริมาตร 50 µl ทำการเขย่า (Vortex) และเขย่า (Shaking) ที่ 37 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10% SDS/proteinase K ปริมาตร 75 µl ทำการเขย่า (Vortex) และบ่ม (Incubate) ที่ 65 ºC เป็นเวลา 10 นาที

4) การตกตะกอนโปรตีนเพื่อแยกดีเอ็นเอ

สารละลายที่ได้จากขั้นตอนการแตกเซลล์ถูกนำมาเติม 5M NaCl ปริมาตร 100 µl และ CTAB/NaCl solution ปริมาตร 100 µl ทำการ Vortex และ Incubate ที่ 65 ºC เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1) ทำการเขย่า (Vortex) 10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนใสด้านบนย้ายไปที่ Microcentrifuge tube

5) การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

สารลายที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนเพื่อแยกดีเอ็นเอถูกนำมาแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการเติม Isopropanol 650 µl ทำการพลิกหลอดขึ้นลงอย่างระวัง และนำไปเก็บที่ –20 ºC เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่11,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง (Supernatant) และเติม 70% Ethanol ที่เย็น หมุนหลอด 2–3 ครั้ง เพื่อล้างดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง (Supernatant) นำหลอดไปไว้ในตู้ Incubate ที่ 37 ºC เป็นเวลา 15 นาที และนำดีเอ็นที่สกัดได้ไปเก็บไว้ที่ –20 ºC

3.2.4. การตรวจสอบ *Salmonella* serotype

1) MLVA typing

การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง PCR ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 µl ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 µl ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 4) Ready–to–use PCR Mix ปริมาตร 0.2 µl (Solis Biodyne) และ ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre–denaturation ที่ 95 ºC เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation ที่ 94 ºC เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing ที่ 55 ºC เป็นเวลา 90 วินาที
Extension ที่ 72 ºC เป็นเวลา 90 วินาที
} จำนวน 30 รอบ

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 ºC เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 1X TE buffer โดยใช้ 3% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio–RAO รุ่น XR+) จากนั้นทำภาพที่ถ่ายได้ไปเข้าโปรแกรม Gel J

2) CRISPR 1 typing

การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง PCR ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 µl ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 µl ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 4) Ready–

to-use PCR Mix ปริมาตร 0.2 µl (Solis Biodyne) และ ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase ให้ครบ 10 µl โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 12 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 60 วินาที
Annealing ที่ 61 °C เป็นเวลา 60 วินาที } จำนวน 30 รอบ
Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 1X TE buffer โดยใช้ 3% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+) จากนั้นทำภาพที่ถ่ายได้ไปเข้าโปรแกรม Gel J

3) CRISPR 2 typing

การตรวจสอบซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง PCR ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 µl ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 µl ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 4) Ready-to-use PCR Mix ปริมาตร 0.2 µl (Solis Biodyne) และ ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase ให้ครบ 10 µl โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 12 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 60 วินาที
Annealing ที่ 59 °C เป็นเวลา 60 วินาที } จำนวน 30 รอบ
Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 1X TE buffer โดยใช้ 3% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+) จากนั้นทำภาพที่ถ่ายได้ไปเข้าโปรแกรม Gel J

4) HRM typing

การวิเคราะห์ HRM Multiplex Real time PCR โดยใช้ BIO-RAD CFX96TM Real-Time System ซึ่งส่วนผสมของ HRM-PCR 10 µl ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 µl ไพร์เมอร์ สำหรับ *fljB*, *gyrB* and *ycfQ* (ตารางที่ 4) Ready-to-use HRM Mix ปริมาตร 2 µl (Solis Biodyne) และ ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที
Annealing ที่ 60 °C เป็นเวลา 60 วินาที
Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 20 วินาที
} จำนวน 45 รอบ

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้น melt ที่ 65-90 °C ต่อ 0.1C/S จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม HRM

5) การตรวจสอบ virulence gene

การวิเคราะห์ PCR ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 µl ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 µl ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 4) Ready-to-use PCR Mix ปริมาตร 0.4 µl (Solis Biodyne) และปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing ที่ 58 °C เป็นเวลา 30 วินาที
Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที
} จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 1.5% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6) การวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Gel J

การวิเคราะห์ผลโดยการทำ DNA fingerprint เป็นการเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอ ในการวิเคราะห์นี้เราใช้โปรแกรม Gel J เนื่องจากเป็นโปรแกรมวิเคราะห์ DNA fingerprint ที่สามารถใช้งานได้ฟรี โดยคุณสมบัติของโปรแกรม Gel J คือกลไกการจับ lane และ band ของดีเอ็นเอที่แม่นยำ โปรแกรมแกรม Gel J ได้รับการพัฒนาจากแอปพลิเคชัน JAVA อาศัย JAVA Library เป็นโปรแกรมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ ซึ่งมีฟังก์ชันการประมวลภาพและการวิเคราะห์คลัสเตอร์

**ขั้นตอนการใช้โปรแกรม Gel j แบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน**

**ขั้นตอนที่ 1** ทำการอัพโหลดรูปภาพเจลโดยโปรแกรมจะรองรับแบบภาพมาตรฐานทั่วไป รวมถึง tiff, jpeg, PNG, gif และ bmp จากนั้นทำการครอบรูปภาพในส่วนที่ต้องการ และสามารถปรับความสว่างหรือความเข้มของรูปภาพเจล

**ขั้นตอนที่ 2** ตรวจจับเลนของโปรแกรม Gel j จะทำการแบ่งเลนอัตโนมัติ แต่ในบางกรณี โปรแกรมอาจมีความคาดเคลื่อนของการตัดแบ่งเลน เนื่องจากความสว่างและความเข้มของ รูปภาพเจล โดยเมื่อมีการตัดแบ่งเลนคลาดเคลื่อนสามารถปรับแต่งการแบ่งเลนได้

**ขั้นตอนที่ 3** ทำการเลือกเลนของ DNA Marker และระบุขนาดของ DNA Marker

**ขั้นตอนที่ 4** กาตรวจจับแบนด์ของโปรแกรม จะทำการตรวจจับแบนด์อัตโนมัติของภาพเจล แต่ในขั้นตอนนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนของการตรวจจับแบนด์ แต่สามารถใช้วิธี Manual เพื่อเพิ่มแบนด์ที่โปรแกรมไม่สามารถตรวจจับได้ จากนั้นทำการบันทึกรูปภาพและถูกจัดเก็บลง ในฐานข้อมูลของโปรแกรม

**ขั้นตอนที่ 5** การสร้าง Dendrogram ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถเลือกหลายรูปภาพที่ถูกจัดเก็บไว้ ในฐานข้อมูลมาทำการสร้าง Phylogenitic tree ได้ ซึ่งในโปรแกรมนี้สามารถใส่ข้อมูลพื้นฐาน ของแต่ละตัวอย่างได้ เช่น เพศ อายุ สายพันธุ์ การดื้อยา ฯ (Heras J. et al., 2015)

# บทที่ 4

## ผลการทดลอง

เชื้อ *Salmonella* spp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 59 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกคือเชื้อจำนวน 43 ตัวอย่างที่มีการยืนยันแล้วจากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยาราม พร้อมทั้งข้อมูลการดื้อยา และกลุ่มที่สอง คือ เชื้อจำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งประด้วย หมู 10 ตัวอย่าง ไก่ 5 ตัวอย่าง และแพะ 1 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งสองกลุ่มในช่วงเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2558 ถึงเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2560 บริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ดังตารางที่ 6

**ตารางที่ 6 ข้อมูลพื้นฐานของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 59 ตัวอย่างที่ศึกษา**

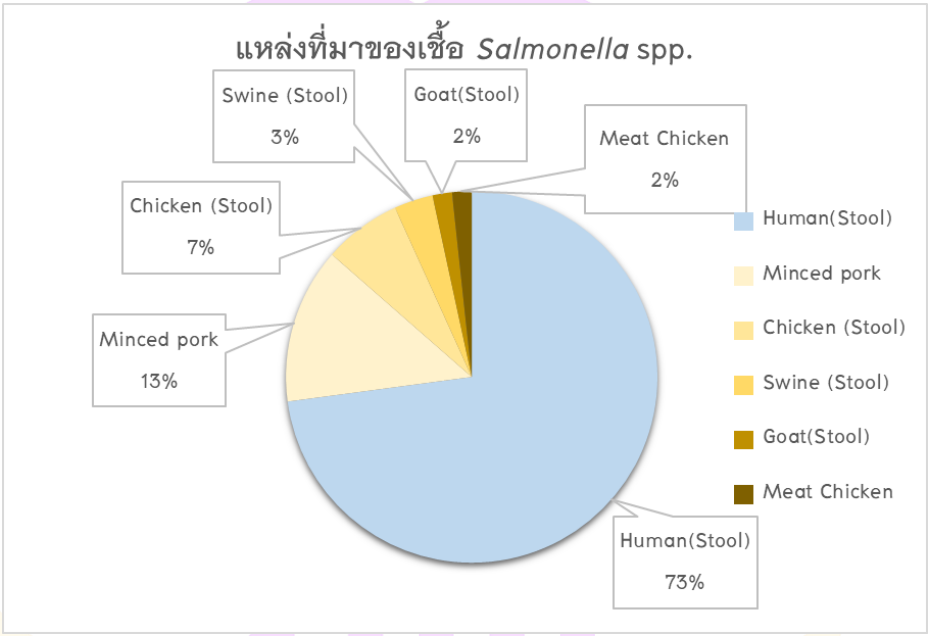
| Isolated number | ID | Source | Place | Serotyping | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Conventional typing | HRM-PCR | WGS |
| 1 | 1 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 2 | 4 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 3 | 5 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 4 | 9 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 5 | 23 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 6 | 25 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 7 | 35 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 8 | 38 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 9 | 49 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 10 | 52 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 11 | 125 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 12 | 131 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 13 | 133 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 14 | 145 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 15 | 246 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 16 | 254 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 17 | 262 | Hospitalized patient | stool | • | • | • |
| 18 | 312 | Hospitalized patient | stool | | • | |
| 19 | 316 | Hospitalized patient | stool | | • | |
| 20 | 345 | Hospitalized patient | stool | | • | |
| 21 | 350 | Hospitalized patient | stool | | • | |
| 22 | 378 | Hospitalized patient | stool | | • | |
| 23 | 392 | Hospitalized patient | stool | | • | |
| 24 | 393 | Hospitalized patient | stool | | • | |
| 25 | 394 | Hospitalized patient | stool | | • | |

**ตาราง 6 (ต่อ)**

| Isolated number | ID | Source | Place | Serotyping | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Conventional typing | HRM–PCR | WGS | |
| 26 | 402 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 27 | 411 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 28 | 412 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 29 | 413 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 30 | 443 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 31 | 444 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 32 | 450 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 33 | 454 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 34 | 458 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 35 | 466 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 36 | 474 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 37 | 475 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 38 | 482 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 39 | 483 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 40 | 484 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 41 | 487 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 42 | 495 | Hospitalized patient | stool | • | • | | Unknown |
| 43 | 497 | Hospitalized patient | stool | | • | | |
| 44 | en6 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 45 | en8 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 46 | en11 | Nan | Minced pork | | • | | |
| 47 | en13 | Chiang Mai | Minced pork | | • | | |
| 48 | en17 | Lampang | Minced pork | | • | | |
| 49 | en18 | Lampang | Minced pork | | • | | |
| 50 | en21 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 51 | en26 | Phayao | Minced pork | | • | | |
| 52 | L7 | Lampang | Swine | • | | | |
| 53 | L8 | Lampang | Swine | • | | | |
| 54 | L10 | Chiang Mai | Chicken | • | | | |
| 55 | L12 | Phrae | Chicken | • | | | |
| 56 | L17 | Lampang | Chickens | • | | | |
| 57 | L24 | Chiang Rai | Meat Chicken | • | | | |
| 58 | L27 | Chiang Rai | Chickens | • | | | |
| 59 | L28 | Chiang Rai | Goat | • | | | |

**ผลการทดลองที่ 1 การวิเคราะห์แหล่งที่มาของเชื้อ *Salmonella* spp.**

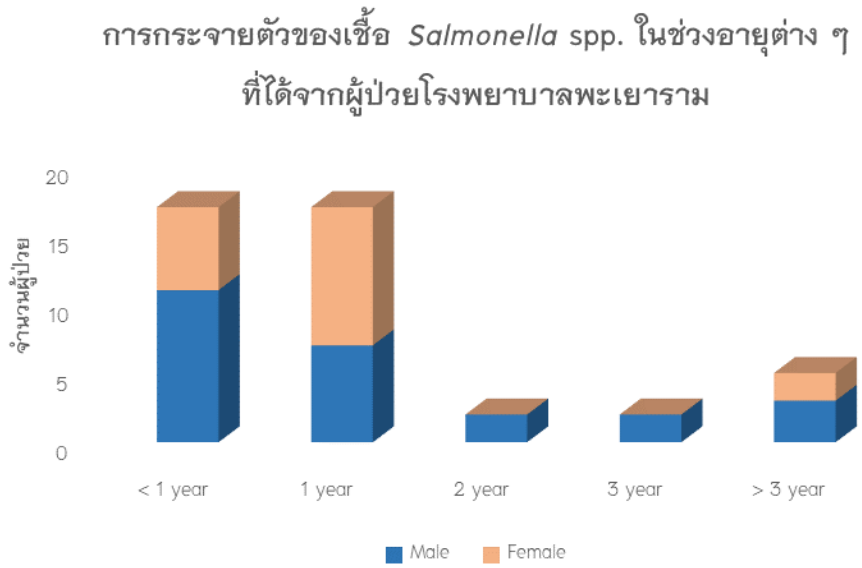
เชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมด 59 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเชื้อที่ได้รับจากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยา 73% ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดมาจากอุจจาระ(Stool) เชื้อ *Salmonella* spp. ที่ได้จากสัตว์คิดเป็น 27% ประกอบด้วยเนื้อหมู (Minced pork) 13% อุจาระไก่ (Chicken Stool) 7% อุจาระหมู (Swine Stool) 3% อุจาระแพะ (Goat Stool) และเนื้อไก่ (Meat Chicken) 2% ตามลำดับ ดังภาพที่ 21




**ภาพที่ 21 แหล่งที่มาของเชื้อ *Salmonella* spp.**

**ผลการทดลองที่ 2 การกระจายตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. ในช่วงอายุที่แตกต่างกันของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพะเยาราม**

เชื้อ *Salmonella* spp. ที่ได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลพะเยาราม จำนวน 43 ตัวอย่าง พบว่าในผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุหนึ่งปีและน้อยกว่าหนึ่งปีคิดเป็น 79.06% โดยผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหนึ่งปีขึ้นไปพบได้น้อย อาจสังเกตได้ว่าผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่าหนึ่งปีเป็นเพศชายมากกว่าดังภาพที่ 22




**ภาพที่ 22 กราฟการกระจายตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในช่วงอายุที่แตกต่างกันของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพะเยารามจำนวน 43 ตัวอย่างช่วงปี พ.ศ. 2558 ถึง ปี พ.ศ. 2560**

**ผลการทดลองที่ 3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติการดื้อยาจากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยาราม**

ข้อมูลการดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ได้จากผู้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยาราม จำนวน 43 ตัวอย่าง ได้ศึกษาข้อมูลการดื้อของยา 8 ชนิด เป็นยากลุ่ม β-lactam 3 ชนิด และ Quinolone 2 ชนิด และยากลุ่มอื่นอีก 3 ชนิด ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าเชื้อ *Salmonella* spp. มีการดื้อยา Ampicillin มากที่สุดคิดเป็น 53.49% พบรองลงมา คือ การดื้อยา Amoxicillin/Clavulanic acid คิดเป็น 37.21% แต่ไม่มีการดื้อยา Norfloxacin และพบตัวอย่างที่น่าสนใจ คือ DI 412 เนื่องจากมีการดื้อยาหลายขนาน ดังตารางที่ 7

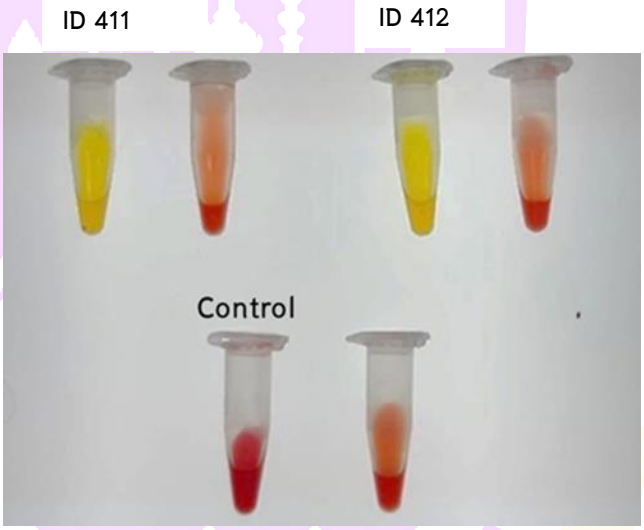
**ตารางที่ 7 แสดงรูปแบบการดื้อยา และผลการทดสอบ ESBLของเชื้อ *Salmonella* spp. จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพะเยาราม**

| Isolated | | | β-lactam | | | Quinolone | | Other | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| number | ID | ESBL | AMP | CTX | CRO | NOR | CIP | SXT | GM | AMG |
| 1 | 1 | | • | | | | | | | |
| 2 | 4 | | • | | | | | • | | |
| 3 | 5 | | | | | | | | | |
| 4 | 9 | | • | | | | | | | |
| 5 | 23 | | | | | | | | | |
| 6 | 25 | | • | | | | | | | |
| 7 | 35 | | • | | | | | | | |
| 8 | 38 | | | | | | | | | |
| 9 | 49 | | | | | | | | | |
| 10 | 52 | | | | | | | | | |
| 11 | 125 | | | | | | | • | | |
| 12 | 131 | | • | | | | | | | |
| 13 | 133 | | | | | | | | | |
| 14 | 145 | | | | | | | | | |
| 15 | 246 | | | | | | | | | |
| 16 | 254 | | • | | | | | | • | • |
| 17 | 262 | | | | | | | | | • |
| 18 | 312 | | | | | | | | | |
| 19 | 316 | | • | | • | | | | • | • |
| 20 | 345 | | • | | | | | | | |
| 21 | 350 | | • | | | | | | | • |
| 22 | 378 | | | | | | | | | |
| 23 | 392 | | • | | | | | | | • |
| 24 | 393 | | | | | | | | | • |
| 25 | 394 | | • | | | | | | | • |
| 26 | 402 | | • | | | | | | | • |
| 27 | 411 | ESBL | • | • | | | | | | • |
| 28 | 412 | ESBL | • | • | • | | • | | • | • |
| 29 | 413 | | • | | | | | | | • |
| 30 | 443 | | • | | | | | | | |
| 31 | 444 | | • | | | | | | | |
| 32 | 450 | | | | | | | | | |
| 33 | 454 | | | | | | | | | |
| 34 | 458 | | | | | | | | | |
| 35 | 466 | | • | | | | | | | • |
| 36 | 474 | | • | | | | | | | • |
| 37 | 475 | | • | | | | | | | • |
| 38 | 482 | | | | | | | | | |
| 39 | 483 | | | | | | | | | |
| 40 | 484 | | • | | | | | | | • |
| 41 | 487 | | | | | | | | | |
| 42 | 495 | | | | | | | | | |
| 43 | 497 | | • | | | | | | | • |
| | Percentages | | 53.49 | 4.65 | 4.65 | 0.00 | 2.33 | 4.65 | 6.98 | 37.21 |

ID:AMP:Ampicillin,CTX:Cefotaxime,CRO:Ceftriaxone,NOR:Norfloxacin,CIP:Ciprofloxacin,SXT:Sulfamethoxazole/Trimethoprim,GM:Gentamicin,AMC:Amoxicillin/Clavulanic acid

**ผลการทดลองที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติการดื้อยาแบบ Extended–Spectrum Beta–Lactamases (ESBL) หรือ (NDP test)**

การตรวจสอบคุณสมบัติการดื้อยาแบบ ESBL อย่างง่าย และรวดเร็วจากเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 43 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพะเยาราม โดยใช้วิธีที่เรียกว่า NDP test หลักการ คือ เชื้อที่ดื้อยาแบบ ESBL จะสามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายยา Cefotaxime ให้เป็นสารที่มีความเป็นกรด และเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง จากการทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมด 43 ตัวอย่าง พบ 3 ตัวอย่าง ซึ่งสองตัวอย่างมาจากผู้ป่วย (ID411–ID412) และหนึ่งตัวอย่างมาจากสัตว์ซึ่งได้จากเนื้อหมู (Minced pork) จังหวัดน่าน (IDen12)

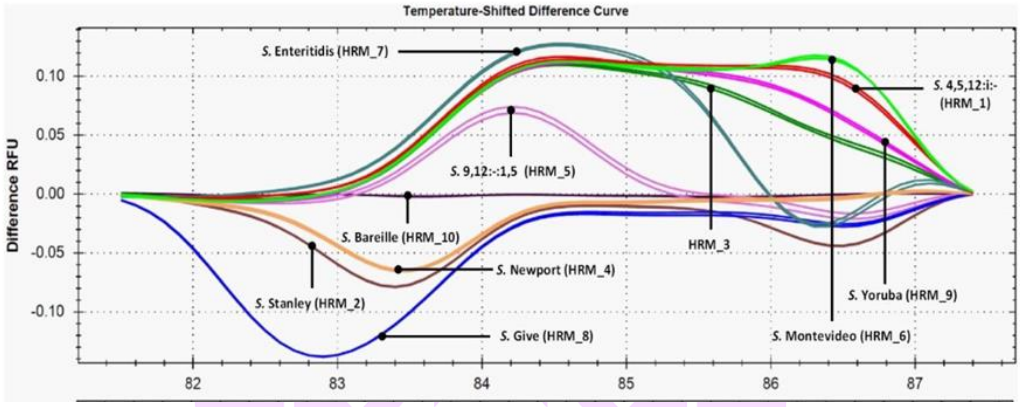



**ภาพที่ 23 ผลของการทดสอบ NDP test จากผู้ป่วย (ID411 – ID412) เพื่อหาเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีคุณสมบัติ ESBL โดยเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง**

**ผลการทดลองที่ 5 การตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 43 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยโดยการวิธี HRM–PCR**

การตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. จากผู้ป่วยจำวนวน 43 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วย โดยใช้วิธี HRM–PCR หลักการคือ การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ Primers (3 คู่) และตรวจสอบรูปแบบของกราฟที่เกิดจากกระบวนการ HRM–PCR โดยพิจารณารูปแบบกราฟที่เกิดขึ้นกับรูปแบบกราฟมาตรฐานที่ทราบ serotype แล้ว

ในการทดลองนี้ใช้ *S.* 4,5,12:i:–*S.* Enteritidis และ *S.* Stanley เป็นตัวเปรียบเทียบ ผลการทดลองพบ serotype ที่พบมากที่สุดคือ *S.* 4,5,12:i:– (HRM_1) จำนวน 12 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *S.* Enteritidis (HRM_7) จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *S.* Stanley (HRM_2) จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยเราพบรูปแบบของกราฟ HRM ที่ไม่สามารถระบุได้ (Unknown) จำนวน 8 ตัวอย่าง



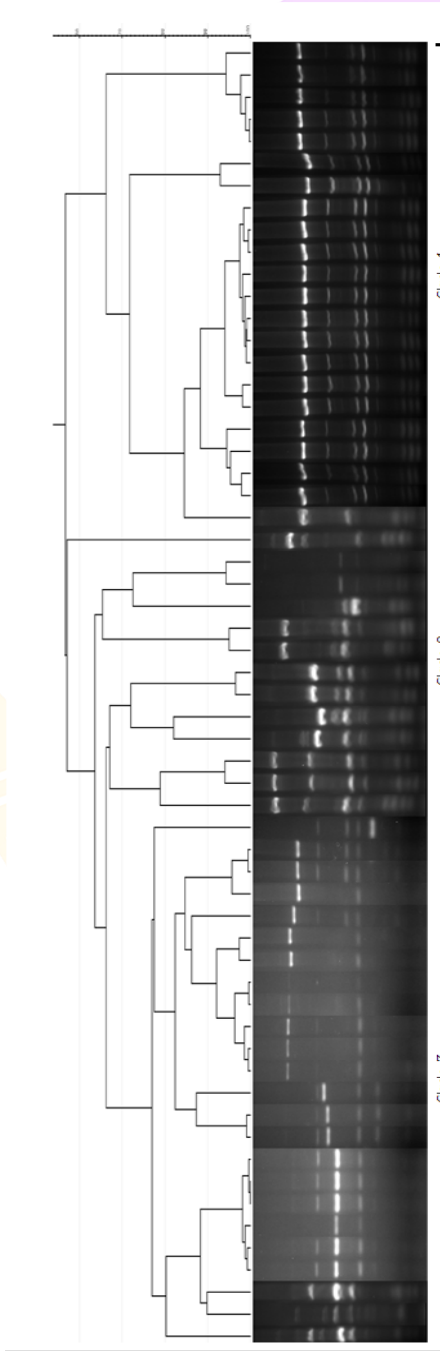

**ภาพที่ 24 รูปแบบกราฟแสดงผล HRM–PCR ของเชื้อ *Salmonella* spp.**

**ผลการทดลองที่ 6 การใช้ CRISPR 2 และ MLVA เพื่อการตรวจสอบโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีการกระจายสูง**

การตรวจสอบทางอณูวิทยาอย่างรวดเร็วของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 59 ตัวอย่าง ในช่วงปี พ.ศ. 2558 ถึง ปี พ.ศ. 2560 ประกอบด้วย 17 serotype ที่ทราบ serotype โดยวิธีมาตราฐานแล้ว (Positive control) และ 8 ตัวอย่างที่ยังไม่ทราบ *Salmonella* serotype (unknown) จึงใช้ CRISPR 2 และ MLVA เพื่อการจัดกลุ่ม *Salmonella* spp. ทั้งหมด ซึ่ง MLVA ให้ผลออกมา 7 แบนที่แตกต่างกันและ CRISPR 2 จำนวน 1 แบนทำให้รูปแบบที่ได้แตกต่างกันออกไปตาม *Salmonella* serotype ต่าง ๆ พบว่าสามารถแบ่ง *Salmonella* spp. ออกเป็น clade ได้ 3 clade โดยพิจารณารูปแบบของ CRISPR 2 และ MLVA พบว่า *S.* 4,5,12:i:– มีรูปแบบ CRISPR 2–MLVA เหมือนกัน โดยมีขนาดของ CRISPR 2 ที่ 1,600 bps จัดอยู่ใน clade 1 ส่วน *S.* Typhimurium *S.* Enteritidis มีรูปแบบ CRISPR 2–MLVA ที่จำเพาะต่อ serotype โดยมีขนาดของ C2 ที่ 1,700 bps และ 800 bps ตามลำดับจัดอยู่ใน clade 3 ซึ่ง *S.* Weltevreden และ *S.* Stanley มีรูปแบบ CRISPR 2–MLVA ที่ใกล้เคียงกัน แต่ต่างกันที่ขนาดของ C2 โดย *S.* Weltevreden มีขนาดแบนอยู่ที่ 1,600 bps 1,650 bps และ 1,500 bps S. Stanley มีขนาดแบนอยู่ที่ 1600 bps และ 1500 bps ซึ่งจัดอยู่ใน clade 3 ส่วน clade 2ประกอบไปด้วยรูปแบบ MLVA และขนาดของ CRISPR 2 ที่แตกต่างกัน ซึ่งมาจาก serotype ที่แตกต่างกัน และพบได้

น้อยรวมถึง serotype ที่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ได้ (unknown) มีอยู่ 8 รูปแบบ ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมในครั้งต่อไปควรเพิ่มการวิเคราะห์ในส่วนของ direct repeats และ จำนวนของ spacer เพื่อจะได้วิเคราะห์ตัวอย่างที่ยังไม่ทราบ (unknown) ได้ดังตารางที่ 8

**ตารางที่ 8 แสดงผลของ CRISPR 2 และ MLVA เพื่อการตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีการกระจายสูง**




| Isolated number | CRISPR 2 Fragment | Serotype |
|---|---|---|
| en11 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| en8 | 1550 bp | S.4,5,12:i:- |
| en26 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 23 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 9 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| L7 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 35 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 394 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 444 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 392 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 497 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 458 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| m1 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 412 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 350 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 25 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 345 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 474 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 484 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| en21 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| 316 | 1600 bp | S.4,5,12:i:- |
| en17 | 1300 bp | S.Schwarzengrund |
| 52 | 1400 bp | S.Covallis |
| L8 | 2000 bp | S.Krefeld |
| L12 | ND | S.Braenderup |
| L10 | 700 bp | S.Agona |
| en18 | 1500 bp | S.Saintpaul |
| 38 | 1500 bp | S.Montevideo |
| 482 | 1000 bp | **Unknown** |
| 466 | 1000 bp | **Unknown** |
| 246 | 850 bp | S.Barilly |
| 254 | 900 bp | S.Kedougou |
| 475 | 2000 bp | **Unknown** |
| 443 | 2000 bp | **Unknown** |
| 133 | 1800 bp | S.Kentucky |
| 495 | 400 bp | **Unknown** |
| 413 | 1500 bp | S.Stanley |
| 312 | 1500 bp | S.Stanley |
| 378 | 1500 bp | S.Weltevreden |
| 131 | 1600 bp | S.Stanley |
| 262 | 1650 bp | S.Weltevreden |
| 145 | 1600 bp | S.Weltevreden |
| 454 | 1900 bp | **Unknown** |
| 5 | 1600 bp | S.Weltevreden |
| L27 | 1700 bp | S.Typhimurium |
| L28 | 1700 bp | S.Typhimurium |
| L17 | 1700 bp | S.Typhimurium |
| 483 | 1500 bp | **unknown** |
| en13 | 950 bp | S.Derby |
| en6 | 900 bp | S.Derby |
| 487 | 800 bp | S.Enteritidis |
| 450 | 800 bp | S.Enteritidis |
| 402 | 800 bp | S.Enteritidis |
| L24 | 800 bp | S.Enteritidis |
| 393 | 800 bp | S.Enteritidis |
| 49 | 800 bp | S.Enteritidis |
| 411 | 700 bp | **Unknown** |
| 125 | 450 bp | S.Give |
| 4 | 700 bp | *S.Agona* |

การศึกษาการกระจายของ *Salmonella* serotype ทั้งหมด 59 ตัวอย่าง ซึ่งจากการทดลองพบว่าซีโรไทป์ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ที่พบมากที่สุดคือ S.4,5,12:i:- อยู่ที่ 35.59% ของเชื้อทั้งหมด ที่พบรองมาคือ *S.* Enteritidis และ *S.* Weltevreden พบอยู่ที่ 10.16% และ 6.77% ตามลำดับ และพบ *S.* Stanley และ *S.* Typhimurium อยู่ที่ 5.08% แต่เราไม่ทราบ *Salmonella* serotype ของ *Salmonella* unknown จำนวน 8 ตัวอย่างจากวิธีการนี้

**ตารางที่ 9 จำนวน serotype เชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในการศึกษาครั้งนี้**

| | Serotype | Number | | Serotype | Number |
|---|---|---|---|---|---|
| Human | *S.* 4,5,12:i:- | 16 | Animal | *S.* 4,5,12:i:- | 5 |
| | *S.* Weltevreden | 4 | | *S.* Typhimurium | 3 |
| | *S.* Enteritidis | 5 | | *S.* Enteritidis | 1 |
| | *S.* Stanley | 3 | | *S.* Krefeld | 1 |
| | Unknown | 8 | | *S.* Braenderup | 1 |
| | *S.* Cowallis | 1 | | *S.* Agona | 1 |
| | *S.* Montevideo | 1 | | *S* .Saintpaul | 1 |
| | *S.* Barilly | 1 | | *S.* Derby | 2 |
| | *S.* Kedougou | 1 | | *S.* Schwarzengrund | 1 |
| | *S.* Kentucky | 1 | | Total | 16 |
| | *S.* Give | 1 | | | |
| | *S.* Agona | 1 | | | |
| | Total | 43 | | | |

**ผลการทดลองที่ 7 การวิเคราะห์ Virulence gene เพื่อตรวจสอบซีโรไทป์ (Serotype) และซับไทป์ (subtype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีการกระจายสูง**

การศึกษา 7 Virulence gene เพื่อใช้ในการตรวจสอบซีโรไทป์ (Serotype) และซับไทป์ (subtype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 59 ตัวอย่าง โดยทดสอบยีนสามกลุ่มได้แก่ ยีน fimbrial (*bcf*C, *csg*A, *agf*A) ยีน invasive( *inv*A) และ ยีน bacteriophage-related(*gip*A, *sop*E1, *sod*C1) พบว่า Salmonella ทุกสายพันธ์มียีน i*nv*A แต่จะมีเพียงบางสายพันธ์เท่านั้นที่ขาดยีน *bcf*C และ *csg*A นั้นก็คือ *S.* Montevideo *S.* Enteritidis *S.* Give และ *S.* Derby (ตารางที่ 5.2)

*S.* 4,5,12:i- *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ทั้ง 3 ชนิดเป็นสายพันธุเดียวกันแต่มีรูปแบบของ Virulence gene ที่ต่างกันซึ่งในส่วนนี้จะเป็นตัวในการใช้ subtype ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้โดย*S.* 4,5,12:i- จำนวน 21 ตัวอย่าง จะถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม หรือ 2 subtype โดยพิจารณนาจากการปรากฏของยีน *sop*E1 เพียงอย่างเดียวดังตารางที่ 10

**ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ Virulence gene เพื่อตรวจสอบซีโรไทป์ (Serotype) และซับไทป์ (subtype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีการกระจายสูง**

| Isolated number | Serotype | Virulence genes | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Inv* A | *bcf* C | *csg* A | *agf* A | *sop* C1 | *sop* E1 | *gip* A |
| en11 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| en8 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| en26 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 23 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 9 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| L7 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 35 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 394 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 444 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 392 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 497 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 458 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| m1 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| 412 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 350 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 25 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 345 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 474 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 484 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| en21 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 316 | S.4,5,12:i:- | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| en17 | S.Schwarzengrund | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 52 | *S*.Covallis | ■ | ■ | ■ | | | | |
| L8 | S.Krefeld | ■ | ■ | ■ | | | | |
| L12 | S.Braenderup | ■ | ■ | ■ | | | | |
| L10 | S.Agona | ■ | ■ | ■ | | | | |
| en18 | S.Saintpaul | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | |
| 38 | *S*.Montevideo | ■ | ■ | | | | | |
| 482 | **Unknown** | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 466 | **Unknown** | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | |
| 246 | S.Barilly | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 254 | S.Kedougou | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 475 | **Unknown** | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 443 | **Unknown** | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 133 | S.Kentucky | ■ | ■ | ■ | | | | ■ |
| 495 | **Unknown** | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 413 | S.Stanley | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ |
| 312 | S.Stanley | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ |
| 378 | S.Weltevreden | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 131 | S.Stanley | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ |
| 262 | S.Weltevreden | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| 145 | S.Weltevreden | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| 454 | **Unknown** | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| 5 | S.Weltevreden | ■ | ■ | ■ | | | | |
| L27 | S.Typhimurium | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| L28 | S.Typhimurium | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| L17 | S.Typhimurium | ■ | ■ | ■ | | ■ | | |
| 483 | **unknown** | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| en13 | S.Derby | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | |
| en6 | S.Derby | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 487 | S.Enteritidis | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 450 | S.Enteritidis | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 402 | S.Enteritidis | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| L24 | S.Enteritidis | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 393 | S.Enteritidis | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 49 | S.Enteritidis | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 411 | **Unknown** | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| 125 | S.Give | ■ | | | | | | |
| 4 | *S*. Derby | ■ | ■ | ■ | | | | |

**ผลการทดลองที่ 8 รูปแบบของ Virulence gene ที่แตกต่างกัน (Virulotypes) และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp.จำนวน 17 serotype และ 8 unknowns**

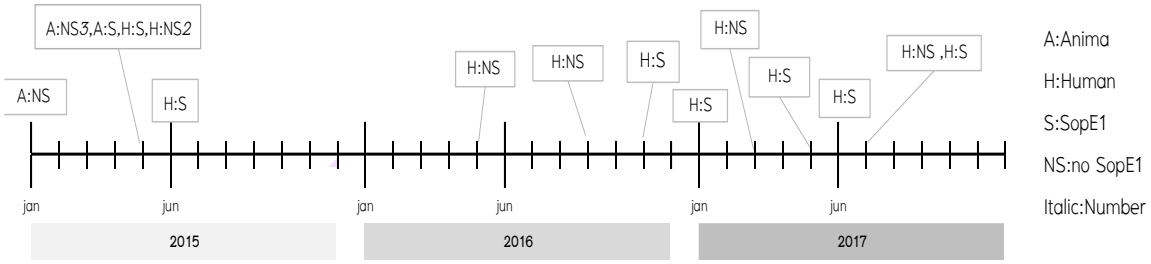
การศึกษารูปแบบของ Virulotypes และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 17 serotype และ 8 unknowns พบว่า S. 4,5,12:i- ส่วนใหญ่ (n =18) แสดงรูปแบบของ Virulotypes เป็น 2 รูปแบบ คือมี *sop*E1 (n=10, V_1) และไม่มี *sop*E1 (n=8, V_2) โดยมีขนาดของ CRISPR 2 อยู่ที่ 1,600 bps ส่วน *S.*Typhimurium แสดงรูปแบบของ Virulotypes 2 รูปแบบ ซึ่งทั้งสองรูปแบบไม่มี *sop*E1 ทั้งคู่เหมือน S. 4,5,12:i- แต่จะต่างกันที่ยีน *agf*A แทนและขนาดของ CRISPR 2 อยู่ที่ 1,700 bps ส่วน *S.* Enteritidis พบ Virulotypes เป็น 3 รูปแบบที่แตกต่างกันแต่มีขนาดของ CRISPR 2 เท่ากันซึ่งมีขนาดอยู่ที่ 800 bps ซึ่ง serotype อื่นๆก็เช่นกันแม้จะเป็น serotype เดียวกันหรือมีขนาดของ CRISPR 2 เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน แต่เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของ Virulent genes ร่วมกับ CRISPR 2 สามารถ subtype *S.* 4,5,12:i- ได้ทั้งหมด 4 รูปแบบ (V_1–V_4) ดังตารางที่ 11

**ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบของ Virulotypes และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 17 serotype และ 8 unknowns**

| Serotypes | Number of strains(n) | Clade | CRISPR 2 (bps) | Virulotypes | Virulent genes | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | *Inv* A | *bcf* C | *csg* A | *agf* A | *sod* C1 | *Sop* E1 | *gip* A |
| | 9 | 1 | 1600 | V_1 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| | 1 | 1 | 1550 | V_1 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| *S.* 4,5,12:i:– * | 8 | 1 | 1600 | V_2 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| | 2 | 1 | 1600 | V_3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| | 1 | 1 | 1600 | V_4 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | | |
| *S* .Typhimurium* | 2 | 3 | 1700 bp | V_1 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| | 1 | 3 | 1700 bp | V_5 | ■ | ■ | ■ | | ■ | | ■ |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | | 100% | | 100% |
| | 3 | 3 | 800 bp | V_6 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| *S.* Enteritidis* | 2 | 3 | 800 bp | V_7 | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | |
| | 1 | 3 | 800 bp | V_8 | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | | 100% | 100% | |
| | 1 | 3 | 1650 | V_5 | ■ | ■ | ■ | | ■ | | ■ |
| *S.* Weltevraden* | 1 | 3 | 1500 | V_1 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| | 1 | 3 | 1600 | V_5 | ■ | ■ | ■ | | | | ■ |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | | 100% | | 100% |
| | 1 | 3 | 1500 | V_9 | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ |
| *S.* Stenley* | 1 | 3 | 1500 | V_10 | ■ | ■ | ■ | | | | ■ |
| | 1 | 3 | 1600 | V_11 | ■ | ■ | ■ | ■ | | | ■ |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | | | | 100% |
| *S* .Derby | 1 | 3 | 950 | V_12 | ■ | ■ | ■ | | | ■ | |
| | 1 | 3 | 900 | V_13 | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | | | | |
| *S* .Agona | 1 | 2 | 700 bps | V_14 | ■ | ■ | ■ | | | | |
| | 1 | 3 | 700 bps | V_15 | ■ | ■ | | | | | |
| | | | | | 100% | 100% | | | | | |
| *S* .Kentucky | 1 | 2 | 1800 | V_16 | ■ | ■ | ■ | | | | ■ |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | | | | |
| *S.* Saintpaul | 1 | 2 | 1500 | V_6 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| *S* .Corvallis | 1 | 2 | 1400 | V_14 | ■ | ■ | ■ | | | | |
| *S* .Krefeld | 1 | 2 | 2000 | V_14 | ■ | ■ | ■ | | | | |
| *S* .Braenderup | 1 | 2 | ND | V_14 | ■ | ■ | ■ | | | | |
| *S.* Montedeveo | 1 | 2 | 1550 | V_15 | ■ | ■ | | | | | |
| *S.* Barielle | 1 | 2 | 850 bps | V_14 | ■ | ■ | ■ | | | | |
| *S.* Kedouko | 1 | 2 | 900 bps | V_14 | ■ | ■ | ■ | | | | |
| *S* .Give | 1 | 3 | 450 bps | V_16 | ■ | | | | | | |
| *S.* Schwarzengrund | 1 | 2 | 1300 bps | V_14 | ■ | ■ | ■ | | | | |
| | | | | | 100% | | | | | | |
| Unknown | | | | | | | | | | | |
| 482(*S.* Typhimurium) | 1 | 2 | 1000 | V_2 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 411 (*S.* Panama) | 1 | 2 | 700 | V_8 | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| 466 (*S.* Bovismorbificans) | 1 | 2 | 1000 | V_7 | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | |
| 483 (*S* . Newport) | 1 | 2 | 1500 | V_3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 443 (*S* .Krefeld) | 1 | 3 | 2000 | V_17 | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 475 (*S* . Albany) | 1 | 3 | 2000 | V_17 | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 495 (*S* .Stanley) | 1 | 3 | 400 | V_17 | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 454 (*S* .Weltevraden) | 1 | 3 | 1900 | V_8 | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| | | | | | 100% | 100% | 100% | | | | |

**ผลการทดลองที่ 9 การวิเคราะห์การกระจายตัวของ *S*.4,5,12:i จำนวน 2 subtype (V_1-V_2) ในระหว่างปี ค.ศ. 2015-2017**

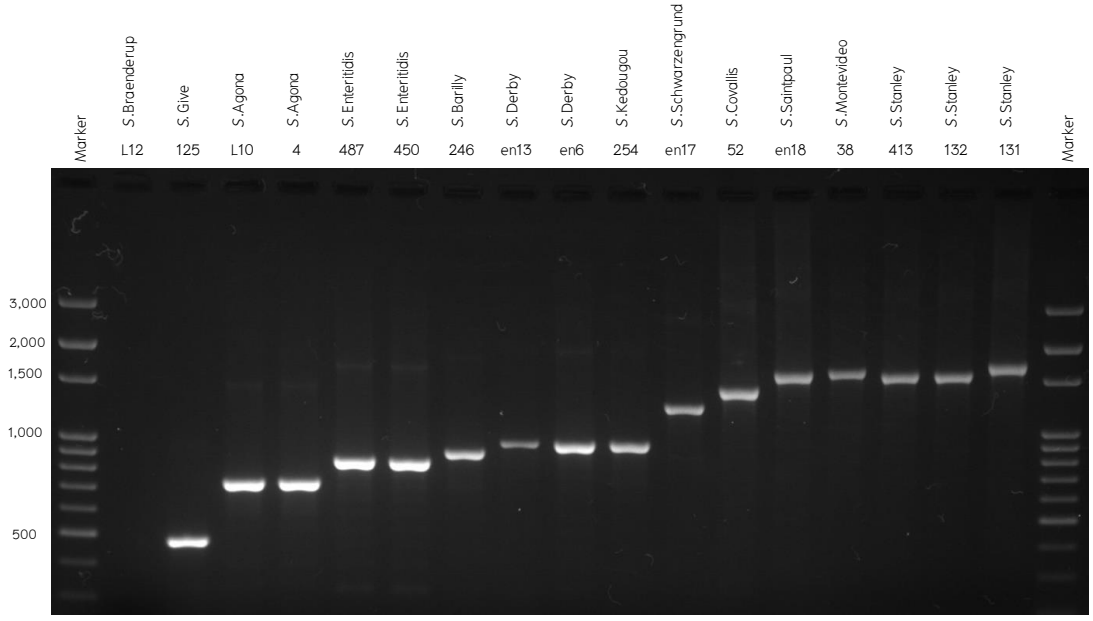
การวิเคราะห์การกระจายตัวของ *S*. 4,5,12:I จำนวน 2 subtype จำนวน 21 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยาราม 16 ตัวอย่าง ได้จากสัตว์ 5 ตัวอย่าง โดยรูปแบบของ 2 subtype มีความแตกต่างกันคือการมีหรือไม่มีของ virulence gene *Sop*E1 พบว่าเชื้อที่ได้จากผู้ป่วย มี *Sop*E 10 (V_1) จำนวน 13ตัวอย่าง และ ไม่มี *Sop*E1 (V_2) จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งในสัตว์พบรูปแบบ subtype ของ *S*. 4,5,12:i รูปแบบเดียวคือ ที่ไม่มี *Sop*E1 จากการศึกษาการกระจายตัวของ *S*. 4,5,12:i จำนวน 2 subtype พบมีการกระจายตัวอยู่สองช่วง คือช่วงที่หนึ่งเดือนมกราคมถึงเดือนเมษายนปี 2015 และช่วงที่สองเดือนกรกฎาคมปี ค.ศ. 2016 – กรกฎาคมปี ค.ศ. 2017 พบว่า *S*. 4,5,12:i ที่ได้จากผู้ป่วยมี *Sop*E1 จำนวน 13 ตัวอย่าง ไม่มี *Sop*E1 จำนวน 3ตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่ subtype (*Sop*E1) อยู่ในช่วงการกระจายที่สอง (N=9) โดยในสัตว์พบการกระจายในช่วงแรก ซึ่งในจำนวนทั้งหมด 3 ตัวอย่างเป็น subtype ที่ไม่มี *Sop*E1



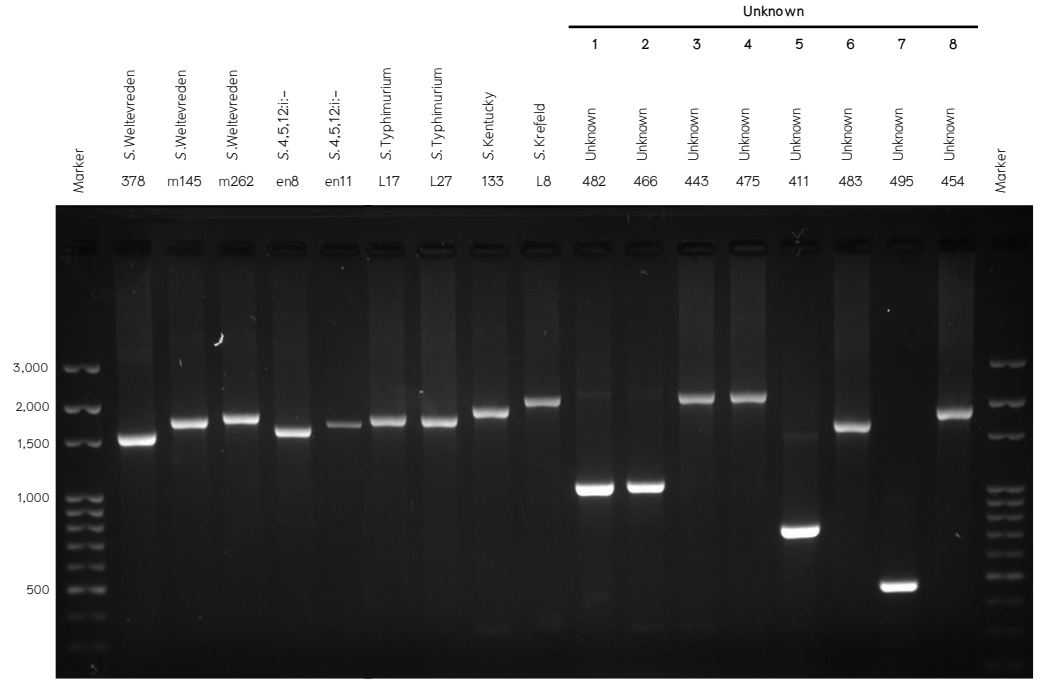

**ภาพที่ 25 การกระจายตัวของ *S*. 4,5,12:I จำนวน 21 ตัวอย่างในระหว่างปี ค.ศ. 2015-2017**

**ผลการทดลองที่ 10 การเปรียบเทียบขนานแบนของ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. 17 serotype และ 8 unknown ในการตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp.**

การวิเคราะห์ CRISPR 2 ใน 17 serotype และ 8 unknown ของเชื้อ *Salmonella* spp. ผลที่ได้พบว่าขนาดของแบนอยู่ในช่วง 500–2,500 bps แต่ *S.* Braenderup ไม่ขึ้นแสดงแบน ซึ่ง *S.* Give, *S.* Agona, *S.* Enteritidis, *S.* Schwarzen และ *S.* Covallis แสดงขนาดของแบนไม่ซ้ำกันซึ่งอยู่ในช่วง 480–1,300 bps โดย *S.* 4,5,12:i:– และ *S.* Typhimurium ขนาดของแบนจะอยู่ประมาณ 1,500–1,600 bps ซึ่งแสดงถึงรูปแบบที่จำเพาะต่อ serotype โดยจากการทดลองนี้ตัวอย่าง 8 unknown มีขนาดแบนอยู่ 500–1,600 bps แต่ก็ยังไม่สามารถระบุซีโรไทป์ (Serotype) ของตัวอย่างดังกล่าวได้ ดังภาพที่ 26–27




**ภาพที่ 26 ผลซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ CRISPR 2 ร่วมกับ gel electrophoresis ชุดที่ 1**




**ภาพที่ 27 ผลซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ CRISPR 2 ร่วมกับ gel electrophoresis ชุดที่ 1**

การวิเคราะห์ CRISPR 2 ใน 17 serotype และ 8 unknown โดยวิเคราะห์จากรูปแบบของ spacer ซึ่งรูปแบบ และการเรียงตัวของ spacer จะมีความจำเพาะต่อ serotype และนำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ไปเปรียบเทียบข้อมูลจาก WGS ที่วิเคราะห์ผ่านเว็บ พบว่าขนาดความยาวและจำนวน spacer ของตัวอย่างกันเคียงกัน โดยรูปแบบของ spacer จะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ CRISPR2 (C2) กับ *Salmonella* serotype โดยขนาดของ C2 มีขนาดที่จำเพาะต่อ Salmonella serotypes เป็นส่วนใหญ่ เช่น *S.*4,5,12:i:– มีขนาดของ C2 ที่ 1,600 bps *S.* Derby มีขนาดของ C2 ที่ 1,000 bps และไม่จำเพาะต่อ *Salmonella* serotypes บางชนิด เช่น *S.* Weltevreden และ *S.* Stanly และผลที่ได้จากการวิเคราะห์ขนาดแบนมีความจำเพาะจาก *Salmonella* spp. ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึง serotype sequence type (ST) ได้ โดย S. 4,5,12:i:– *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis บ่งชี้ถึง ST34 ST19 และ ST11 ตามลำดับ และ. *S.* Stanley และ *S.* Weltevreden มีขนาดของแอมพิคอนใกล้เคียงกันซึ่งบ่งชี้ถึง ST29 และ ST365 เช่นกัน ดังตารางที่ 12

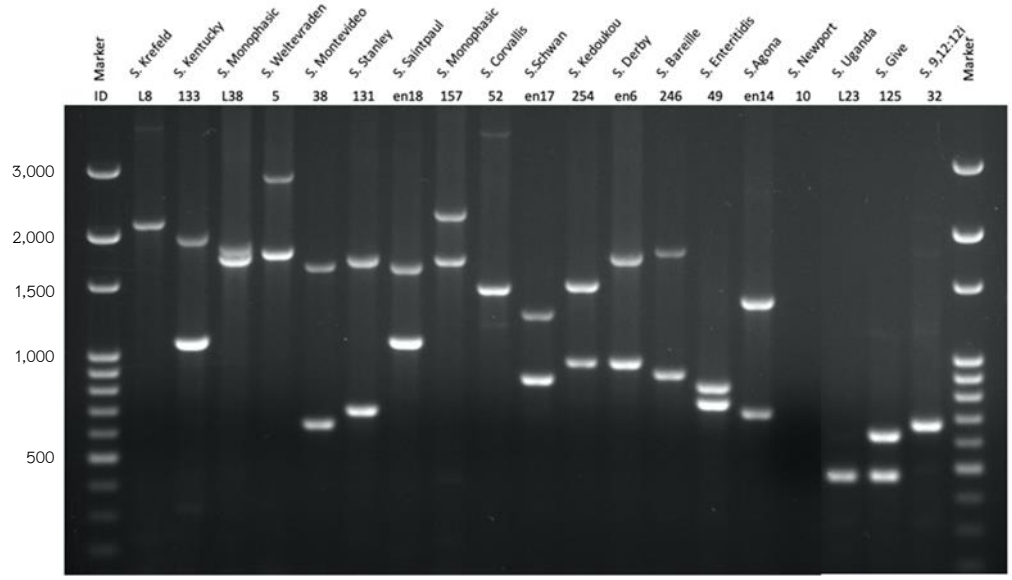
ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า CRISPR 2 สามารถใช้ข้อมูลจาก WGS ในการทำนาย serotype ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึง serotype sequence type (ST) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นวิธีทางเลือกในการตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ *Salmonella* spp.

**ตารางที่ 12 แสดงลักษณะรูปแบบของ spacer ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 17 serotype และ 8 unknown ที่ศึกษาในครั้งนี้**

| NO | Isolated | C2 (Fragment) | S1 | S2 | S3 | S7 | S8 | S9 | s16 | s17 | Serotypes | Expected C2 Fragments | Expected number of spacers C2 | Expected ST | WGS data Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | L12 | 0 | | | | | | | | | S.Braenderup | 0 | 18 | 22 | SAL_BA8466AA |
| 2 | m125 | 450 | ParAB0 | CheB1 | CheB2 | | | | | | S.Give | 465 | 6 | 516 | SAL_XA8594AA |
| 3 | L10 | 700 | AgoB1 | AgoB2 | AgoB3 | AgoB7 | AgoB8 | | | | S.Agona | 752 | 8 | 13 | SAL_DB2207AA |
| 4 | m4 | 700 | AgoB1 | AgoB2 | AgoB3 | AgoB7 | AgoB8 | | | | S.Agona | 752 | 8 | 13 | SAL_DB2207AA |
| 5 | 487 | 850 | EntB0 | EntB1 | EntB2 | EntB6 | EntB7 | EntB8 | | | S.Enteritidis | 833 | 10 | 11 | SAL_XA8590AA |
| 6 | 450 | 850 | EntB0 | EntB1 | EntB2 | EntB6 | EntB7 | EntB8 | | | S.Enteritidis | 833 | 10 | 11 | SAL_XA8590AA |
| 7 | m246 | 900 | STMB0 | STMB32 | STMB2 | STMB32 | STMB4 | STMB5 | | | S.Barilly | 950 | 11 | 909 | SAL_XA8606AA |
| 8 | en13 | 1000 | DerB1 | DerB2 | DerB3 | DerB13 | DerB7 | DerB9 | | | S.Derby | 1014 | 13 | 40 | SAL_FA4928AA |
| 9 | en6 | 1000 | DerB1 | DerB2 | DerB3 | DerB13 | DerB7 | DerB9 | | | S.Derby | 1014 | 13 | 40 | SAL_FA4928AA |
| 10 | m254 | 1000 | EnuB1 | EnuB2 | 3 | 7 | Newp13 | kra16var | | | S.Kedougou | 953 | 12 | 1543 | SAL_XA8603AA |
| 11 | en17 | 1300 | ParBB5 | STMB32 | BovB1 | Swa3 | Swa4 | Swa5 | SwaB12 | SwaB13 | S. Schwarzengrund | 1258 | 17 | 96 | SAL_DA7383AA |
| 12 | m52 | 1400 | MaraB1 | NapB4 | AltB23 | LexB8 | LexB8 | 9 | SenB13 | JavB1 | S.Covallis | 1441 | 20 | 1541 | SAL_XA8588AA |
| 13 | en18 | 1500 | ParBB1 | StpB3 | StpB27 | StpB15 | StpB7 | StpB8 | StpB22 | StpB23 | S.Saintpaul | 1563 | 22 | 50 | SAL_FA2386AA |
| 14 | m38 | 1550 | JavB1 | MonB39 | MonB40 | MonB44 | MonB45 | MonB56 | MonB46 | MonB48 | S.Montevideo | 1625 | 23 | 1531 | SAL_XA8587AA |
| 15 | 413 | 1500 | EntB0 | IndB1 | EntB10 | NewpB34var1 | BloB1 | MbaB38 | NiaB2 | StaB6 | S.Stanley | 1686 | 24 | 29 | SAL_XA8593AA |
| 16 | 132 | 1500 | EntB0 | IndB1 | EntB10 | NewpB34var1 | BloB1 | MbaB38 | NiaB2 | StaB6 | S.Stanley | 1686 | 24 | 29 | SAL_XA8593AA |
| 17 | 131 | 1600 | EntB0 | IndB1 | EntB10 | NewpB34var1 | BloB1 | MbaB38 | NiaB2 | StaB6 | S.Stanley | 1686 | 24 | 29 | SAL_XA8593AA |
| 18 | 378 | 1500 | ChoB16 | WelB2 | WelB3 | WelB5 | WelB6 | WelB7 | WelB22 | WelB23 | S.Weltevreden | 1808 | 26 | 365 | SAL_XA8578AA |
| 19 | m145 | 1770 | ChoB16 | WelB2 | WelB3 | WelB5 | WelB6 | WelB7 | WelB22 | WelB23 | S.Weltevreden | 1808 | 26 | 365 | SAL_XA8578AA |
| 20 | 262 | 1800 | ChoB16 | WelB2 | WelB3 | WelB5 | WelB6 | WelB7 | WelB22 | WelB23 | S.Weltevreden | 1808 | 26 | 365 | SAL_XA8578AA |
| 21 | en8 | 1450 | STMB0 | STMB32 | STMB1 | STMB5 | STMB6 | STMB7 | STMB14 | STMB15 | S.4,5,12:i:- | 1686 | 23 | 34 | SAL_XA8579AA |
| 22 | en11 | 1600 | STMB0 | STMB32 | STMB1 | STMB5 | STMB6 | STMB7 | STMB15 | STMB16 | S.4,5,12:i:- | 1686 | 24 | 34 | SAL_XA8579AA |
| 23 | L17 | 1700 | STMB0 | STMB32 | STMB1 | STMB5 | STMB6 | STMB7 | STMB13 | STMB14 | S.Typhimurium | 1809 | 26 | 19 | SAL_CB8211AA |
| 24 | L27 | 1700 | STMB0 | STMB32 | STMB1 | STMB5 | STMB6 | STMB7 | STMB13 | STMB14 | S. Typhimurium | 1809 | 26 | 19 | SAL_CB8211AA |
| 25 | m133 | 1800 | EntB39 | IndB1 | KenB1 | KenB5 | KenB6 | KenB7 | KenB59 | KenB20 | S.Kentucky | 1809 | 26 | 696 | SAL_XA8595AA |
| 26 | L8 | 2000 | AgoB1 | WorB1 | WorB2 | EntB40 | TenB2var1 | 9 | 16 | 17 | S.Krefeld | 2173 | 32 | 3157 | SAL_YA8552AA |
| | Unknown | | | | | | | | | | Conventional Typing | | | | |
| 27 | 482 | 1000 | STMB0 | STMB32 | STMB1 | STMB21 | STMB22 | STMB23 | | | S.Typhimurium | NA | NA | NA | NA |
| 28 | 466 | 1000 | STMB0 | STMB32 | STMB1 | ParBB7 | BovB1 | BovB2 | | | S.Bovismorbificans | 1075 | 14 | 142 | SAL_ZA1179AA |
| 29 | 443 | 2100 | AgoB1 | WorB1 | WorB2 | EntB40 | TenB2var1 | 9 | 16 | 17 | S.Krefeld | 2173 | 32 | 746 | SAL_YA8552AA |
| 30 | 475 | 2100 | AlbB3 | AlbB4 | Kot26 | AlbB5 | AlbB6 | AlbB7 | Soe7 | AlbB22 | S.Albany | 2173 | 32 | 292 | SAL_XA8577AA |
| 31 | 411 | 850 | PanB1 | ParAB0var1 | PanB2 | PanB3 | PanB4 | PanB5 | | | S.Panama | 773 | 9 | 48 | CP012346.1 |
| 32 | 483 | 1600 | ParAB0 | InfB1 | NewpB1 | NewpB2 | KotB10 | NewpB3 | 16 | 17 | S.Newport | 1501 | 17 | 46 | CP039436.1 |
| 33 | 495 | 450 | EntB0 | IndB1 | EntB10 | spcer4 | NA | NA | NA | NA | S.Stanley | NA | NA | NA | NA |
| 34 | 454 | 1800 | ChoB16 | WelB2 | WelB3 | ChoB17 | ChoB18 | WelB4 | WelB22 | WelB23 | S.Weltevreden | 1808 | 26 | 365 | SAL_XA8578AA |

**ผลการทดลองที่ 12 การตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) โดยใช้ CRISPR 1 และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 19 serotype ที่แตกต่างกัน**

การวิเคราะห์หาซีโรไทป์ (serotype) ของเชื้อ S*almonella* spp. โดยใช้ CRISPR 1 ร่วมกับ CRISPR 2 มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดีกว่า CRISPR 2–MLVA และ HRM–PCR โดยการใช้ CRISPR 1 ร่วมกับ CRISPR 2 จะได้รูปแบบและขนาดของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 ที่จำเพาะต่อ *Salmonella* serotype ที่แตกต่างกันซึ่งสังเกตได้จากรูปแบบเจลดังรูปที่ 28 ไม่ต้องอาศัยการ sequencing ซึ่งวิเคราะห์ผลโดยการปรียบเทียบขนาดแบนของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 กับ *Salmonella* spp. ที่ทราบ serotype ผ่านการ conventional typing พบว่าส่วนมากแต่ละ Serotype จะปรากฏแบน 2 ขนาดต่อ 1 serotype ซึ่งจะมีบาง serotype เท่านั้นที่จะพบแบนเพียงขนาดเดียว เช่น *S.* Krefeld และ *S.* Uganda แต่ *Salmonella* spp. บาง serotype ไม่พบแบนของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 เช่น *S.* Newport และในกรณีของ *S.* 4,5,12:i:– และ *S.* Enteritidis มีขนาดของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 ใกล้เคียงกันอาจจะต้องใช้เวลาในการรันเจลให้มากขึ้นเพื่อแยกความแตกต่าง ดังนั้นคาดว่าเราสามารถใช้เทคนิค CRISPR 1 ร่วมกับ CRISPR 2 เพื่อทดสอบหา *Salmonella* serotype และการกระจายตัวที่สูงอย่างรวดเร็ว โดยไม่อาศัยการ sequencing




**ภาพที่ 28 ขนาด CRISPR 1 และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 19 serotype ที่แตกต่างกัน**

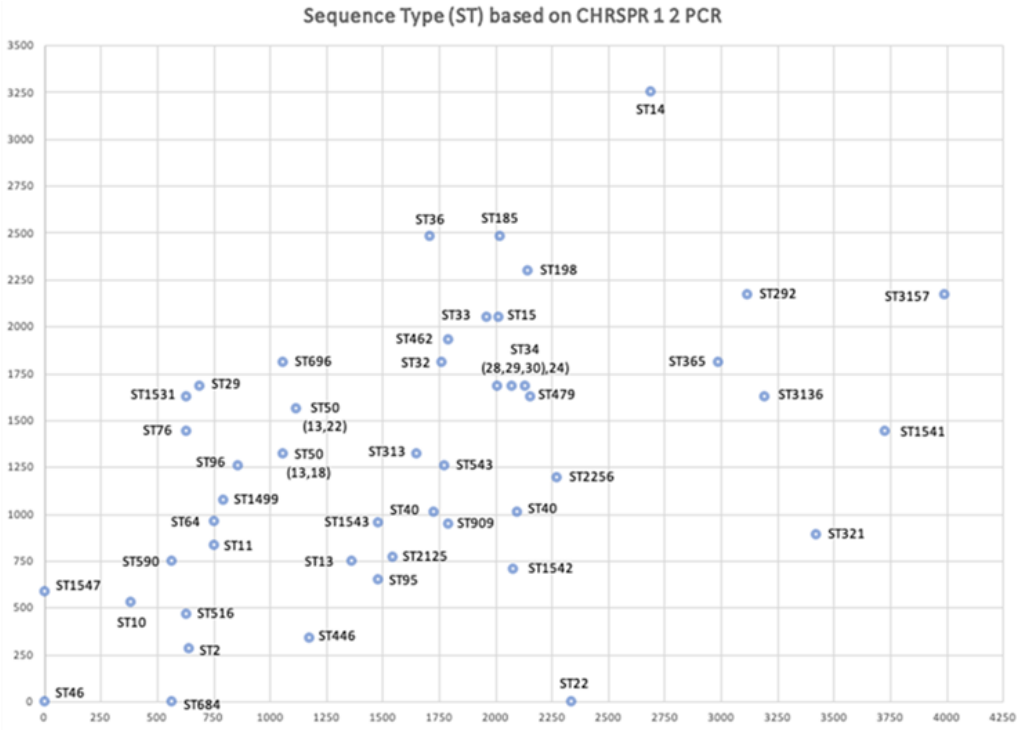
**ผลการทดลองที่ 13 การวิเคราะห์ขนาดของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 จาก WGS ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 40 serotype ที่แตกต่างกัน**

การวิเคราะห์ขนาดของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 จาก public WGS ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 40 ชนิด ที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์ใช้โปรแกรม WGS (Mega 6) และโปรแกรม CRISPR Cas Finder (https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/) พบว่า *Salmonella* serotype ที่แตกต่างกันจะมีความจำเพาะของรูปแบบและจำนวน spacer ของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 โดย CRISPR 1 มีจำนวน spacer อยู่ระหว่าง 0-60 spacer ซึ่งมีความยาวประมาณ 384-3,990 bps โดย CRISPR 2 มีจำนวน spacer อยู่ระหว่าง 0-48 spacer ซึ่งมีความยาวประมาณ 282-3,252 bps ทั้งนี้จำนวนของ spacer ที่มากขึ้นจะสัมพันธ์กับความยาวของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 ซึ่ง *Salmonella* serotype ที่แตกต่างกันจะมีรูปแบบและจำนวนของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 spacer ที่จำเพาะ รวมไปถึงความจำเพาะของขนาดแบน CRISPR 1 และ CRISPR 2 จากวิเคราะห์ WGS เราสามารถบ่งชี้ eBG และ ST ของ *Salmonella* serotype ชนิดต่าง ๆ ได้ดังตารางที่ 13

การแสดงผลการวิเคราะห์หา serotype ที่แตกกัน 40 จาก WGS เราแสดงผลในรูปแบบของกราฟ โดยใช้ข้อมูลความยาวของ CRISPR 1 (bps) เป็นแกน x และความยาว CRISPR 2(bps) เป็นแกน y การแสดงผลดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการแสดง serotype ชนิดต่าง ๆ และมีความง่ายของการวิเคราะห์ serotype ทั้งนี้เราสามารถใช้การแสดงผลนี้ในการบ่งชี้ subtype ได้ เช่น ST34 พบทั้งหมดสาม subtype เป็น subtype ที่มี CRISPR สามจำนวนคือ 28 29 และ 30 เป็นต้นดังภาพที่ 29

ตารางที่ 13 แสดงขนาดของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 จาก WGS ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 40 serotype ที่แตกต่างกัน

| Numbers | Serotypes | eBG | ST | Spacers C1 | Spacers C2 | Predicted C1 Fragments | Predicted C2 Fragments | WGS data | Country |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | S. Newport | 3 | 46 | NA | NA | 0 | 0 | SAL_XA8581AA | Thailand |
| 2 | 9,12:-:1,5 | 17 | 1547 | 6 | 6 | 0 | 587 | SAL_XA8584AA | Thailand |
| 3 | Dublin | 53 | 10 | 0 | 5 | 384 | 527 | SAL_BB8329AA | Thailand |
| 4 | S. Uganda | 157 | 684 | NA | NA | 564 | 0 | SAL_YA4616AA | Taiwan |
| 5 | Amstedum | 183 | 590 | 5 | 20 | 567 | 752 | SAL_GA9742AA | Thailand |
| 6 | Give | 67 | 516 | 6 | 4 | 628 | 465 | SAL_XA8594AA | Thailand |
| 7 | Emek | 311 | 76 | 6 | 20 | 628 | 1441 | SAL_IB4848AA | Thailand |
| 8 | Montevideo | 40 | 1531 | 6 | 23 | 628 | 1625 | SAL_XA8587AA | Thailand |
| 9 | Thyphi | 13 | 2 | 6 | 0 | 642 | 282 | SAL_AA8490AA | Thailand |
| 10 | Stanley | 29 | 29 | 7 | 24 | 689 | 1686 | SAL_XA8593AA | Thailand |
| 11 | Enteritidis | 4 | 11 | 8 | 10 | 750 | 833 | SAL_XA8590AA | Thailand |
| 12 | Anatum | 65 | 64 | 8 | 12 | 750 | 959 | SAL_BA1529AA | Thailand |
| 13 | Bovismorbific | 34 | 1499 | 9 | 14 | 794 | 1076 | SAL_FA5988AA | Thailand |
| 14 | Schwarzengrund | 33 | 96 | 10 | 17 | 860 | 1258 | SAL_DA7383AA | Thailand |
| 15 | 4,5,12:i:- | 1 | 19 | 10 | 26 | 872 | 1807 | SAL_BB8263AA | Thailand |
| 15 | Saintpaul | 14 | 50 | 13 | 18 | 1055 | 1319 | SAL_VA7373AA | Franch |
| 16 | Kentucky | 320 | 696 | 13 | 26 | 1056 | 1809 | SAL_XA8595AA | Thailand |
| 17 | Saintpaul | 14 | 50 | 13 | 22 | 1117 | 1563 | SAL_FA2386AA | Thailand |
| 18 | Hvittingfoss | 259 | 446 | 15 | 2 | 1177 | 342 | SAL_IB4772AA | Thailand |
| 19 | Agona | 54 | 13 | 18 | 0 | 1360 | 752 | SAL_DB2207AA | Thailand |
| 20 | Kedougou | 291 | 1543 | 20 | 12 | 1482 | 953 | SAL_XA8603AA | Thailand |
| 21 | Thompson | 265 | 2125 | 21 | 9 | 1544 | 771 | SAL_CA7731AA | Thailand |
| 22 | Typhimurium | 1 | 313 | 21 | 18 | 1648 | 1320 | SAL_VA1541AA | Thailand |
| 23 | Typhimurium | 138 | 36 | 22 | 37 | 1709 | 2479 | SAL_VA1501AA | Thailand |
| 24 | 4,5,12:i:- | 1 | 19 | 22 | 26 | 1709 | 1808 | SAL_CB4737AA | Canada |
| 25 | Derby | 57 | 40 | 24 | 13 | 1724 | 1014 | SAL_GA1617AA | Franch |
| 25 | Infantis | 31 | 32 | 24 | 26 | 1764 | 1809 | SAL_DA8557AA | Thailand |
| 26 | Livingstone | 255.1 | 543 | 25 | 17 | 1775 | 1258 | SAL_IB4755AA | Thailand |
| 27 | Bareilly | 206 | 909 | 25 | 11 | 1788 | 950 | SAL_XA8606AA | Thailand |
| 28 | Singapore | 84 | 462 | 25 | 28 | 1789 | 1929 | SAL_FA8436AA | Thailand |
| 29 | Hadar | 22 | 33 | 28 | 30 | 1960 | 2051 | SAL_DA7410AA | Thailand |
| 30 | 4,5,12:i:- | 1 | 34 | 28 | 24 | 2009 | 1686 | SAL_XA8592AA | Thailand |
| 31 | Heidenberg | 26 | 15 | 30 | 27 | 2013 | 2052 | SAL_GA3792AA | Thailand |
| 32 | Senftenberg | 30 | 185 | 29 | 37 | 2021 | 2479 | SAL_DA2592AA | Thailand |
| 33 | 4,5,12:i:- | 1 | 34 | 29 | 24 | 2070 | 1686 | SAL_XA8600AA | Thailand |
| 34 | Lexinton | 254 | 1542 | 30 | 8 | 2080 | 709 | SAL_DA1663AA | Thailand |
| 35 | Derby | 57 | 40 | 30 | 13 | 2093 | 1014 | SAL_FA4928AA | Thailand |
| 36 | 4,5,12:i:- | 1 | 34 | 30 | 24 | 2131 | 1686 | SAL_XA8579AA | Thailand |
| 37 | Kentucky | 56 | 198 | 31 | 34 | 2141 | 2296 | SAL_VA1539AA | Thailand |
| 38 | Rissen | 66 | 469 | 31 | 23 | 2153 | 1624 | SAL_FA4926AA | Thailand |
| 39 | Brunai | 252 | 2256 | 27 | 16 | 2271 | 1198 | SAL_IB4796AA | Thailand |




**ภาพที่ 29 กราฟแสดง Sequence type (ST) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แตกต่างกัน**

**ผลการทดลองที่ 14 ตารางแสดงการเปรียบเทียบวิธีในการใช้ตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) และซับไทป์ (subtype) ของเชื้อ *Salmonella* spp.**

การศึกษานี้เราตราวจสอบ *Salmonella* typing ใช้วิธีการอณูวิทยาอย่างรวดเร็วทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ HRM–PCR CRISPR 2 และ verulotype analysis และ CRISPR 1 ร่วมกับ CRISPR 2 พบว่า วิธี HRM–PCR มีข้อเสีย คือการวิเคราะห์ผลยากและช้า ไม่สามารถบ่งชี้ serotype บาง serotype เช่น *S.* Weltevreden เนื่องด้วยรูปแบบกราฟของ HRM–PCR มีความใกล้เคียงกัน ในกรณีของ CRISPR 2 และ verulotype analysis สามารถแยก *Salmonella* serotype ได้มากแต่จำเป็นต้องใช้กระบวนการ sequencing เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่สูง ซึ่งมีราคาสูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ส่วนวิธี CRISPR 1 ร่วมกับ CRISPR 2สามารถที่จะหา *Salmonella* serotype และ subtype 40 ชนิดได้ การวิเคราะห์ผลของวิธีนี้ เพราะสามารถอ่านผลได้จากผลเจลทันที ค่าใช้จ่ายน้อย และใช้เวลาในการปฏิบัติเวลา ดังนั้นเราพบว่าวิธี CRISPR 1 ร่วมกับ CRISPR 2 มีประสิทธิภาพที่สุดการหาการกระจายของเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์ *Salmonella* serotype ยังไม่ครอบคลุมเราจำเป็นต้องทำเจลของ serotype ให้มากขึ้น และนำข้อมูลไปตรวจสอบกับ WGS เพื่อทดสอบความถูก และเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการ

**ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบวิธีในการใช้ตราวจสอบซีโรไทป์ (serotype) และซับไทป์ (subtype) ของเชื้อ *Salmonella* spp.**

| Feature | HRM-PCR | CRISPR 2 and verulotype analysis | CRISPER 1+2 |
|---|---|---|---|
| Gene target | *flj*B *gyr*B and *ycf*Q | CRISPR 2, MLVA (7), Virulence (7) | CRISPER 1+2 |
| Discriminatory power | Moderate | Excellent | Good |
| Repebility | Excellent | Excellent | Excellent |
| Ease of interpreated of data genrated | Poor | Poor | Excellent |
| Sequesing | No | YES | May be |
| Esae of use | Poor | Poor | Excellent |
| High throughput | NO | No | YES |
| Machine analysis | RT-PCR | Conventional PCR | Conventional PCR |
| Gel elctrophoresis | NO | YES | YES |
| cost | High | High | Low |
| Time (Day) | 1-3 | 5-7 | 1 |

# บทที่ 5

# สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการหา serotype ของเชื้อ *Salmonella* spp. (*Salmonella* typing) โดยใช้เทคนิคโมเลกุลอย่างรวดเร็ว และศึกษาลักษณะการแพร่กระจายของ Salmonella spp. (*Salmonella* transmission routes) ของ *Salmonella* serotype ที่ระบาดมากจากสัตว์เศรษฐกิจสู่มนุษย์ ซึ่งได้เชื้อจากผู้ป่วยโรงพยาบาลพะเยาราม จำนวน 43 ตัวอย่าง และได้จากจากสัตว์จำนวน 16 ตัวอย่าง (ประกอบไปด้วย หมู 10 ตัวอย่าง ไก่ 5 ตัวอย่าง แพะ 1 ตัวอย่าง) ในระหว่างเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2558 ถึงเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2560 จากทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. จัดเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonoses) (Antillés Silva, & Noelia. 2014) ซึ่งก่อให้เกิดโรคสำคัญในระบบทางเดินอาหารเป็นสาเหตุของการเกิดโรค Gastroenteritis โดยส่วนมากจะส่งผลรุนแรงในเด็กที่ช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 5 ปี และในผู้สูงอายุ (Antillés Silva, & Noelia. 2014) โดยความรุนแรงของเชื้อ การดื้อยาปฏิชีวนะ และความจำเพาะของโฮสต์จะสัมพันธ์กับ *Salmonella* serotype (Eng S-KK, et al., 2015b) เช่น กรณีของการติดเชื้อ *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน เนื่องจากเชื้อมีความสามารถแทรกตัวข้ามผ่านผนังลำไส้ใหญ่เข้าสู่ระบบเลือดทำให้โรคทั้งระบบ (Gordon MA, et al., 2008) โดยวิธีมาตราฐานในการตรวจสอบ *Salmonella* serotype คือการวิเคราะห์ยีน o-antigens (wzxC2, rfbJ, prt, tyv, wzxE, wzxC1, prt) และ H-antigens (fliC and fljB) ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีความยุ่งยาก ใช้เวลาค่อนข้างมาก และต้องใช้ผู้เชียวชาญในการทำการวิจัย (Hendriksen, & R. S. 2010) เราจึงได้นำวิธีการทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้ในการตรวจสอบ *Salmonella* serotype ซึ่งประกอบด้วยเทคนิค HRM-PCR เป็นการใช้ไพเมอร์จาก 3 ยีนในการตรวจสอบ *Salmonella* serotype โดยวิเคราะห์จากรูปแบบของกราฟ HRM เกิดขึ้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวพิสูจน์แล้วว่าใช้ได้จริงในประเทศสวีเดนและประเทศไทย (Zeinzinge, et al., 2012; Pooncharoen, et al., 2019a) จึงพัฒนาวิธีการตราวจสอบ serotype และ subtype ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ CRISPR loci พบว่า CRISPR 2 มีความสามารถในการ serotyping และ subtyping ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ โดยวิเคราะห์ผลจากขนาดและรูปแบบของแบนที่เกิดขึ้นOkd agarose gel electrophoresis และการวิเคราะห์ CRISPR fragment โดยใช้ HRM-

PCR (Rahn K, et al., 1992) โดยทั่วไปแล้วการใช้เทคนิค MLVA จะใช้ร่วมกับ Capillary Electrophoresis (CE) แต่ในการศึกษานี้เราใช้ CRISPR 2 ร่วมกับ MLVA ในการวิเคราะห์ *Salmonella* serotype เพื่อสร้างรูปแบบลายพิมพ์ดีเอนเอ (DNA fingerprint) ที่จำเพาะต่อ *Salmonella* serotype โดยแปลผลได้จาก agarose gel electrophoresis ได้โดยตรง

*S*.4,5,12:i- เป็นตัวที่พบว่ามีการแพร่ระบาดทั่วโลกสูง แต่ยังความเหมือนกันของสายพันธุ์ (clonal prevalence) ค่อนข้างสูง โดยปกติแล้วสามารถ subtype *S*.4,5,12:i- ได้ด้วยวิธี Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) ร่วมกับ capillary electrophoresis (Lindstedt, et al., 2003) phage typing Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Mandilara et. al., 2006) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ใช้ CRISPR 2 PCR ร่วมกับ High-Resolution Melting (HRM) พบว่าผลของวิธีดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพค่อนข้างน้อย (Fabre, et al., 2012) อย่างไรก็ตามการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ได้ใช้ CRISPR 2 ร่วมกับ virulence gene วิเคราะห์ผลผ่านการรัน agarose gel electrophoresis พบว่าเราสามารถ subtype *S*. 4,5,12:i- โดยพิจารณาจากการ virulence gene (มียีน *sop*E1 และ ไม่มียีน *sop*E1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยจากประเทศจีนที่สามารถ subtype *S*. 4,5,12:i- (ST131) (Yang et al. 2015) และคาดว่า *sop*E1 น่าจะถ่ายทอดให้กันแบบ horizontal (Zhang, et al., 2002) ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในประเทศจีนในการผลิตสุกรมีการศึกษา CRISPR 1 และ CRISPR 2 จากจำนวนตัวอย่าง 173 พบว่า CRISPR TST4 สามารถ subtype ของ *S*. 4,5,12:i- ได้มากที่สุด (Tanmoy, et al., 2020) นอกจากนี้การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า CRISPR-cas สามารถจัดกลุ่ม S. Typhi ที่มีรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกัน ตามความที่เกี่ยวข้องกับสถานที่จากประชากรในแถบภูมิภาคเอเชียใต้ (Tanmoy, et al., 2020) โดยสรุปแล้วการใช้ CRISPR 2-MLVA ในการวิเคราะห์ *Salmonella* serotype สามารถบอก serotype และ subtype S. 4,5,12:i- ทราบถึง sequence type (ST) รวมถึงทราบการกระจายของ *Salmonella* serotype ต่าง ๆ และสามารถใช้วิธีการดังกล่าวเพื่อหาข้อมูลการระบาดของเชื้อในภูมิภาคเพื่อเฝ้าระวังได้ งานในอนาคตอาจนำไปประยุกต์ใช้ โดยมุ่งเน้นไปใช้วิธีการดังกล่าวร่วมกับ serotype อื่น ๆเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของวิธีการนี้ และการวิเคราะห์ *Salmonella* serotype ด้วย CRISPR 1 และ CRISPR 2 พบว่าสามารถตรวจสอบ *Salmonella* serotype ได้โดยไม่ต้อง sequencing และเมื่อวิเคราะห์ผ่าน public WGS ร่วมกับโปรแกรม CRISPR Cas Finder (https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/) ทำให้ทราบถึงรูปแบบและจำนวน spacer ของ CRISPR 1 และ CRISPR 2 ทำให้สามารถแยก *Salmonella* serotype ต่าง ๆได้พร้อมได้รับข้อมูลของ sequence type (ST) ซึ่งวิธีการที่ผู้วิจัยพัฒนามาจดสิทธิบัตรเรียบร้อยแล้ว

งานวิจัยนี้สามารถหากระบวนการตรวจสอบ *Salmonella* serotype ที่มีประสิทธิภาพ มีความง่าย และรวดเร็วได้สำเร็จ ซึ่งวิธีการที่ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือ การใช้ CRISPR ร่วมกับ CRISPR 2 หา *Salmonella* serotype ได้โดยไม่ต้อง sequencing สามารถวิเคราะห์ผลผ่านการอ่านกราฟได้อย่างง่าย และทำให้เราทราบถึงการกระจายตัวของเชื้อ *Salmonella* spp. ในแต่ละภูมิภาคทำให้สามารถเฝ้าระวังการระบาดในอนาคตได้

# บรรณานุกรม


กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. **คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข.** กรุงเทพ:บริษัท แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น. https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/AMR/06.pdf.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. **คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข.** กรุงเทพ:บริษัท แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด

คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ.กระทรวงสาธารณสุข. **การดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย**. [อินเตอร์เน็ต]. 2558. [เข้าถึงเมื่อ4สิงหาคม 63]. สืบค้นจาก: https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/AMR/06.pdf

จารัส พูลเกื้อ.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1. **ความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อหมูและไก่ที่แยกได้จากตลาดสด**. [อินเตอร์เน็ต].2561. [เข้าถึงเมื่อ 23 กรกฎาคม 2563]. สืบค้นขาก: www.dmsc.moph.go.th

ฌาณพรรธน์ ศรีธาดา.รายงานความชุกของการพบเชื้อ *Salmonella* spp. **ในเนื้อสัตว์จาตลาดสดในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง**. [อินเตอร์เน็ต]. 2559 [เข้าถึงเมื่อ 29 กรกฎาคม 2563]. สืบค้นจาก:www. region6.dld.go.th

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ.(2554) **จุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายอนุชา มุมอ่อน, นายวสันต์ เคยเหล่า และนางสุดารัตน์ เคยเหล่า. **แนวทางการควบคุมเชื้อซัลโมเนลล่าในขั้นตอนการผลิตเนื้อไก่ในโรงฆ่า และชำแหละไก่เพื่อการส่งออก**. [อินเตอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 30กรกฎาคม 2563]. สืบค้นจาก: http://certify.dld.go.th/certify/images/article/b09Salmonella.pdf

ภัทรชัย กีรติสิน.(2549) **ตำราวิทยาแบคทีเรียทางการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:ห้างหุ้นส่วนจำกัด.วีเจ.พริ้นติ้ง

ระเบียบกรมปศุสัตว์. **ว่าด้วยการควบคุมโรคแซลโมเนลลาสำหรับสัตว์ปีก**. [อินเตอร์เน็ต]. 2553.[เข้าถึงเมื่อ 14 ตุลาคม 2563] สืบค้นได้: https://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2553/E/140/1.PDF

วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. (2556) **เอนเทอโรแบคริซีอี.** ในอิสยา จันทร์วิทยานุชิต.แบคทีเรียทางการแพทย์.(พิมพ์ครั้งที่ 3/น.226–229). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำ. **การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp**. [อินเตอร์เน็ต]. 2554. [เข้าถึงเมื่อ 29 กรกฎาคม 2563]. สืบค้นจาก:ww.fisheries.go.th

ศ.เกียรติคุณ พญ.นลินี อัศวโภคี, ศ.นพ.ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร และพ.อ.ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ. (2550) **ยาต้านจุลชีพที่สำคัญ 1** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดวี.เจ.พริ้นติ้ง; 2558.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. **Percentage of Susceptible Organisms Isolated From All Specimen, 92 hospitals**, Jan – Dec2019[ อินเทอร์เน็ต].2019. [เข้าถึงเมื่อ 3 สิงหาคม 63 ].สืบค้นจาก: https://www.trathospital.go.th/upload/antibiogram2019_mail.pdf

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. **Percentage of susceptible Organisms Isolated From All Specimen, RMSc 1 & 1/1, 11 hospitals**, Jan – Jun 2018 [อินเทอร์เน็ต].2019. [เข้าถึงเมื่อ 3 สิงหาคม 63 ].สืบค้นจาก: http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms/2019/12/Jan–Dec2019–All.pdf

สมาคมกุมารเวชศาสตร์ทางเดินอาหารและตับ. **แนวทางเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคท้องร่วงเฉียบพลันในเด็ก**. 2562

สำนักระบาดวิทยากระทรวงสาธารณะสุข. **Typhoid**. [อินเตอร์เน็ต]. 2551. [เข้าถึงเมื่อเข้าถึงเมื่อ 3 สิงหาคม 63].เข้าถึงได้จาก: http://mpmedgroup.com/share_file/art_8RAX3HSG.p

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์. **โรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis).** [อินเตอร์เน็ต].2540 [เข้าถึงเมื่อ 20 กรกฎาคม2563]. สืบค้นจาก: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/applications/files/Salmonella1.pdf

อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และ ธันยชัย สุระ. **ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์.** [อินเตอร์เน็ต].2534.[เข้าถึงเมื่อ 6 สิงหาคม 63].สืบค้นจาก: http://www.tsh.or.th/file_upload/files/v1%20n4%20469.pdf

อ.นพ. ชัยวรรธน์ ประดิษฐ์ทองงาม. **โรคติดต่อทางอาหารและน้ำ** [อินเตอร์เน็ต].2567.[เข้าถึงเมื่อ 2 มกราคม2567] สืบค้นได้จาก: https://sriphat.med.cmu.ac.th/th/knowledge–388

โรงพยาบาลศิริราช ปิยมหาราชการุณย์. **โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน.**[อินเตอร์เน็ต].2565.[เข้าถึงเมื่อ 14 มกราคม2567] สืบค้นได้

Antillés Silva, & Noelia. (2014) Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. **Epidemiology and antimicrobial resistance of Salmonella spp. and Campylobacter spp. from wild birds and poultry reared outdoors.** 2014; 2016-04-23T05:45:14Z

Anna Fàbrega & Jordi Vila. (2013) Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews** 26(2):308-41.2013. DOI:10.1128/CMR.00066-12

Acc. Chem. Res. (1984). The mechanisms of reactions of beta-lactam antibiotics Michael. **PageAccounts of Chemical Research** 1984 17 (4), 144-151.DOI: 10.1021/ar00100a00552.

Adrian Muwonge, Franklyn Egbe, Mark Bronsvoort, Demelash B. Areda,Tiny Hlokwe, & Anita Michel. (2019). Molecular Epidemiology of Mycobacteriumbovis in Africa. **Springer Nature Switzerland AG 2019A.** (pp.127-169): https://doi.org/10.1007/978-3-030-18690-6_8127

Ali S & Alsayeqh AF. (2022). Review of major meat-borne zoonotic bacterial pathogens. **Frontiers in Public Health,** 15 Dec 2022. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1045599

Bangtrakulnonth A., Pornreongwong S., Pulsrikarn C., Sawanpanyalert P., Hendriksen RS.,& Wong DMLF.(2004) ***Salmonella*** **serovars from humans and other sources in Thailand,** 1993-2002. Emerging infectious diseases.2004;10(1):131.

Borriello G, Lucibelli MG, Pesciaroli M, Carullo MR, Graziani C, Ammendola S, Battistoni A, Ercolini D, Pasquali P,& Galiero G. (2012). **Diversity of *Salmonella* spp. serovars isolated from the intestines of water buffalo calves with gastroenteritis**. BMC Veterinary Research 8:1. DOI: 10.1186/1746-6148-8-201.

Bush K., Jacoby GA., & Medeiros AA. (1995) **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure**. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1995;39(6):1211.

Caméléna F. Birgy A, Smail Y, Courroux C, Mariani-Kurkdjian P, Le Hello S , Bonacorsi S,&Bidet P.(2019) **Rapid and Simple Universal Escherichia coli Genotyping Method Based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Using Single-Tube Multiplex PCR and Standard Gel Electrophoresis**.2019;(6)12-18

Cohen ML.,& Tauxe RV.(1986) Drug-resistant *Salmonella* in the United States: an epidemiologic perspective. **Science.** 1986;234(4779):964-9.

CRISPR-Cas++. (2021). **What is a CRISPR-Cas system?** [อินเตอร์เน็ต]. 2019. [เข้าถึงเมื่อ 7 ตุลาคม 2563] สืบค้นได้จาก: https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/Home/About

C. Löfström, T. Hansen, S. Maurischat, & B. Malorny.(2016) *Salmonella*: Salmonellosis. **Encyclopedia of Food and Health**.2016, Pages 701-705. Doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00607-3

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, & Arlet G.(2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2010;(65):490–495

Dennis Kunkel Microscopy/science Photo Library. (2018). ***Salmonella* Enterica**. United Kingdom: Science Photo Library (SPL)

Eng S-KK, Pusparajah P, Ab Mutalib N-SS, Ser H-LL, Chan K-GG, & Lee L-HH. (2015b). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**. 8:284–293. DOI:10.1080/21553769.2015.1051243.

Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M., & Weill FX. (2012). Crispr typing and subtyping for improved Laboratory surveillance of *Salmonella* infections. **PLoS ONE 7**. DOI: 10.1371/journal.pone.0036995.

Fahd K. Majiduddin, Isabel C. Materon, & Timothy G. Palzkill. (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. International **Journal of Medical Microbiology.** Volume 292, Issue 2, 2002, Pages 127-137.Doi.org/10.1078/1438-4221-00198

Gordon MA, Graham SM, Walsh AL, Wilson L, Phiri A, Molyneux E, Zijlstra EE, Heyderman RS, Hart CA, & Molyneux ME. (2008). FEpidemics of invasive *Salmonella* enterica serovar enteritidis and S. enterica serovar typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. **Clinical Infectious Diseases.** 46:963–969. DOI: 10.1086/529146.

Hendriksen, & R. S. (2010). **Global epidemiology of non-typhoidal *Salmonella* infections in humans**. Technical University of Denmark.

Herikstad H., Motarjemi Y., & Tauxe R. (2002) *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiology & Infection.** 2002;129(1):1–8.

Jenkins AO, Venter EH, Hutamo K, & Godfroid J. (2010) Comparison of the capillary and agarose electrophoresis based multiple locus VNTR (variable number of tandem repeats) analysis (MLVA) on Mycobacterium bovis isolates. **Vet Microbiol**. 2010 Sep 28;145(1–2):172–6.doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.036. Epub 2010 Mar 7. PMID: 20346599.

Kaminski, M.M., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S. et al. (2021). **CRISPR-based diagnostics.** Nat Biomed Eng 5, 643–656 (2021). https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7

Lindstedt BA, Heir E, Nygård I, & Kapperud G. (2003). Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. J**ournal of Medical Microbiology.** 52:141–149. DOI: 10.1099/jmm.0.04958-0.

Majowicz SE., Musto J., Scallan E., Angulo FJ., Kirk M., O'Brien SJ., et al. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical infectious diseases**. 2010;50(6):882-9

Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ,… , Koonin EV. (2020) Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. **Nat Rev Microbiol.** 2020 Feb;18(2):67–83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31857715.

Mandilara G, Lambiri M, Polemis M, Passiotou M, & Vatopoulos A. (2013). **Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* typhimurium (1,4,[5],12:I:–) in Greece**, 2006 to 2011. Eurosurveillance 18:1–8..

Michel Y Popoff, Jochen Bockemühl, & Linda L Gheesling (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. **Research in Microbiology**. Volume 155, Issue 7, September 2004, Pages 568–570: Doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.005

Nozipho Pamela Tshakan. (2021) **Molecular Epidemiology of Antibiotic Resistant *Salmonella* spp. from Farm to Fork in an Intensive Pig Production System in Kwazulu Natal South Africa**.

Pegues DA., Ohl ME., & Miller SI.(2005) ***Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi**. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Eds. Principles and practice of infectious diseases. 6thed. New York: Churchill Livingstone 2005: 2637.

Pooncharеon K, Narong Nuanmuang, Prommuang P, & Sriisan S. (2019a.) High–resolution melting–curve analysis for serotyping of *Salmonella* spp. group B isolated from minced pork in the Northern part of Thailand. **Journal of Associated Medical Sciences**. 52:62–71. DOI: 10.14456/jams.2018.3.

Pooncharеon K, Pulsrikarn C, Khamvichai S, & Tadee P. (2019b). Feasibility of high resolution melting curve analysis for rapid serotyping of *Salmonella* from hospitalised patients. **Journal of Associated medical Sciences**. 52:36–40. DOI: 10.14456/jams.2018.3.

Pooncharеon K, Pulsrikarn C, Nuanmuang N, & Khamai P. (2019c). Effectiveness of BOX–PCR in Differentiating Genetic Relatedness among *Salmonella enterica* Serotype 4,[5],12:i:–Isolates from Hospitalized Patients and Minced Pork Samples in Northern Thailand. **International Journal of Microbiology 2019.** DOI: 10.1155/2019/5086240.

Rahn K, Grandis A De, Clarke RC, McEwen S. A, Galin JE, Ginocchio C, III RC, & Gyles CL. (1992). Amplification of invA gene of Salmonella by polymerase chain reaction (PCR) as a specific method for detection of *Salmonellae*. **Molecular and Cellular Probes.** 6:271–279.

Scallan E., Hoekstra RM., Angulo FJ., Tauxe RV., Widdowson M–A., & Roy SL. (2011) **Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens**. Emerging infectious diseases. 2011;17(1):7.

Suraj Dhara. ***SALMONELLA* PANIKER'S MICROBIOLOGY** [อินเตอร์เน็ต]. 2019. [เข้าถึงเมื่อ 7 ตุลาคม 2563] สืบค้นได้จาก :https://pt.slideshare.net/SurajDhara2/salmonella–197480246

Tanmoy AM, Saha C, Sajib MSI, Saha S, Komurian–Pradel F, Belkum A van, Louwen R, Saha SK, & Endtz HP. (2020). **CRISPR–Cas Diversity in Clinical *Salmonella* enterica**. Genes 11.

Teklemariam AD, Al–Hindi RR, Albiheyri RS, Alharbi MG, Alghamdi MA, Filimban AAR, Al Mutiri AS, Al–Alyani AM, Alseghayer MS, Almaneea AM, et al. (2023). Human Salmonellosis: A Continuous Global Threat in the Farm–to–Fork Food Safety Continuum. **Foods.** 2023; 12(9):1756. https://doi.org/10.3390/foods12091756

Travers K., & Michael B. (2002) **Morbidity of infections caused by antimicrobial–resistant bacteria**. Clinical Infectious Diseases. 2002;34(Supplement_3):S131–S4.

Varma JK., Mølbak K., Barrett TJ., Beebe JL., Jones TF., Rabatsky–Ehr T., et al. (2005) Antimicrobial–resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. **The Journal of infectious diseases.** 2005;191(4):554–61.

Yang X, Wu Q, Zhang J, Huang J, Guo W, & Cai S. (2015). **Prevalence and characterization of monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:–of food origin in China**. PLoS ONE 10:1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0137967

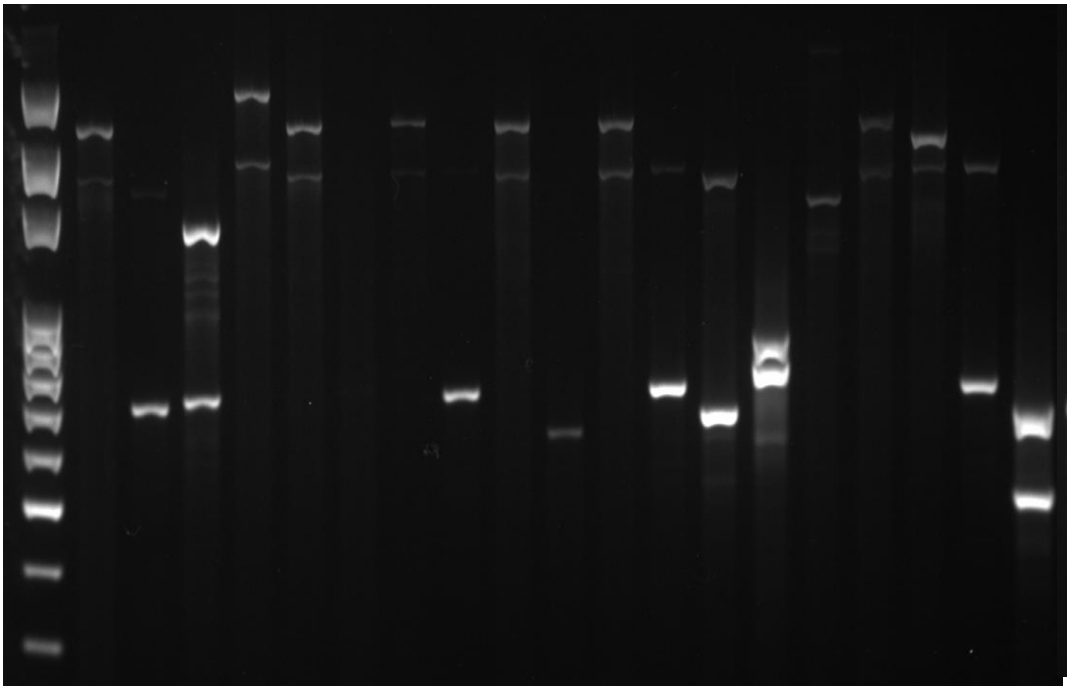
Zeinzinger J, Pietzka AT, Stöger A, Kornschober C, Kunert R, Allerberger F, Mach R, & Ruppitsch W. (2012). One–step triplex high–resolution melting analysis for rapid identification and simultaneous subtyping of frequently isolated *Salmonella* serovars. **Applied and Environmental Microbiology** 78:3352–3360.

Zhang S, Santos RL, Tsolis RM, Mirold S, Hardt WD, Adams LG, & Bäumler AJ. (2002). Phage mediated horizontal transfer of the *sop*E1 gene increases

enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. **FEMS Microbiology.** Letters 217:243–247. DOI: 10.1016/S0378– 1097(02)01094–7.

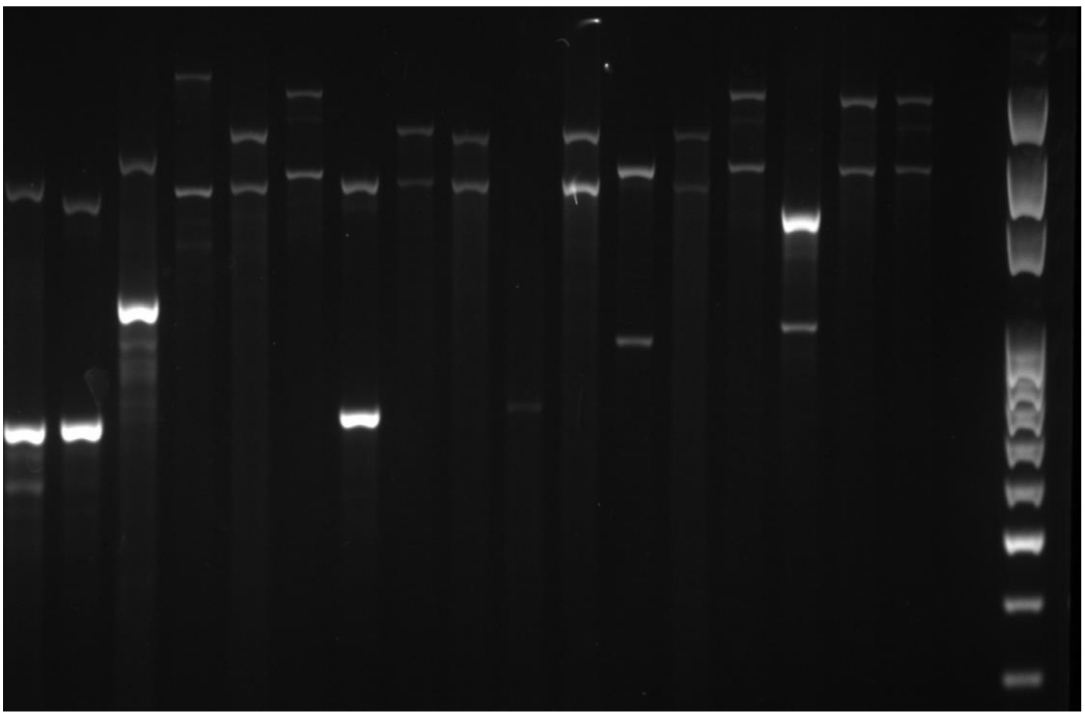
# ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก. การตรวจสอบซีโรไทป์ (serotype) โดยใช้ CRISPR 1 และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 19 serotype ที่แตกต่างกัน**



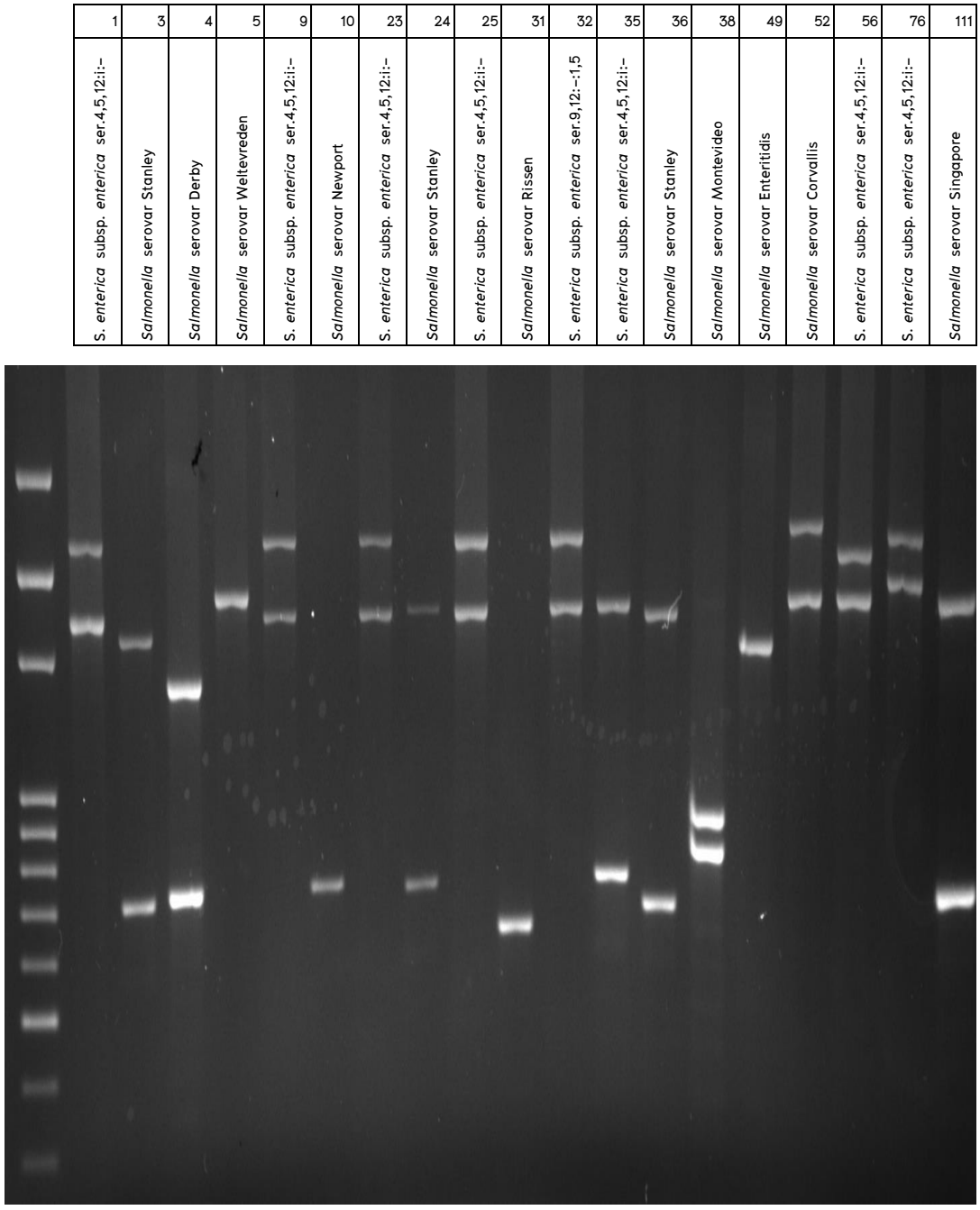
| 1 | 3 | 4 | 5 | 9 | 10 | 23 | 24 | 25 | 32 | 35 | 36 | 38 | 49 | 52 | 56 | 76 | 112 | 125 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Derby | *Salmonella* serovar Weltevreden | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Newport | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Stanley | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.9,12:-:1,5 | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Montevideo | *Salmonella* serovar Enteritidis | *Salmonella* serovar Corvallis | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Give |

**ภาคผนวก ก–1 ขนาด CRISPR 1 และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 19 serotype ที่แตกต่างกัน**



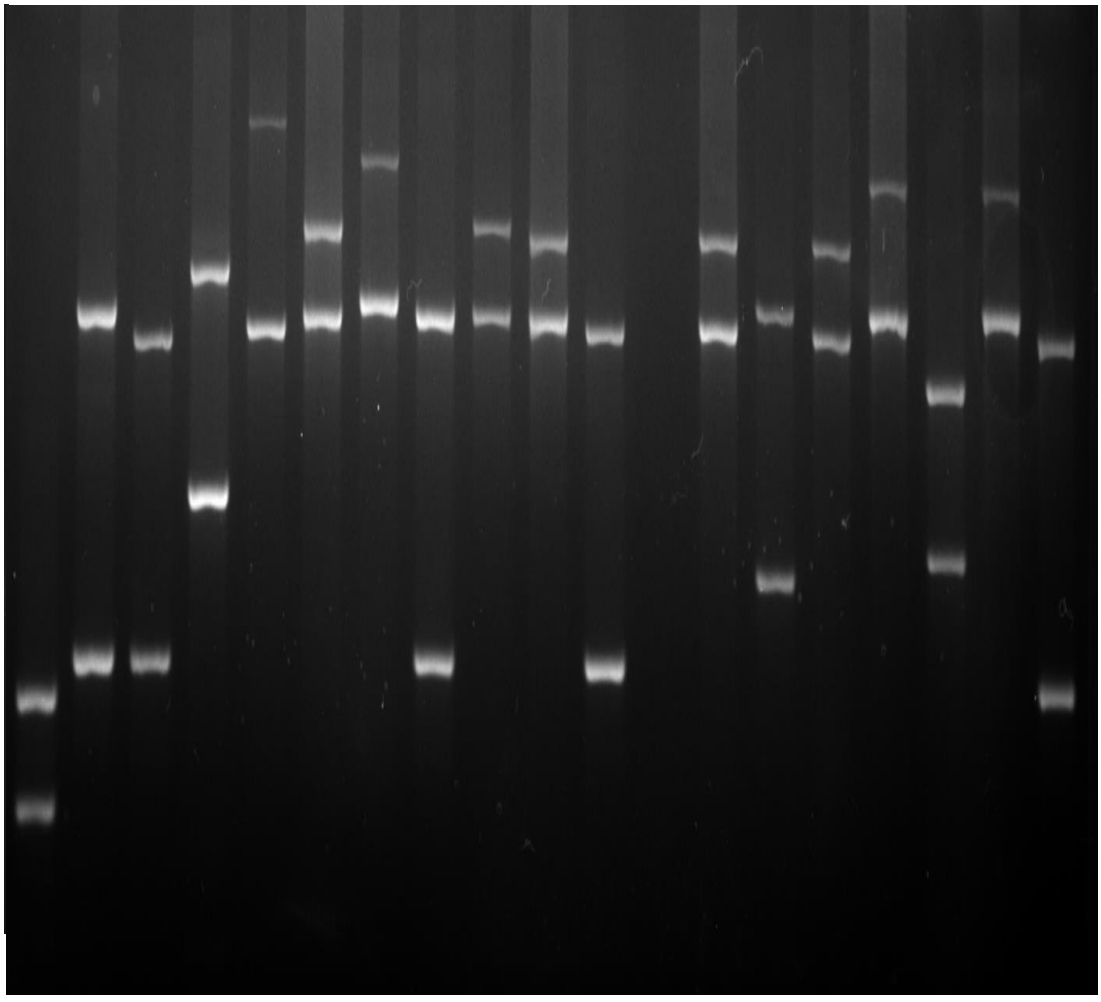
| 131 | 132 | 133 | 134 | 142 | 145 | 148 | 152 | 157 | 161 | 172 | 246 | 249 | 253 | 254 | 269 | 269 | 298 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Kentucky | *Salmonella* serovar Yoruba | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | Salmonella serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Stanley | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Stanley | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Bareilly | *S. enterica* subsp. *enterica* ser.4,12:i:- | *Salmonella* serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Kedougou | *Salmonella* serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Stanley |

**ภาคผนวก ก–2 ขนาด CRISPR 1 และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 19 serotype ที่แตกต่างกัน**




**ภาคผนวก ก–3 ขนาด CRISPR 1 และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 19 serotype ที่แตกต่างกัน**

| 112 | 125 | 131 | 132 | 133 | 134 | 142 | 145 | 148 | 152 | 157 | 161 | 166 | 172 | 246 | 249 | 253 | 254 | 262 | 269 | 298 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Give | *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Kentucky | *Salmonella* serovar Yoruba | S. *enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | Salmonella serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Stanley | S. *enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | S. *enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Stanley | *Salmonella* serovar Newport | S. *enterica* subsp. *enterica* ser.4,5,12:i:- | *Salmonella* serovar Bareilly | S. *enterica* subsp. *enterica* ser.4,12:i:- | *Salmonella* serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Kedougou | *Salmonella* serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Weltevreden | *Salmonella* serovar Stanley |



**ภาคผนวก ก–4 ขนาด CRISPR 1 และ CRISPR 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 19 serotype ที่แตกต่างกัน**

# ประวัติผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| **ชื่อ-สกุล** | สุดารัตน์ ศรีส่ง |
| **วัน เดือน ปี เกิด** | 23 พฤษภาคม 2540 |
| **สถานที่เกิด** | ฉะเชิงเทรา |
| **วุฒิการศึกษา** | ปีการศึกษา 2562 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา<br>ปีการศึกษา 2558 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนปทุมวิไล จังหวัดปทุมธานี |
| **ที่อยู่ปัจจุบัน** | บ้านเลขที่199/138 หมู่ 3 หมู่บ้านฮาบิทาวน์ ซอย 13 ต.บ้านใหม่ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000 |
| **ผลงานตีพิมพ์** | Sudarat Srisong. (2024). CRISPR 2 spacer architecture analysis and virulotyping for epidemiological study of Salmonella enterica subsp. Enterica circulating in northern Thailand. Journal of Associated Medical Sciences. (2015 –2017) |