

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการจำแนกสายพันธุ์ *Listeria innocua*

โดย High Resolution Melting Analysis

นางสาวกฤตาภรณ์ ถนัดสร้าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิต สำนักวิทยบริการฯ ที่ส่งกรมการบัณฑิตวิทยาลัย  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR  
*Listeria innocua* STRAINS DIFFERENTIATION BY  
HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS

Miss Krittaporn Thanatsang

The logo of Chulalongkorn University, featuring a central emblem with a sunburst and a tiered structure, set against a light background.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการจำแนกสายพันธุ์  
*Listeria innocua* โดย High Resolution Melting  
Analysis

โดย

นางสาวกฤตาภรณ์ ถนัดสร้าง

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิมจงใจรัก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ยุพคุณ จตุรงค์สัมฤทธิ์)

กฤตภารณ์ ถนัดสร้าง : การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการจำแนกสายพันธุ์ *Listeria innocua* โดย High Resolution Melting Analysis. (DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Listeria innocua* STRAINS DIFFERENTIATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สุวิมล กิริติพิบูล , 79 หน้า.

*Listeria innocua* เป็น *Listeria* สปีชีส์ที่พบว่ามี การปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปรุงสุกและอาหารพร้อมบริโภคค่อนข้างมากจึงเป็นปัญหาในการส่งออกผลิตภัณฑ์ดังกล่าว แม้ว่าประเทศผู้นำเข้า เช่น สหรัฐอเมริกาและประเทศญี่ปุ่นจะกำหนดเกณฑ์มาตรฐานทางจุลินทรีย์เฉพาะ *L. monocytogenes* แต่เนื่องจากผู้นำเข้าในสหภาพยุโรปได้กำหนดไม่ให้เป็น *Listeria* ทุกสปีชีส์ซึ่งรวมถึง *L. innocua* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องควบคุมไม่ให้มีการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ มีงานวิจัยหลายฉบับรายงานว่า *L. innocua* มักจะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิต ดังนั้นการศึกษาเส้นทางการปนเปื้อนของ *L. innocua* จากสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตสู่ผลิตภัณฑ์จึงเป็นสิ่งจำเป็นในการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนของ *L. innocua* เข้าสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ใช้เทคนิคระดับโมเลกุลหลายวิธีในการตรวจติดตามแหล่งการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร การวิเคราะห์ความแตกต่างที่บริเวณตำแหน่ง Tandem Repeat (TR) ภายในจีโนมของแบคทีเรียเป็นเทคนิคระดับโมเลกุลที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียหลายชนิดและพบว่ามีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์สูงกว่าเทคนิคอื่นๆ แต่จำเป็นต้องใช้ Capillary Electrophoresis (CE) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงในการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค High Resolution Melting Analysis (HRM) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างที่บริเวณตำแหน่ง TR ของ *L. innocua* เพื่อใช้ในการการจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* จำนวน 93 ไอโซเลทที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมภายในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งในโรงงานแห่งหนึ่ง ในขั้นแรกได้ใช้โปรแกรม Unipro UGENE ในการค้นหาตำแหน่ง TR ภายในจีโนมของ *L. innocua* และได้คัดเลือก TR 13 ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุดอย่างน้อย 5 นิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย CE และเทคนิค HRM จากนั้นออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง TR ด้วยโปรแกรม Primer3 การพัฒนาเทคนิค HRM เริ่มจากการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR โดยได้เลือก *L. innocua* 11 ไอโซเลทจากแหล่งต่างๆภายในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 13 ตำแหน่งด้วยไพรเมอร์ 13 คู่โดยปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาและวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดย CE สำหรับตำแหน่ง TR ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จะนำมาวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR ด้วยเทคนิค HRM พบว่า ไพรเมอร์ 8 คู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 11 ไอโซเลทได้ที่ตำแหน่ง TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13 ซึ่งผลการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HRM ในทุกตำแหน่ง ยกเว้นตำแหน่ง TR5 และ TR13 ที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บริเวณ TR ในบางไอโซเลท ซึ่ง CE ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันได้ ในขณะที่เทคนิค HRM นั้นสามารถจำแนกได้โดยให้รูปแบบของ melting profile ที่แตกต่างกัน ในขั้นต่อมา จำแนกความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอของ *L. innocua* ทั้ง 93 ไอโซเลทที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 8 ตำแหน่งด้วย CE แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM พบว่า ตำแหน่ง TR1, TR3, TR6 และ TR13 มีความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอและมีรูปแบบ melting profile จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM เป็น 2, 6, 4, และ 6 รูปแบบที่ตำแหน่ง TR1, TR3, TR6 และ TR13 ตามลำดับ ในขณะที่ตำแหน่ง TR2, TR5, TR10 และ TR12 ไม่มีความแตกต่างของ TR ใน 93 ไอโซเลทที่ใช้ทดสอบ ซึ่งเทคนิค HRM สามารถจำแนกไอโซเลทที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันออกจากกันและจัดกลุ่มไอโซเลทที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากันไว้ด้วยกันได้อย่างถูกต้องในทุกตำแหน่ง โดยมีข้อยกเว้นในไอโซเลทที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง TR5 และ TR13 การประเมินความแม่นยำของเทคนิคโดยการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำ พบว่า เทคนิค HRM มีความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำภายในครั้งเดียวกันและวันที่ต่างกันในทุกตำแหน่ง การจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR ด้วย CE และเทคนิค HRM สามารถจำแนก *L. innocua* 93 ไอโซเลทได้เป็น 10 จีโนไทป์และมีค่า Discriminatory index เป็น 0.45 โดยสามารถเชื่อมโยงสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมภายในบริเวณผลิตได้ สรุปได้ว่าเทคนิค HRM เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR และสามารถใช้ทดแทนการวิเคราะห์ด้วย CE โดยให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับ CE จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ติดตามสายพันธุ์ของ *L. innocua* ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหารได้

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อนิลิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556

# # 5471912823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: LISTERIA INNOCUA / HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS (HRM) / TANDEM REPEAT

KRITTAPORN THANATSANG: DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Listeria innocua* STRAINS DIFFERENTIATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph.D., 79 pp.

*Listeria innocua* is the most common specie found in ready-to-eat meat products which lead to rejection of food products. Especially, the foods imported to European countries require “Zero-Tolerance” for all species of *Listeria*, which is including *L. innocua*. Many researches worldwide have reported that *L. innocua* is the most frequently found species in food products and plant environments. Therefore, understanding the routes of contamination of *L. innocua* is necessary for controlling and preventing *L. innocua* contamination into food products. Currently, molecular subtyping techniques are frequently used for tracking sources of microbial contamination in food products. Variance detection of Tandem Repeat (TR) loci was a technique previously used for subtyping many microorganisms and showed higher discriminatory power than other techniques. However, this technique still needs Capillary Electrophoresis (CE) for detecting difference of amplicon size, which is relatively expensive. Therefore, in this study, High Resolution Melting Analysis (HRM) was developed for variant detection of Tandem Repeat loci for strain differentiation of *L. innocua*. Ninety-three isolates of *L. innocua* obtained from a cooked frozen chicken plant were used for experiment. Unipro UGENE program was used to locate TR loci within *L. innocua* genome and 13 TR loci (designated TR1-TR13) which had at least 5 nucleotides repeated were chosen. Primers for amplification of these TR loci were designed by Primer3. For primer validation, 11 isolates were selected from different locations in the processing plant and used to amplify TR region with 13 primers by Polymerase Chain Reaction (PCR). Amplified products were separated and sized by Capillary Electrophoresis (CE). Feasibility of HRM technique to differentiate variances of TR was also demonstrated on the 11 isolates at the TR loci which were successfully amplified. The results showed that 8 primer sets were successfully amplified the 11 isolates at TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 and TR13. The results of size analysis by CE were consistent with HRM melting profile at every locus, except TR5 and TR13 where the point mutation occurred within amplicon which could not be detected by CE but HRM could discriminate the amplified products of the same size with differing in nucleotide composition. Then, these 8 loci were used for size analysis of 93 isolates of *L. innocua* by CE followed by HRM analysis. Four TR loci (TR1, TR3, TR6 and TR13) were found discriminatory in size analysis. HRM analysis revealed 2, 6, 4 and 6 different types at TR1, TR3, TR6 and TR13, respectively, while no variation were detected at TR2, TR5, TR10 and TR12. The isolates with different sizes could be discriminate from each other by HRM and the isolates which had the same amplicon size were grouped together. Repeatability and reproducibility of HRM technique were also evaluated and the results showed that HRM technique was repeatable and reproducible. Subtyping of *L. innocua* by variance detection of TR loci using CE and HRM could discriminate 93 isolates into 10 genotypes with discriminatory index of 0.45. This technique could also infer relationship between strains contaminated in products and plant environments. In conclusion, detection of TR loci by HRM technique is a highly potential technique for subtyping of *L. innocua* which can be used to replace CE and can be applied for tracking sources of *L. innocua* contamination in food processing plants.

Department: Food Technology

Student's Signature .....

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2013

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีโดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้โอกาสในการทำวิจัยนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำวิจัย และตรวจทานวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา และดร.ยุพคุณ จตุรงค์สัมฤทธิ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลามาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งได้ให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไขและให้แนวคิดต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ Assistant Professor Hajime Takahashi และ Food Microbiology Laboratory, Tokyo University of Marine Science and Technology ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้กรุณาให้ความรู้และให้คำแนะนำด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์รุจเวทย์ ทหารแก้ว และ ดร.มงคล เวสารัชเวชย์ ที่ได้อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัย และขอขอบคุณนางสาวพนัสพันธ์ ศิลมัฐ นางสาวดารณี ศรีสิทธินาม และ นายจิรพิพรรธ แพรไพศาล รวมถึงนักวิจัยทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำ ตลอดจนให้คำปรึกษาในการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุกๆเรื่องตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (RES 560530011 FW) ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัว ผู้ซึ่งส่งเสริม สนับสนุนในทุกๆด้านและให้กำลังใจอันมีค่าตลอดมา จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 <i>Listeria</i> spp.....	5
2.2 Listeriosis.....	8
2.3 การปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> spp. ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร.....	10
2.4 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Listeria</i> .....	14
2.4.1 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Listeria</i> โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotyping).....	14
2.4.1.1 Serotyping.....	14
2.4.1.2 Phage typing.....	15
2.4.2 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Listeria</i> โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (Genotyping).....	15
2.4.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	16
2.4.2.2 Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE).....	17
2.4.2.3 Ribotyping.....	17
2.4.2.4 Amplify Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	18
2.4.2.5 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD).....	19
2.4.2.6 Repetitive extragenic palindromic element-based PCR (REP-PCR) .....	21
2.4.2.7 Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA).....	22
2.4.2.8 Multi-locus Sequence Typing (MLST).....	23
2.5 Capillary Electrophoresis (CE).....	24
2.6 High Resolution Melting Analysis (HRM).....	25

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	26
3.1 แบบที่เรียกใช้ในงานวิจัย .....	26
3.2 การเตรียมดีเอ็นเอจาก <i>L. innocua</i> .....	26
3.3 ส่วนผสมของสารเคมีและสภาวะที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR โดย High Resolution Melting Analysis (HRM).....	26
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย .....	28
3.4.1 การคัดเลือกตำแหน่ง Tandem repeats (TR) และการออกแบบไพรเมอร์.....	28
3.4.2 การพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อจำแนกสายพันธุ์ <i>L. innocua</i> .....	30
3.4.2.1 การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR และวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE) .....	30
3.4.2.2 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM.....	30
3.4.2.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE และผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM .....	30
3.4.3 การจำแนกสายพันธุ์ <i>L. innocua</i> ด้วยเทคนิค HRM .....	31
3.4.3.1 การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE)..	31
3.4.3.2 การการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM .....	31
3.4.3.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE และผลการจำแนกความแตกต่างของ TR ด้วยเทคนิค HRM .....	32
3.4.4 การประเมินความแม่นยำของเทคนิค HRM .....	32
3.4.4.1 การทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (Repeatability) .....	32
3.4.4.2 การทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (Reproducibility).....	32
3.4.5 การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์.....	33
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัยและการอภิปรายผล .....	34
4.1 ผลการค้นหาตำแหน่ง TR และออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR ของ <i>L. innocua</i> .....	34



4.2 ผลการพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อจำแนกสายพันธุ์ <i>L. innocua</i> .....	35
4.2.1 ผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR และวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE).....	35
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM .....	37
4.2.3 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE และ HRM.....	37
4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ <i>L. innocua</i> ด้วยเทคนิค HRM.....	41
4.3.1 ผลการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE).....	41
4.3.2 ผลการวิเคราะห์การจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM.....	42
4.3.3 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE และ HRM.....	46
4.4 ผลการประเมินความแม่นยำของเทคนิค HRM.....	58
4.4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (Repeatability).....	58
4.4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (Reproducibility) ...	58
4.5 ผลการประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ .....	61
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	65
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	65
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	66
รายการอ้างอิง .....	67
ภาคผนวก.....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	79

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2- 1 ปัจจัยที่จำกัดการเติบโตของ <i>Listeria</i> spp. ....	6
2- 2 ลักษณะที่จำแนกสปีชีส์ของ <i>Listeria</i> spp. โดยวิธีทางชีวเคมี .....	7
2- 3 Serotypes ของ <i>Listeria</i> สปีชีส์ต่างๆ.....	7
2- 4 ตัวอย่างการระบาดของ listeriosis ในประเทศต่างๆ.....	9
2- 5 ปริมาณการพบ <i>Listeria</i> สปีชีส์ต่างๆในสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์การในโรงงานผลิตนมในประเทศสหรัฐอเมริกา .....	11
2- 6 ปริมาณการพบ <i>Listeria</i> สปีชีส์ต่างๆในสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตชีส ประเทศตุรกี .....	11
2- 7 ปริมาณการพบ <i>Listeria</i> สปีชีส์ต่างๆในสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งในประเทศไทย .....	12
2- 8 ตัวอย่างไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD .....	20
3- 1 รายละเอียดของตำแหน่ง TR และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง .....	29
4- 1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ <i>L. innocua</i> จำนวน 11 ไอโซเลทที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Capillary Electrophoresis.....	36
4- 2 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย Capillary Electrophoresis และเทคนิค HRM .....	48
4- 3 จีโนไทป์ที่จำแนกได้จากการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR โดย CE และเทคนิค HRM.....	62
4- 4 ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และบริเวณที่พบ <i>L. innocua</i> ในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง	63

## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2- 1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	5
2- 2 เส้นทางการปนเปื้อนของ <i>L. monocytogenes</i> ระหว่างสิ่งแวดล้อม สัตว์ อาหาร และคน.....	10
2- 3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค RFLP.....	16
2- 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์แบบที่เรียกว่าเทคนิค PFGE.....	17
2- 5 หลักการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค ribotyping.....	18
2- 6 หลักการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค AFLP.....	19
2- 7 หลักการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD.....	21
2- 8 หลักการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค REP-PCR.....	22
2- 9 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค MLVA.....	23
2- 10 ส่วนประกอบของเครื่องมือ Capillary Electrophoresis.....	24
2- 11 หลักการเบื้องต้นในการวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HRM).....	25
4- 1 แผนผังแสดงตำแหน่งของ TR ทั้ง 13 ตำแหน่ง (TR1-TR13) ภายในจีโนมของ <i>L. innocua</i> CLIP 11262.....	35
4- 2 แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์โดย Capillary electrophoresis (ย้าย) และ melting peak จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM (ขวา) ของ <i>L. innocua</i> 11 ไอโซเลท.....	39
4- 3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง TR5.....	41
4- 4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง TR13.....	41
4- 5 melting peak จากการวิเคราะห์ความแตกต่างที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ <i>L. innocua</i> 93 ไอโซเลท.....	45
4- 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง TR6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์และความแปรผันของจำนวน Tandem Repeat ในแต่ละรูปแบบ.....	47
4- 7 melting peak จากการวิเคราะห์ที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ <i>L. innocua</i> ในการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (repeatability).....	59
4- 8 melting peak ที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) ด้วยเทคนิค HRM.....	60

## บทที่ 1

### บทนำ

การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* เป็นปัญหาสำหรับอุตสาหกรรมอาหารประเภทอาหารพร้อมบริโภค เนื่องจาก *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค listeriosis ซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงถึงประมาณร้อยละ 30 (Lukinmaa, Nakari, Eklund, & Siitonen, 2004; Vázquez-Boland et al., 2001) ดังนั้นทั้งผู้ผลิตและผู้นำเข้าจึงได้ให้ความสำคัญกับการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นอย่างมาก Codex Committee on Food Hygiene จึงได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานด้านจุลินทรีย์สำหรับ *L. monocytogenes* โดยอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Listeria* ซึ่ง *Listeria* สามารถเจริญเติบโตได้มากกว่า 0.5 log CFU/g นั้นต้องไม่พบ *L. monocytogenes* ในอาหาร 25 กรัม สำหรับอาหารที่ไม่ได้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Listeria* (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 log CFU/g) เช่น อาหารแช่เยือกแข็งหรืออาหารที่มี pH ต่ำกว่า 4.4 และ  $a_w < 0.92$  ให้พบ *L. monocytogenes* ได้ไม่เกิน 100 CFU ต่อ 25 กรัม (Codex Alimentarius, 2007; Nørrung, 2000) สำหรับมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ของประเทศไทย กรมปศุสัตว์ได้กำหนดว่าต้องไม่พบ *L. monocytogenes* ในอาหาร 25 กรัม (กรมปศุสัตว์, 2551) แต่ผู้นำเข้าจากประเทศในสหภาพยุโรปได้ให้ความสำคัญกับ *Listeria* ทุกสปีชีส์ โดยระบุไม่ให้พบ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์เนื่องจากการตรวจพบเชื้อ *Listeria* สปีชีส์อื่น ๆ เป็นการสะท้อนถึงระบบการจัดการด้านสุขอนามัยในการผลิต (Pesavento, Ducci, Nier, Comodo, & Lonostro, 2010) ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญกับปัญหาการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. มากขึ้น และศึกษาถึงแนวทางที่จะควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหาร

*Listeria* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำ ในสภาวะที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศก็ได้ และยังสามารถสร้างฟิล์มชีวภาพในเครื่องจักรหรืออุปกรณ์ที่มีความเปียกชื้นซึ่งยากแก่การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์หลังกระบวนการให้ความร้อนในขั้นตอนแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง (Alessandria, Rantsiou, Dolci, & Cocolin, 2010; Blackman & Frank, 1996) ที่ผ่านมามีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและพบการปนเปื้อนของ *Listeria* หลายสปีชีส์ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมในบริเวณผลิต Pritchard, Flanders, and Donnelly (1995) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในอุปกรณ์การผลิตและสิ่งแวดล้อมบริเวณโรงงานแปรรูปนมในประเทศสหรัฐอเมริกา พบปริมาณการปนเปื้อนของ *L. innocua* ร้อยละ 60 *L. monocytogenes* ร้อยละ 35 และ

*L. seeligeri* ร้อยละ 5 Cagri-Mehmetoglu et al. (2011) ได้ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิตชีส 2 แห่งในประเทศตุรกี พบการปนเปื้อนของ *L. innocua* มากที่สุดทั้ง 2 โรงงาน (ร้อยละ 53.8 และ 57.1) รองลงมาคือ *L. monocytogenes* (ร้อยละ 23.1 และ 28.6) และ *L. grayi* (ร้อยละ 23.1 และ 14.3) Keeratipibul and Techaruwichit (2012) ได้ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในโรงงานไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งในประเทศไทย พบการปนเปื้อนของ *Listeria* 4 สปีชีส์ คือ *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligery* และ *L. monocytogenes* คิดเป็นปริมาณการพบร้อยละ 82.3, 11.2, 5.5 และ 1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกหลายฉบับที่พบว่าการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ส่วนใหญ่ในผลิตภัณฑ์เป็นการปนเปื้อนของ *L. innocua* (Bouayad & Hamdi, 2012; Choi, Cho, Park, Chung, & Oh, 2001; Moharem, Charith, & Janardhana, 2007) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเส้นทางการปนเปื้อน รวมถึงมีการติดตามการปนเปื้อนของ *L. innocua* เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมสู่ผลิตภัณฑ์

การตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. ในโรงงานอุตสาหกรรมใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบดั้งเดิมซึ่งใช้วิธีทางชีวเคมีในการจำแนกชนิดของ *Listeria* โดยดูจากลักษณะปรากฏ วิธีนี้มีข้อจำกัดคือสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับสปีชีส์เท่านั้น ซึ่งไม่ละเอียดเพียงพอต่อการเชื่อมโยงการแพร่กระจายของ *Listeria* ในโรงงาน เนื่องจาก *Listeria* ภายในโรงงานอุตสาหกรรมมีการปรับตัวให้ทนต่อสภาวะแวดล้อม จึงทำให้ *Listeria* แต่ละสปีชีส์นั้นมีหลากหลายสายพันธุ์ อาจมีเพียงบางสายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมเท่านั้นที่ปนเปื้อนเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ การตรวจวิเคราะห์ *Listeria* ด้วยวิธีดั้งเดิมนี้อาจไม่สามารถใช้ในการระบุแหล่งปนเปื้อนที่แท้จริงได้ ทำให้กระบวนการค้นหาแหล่งกำเนิด หรือต้นตอการแพร่ระบาดในโรงงานนั้นทำได้ยาก

เทคนิคทางอณูชีววิทยาจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับสายพันธุ์ ซึ่งจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จากความแตกต่างภายในดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid-DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid-RNA) เทคนิคเหล่านี้เป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญต่อการศึกษาด้านระบาดวิทยาของแบคทีเรีย โดยเฉพาะการนำมาใช้ตรวจสอบและหาแหล่งที่มาของการระบาดหรือปนเปื้อนของแบคทีเรีย ซึ่งจะช่วยให้กระบวนการค้นหาต้นตอของการปนเปื้อนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ (Norton et al., 2001) เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียมีหลายเทคนิค เช่น Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) เป็นเทคนิคที่ถูกจัดเป็น “gold standard” ในการจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* และนิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ เทคนิคนี้มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์สูง แต่มีข้อจำกัดคือใช้แรงงานมาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์นานหลายวัน รวมทั้งต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะในการตรวจสอบซันดีเอ็นเอ (Jiang et al., 2008; Murphy et al., 2007)

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์สูง แต่มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ค่อนข้างซับซ้อน (Graves, Swaminathan, & Hunter, 2007; Lomonaco, Nucera, Parisi, Normanno, & Bottero, 2011) Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่มีวิธีการวิเคราะห์ที่ไม่ซับซ้อน แต่มีปัญหาเรื่องการทำซ้ำระหว่างห้องปฏิบัติการ (Gravesen et al., 2000) ต่อมาจึงมีการพัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์ความแปรผันของจำนวน Tandem Repeat (TR) ที่ซ้ำๆกันบนตำแหน่งจำเพาะในดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณตำแหน่ง TR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ด้วย Capillary Electrophoresis (CE) เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* (Lindstedt, Vardund, & Kapperud, 2004a), *Salmonella Typhimurium* (Lindstedt, Vardund, Aas, & Kapperud, 2004b) และ *Listeria monocytogenes* (Lindstedt et al., 2008) พบว่ามีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ที่สูงกว่าเทคนิคอื่นๆ มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน และมีความสามารถในการทำซ้ำ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือต้องใช้ Capillary Electrophoresis ในการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง จึงอาจไม่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก

High Resolution Melting Analysis (HRM) เป็นเทคนิคที่ถูกใช้ในการวิเคราะห์ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการตรวจวัดอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ (DNA Melting Temperature-T<sub>m</sub>) ซึ่งขึ้นกับความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ ปริมาณ G/C และลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้นดีเอ็นเอ ที่ผ่านมาได้มีการใช้เทคนิค HRM ในการวิเคราะห์ความแปรผันของ TR ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus anthracis* (Fortini et al., 2007), *Yersinia pestis* (Ciammaruconi et al., 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Pang et al., 2011) และ *Bacillus licheniformis* (Dhakal et al., 2013) โดยจำแนกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่มีจำนวน TR ต่างๆกันโดยพิจารณาจาก melting profile ที่จำเพาะต่อขนาดของชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ พบว่าเป็นเทคนิคที่มีราคาไม่แพงและใช้เวลาในการวิเคราะห์รวดเร็ว

การตรวจติดตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารนั้นจะต้องวิเคราะห์แบคทีเรียที่แยกได้จากพื้นผิวสิ่งแวดล้อม อุปกรณ์การผลิต รวมถึงตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนต่างๆเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์จึงต้องมีราคาถูกและใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์รวดเร็ว งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อตรวจสอบและจำแนกความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR โดยเทคนิค HRM เพื่อทดแทนการใช้ CE ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *L. innocua* หากประสบผลสำเร็จจะทำให้สามารถจำแนก *L. innocua* ได้ในระดับสายพันธุ์และสามารถหาความสัมพันธ์ของการแพร่กระจายของ *L. innocua* ในผลิตภัณฑ์ระหว่างกระบวนการผลิต สิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ ทำให้การตรวจติดตามการ

แพร่กระจายของ *L. innocua* มีประสิทธิภาพ รวมทั้งช่วยให้มาตรการควบคุมและจัดการการปนเปื้อนภายในโรงงานมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

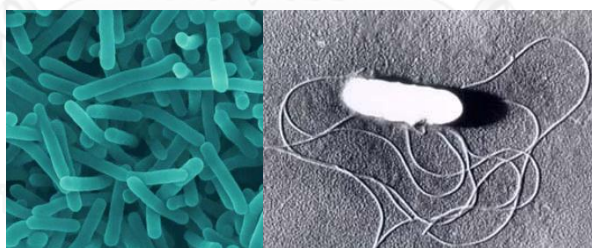
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

*Listeria* spp. เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อมและอาหารโดยมักปนเปื้อนในอาหารพร้อมบริโภค ซึ่งผู้ผลิตและผู้นำเข้าต่างให้ความสำคัญกับการปนเปื้อนของ *Listeria* โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* ซึ่งก่อให้เกิดโรค listeriosis อย่างไรก็ตามพบว่าการปนเปื้อนของ *Listeria* ส่วนใหญ่ภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเป็นการปนเปื้อนของ *L. innocua* ซึ่งการพบ *Listeria* สปีชีส์อื่นๆในบริเวณผลิตเป็นการบ่งชี้ถึงความเสี่ยงในการตรวจพบ *L. monocytogenes* ดังนั้นการติดตามการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. จึงเป็นสิ่งจำเป็นในการควบคุมการปนเปื้อนภายในโรงงานอุตสาหกรรม

#### 2.1 *Listeria* spp.

*Listeria* เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ (รูป 2-1) สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนต่ำมาก สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เคลื่อนที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูป 2- 1 *Listeria monocytogenes* (Food Safety Information Council)

*Listeria* เป็นแบคทีเรียประเภท mesophilic โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตที่สุด คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิต่ำและมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแช่แข็ง นอกจากนี้ *Listeria* ยังสามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาวะที่มี pH ตั้งแต่ 4.4-9.4 และความเข้มข้นของเกลือ 10 % โดยมี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะมีระยะเวลาการแบ่งตัวประมาณ 45 นาที ปัจจัยและขอบเขตของการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. แสดงในตาราง 2-1



ตาราง 2- 1 ปัจจัยที่จำกัดการเติบโตของ *Listeria* spp. (ICMSF, 1996)

ปัจจัย	ต่ำสุด	สูงสุด
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	-0.4	45
pH	4.4	9.4
$a_w$	0.92	-
เกลือ (%)	-	10

*Listeria* spp. ประกอบด้วย 15 สปีชีส์ คือ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* และ *L. grandensis* (Bakker et al., 2014; Bertsch et al., 2013; Graves et al., 2010; Jadhav, Bhav, & Palombo, 2012; Lang Halter, Neuhaus, & Scherer, 2013; Leclercq et al., 2010) การจำแนก *Listeria* spp. ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆในขั้นต้นจะใช้ selective media เช่น Oxford agar, Agar *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA) และ PALCAM agar โดยลักษณะของโคโลนีของ *Listeria* spp. ที่ขึ้นบน Oxford agar จะเป็นสีเทา มี clear zone สีดำล้อมรอบ ลักษณะของโคโลนีบน ALOA มีสีเขียวหรือฟ้าอ่อน สำหรับ *L. monocytogenes* จะมี clear zone สีขาวขุ่น และลักษณะของโคโลนีบน PALCAM agar มีสีเขียวอมเทา และมี clear zone สีดำ (USFDA, 2011)

สำหรับการจำแนก *Listeria* แต่ละสปีชีส์สามารถแบ่งแยกได้โดยการทดสอบทางชีวเคมี เช่น การทดสอบ hemolytic การหมักและสร้างกรดจากน้ำตาล mannitol, rhamnose และ xylose รวมทั้งการทดสอบ CAMP test (Christie Atkins Munch-Peterson phenomenon) โดยลักษณะของ *Listeria* แต่ละสปีชีส์จากการทดสอบแสดงในตาราง 2-2

*Listeria* spp. สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคคือ *L. monocytogenes* โดยทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งคนและสัตว์ อย่างไรก็ตามมีเพียงบางสายพันธุ์ของ *L. monocytogenes* เท่านั้นที่เป็นแบคทีเรียก่อโรค โดยมีเพียง 3 serotypes จากทั้งหมด 13 serotypes ดังแสดงในตาราง 2-3 ที่เป็นสาเหตุของโรค listeriosis ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจาก serotype 4b, 1/2a และ 1/2b โดยก่อให้เกิดโรคได้มากถึงร้อยละ 89-96 (Farber & Peterkin, 1991)

ตาราง 2- 2 ลักษณะที่จำแนกสปีชีส์ของ *Listeria* spp. โดยวิธีทางชีวเคมี (ICMSF, 1996; USFDA, 2011)

Species	Acid produced from			CAMP test		$\beta$ -Hemolysis <sup>f</sup>
	Mannitol	Rhamnose	Xylose	S <sup>e</sup>	R <sup>e</sup>	
<i>L. monocytogenes</i>	-	+ <sup>c</sup>	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i> <sup>a</sup>	-	-	+	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	+/- <sup>d</sup>	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	+/- <sup>d</sup>	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	+	-	+
<i>L. grayi</i> <sup>b</sup>	+	+/- <sup>d</sup>	-	-	-	-

a = สายพันธุ์ที่สามารถหมักน้ำตาล ribose ได้ จัดอยู่ใน *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* และสายพันธุ์ที่ไม่สามารถหมัก ribose จัดอยู่ใน *L. ivanovii* subsp. *londinensis*

b = *L. grayi* subsp. *murrayi* สามารถ reduces ไนเตรท *L. grayi* subsp. *grayi* ไม่สามารถ reduce ไนเตรท

c = *L. monocytogenes* บางสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด listeriosis ในสัตว์ให้ผลเป็นลบ

d = สามารถให้ผลได้ทั้งบวกและลบ

e = ทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน *Staphylococcus aureus* และ *Rhodococcus equi*

f = ทดสอบบน blood sheep agar

ตาราง 2- 3 Serotypes ของ *Listeria* สปีชีส์ต่างๆ (USFDA, 2011)

สปีชีส์	serotypes
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, un*
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, un*

\*un = ยังไม่กำหนด

## 2.2 Listeriosis

โรค listeriosis เป็นโรคที่เกิดจากสปีชีส์ *L. monocytogenes* โดยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค listeriosis พบว่ามักเกิดจาก serotype 4b, 1/2a และ 1/2b, ซึ่ง serotype 4b เป็นสาเหตุของโรคนี้ถึงร้อยละ 50 เส้นทางการหลักในการส่งผ่านของเชื้อในคนและสัตว์เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน *L. monocytogenes* ซึ่งมีรายงานความเกี่ยวข้องระหว่างการระบาดของโรค listeriosis และอาหาร โรคนี้มีโอกาสพบค่อนข้างยาก แต่เมื่อเป็นแล้วจะมีความรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูง ซึ่งโรคนี้จะส่งผลกระทบต่อประชากรบางกลุ่ม เช่น หญิงมีครรภ์ เด็กในครรภ์มารดา ทารกแรกเกิด และผู้สูงอายุมากกว่าประชากรทั่วไป

โรค listeriosis แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ invasive และ non-invasive โดยทั่วไปประเภท invasive จะเกิดการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อของลำไส้ และลุกลามไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย เช่น รกของเด็กในครรภ์ ระบบประสาทส่วนกลาง เลือด หรือหลายส่วนร่วมกัน โดยผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคคือ หญิงมีครรภ์ ผู้สูงอายุ ผู้ที่เป็นมะเร็ง ตับอักเสบ เบาหวาน เอ็ดส์ เนื่องจากโรคนี้จะทำให้ภูมิคุ้มกันต่ำลง และมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 20-30 ทำให้โรคนี้เป็นหนึ่งในโรคติดต่อทางอาหารที่รุนแรงซึ่งส่งผลกระทบต่อสังคมและเศรษฐกิจสูงที่สุดในบรรดาโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (Mead et al., 1999; Roberts, 1989; Roberts & Pinner, 1990) สำหรับ listeriosis ประเภท non-invasive ผู้ป่วยจะมีอาการของโรคทางเดินอาหารอักเสบ เช่น ท้องร่วง ปวดหัว และปวดกล้ามเนื้อ ซึ่งสามารถหายได้ด้วยตัวเอง (Aureli et al., 200; Dalton et al., 1997; Reid et al., 1994; Salamina et al., 1996)

Todd and Notermans (2011) ได้รายงานการระบาดของโรค listeriosis ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับอาหาร แสดงในตาราง 2-4 พบว่าการระบาดของ listeriosis ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนในชีสและ deli meats ในปี 2005 มีผู้ติดเชื้อและเสียชีวิตในประเทศออสเตรเลีย 2 ราย โดยที่ทั้ง 2 รายนี้เป็นผู้ป่วยมะเร็งและได้รับเชื้อมาจากอาหารในโรงพยาบาล ในปี 2007 การระบาดของโรค listeriosis มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในชีสซึ่งผลิตจากนมที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ และในปีเดียวกัน ประเทศในสหราชอาณาจักรมีรายงานการระบาดของ listeriosis ในผู้ป่วย 1,157 ราย ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มผู้สูงอายุ (อายุมากกว่า 65 ปี) และเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ซึ่งมีรายงานผู้เสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 20

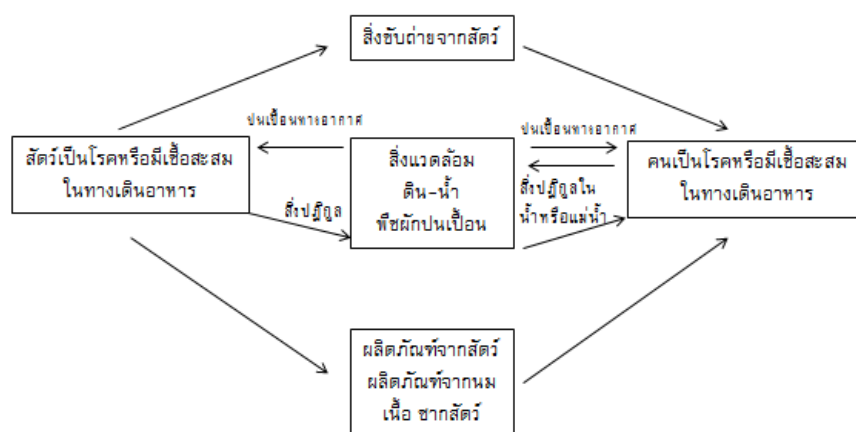
ตาราง 2- 4 ตัวอย่างการระบาดของ listeriosis ในประเทศต่างๆ (Todd &amp; Notermans, 2011)

ปี	ประเทศ	แหล่งปนเปื้อน	จำนวนผู้ป่วย	จำนวนผู้เสียชีวิต	อ้างอิง
2005	สเปน	เนื้อสัตว์	2	-	EFSA (2007)
2005	โปแลนด์	-	9	0	EFSA (2007)
2005	นอร์เวย์	เนื้อสัตว์	-	-	EFSA (2007)
2005	เยอรมัน	-	-	-	EFSA (2007)
2005	อเมริกา (เท็กซัส)	ซอฟต์ชีส	12	-	CDC (2009)
2005	อเมริกา (แมริแลนด์)	เนื้อไก่ย่าง	13	-	CDC (2009)
2005	อเมริกา (นิวยอร์ก)	-	6	-	CDC (2009)
2005	อเมริกา (นิวยอร์ก)	ไก่ย่าง	3	-	CDC (2009)
2005	ออสเตรเลีย	Deli meats	2	2	ABC (2005)
2006	สวิตเซอร์แลนด์	ผลิตภัณฑ์นม	-	-	EFSA (2007)
2006	สาธารณรัฐเช็ก	ซอฟต์ชีส	78	13	EFSA (2007)
2006	เยอรมัน	Harz cheese	6	1	EFSA (2007)
2006	อเมริกา (โอไฮโอ)	แฮม	3	0	CDC (2009)
2007	นอร์เวย์	-	21	5	EFSA (2009)
2008	แคนาดา	Deli meat	58	20	(2009)
2008	แคนาดา (ควิเบก)	ซอฟต์ชีส	21	1	(2008)

### 2.3 การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร

*Listeria* เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปมักพบ *Listeria* spp. ในดิน น้ำ สิ่งสกปรก พืชผักที่เน่าเปื่อย น้ำเสียจากโรงฆ่าสัตว์ น้่านมของทั้งแม่วัวปกติและที่เป็นโรค เต้านมอักเสบ อุจจาระของคนและสัตว์ (Farber, 1991; MacGowan, Bowker, & Mclauchlin, 1994; Van Renterghem, Huysman, Rygole, & Verstraete, 1991) สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหาร พบการปนเปื้อนของ *Listeria* ได้ตามพื้น ผนัง สายพานและเครื่องจักรอุปกรณ์ ซึ่งบริเวณพื้นผิวที่เปียกชื้นภายในโรงงานและซอกมุมของเครื่องจักรที่ยากต่อการทำความสะอาด เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการกักเก็บและเจริญเติบโตของ *Listeria* ซึ่ง *Listeria* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำและมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแช่แข็ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนในขั้นตอนแช่เย็นและแช่เยือกแข็งหลังกระบวนการให้ความร้อน จึงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการเก็บรักษาอาหารพร้อมบริโภค (ICMSF, 1996)

Audurier and Martin (1989) ได้อธิบายเส้นทางการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ระหว่างแหล่งการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและอาหารสู่คน แสดงในรูป 2-2 ซึ่งการปนเปื้อนข้ามของ *L. monocytogenes* ระหว่างกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค listeriosis โดย *Listeria* ที่ปนเปื้อนเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรมนั้น อาจมาจากวัตถุติด อากาศ หรือคน (Nightingale et al., 2004)



รูป 2- 2 เส้นทางการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ระหว่างสิ่งแวดล้อม สัตว์ อาหาร และคน (Audurier & Martin, 1989)

Pritchard et al. (1995) ศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์การผลิตของโรงงานผลิตนมในประเทศสหรัฐอเมริกา เช่น สายพาน ตะกร้า โตะ และเครื่องกรอง ทั้งหมด 378 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *L. innocua* อยู่มากที่สุดถึงร้อยละ 60 รองลงมาเป็น *L. monocytogenes* และ *L. seeligeri* ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 2-5

ตาราง 2- 5 ปริมาณการพบ *Listeria* สปีชีส์ต่างๆในสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์การในโรงงานผลิตนมในประเทศสหรัฐอเมริกา (Pritchard et al., 1995)

สปีชีส์	ปริมาณการพบ (ร้อยละ)
<i>L. innocua</i>	60
<i>L. monocytogenes</i>	35
<i>L. seeligeri</i>	5

นอกจากนี้ งานวิจัยของ Cagri-Mehmetoglu et al. (2011) พบว่า *L. innocua* เป็นสปีชีส์ที่มีการปนเปื้อนมากที่สุดในสิ่งแวดล้อมภายในโรงงานผลิตชีสในประเทศตุรกี รองลงมาคือการปนเปื้อนจาก *L. monocytogenes* และ *L. grayi* ตามลำดับ (ตาราง 2-6)

ตาราง 2- 6 ปริมาณการพบ *Listeria* สปีชีส์ต่างๆในสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตชีส ประเทศตุรกี (Cagri-Mehmetoglu et al., 2011)

สปีชีส์	ปริมาณการพบ (ร้อยละ)
<i>L. innocua</i>	56
<i>L. monocytogenes</i>	26
<i>L. grayi</i>	18

Keeratipibul and Techaruwichit (2012) ได้ศึกษาความชุกของการปนเปื้อน *Listeria* spp. บริเวณสิ่งแวดล้อมภายในโรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งในประเทศไทย จำนวน 7,643 ตัวอย่าง และตรวจพบ *Listeria* 401 ตัวอย่าง ซึ่งพบการปนเปื้อนของ *L. innocua* มากที่สุด รองลงมาคือ *L. welshimeri*, *L. seeligeri* และ *L. monocytogenes* ตามลำดับ โดยเกิดการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. มากที่สุดที่บริเวณท่อระบายอากาศของเครื่องแช่เย็น สายพาน และน้ำ

ทั้งจากเครื่องแช่เยือกแข็ง ปริมาณการพบ *Listeria* สปีชีส์ต่างๆบริเวณสิ่งแวดล้อมในโรงงาน แสดงในตาราง 2-7

ตาราง 2- 7 ปริมาณการพบ *Listeria* สปีชีส์ต่างๆในสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งในประเทศไทย (Keeratipibul & Techaruwichit, 2012)

สปีชีส์	ปริมาณการพบ (ร้อยละ)
<i>L. innocua</i>	82.3
<i>L. welshimeri</i>	11.2
<i>L. seeligeri</i>	5.5
<i>L. monocytogenes</i>	1

ในผลิตภัณฑ์อาหารพบ *Listeria* spp. มากในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากนม อย่างไรก็ตามยังสามารถพบ *Listeria* ได้ในอาหารชนิดอื่นๆเช่น ผักสดและผลไม้ Karakolev (2009) ได้ตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. ในอาหารโดยวิธี ISO 11290-1 ในเนื้อวัว เนื้อวัวสับ เนื้อหมู เนื้อหมูสับ และไส้กรอก พบว่า จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด 786 ตัวอย่าง พบว่า 133 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.9) มีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. โดยแบ่งเป็นการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ถึง 87 ตัวอย่าง (ร้อยละ 65.4) ตามด้วย *L. innocua* 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26.3) *L. welshimeri* 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.5) และ *L. ivanovii* 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.8) นอกจากนี้ ยังตรวจพบ *L. monocytogenes* ที่ภายในชิ้นเนื้อสัตว์ ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าสัตว์อาจเกิดการติดเชื้อจากอาหารหรือน้ำดื่ม และการตรวจพบเชื้อในเนื้อสับและหมูสับมากกว่าเนื้อสดนั้น เกิดจากการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิต ผู้วิจัยยังได้กล่าวว่ไม่ควรมองข้ามการปนเปื้อนของ *Listeria* สปีชีส์อื่นๆที่ไม่ก่อโรค เนื่องจากการพบ *L. ivanovii* ร่วมกับ *L. innocua* หรือ *Listeria* ที่ไม่ก่อโรคสปีชีส์อื่นๆในอาหารหรือสิ่งแวดล้อม สามารถบ่งชี้ถึงความเสี่ยงในการพบ *L. monocytogenes* นอกจากนี้ Bouayad and Hamdi (2012) ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์จากนม (ชีสชนิดต่างๆ ครีมชีส และเวย์) เนื้อสัตว์สไลด์และเนื้อสัตว์ปรุงสุก พบว่าตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด 227 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของ *Listeria* ในซอพต์ชีส เวย์ เนื้อสไลด์และเนื้อปรุงสุก 21 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.3 โดยแบ่งเป็นการปนเปื้อนของ *L. innocua* มากที่สุด 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 52.4) รองลงมาเป็น *L. monocytogenes* 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28.6), *L. ivanovii* 3 ตัวอย่าง

(ร้อยละ 14.3) และ *L. welshimeri* 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.7) ตามลำดับ ซึ่งการพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วมีสาเหตุมาจาก i) การให้ความร้อนที่ไม่เพียงพอระหว่างกระบวนการ ii) ความต้านทานของแบคทีเรียต่อ pH ที่ต่ำลงระหว่างกระบวนการผลิตชีส และ iii) การปนเปื้อนข้ามผ่านทางอากาศ เครื่องมือ หรือพนักงาน (Farber & Peterkin, 1991; Jouve, 1996; Rosset, 2001) Tompkin, Scott, Bernard, Sveum, and Gombas (1999) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารและได้สรุปว่าการปนเปื้อนส่วนใหญ่เกิดจากการที่ผลิตภัณฑ์อาหารสัมผัสพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมภายในโรงงานผลิตที่มีการปนเปื้อน

จากข้อมูลข้างต้นนี้จะเห็นได้ว่า *L. innocua* เป็นสปีชีส์ที่มักพบว่าปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและผลิตภัณฑ์อาหารมากกว่า *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ก่อโรค เนื่องจาก *L. innocua* สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่า *L. monocytogenes* (Curiale & Lewus, 1994) ซึ่งการพบทั้ง *L. innocua* และ *L. monocytogenes* ร่วมกันแสดงว่าทั้ง 2 สปีชีส์นี้สามารถเจริญได้ในระบบนิเวศน์เดียวกัน ดังนั้น *L. innocua* จึงใช้เป็นตัวชี้วัดของการตรวจพบ *L. monocytogenes* Tompkin (2002) ได้แนะนำว่าในการควบคุม *L. monocytogenes* ให้ใช้การควบคุม *Listeria* spp. แทน โดยที่การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. นั้นให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่า จะทำให้สามารถดำเนินการจัดการและแก้ไขได้อย่างรวดเร็ว และเป็นการสร้างความตระหนักให้มีการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนทุกครั้งที่มีการพบ *Listeria* spp. ในทุกสปีชีส์ ให้ถือว่ามีความสำคัญเทียบเท่าการพบ *L. monocytogenes*

เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค กรมปศุสัตว์ได้กำหนดมาตรฐานด้านจุลินทรีย์สำหรับผู้ผลิตเพื่อให้มีการควบคุมและจัดการการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ภายในโรงงานผลิตอาหารสำเร็จรูป โดยกำหนดไม่ให้พบ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ 25 กรัม (กรมปศุสัตว์, 2551) แต่ประเทศผู้นำเข้าในสหภาพยุโรปได้ให้ความสำคัญกับ *Listeria* สปีชีส์อื่นๆแม้ว่าจะไม่ก่อโรคก็ตาม โดยกำหนดไม่ให้พบ *Listeria* ทุกสปีชีส์ในผลิตภัณฑ์อาหาร (Pesavento et al., 2010) อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* และ *Listeria* สปีชีส์อื่นๆในผลิตภัณฑ์ยังคงเกิดขึ้นอยู่บ่อยครั้ง อาจมีสาเหตุมาจากไม่สามารถหาแหล่งต้นกำเนิดหรือเส้นทางการปนเปื้อนที่แท้จริงของการปนเปื้อนได้ ทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมและจัดการการปนเปื้อนไม่เพียงพอ ดังนั้นการศึกษาเส้นทางการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตสู่ผลิตภัณฑ์ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนของ *Listeria* เข้าสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคสำหรับจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* หลายเทคนิคเพื่อใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาและติดตามการปนเปื้อนเพื่อศึกษาเส้นทางการปนเปื้อนซึ่งจะทำให้การควบคุมและจัดการการปนเปื้อนของ *Listeria* มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น



## 2.4 การจำแนกสายพันธุ์ *Listeria*

การตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. ในโรงงานอุตสาหกรรมและหน่วยงานของรัฐนั้นใช้การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีดั้งเดิมหรือวิธีมาตรฐาน (เช่น วิธีมาตรฐาน ISO 11290-1:1996 และ AOAC 2003.12) ซึ่งใช้การทดสอบทางชีวเคมีในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ อย่างไรก็ตามการจำแนกในระดับสปีชีส์นั้นไม่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาการระบาดของแบคทีเรียก่อโรคหรือติดตามการปนเปื้อนของแบคทีเรียในโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ภายในโรงงานอุตสาหกรรมนั้นมีหลายสายพันธุ์แม้ว่าจะเป็นสปีชีส์เดียวกัน เกิดจากการที่แบคทีเรียมีการปรับตัวให้ทนต่อสภาวะแวดล้อม แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาจไม่ใช่สายพันธุ์เดียวกับที่ตรวจพบในสิ่งแวดล้อมภายในโรงงาน ทำให้ไม่สามารถจัดการการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นวิธีการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถระบุได้ลึกกว่าระดับสปีชีส์จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการเชื่อมโยงการปนเปื้อนของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม ทำให้สามารถติดตามการปนเปื้อนและแก้ปัญหาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การจำแนกความแตกต่างของ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotyping) และการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (Genotyping)

### 2.4.1 การจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotyping)

การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออกจะใช้ลักษณะหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนในการจำแนกความแตกต่าง เช่น คุณสมบัติทางชีวเคมี ชนิดของแอนติเจนบนผนังเซลล์ ความไวต่อสารต้านจุลชีพ และความไวต่อไวรัสแบคทีเรีย (Zadoks & Watts, 2009) ตัวอย่างการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก เช่น serotyping และ phage typing

#### 2.4.1.1 Serotyping

หลักการของ serotyping คือ การใช้แอนติซีรัม (antisera) ที่มีความจำเพาะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนผนังเซลล์ (somatic antigens, O-antigens) หรือแอนติเจนบริเวณแส้ (flagella antigens, H-antigens) ทำให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนขึ้น *Listeria* spp. แบ่งออกได้เป็น 16 serotypes โดยที่ *L. monocytogenes* แบ่งได้เป็น 13 serotypes แสดงในตาราง 2-3 (Jeršek, Tcherneva, Rijpens, & Herman, 1996) โดยทั่วไป *L. monocytogenes* ที่พบมากในสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิตอาหาร คือ serotype 1/2a ตามมาด้วย 4b, 1/2b, 4c และ

1/2c และ ร้อยละ 95 ของตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อน *Listeria* และผู้ป่วยเป็น serotype 1/2a, 1/2b, 4b และ 1/2c (Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet, & Martin, 2004)

ข้อเสียของเทคนิคนี้ คือแอนติซีรัมที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องมีคุณภาพดี จำเป็นต้องมีสายพันธุ์เปรียบเทียบ ราคาแพง ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ใช้แรงงานมาก และมีความสามารถในการทำซ้ำที่ต่ำเนื่องจาก *L. monocytogenes* บางสายพันธุ์มีแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่เหมือนกัน (Palumbo, Borucki, Mandrell, & Gorski, 2003) นอกจากนี้ สปีชีส์ต่างกันอาจให้ผล serotype ที่เหมือนกันได้ เช่น *L. monocytogenes* และ *L. seeligeri* มี serotype ที่เหมือนกันคือ 1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4c และ 6b ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถระบุสปีชีส์ที่ถูกต้องได้ (Liu, 2006)

#### 2.4.1.2 Phage typing

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยใช้หลักความจำเพาะของไวรัสแบคทีเรีย (bacteriophage) และตัวรับ (phage receptors) บนผิวเซลล์แบคทีเรีย โดยไวรัสแบคทีเรียจะเข้าไปจับกับตัวรับที่เหมาะสม ยึดติดกับผนังเซลล์และเกิดการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย เมื่อเกิดการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะเกิด clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งนำมาเป็นเกณฑ์ในการจำแนกสายพันธุ์ (Graves et al., 2007) Capita, Prieto, Mereghetti, and Alonso-Calleja (2005) ได้จำแนกสายพันธุ์ของ *L. monocytogenes* จำนวน 96 ไอโซเลทที่แยกได้จากโรงงานชำแหละเนื้อไก่โดยใช้ phage typing set พบว่ามีเพียง 53 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ (phage typeable) ซึ่งจำแนก *L. monocytogenes* 53 ไอโซเลทออกเป็น 42 รูปแบบ เทคนิคนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้ bacteriophage หลายชนิดในการวิเคราะห์และต้องมีการเก็บรักษาที่ได้มาตรฐาน ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น นอกจากนี้ยังมี *Listeria* บางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ (untypeable) เนื่องจากไม่มี phage ที่จำเพาะกับตัวรับบนผิวเซลล์แบคทีเรีย นั้น ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์รูปแบบที่เกิดขึ้นได้ (Jeyaletchumi et al., 2010)

#### 2.4.2 การจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (Genotyping)

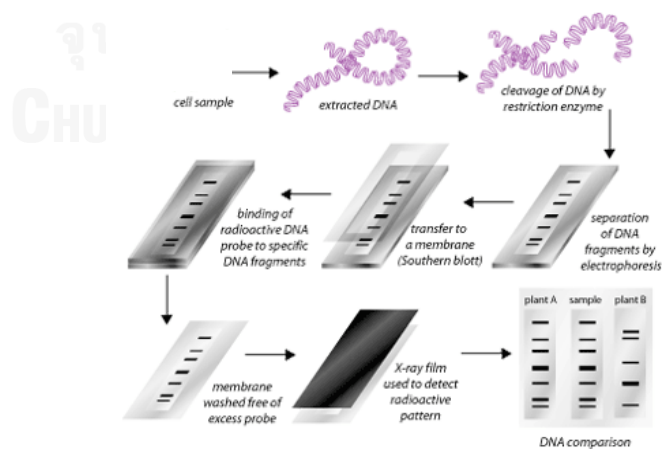
เนื่องจากข้อจำกัดในการจำแนกสายพันธุ์ด้วยการดูลักษณะที่แสดงออก จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคสำหรับจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยวิเคราะห์จากความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมบนดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid-DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid-RNA) ของแบคทีเรีย ซึ่งมีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์สูงกว่าการจำแนกโดยใช้ลักษณะที่แสดงออก ตัวอย่างเทคนิคจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม ได้แก่

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE), Ribotyping, Amplify Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Repetitive extragenic palindromic element-based PCR (REP-PCR), Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) และ Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

#### 2.4.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะซึ่งเรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์โดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมีลำดับของนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไปเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดชิ้นส่วนและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกัน ขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RFLP แสดงในรูป 2-3

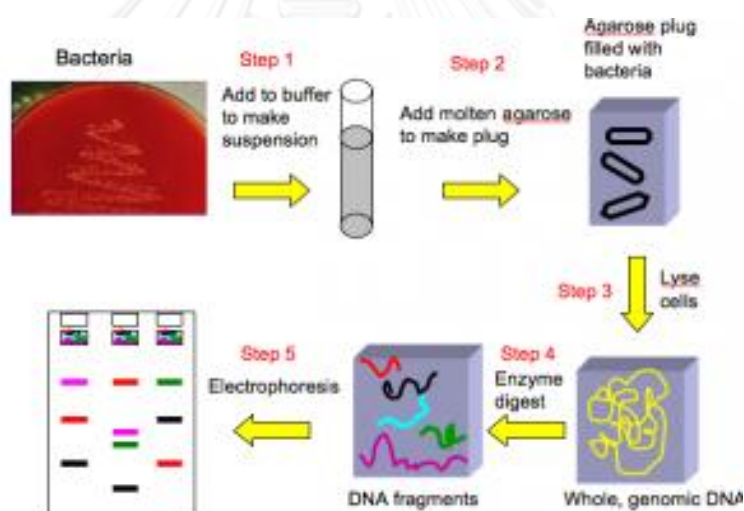
ข้อเสียของเทคนิคนี้คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์อาจมีจำนวนมากถึง 100 ชิ้นจึงทำให้เกิดความยุ่งยากในการเปรียบเทียบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Olsen, Brown, Skov, & Christensen, 1993) ต่อมาจึงได้มีการนำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction-PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการก่อน แล้วจึงตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เรียกเทคนิคนี้ว่า PCR-RFLP



รูป 2- 3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค RFLP (Harishvasudevan, 2006)

### 2.4.2.2 Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE เป็นเทคนิคที่ใช้จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอได้เป็นชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 40-600 kb แล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสซึ่งจะมีการสลับขั้วกระแสไฟฟ้าเป็นจังหวะทำให้เกิดการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ได้ โดยขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เรียกว่าเทคนิค PFGE แสดงในรูป 2-4 การจำแนกสายพันธุ์ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิค PFGE ส่วนมากมักจะใช้เอนไซม์ *SmaI* ร่วมกับเอนไซม์ *ApaI* เพื่อเพิ่มความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ (Wiedmann, 2002) เทคนิค PFGE ถือว่าเป็น gold standard สำหรับการศึกษาระบาดวิทยาของแบคทีเรียก่อโรค (Jiang et al., 2008) ถึงแม้ว่าเทคนิค PFGE เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อด้อยคือใช้แรงงานมาก ต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่จำเพาะ เอนไซม์ราคาแพง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน (Murphy et al., 2007)

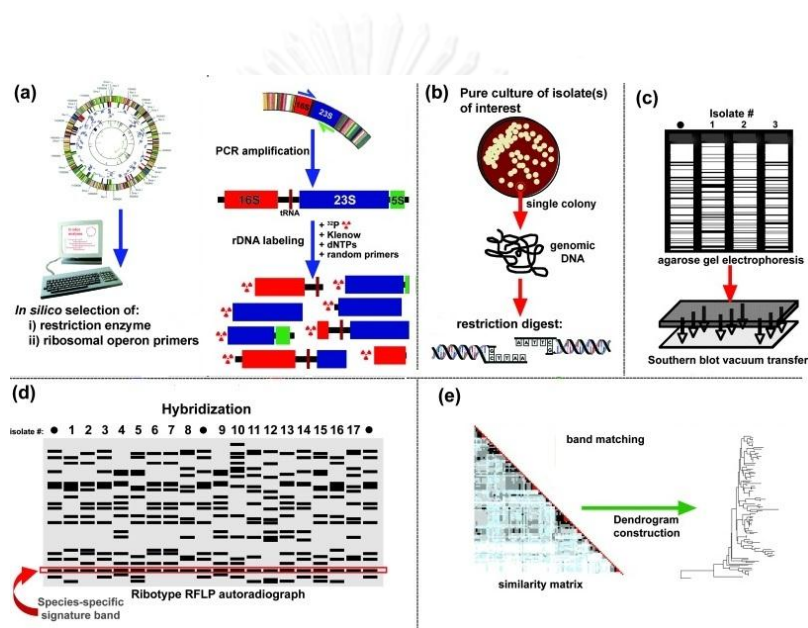


รูป 2- 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเทคนิค PFGE (Food Safety News, 2009a)

### 2.4.2.3 Ribotyping

เป็นเทคนิคการจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยความแตกต่างของยีนบริเวณ 16s และ 23s ribosomal RNA (rRNA) ดีเอ็นเอจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *EcoRI*, *PvuII* หรือ *XhoI* แล้วแยกชิ้นส่วนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรน เช่น ไนโครเซลลูโลสหรือแผ่นไนลอน แล้วนำแผ่นเมมเบรนมาไฮบริไดซ์พร้อมกับโพรบ (probe)

ซึ่งติดฉลากกัมมันตรังสีและจำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน rRNA สารกัมมันตรังสีที่ติดอยู่กับโพรบ ทำให้สามารถติดตามชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยอาศัยการเรืองแสงของกัมมันตรังสีภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (Jadhav et al., 2012) ซึ่งความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ จะนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียที่เรียงแสดงในรูป 2-5 ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้มีความสามารถในการทำซ้ำ แต่ก็ยังคงไม่สามารถจำแนก *L. monocytogenes* serotype 1/2b กับ 4b ได้ (Graves et al., 2007)



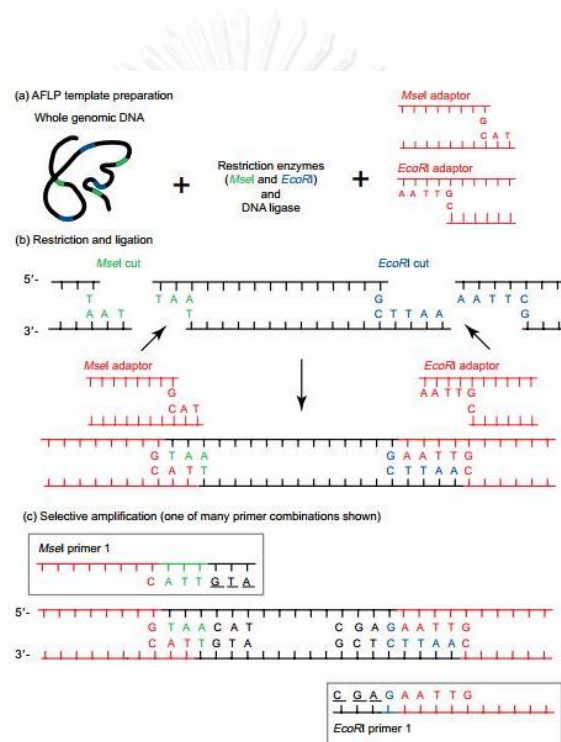
รูป 2- 5 หลักการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค ribotyping (Bouchet, Huot, & Goldstein, 2008)

#### 2.4.2.4 Amplify Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เป็นเทคนิคซึ่งใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบเพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ แล้วจึงเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางชิ้นด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เนื่องจากถ้าเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมดจะมีปริมาณมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ขั้นตอนในการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค AFLP แสดงในรูป 2-6

ในการวิเคราะห์ด้วย AFLP ใช้วิธีต่อ adapter เข้าไปที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด แล้วเลือกเพิ่มปริมาณเพียงบางชิ้นด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน adapter ต่อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์และเพิ่มนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ที่ปลาย 3' ประมาณ 1-3 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า selective nucleotides ซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ตัดไว้ได้เพียงบางส่วน หลังจากทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแล้ว ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกตรวจสอบด้วย

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และนำสายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาใช้จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) Lomonaco et al. (2011) ได้ใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกสายพันธุ์ *L. monocytogenes* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ร่วมกับ *Eco*RI และ *Hind*III ร่วมกับ *Hha*I พบว่า มีความสามารถในการจำแนกเทียบเท่ากับเทคนิค PFGE และมีความสามารถในการทำซ้ำ อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังคงใช้เวลาในการวิเคราะห์มากเนื่องจากขั้นตอนการตัดเอนไซม์และการต่อ adaptor



รูป 2- 6 หลักการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค AFLP (Skipper, 2009)

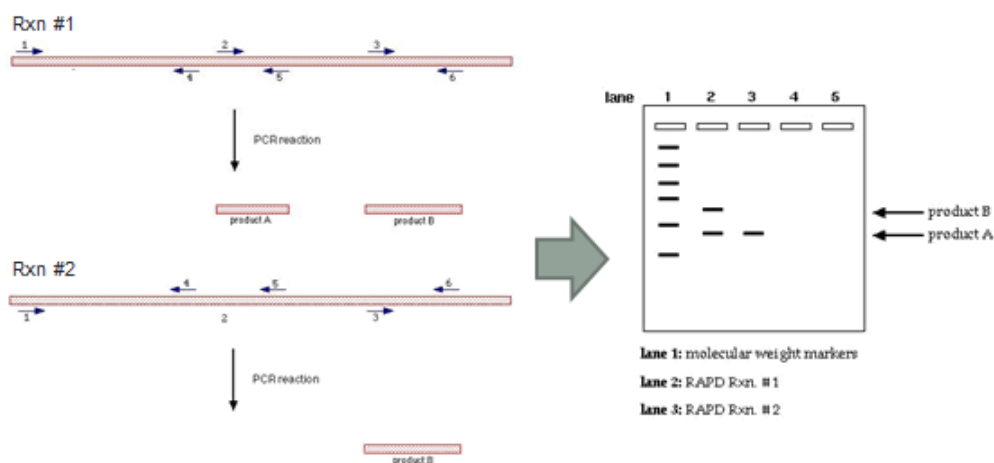
#### 2.4.2.5 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

เป็นการประยุกต์การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10-12 bp (ตาราง 2-8) เพียงชนิดเดียวสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายๆตำแหน่งพร้อมๆกันและใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ต่ำ (ประมาณ 37 องศาเซลเซียส) ถ้าตำแหน่งใดที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ทิศทางแบบที่ปลาย 3' เข้าหากันและอยู่ห่างจากกันไม่มากนัก (ไม่เกิน 500 bp) จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ใช้วิธีการสังเคราะห์แบบสุ่ม จึงไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ต้องการศึกษา ส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จะกระจายอยู่ทั่วจีโนมโดยไม่เฉพาะเจาะจง โดยความแตกต่างของ

สายพันธุ์พิจารณาจากการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลง เพิ่มหรือหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณนั้น (Tyler, Wang, Tyler, & Johnson, 1997) หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RAPD แสดงในรูป 2-7

ตาราง 2- 8 ตัวอย่างไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD

RAPD Primer	Primer sequence
HLWL74	5' ACGTATCTGC 3'
HLWL85	5' ACAACTGCTC 3'
OPM-01	5' GTTGGTGGCT 3'
PB1	5' GGAAGTGTCA 3'
PB4	5' AAGGATCAGC 3'
UBC127	5' ATCTGGCAGC 3'
UBC155	5' CTGGCGGCTG 3'
UBC156	5' GCCTGGTTGC 3'
Universal forward sequencing primer	5' TTATGTAAAACGACGGCCAGT 3'
Lis5	5' GCTGGAGTCA 3'
Lis11	5' AGCCAGGTCA 3'
CsM13	5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'
inIAF	5' CAGGCAGCTACAATTACACA 3'
PH	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'



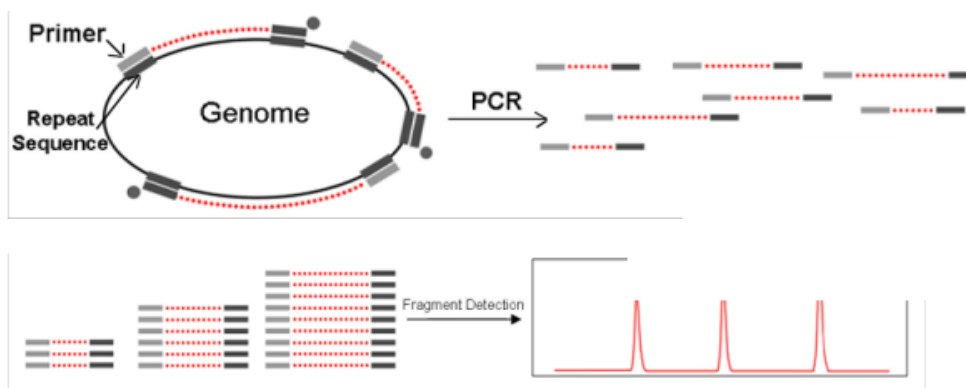
รูป 2- 7 หลักการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD (Rutgers University)

Giovannacci et al. (1999) ได้จำแนกสายพันธุ์ *L. monocytogenes* จำนวน 287 ไอโซเลทโดยเทคนิค RAPD พบว่า สามารถจำแนก *L. monocytogenes* ได้เป็น 17 กลุ่มโดยใช้ ไพรมเมอร์ 5 ชนิด (HLWL74, PB4, UBC127, Lis5 และ Lis11) และพบว่ามี ความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ใกล้เคียงกับเทคนิค PFGE อย่างไรก็ตาม เทคนิค RAPD มี ข้อจำกัดเรื่องการทำซ้ำระหว่างห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสถานะและส่วนผสมของ สารเคมีเพียงเล็กน้อย อาจทำให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป

#### 2.4.2.6 Repetitive extragenic palindromic element-based PCR (REP-PCR)

REP เป็นเทคนิคซึ่งจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียโดยการเพิ่มปริมาณ ส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆกัน (repetitive sequence) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรส จากนั้นแยกชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส repetitive element ที่นิยมใช้ ได้แก่ repetitive extragenic palindromic (REP) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) ซึ่ง repetitive element นี้จะเป็นส่วนที่จับกับไพรมเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ถ้าในจีโนมของแบคทีเรียมี repetitive sequence ในตำแหน่งต่างๆกันจะทำให้เกิดความ หลากหลายของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และใช้ในการพิจารณาความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย (Harvey, Norwood, & Gilmour, 2004) หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค REP-PCR แสดงในรูป 2-8





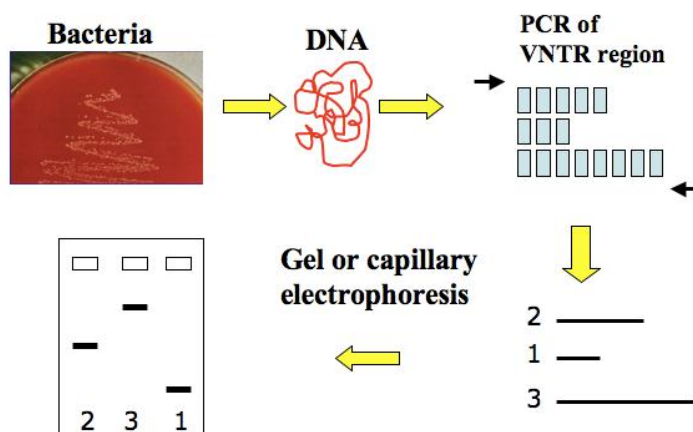
รูป 2- 8 หลักการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค REP-PCR (Microbe Inotech Laboratory)

Jeršek et al. (1999) ได้ใช้เทคนิค REP-PCR ในการจำแนก *L. monocytogenes* 46 ไอโซเลทที่แยกได้จากคน สัตว์ และอาหาร ซึ่งเทคนิคนี้ได้จำแนก *L. monocytogenes* ออกเป็น 4 กลุ่ม และสามารถจำแนก serotype 1/2a, 1/2b และ 4b ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และ Chou and Wang (2006) ได้ใช้เทคนิค REP-PCR จำแนกสายพันธุ์ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากอาหารทะเล พบว่ามีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ใกล้เคียงเทคนิค PFGE อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องการทำซ้ำระหว่างห้องปฏิบัติการ

#### 2.4.2.7 Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis

##### (MLVA)

MLVA เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยพิจารณาความแปรผันของจำนวน Tandem Repeat ที่ตำแหน่งจำเพาะภายในจีโนมของแบคทีเรีย Tandem Repeat คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอไทด์ 2 โมเลกุลขึ้นไปซ้ำกันเป็นชุดๆ ภายในจีโนมของแบคทีเรีย ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์แสดงในรูป 2-9 โดยเริ่มจากการหาตำแหน่ง Tandem Repeat ทั้งหมดภายในจีโนมของแบคทีเรียที่สนใจแล้วออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ Tandem Repeat ที่ต้องการ จากนั้น เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วนำไปหาขนาดเพื่อนำไปคำนวณจำนวน Tandem Repeat ด้วย Capillary Electrophoresis หรือ automated sequencing ความแตกต่างของจำนวน Tandem Repeat จะนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย ซึ่งการวิเคราะห์ Tandem หลายตำแหน่งเป็นการเพิ่มความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ตรวจติดตามการปนเปื้อนหรือศึกษาระบาดวิทยา (Miya et al., 2008; Murphy et al., 2007; Sperry, Kathariou, Edwards, & Wolf, 2008)



รูป 2- 9 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค MLVA (Food Safety News, 2009b)

Lindstedt et al. (2008) ได้ใช้เทคนิค MLVA ในการจำแนก *L. monocytogenes* โดยใช้ Tandem Repeat ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง เปรียบเทียบกับเทคนิค PFGE พบว่า เทคนิค MLVA มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์มากกว่าเทคนิค PFGE เช่นเดียวกัน Chen 2011 ที่พบว่าเทคนิค MLVA มีความสามารถเปรียบเทียบการจำแนกสายพันธุ์สูงกว่าเทคนิค MLVA, AFLP และ PFGE และมีความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือต้องค้นหาตำแหน่ง Tandem Repeat และออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis ค่อนข้างสูง ทำให้ไม่เหมาะกับการใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก

#### 2.4.2.8 Multi-locus Sequence Typing (MLST)

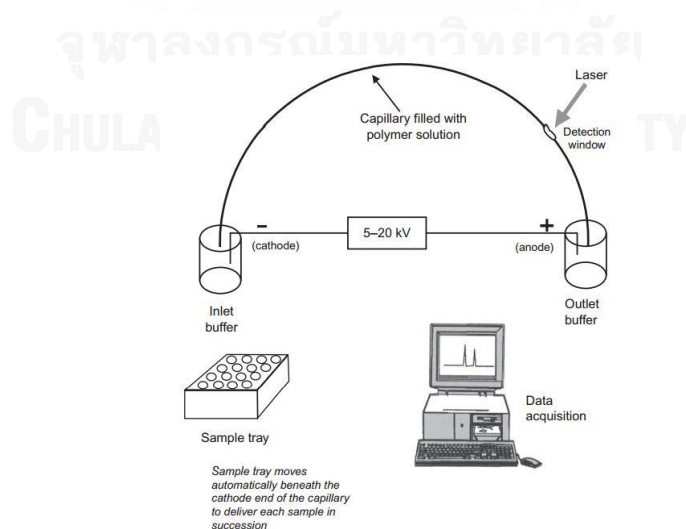
เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน housekeeping gene ซึ่งเป็นยีนที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อนั้นๆและเป็นยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างช้าๆ วิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ housekeeping gene ที่มีความยาวประมาณ 450-500 bp และตามด้วย automated sequencing ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเชื้อแต่ละไอโซเลทจะนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาความสัมพันธ์และสามารถหาความเชื่อมโยงระหว่างแหล่งที่พบซึ่งใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาได้ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถเก็บในฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆได้ทั่วโลก (Maiden et al., 1998; Urwin & Maiden, 2003)

ถึงแม้ว่าเทคนิค MLST จะมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง แต่เทคนิคนี้มีข้อดีคือ มีความแม่นยำสูง สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างของชนิดเอ็นเอที่ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยการวิเคราะห์ขนาด และง่ายต่อการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Graves et al., 2007)

## 2.5 Capillary Electrophoresis (CE)

CE เป็นเทคนิคสำหรับวิเคราะห์ขนาดของชนิดเอ็นเอที่พัฒนามาจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ระบบแคปิลลารีแทนการใช้แผ่นเจล โดยแคปิลลารีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 50 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 30-80 เซนติเมตร แคปิลลารีมักทำจากแก้วหรือซิลิกา ภายในบรรจุสารพอลิเมอร์ เช่น dimethyl polyacrylamide จากการที่แคปิลลารีมีขนาดเล็ก ทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์และตัวอย่างปริมาณน้อยในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการวิเคราะห์รวดเร็ว และยังสามารถแยกขนาดชนิดเอ็นเอได้ละเอียดกว่าการใช้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดั้งเดิม อย่างไรก็ตามการใช้ CE ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเครื่องมือวิเคราะห์นี้ยังมีราคาแพงทำให้สามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง (Butler, 2011; Petersen, Okorodudu, Mohammad, & Payne, 2003)

ส่วนประกอบพื้นฐานในระบบแคปิลลารี ประกอบด้วยแคปิลลารี เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแรงสูงที่ต่อกับอิเล็กโทรด ภาชนะใส่บัฟเฟอร์ ถาดใส่ตัวอย่าง และเครื่องตรวจจับสัญญาณ แสดงในรูป 2-10 ตัวอย่างชนิดเอ็นเอจะถูกฉีดเข้าไปในแคปิลลารีโดยใช้สนามไฟฟ้าแล้วเกิดการแยกของชนิดเอ็นเอภายในแคปิลลารี เครื่องตรวจจับสัญญาณที่ปลายข้างหนึ่งของแคปิลลารีจะตรวจวัดสัญญาณแล้วบันทึกข้อมูลที่ได้โดยเครื่องประมวลผล

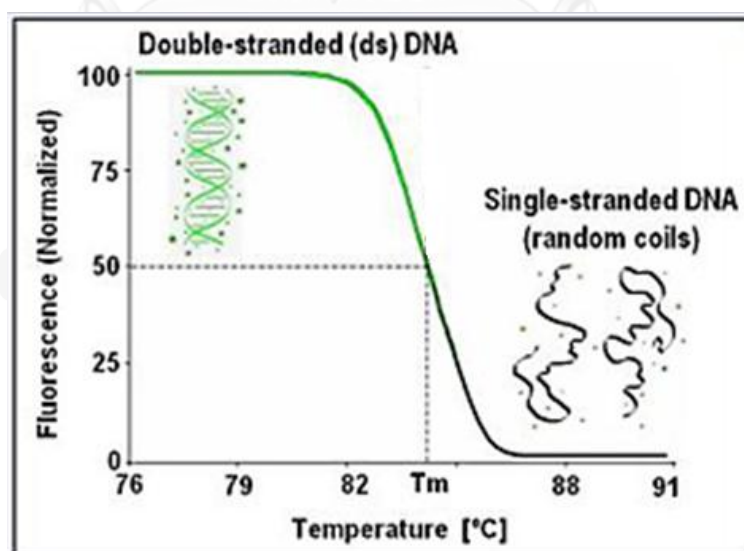


รูป 2- 10 ส่วนประกอบของเครื่องมือ Capillary Electrophoresis (Butler, 2011)

## 2.6 High Resolution Melting Analysis (HRM)

เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการตรวจวัดอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ หลักการของ HRM คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งที่สนใจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยมี fluorescent dye ซึ่งจะยึดเกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และเกิดการเปล่งแสง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกตัวออกจากกัน และตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลง อุณหภูมิจุดที่การแยกสายดีเอ็นเอเกิดขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์คืออุณหภูมิหลอมเหลว (Melting Temperature;  $T_m$ ) ของชิ้นดีเอ็นเอนั้น หลักการของการหาอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ แสดงในรูป 2-11

ปัจจัยที่ส่งผลต่ออุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอได้แก่ ความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้นดีเอ็นเอ และปริมาณ G/C ที่อยู่ในชิ้นดีเอ็นเอนั้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอก คือความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  ในปฏิกิริยา ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ เทคนิค HRM ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), DNA methylation และ gene mutation นอกจากนี้ ยังมีการใช้เทคนิค HRM เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus anthracis* (Fortini et al., 2007), *Yersinia pestis* (Ciammaruconi et al., 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Pang et al., 2011) และ *Bacillus licheniformis* (Dhakal et al., 2013)



รูป 2- 11 หลักการเบื้องต้นในการวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HRM (The Witter Lab)

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

*Listeria innocua* จำนวน 93 ไอโซเลทที่ใช้ในการวิจัยนี้ แยกมาจากผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมภายในโรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง โดยเชื้อทั้งหมดได้ผ่านการตรวจวิเคราะห์ว่าเป็นสปีชีส์ *L. innocua* โดยวิธี ISO 11290-1:1996 และเก็บในสารละลายกลีเซอรอล 15% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2 การเตรียมดีเอ็นเอจาก *L. innocua*

เพาะเลี้ยง *L. innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar + 0.6% Yeast Extract (TSA-YE) (Merck, Germany) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายโคโลนีเดียวลงใน Tryptic Soy Broth + 0.6% Yeast Extract (TSB-YE) (Merck, Germany) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวขุ่น จากนั้นดูดสารแขวนลอย 1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออน 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บเซลล์ *L. innocua* ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ *L. innocua* ทำโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC Real Genomic (RBC bioscience, Taiwan) วิธีสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากข้อแนะนำของผู้ผลิตสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียแกรมบวก (รายละเอียดในภาคผนวก) วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องมือ NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.3 ส่วนผสมของสารเคมีและสภาวะที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR โดย High Resolution Melting Analysis (HRM)

1) ส่วนผสมของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

10X PCR buffer (Invitrogen, Brazil)	2.5	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen, Brazil)	0.75	ไมโครลิตร

10 mM dNTP (Thermo Scientific, USA)	0.25	ไมโครลิตร
10 $\mu$ M Forward primer (IDT, USA)	0.5	ไมโครลิตร
10 $\mu$ M Reverse primer (IDT, USA)	0.5	ไมโครลิตร
20X ResoLight®Dye (Roche, Germany) (สำหรับขั้นตอน HRM)	0.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil)	0.1	ไมโครลิตร
Template DNA (10ng/ $\mu$ L)	5	ไมโครลิตร
Deionized water	15.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

2) สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซโฟลิมเมอร์เรส (Miya et al., 2008)

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	60 องศาเซลเซียส	40 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	4 นาที	

3) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM

Duplex formation		
	95 องศาเซลเซียส	1 นาที
	40 องศาเซลเซียส	1 นาที
HRM	60-99 องศาเซลเซียส (50 acquisition/องศาเซลเซียส)	
Cooling	40 องศาเซลเซียส	

### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การคัดเลือกตำแหน่ง Tandem repeats (TR) และการออกแบบไพรเมอร์

ค้นหาตำแหน่ง TR ภายในจีโนมของ *L. innocua* CLIP 11262 (NCBI Reference Sequence: NC\_003212.1) ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงโดยโปรแกรม Unipro UGENE (Unipro, Russia) แล้วคัดเลือกตำแหน่ง TR โดยมีเงื่อนไขว่าตำแหน่ง TR นั้นจะต้องมีนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุดอย่างน้อย 5 นิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย CE และเทคนิค HRM

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ TR ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, USA) แล้วตรวจสอบอุณหภูมิหลอมเหลวของชิ้นดีเอ็นเอ (DNA melting temperature-T<sub>m</sub>) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Tm Utility เพื่อตรวจสอบ T<sub>m</sub> ของชิ้นดีเอ็นเอที่มีจำนวน TR ต่างๆกัน

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของ TR ด้วยเทคนิค HRM ความแตกต่างของ T<sub>m</sub> ของชิ้นดีเอ็นเอที่มีจำนวน TR ใกล้เคียงกันควรห่างกันอย่างน้อย 0.2 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะให้เห็นความแตกต่างของ melting profile อย่างชัดเจน ในกรณีที่ความแตกต่างของ T<sub>m</sub> น้อยกว่า 0.2 องศาเซลเซียส ไพรเมอร์จะถูกออกแบบใหม่ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ครอบคลุมบริเวณตำแหน่ง TR มีขนาดเล็กลงเพื่อเพิ่มขีดความสามารถของเทคนิค HRM รายละเอียดของตำแหน่ง TR ที่ถูกคัดเลือกและไพรเมอร์แสดงในตาราง 3-1

ตาราง 3- 1 รายละเอียดของตำแหน่ง TR และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

TR locus	Repeat sequence	location	Primer Sequence (5' → 3')
TR1	ACAAAT	118054	F-TCGGTCGATTAAGTCGAAA
			R-CCACCTTCATTTGCGTTACC
TR2	AAAAT	678153	F-CGATAAACAGCAGGTCCATT
			R-GGCACAAAGCATGCTAGAAA
TR3	CGGTAGACC	1124290	F-GACAAAAGTAAGTCATGCGGGTATTT
			R-TAGCTACAATCGGATTAACGG
TR4	GCTGTAGAATGGTTTAATACGAACATTT GGGAACCGATTAATAGCAGTTTCAAC TGTGGCTTATGCAATATCAAGCTACTTT TCAACCTCATGGAAATGATAAAATTAG TTTGGTTCCTT	1285178	F-CGCCGCCCGCCGCCCGCCCCCGTGAAAT CGTAGGCTCTGCA
			R-ACTGCATCGTGAGCAGTTTG
TR5	TGCTTT	1695412	F-CGATGTTTGTGATTTTGCCTCT
			R-GAAGGAGGAAACGTGGATGA
TR6	AATCGGC	1924244	F-GTACCTCCATTTGCTGTCC
			R-ATGTTATCCACCTTCAAGTAACTG
TR7	TCGGCA	1924542	F-TGGATTGACAGTTGGTTTTTCA
			R-CTGATGCTGACGCCGATG
TR8	TCGGCA	1924709	F-GGATTGACAGTTGGTTTTTCAACTAGGA
			R-TGACGCCGACGCTGATGCTGACG
TR9	GCATCC	1924762	F-ATCAGCGTCAGCATCGGCATCA
			R-TGACGCTGATGCCGACGC
TR10	CAATCG	2172229	F-CACTGATGATTCGAAAAGCAAC
			R-ACAAATCCTAAAACGTGGTCA
TR11	TAAAGA	2444015	F-CGCCGCCCGCCGCCCGCCCCCGTGCTA GACTAATTCTAAGGCAAT
			R-TCCTTTTAAATCTTCATAAGAAACAAG
TR12	TTTTA	2471516	F-AAAACTGTCACCATTCGATGT
			R-ACTTAATCAATCAGTTCCAAATGC
TR13	TTTACTGGG	2741368	F-ATGTGCTGGATCTGCTGGT
			R-AAAATCCAGTAGTTCGGTAGAC



### 3.4.2 การพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua*

#### 3.4.2.1 การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR และวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE)

เลือก *L. innocua* จำนวน 11 ไอโซเลทที่แยกได้จากแหล่งต่างๆภายในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง มาทดสอบการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่อง PCR Thermocycle (Techne, UK) โดยใช้ไพรเมอร์ 13 คู่ในตาราง 3-1 ใช้ส่วนผสมของสารเคมีตามข้อที่ 3.3 (1) และสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามข้อที่ 3.3 (2) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสทุกครั้งจะมีการควบคุมคุณภาพโดยใช้น้ำปราศจากไอออนแทนดีเอ็นเอของ *L. innocua* เพื่อตรวจสอบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาและไม่เกิดการปนเปื้อนระหว่างการเตรียม จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์โดย Capillary Electrophoresis (CE) ด้วยเครื่อง QIAxcel (QIAGEN, Germany)

#### 3.4.2.2 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM

สำหรับตำแหน่ง TR ที่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากข้อ 3.4.2.1 นำ *L. innocua* จำนวน 11 ไอโซเลทนี้มาวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR โดยเทคนิค HRM ด้วยเครื่อง LightCycler®480 (Roche, Germany) เพื่อวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างของรูปแบบ melting profile ในแต่ละตำแหน่ง โดยใช้ส่วนผสมของสารเคมีตามข้อที่ 3.3 (1) และสภาวะในการทำปฏิกิริยาตามข้อที่ 3.3 (2-3) วิเคราะห์ข้อมูลของ melting profile ในแต่ละตำแหน่ง TR ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software (Roche, Germany)

#### 3.4.2.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE และผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM

ขนาดชิ้นดีเอ็นเอของ *L. innocua* ทั้ง 11 ไอโซเลทที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CE จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับรูปแบบของ melting profile ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM โดยไอโซเลทที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากันควรมีรูปแบบของ melting profile เหมือนกันและไอโซเลทที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอต่างกันควรมีรูปแบบของ melting profile ที่แตกต่างกัน สำหรับ

ไอโซเลทที่มีผลการวิเคราะห์ด้วย CE ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM จะนำมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในซันดีเอ็นเอโดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Bioneer ประเทศเกาหลี

### 3.4.3 การจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* ด้วยเทคนิค HRM

#### 3.4.3.1 การวิเคราะห์ขนาดของซันดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE)

สำหรับตำแหน่ง TR ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากข้อ 3.4.2.1 นำดีเอ็นเอของ *L. innocua* ทั้ง 93 ไอโซเลท มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่อง PCR Thermocycle (Techne, UK) ใช้ส่วนผสมของสารเคมีตามข้อที่ 3.3 (1) และใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามข้อที่ 3.3 (2) แล้ววิเคราะห์ขนาดของซันดีเอ็นเอ โดย CE ด้วยเครื่องมือ QIAxcel (QIAGEN, Germany)

จำนวน TR (Repeat Unit: RU) ของทุกไอโซเลท ในแต่ละตำแหน่ง คำนวณได้โดยสมการ:

$$\text{จำนวน TR (RU)} = \frac{\text{amplicon size} - \text{flanking size}}{\text{Repeat size}}$$

#### 3.4.3.2 การการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM

นำดีเอ็นเอของ *L. innocua* ทั้ง 93 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR โดยเทคนิค HRM ด้วยเครื่อง LightCycler®480 (Roche, Germany) โดยใช้ตำแหน่ง TR ที่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้อ 3.4.2.1 ใช้ส่วนผสมของสารเคมีตามข้อที่ 3.3 (1) และสภาวะในการทำปฏิกิริยาตามข้อที่ 3.3 (2-3)

วิเคราะห์ข้อมูลของ melting profile ในแต่ละตำแหน่ง TR ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software (Roche, Germany) เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting profile โดยพิจารณาจากรูปแบบของ Normalized melting peak สำหรับตำแหน่ง TR ที่พบความแตกต่างของ melting profile จะถูกนำมาทดสอบต่อไป

### 3.4.3.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE และผลการจำแนกความแตกต่างของ TR ด้วยเทคนิค HRM

ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CE ทั้ง 93 ไอโซเลทจะนำมาเปรียบเทียบกับรูปแบบของ melting profile ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM สำหรับไอโซเลทที่มีผลการวิเคราะห์ด้วย CE ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM จะนำมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้นดีเอ็นเอโดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Bioneer ประเทศเกาหลี

### 3.4.4 การประเมินความแม่นยำของเทคนิค HRM

สำหรับตำแหน่ง TR ที่มีรูปแบบของ melting profile แตกต่างกันในข้อ 3.4.3.2 เลือก *L. innocua* รูปแบบละ 1 ไอโซเลทในแต่ละตำแหน่ง TR เพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบความแม่นยำของเทคนิค โดยแบ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำภายในการทดลองครั้งเดียวกันและความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน ดังนี้

#### 3.4.4.1 การทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (Repeatability)

ทดสอบดีเอ็นเอของไอโซเลทที่ถูกเลือกในแต่ละตำแหน่งด้วยเทคนิค HRM โดยเครื่อง LightCycler®480 (Roche, Germany) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำภายในการทดสอบครั้งเดียวกัน โดยใช้สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีตามข้อที่ 3.3 วิเคราะห์ผลโดยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software (Roche, Germany) แล้วพิจารณาลักษณะของ melting profile ในแต่ละตัวอย่าง (ดัดแปลงวิธีทดสอบจาก Norambuena, Copeland, Křienková, Štambergová, and Macek Jr (2009))

#### 3.4.4.2 การทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (Reproducibility)

ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอของไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกในแต่ละตำแหน่งด้วยเทคนิค HRM โดย LightCycler®480 (Roche, Germany) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยทดสอบ 2 ครั้งในวันที่ต่างกัน ใช้สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีตามข้อที่ 3.3 วิเคราะห์ผลโดยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software (Roche, Germany) แล้วพิจารณาลักษณะของ

melting profile เปรียบเทียบกันในแต่ละวัน (ดัดแปลงวิธีทดสอบจาก Norambuena et al. (2009))

### 3.4.5 การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์

ความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์โดยการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ประเมินโดยพิจารณาจากจำนวนของสายพันธุ์ (จีโนไทป์) ที่จำแนกได้จาก CE และเทคนิค HRM การกำหนดจีโนไทป์ของ *L. innocua* ทั้ง 93 ไอโซเลทจากการวิเคราะห์ด้วย CE ทำโดยการนำจำนวน repeat unit ของแต่ละไอโซเลทในการวิเคราะห์ทั้ง 4 ตำแหน่งมารวมเข้าด้วยกัน (เช่น 4-4-7-5 เป็นจำนวน repeat unit ที่ตำแหน่ง TR1, TR3, TR6 และ TR13 ตามลำดับ) สำหรับการกำหนดจีโนไทป์ของ *L. innocua* ในการจำแนกด้วยเทคนิค HRM ทำโดยนำรูปแบบของ melting profile ของ TR ทั้ง 4 ตำแหน่งของแต่ละไอโซเลทมารวมเข้าด้วยกัน (เช่น A-A-C-B เป็นรูปแบบของ melting profile ที่ตำแหน่ง TR1, TR3, TR6 และ TR13 ตามลำดับ) และพิจารณาความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์จากการประเมินค่า Hunter and Gaston Discriminatory Index (D-value) (Hunter & Gaston, 1988) ตามสมการ:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj - 1)$$

โดยที่ N = จำนวนไอโซเลทที่ใช้ทดสอบ

S = จำนวนของจีโนไทป์ที่จำแนกได้

nj = จำนวนของไอโซเลทที่เป็นสมาชิกในจีโนไทป์ j

## บทที่ 4

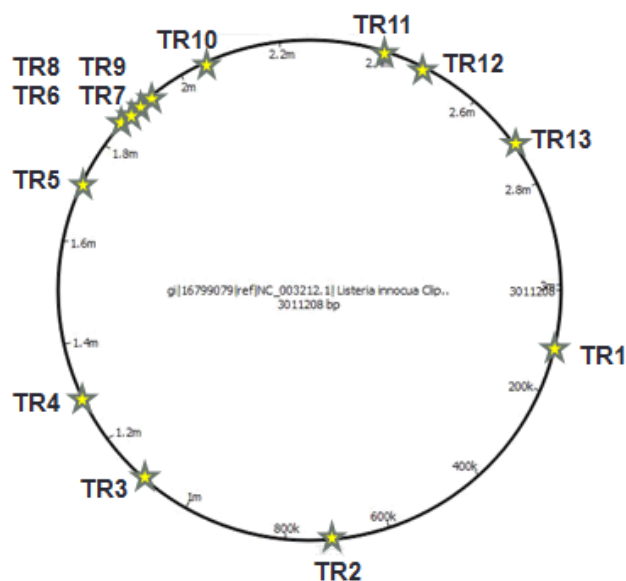
### ผลการดำเนินงานวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการค้นหาคำแหน่ง TR และออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR ของ *L. innocua*

Tandem Repeat (TR) คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุดๆ ซึ่งสามารถเกิดการเพิ่มหรือลดของ repeat unit ได้ในระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำให้เกิดความหลากหลายของจำนวน TR ในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์และใช้ความแตกต่างของจำนวน TR นี้เป็น marker ในการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย การวิเคราะห์ความแตกต่างของ TR เพียงตำแหน่งเดียวอาจทำให้ความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการติดตามการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยเพิ่มจำนวนตำแหน่ง TR ให้มีหลายตำแหน่งเพื่อเพิ่มความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ (Dhakal et al., 2013; Keim et al., 2000)

ในการค้นหาคำแหน่ง TR สำหรับนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย CE และ HRM ได้เลือก complete genome ของ *L. innocua* CLIP 11262 จากฐานข้อมูลของ NCBI (NCBI Reference Sequence: NC\_003212.1) เพื่อเป็นสายพันธุ์อ้างอิง แล้วถ่ายโอนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. innocua* CLIP 11262 ในโปรแกรม Unipro UGENE โดยกำหนดเงื่อนไขไว้ว่าตำแหน่ง TR นั้นต้องมีนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันอย่างน้อย 5 นิวคลีโอไทด์ จากเงื่อนไขดังกล่าวทำให้ได้ตำแหน่ง TR ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง (TR1-TR13) ซึ่งกระจายตัวอยู่ภายในจีโนมดังแสดงในรูป 4-1

ไพรเมอร์ 13 คู่สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง TR ทั้ง 13 ตำแหน่งถูกออกแบบโดยโปรแกรม primer3 รายละเอียดของตำแหน่ง TR และไพรเมอร์ แสดงในตาราง 3-1



รูป 4- 1 แผนผังแสดงตำแหน่งของ TR ทั้ง 13 ตำแหน่ง (TR1-TR13) ภายในจีโนมของ *L. innocua* CLIP 11262

#### 4.2 ผลการพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua*

##### 4.2.1 ผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR และวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE)

การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR ได้เลือก *L. innocua* จำนวน 11 ไอโซเลทที่แยกได้จากแหล่งต่างๆภายในโรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง ได้แก่ พื้นที่บริเวณผลิตสายพาน ถูมือพนักงาน เครื่องชั่ง รองเท้าบูต และแผ่นซูพีลีนรองใต้สายพาน ซึ่งคาดว่าจะพบความแตกต่างบริเวณ TR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน พบว่ามี TR 8 ตำแหน่งจาก 13 ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR ได้ ได้แก่ ตำแหน่ง TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13 จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE ได้ผลดังตาราง 4-1

ตาราง 4- 1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ *L. innocua* จำนวน 11 ไอโซเลทที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Capillary Electrophoresis

Isolate	Size (bp)							
	TR1	TR2	TR3	TR5	TR6	TR10	TR12	TR13
05	250	140	458	125	244	99	124	149
18	250	140	494	125	244	99	124	167
24	250	140	485	125	244	99	124	149
28	250	140	485	125	244	99	124	167
52	250	140	485	125	244	99	124	167
55	250	140	485	125	244	99	124	77
58	250	140	485	125	244	99	124	149
59	256	140	395	125	226	99	124	104
60	250	140	431	125	256	99	124	167
67	250	140	449	125	244	99	124	149
91	250	140	485	125	244	99	124	140

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR มักใช้ capillary electrophoresis (CE) ในการจำแนกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE มีความละเอียดและแม่นยำสูง โดยสามารถจำแนกความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากกว่า 5 bp ได้ (Nederbragt et al., 2008; Petersen et al., 2003)

ผลการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง TR ทั้ง 8 ตำแหน่งด้วย CE จากตาราง 4-1 พบว่ามี TR 4 ตำแหน่ง ได้แก่ TR1, TR3, TR6 และ TR13 ที่มีความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งบ่งบอกถึงการมีความแตกต่างของจำนวน TR ภายใน 11 ไอโซเลทที่คัดเลือกมาทดสอบ โดยพบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 250 และ 256 bp ที่ตำแหน่ง TR1 ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 395, 431, 449, 458, 485 และ 494 ที่ตำแหน่ง TR3 ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 226, 244 และ 256 ที่ตำแหน่ง TR6 และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 77, 104, 140, 149, 167 ที่ตำแหน่ง TR13 สำหรับตำแหน่ง TR2, TR5, TR10 และ TR12 นั้นไม่พบความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอใน 11 ไอโซเลทที่ทดสอบ โดยตำแหน่ง TR2 ชิ้นดีเอ็นเอของทั้ง 11 ไอโซเลทมีขนาด 140 bp ตำแหน่ง TR5 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 125 bp ตำแหน่ง TR10 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 99 bp และตำแหน่ง TR 12 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 124 bp

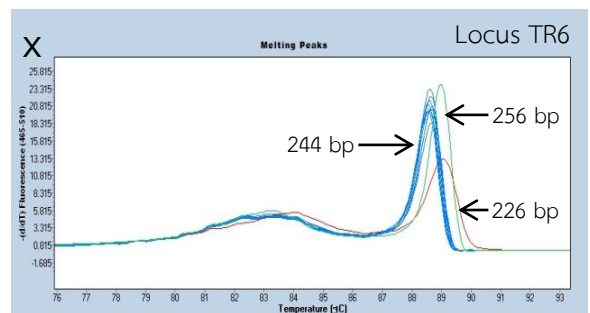
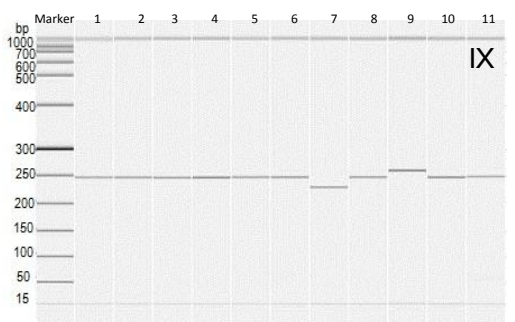
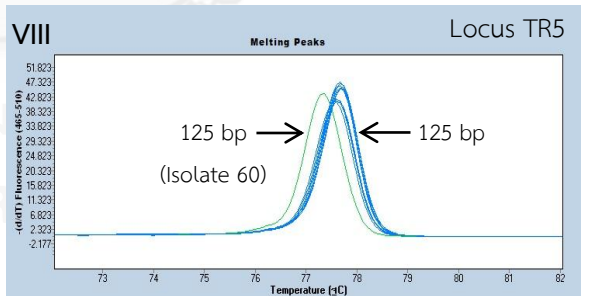
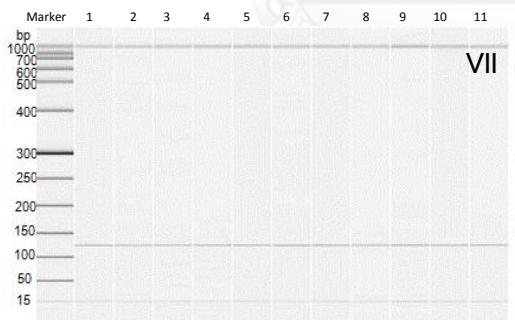
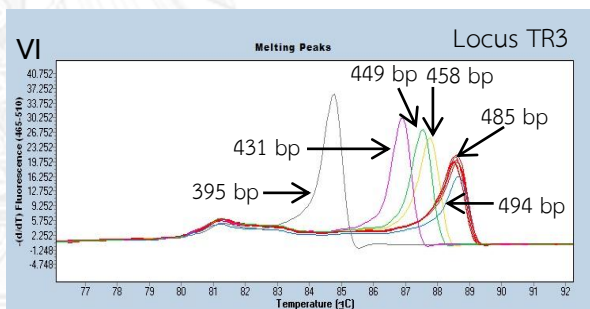
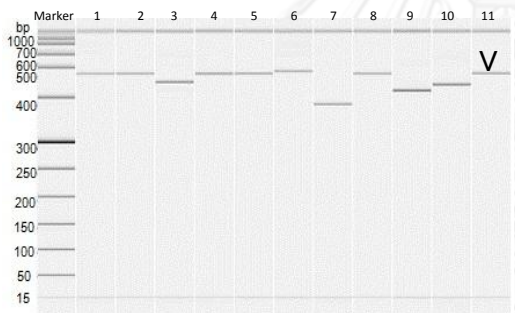
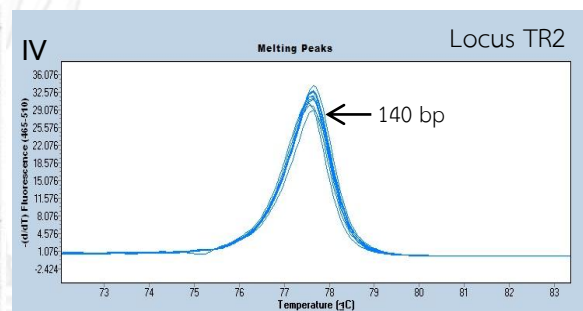
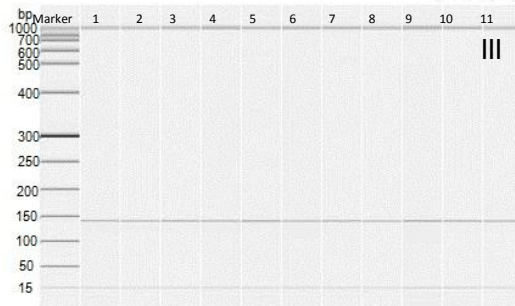
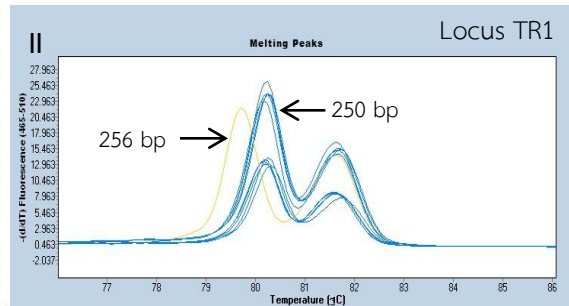
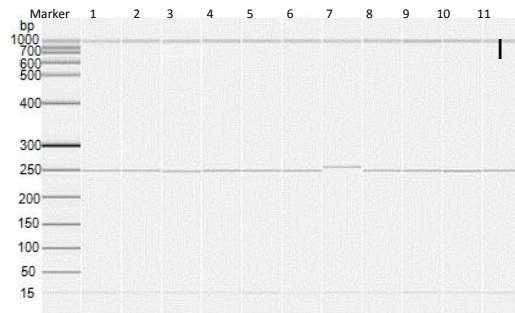
#### 4.2.2 ผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM

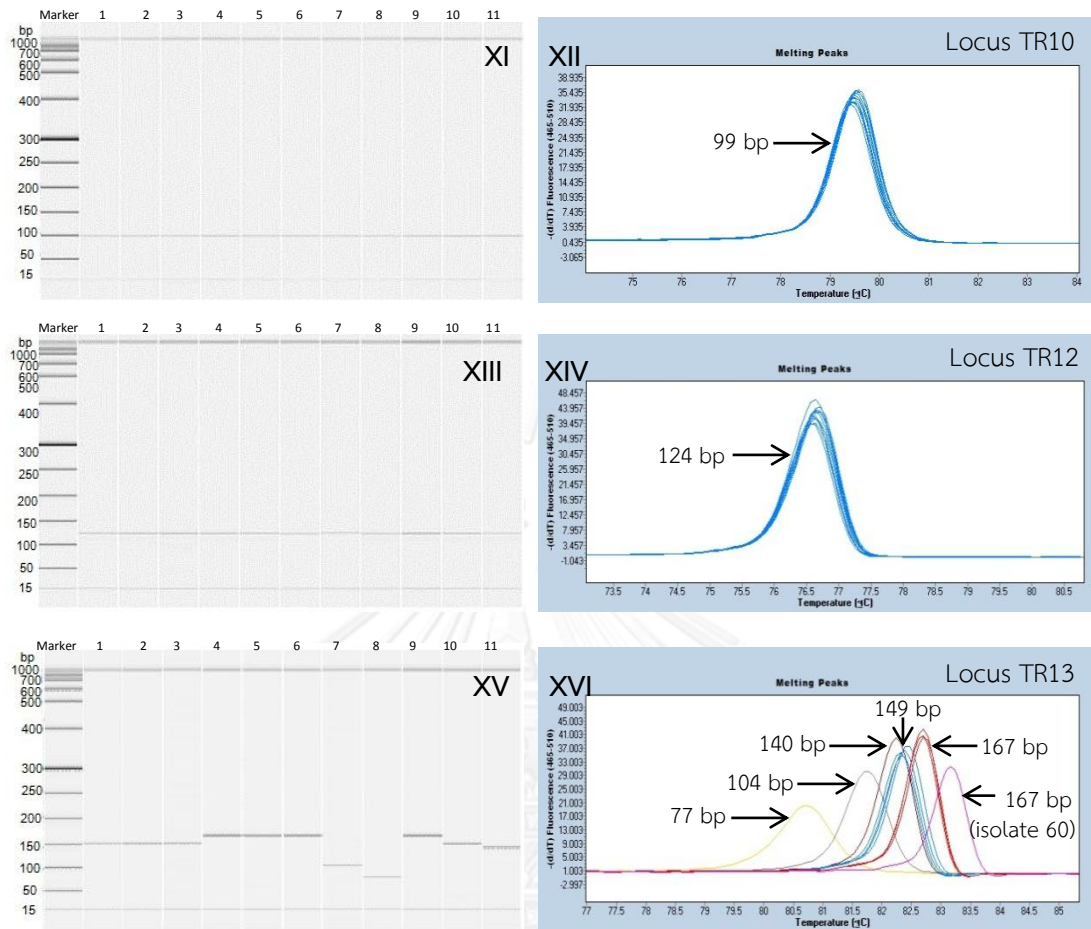
สำหรับ TR ทั้ง 8 ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *L. innocua* ทั้ง 11 ไอโซเลทได้จากข้อ 4.1.1 ได้แก่ TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13 ถูกนำมาทดสอบต่อโดยนำ *L. innocua* ทั้ง 11 ไอโซเลทนั้นมาวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM เพื่อประเมินลักษณะของ melting profile ที่ได้ในแต่ละตำแหน่งได้ผลดังรูป 4-2 ซึ่งพบว่า ตำแหน่ง TR1 มี melting profile 2 รูปแบบ ตำแหน่ง TR2 มี melting profile 1 รูปแบบ ตำแหน่ง TR3 มี melting profile 6 รูปแบบ ตำแหน่ง TR5 มี melting profile 2 รูปแบบ ตำแหน่ง TR6 มี melting profile 3 รูปแบบ ตำแหน่ง TR10 มี melting profile 1 รูปแบบ ตำแหน่ง TR12 มี melting profile 1 รูปแบบ และตำแหน่ง TR13 มี melting profile 6 รูปแบบ

#### 4.2.3 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE และ HRM

จากผลการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE และผลการวิเคราะห์การจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM ทั้ง 8 ตำแหน่ง (TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13) ในหัวข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 พบว่าขนาดชิ้นดีเอ็นเอของทั้ง 11 ไอโซเลทที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CE สอดคล้องกับ melting profile ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HRM ทั้ง 8 ตำแหน่งโดยเทคนิค HRM สามารถจัดกลุ่มไอโซเลทที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากันไว้ด้วยกันและจำแนกไอโซเลทที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกันออกจากกันได้ โดยมีรูปแบบของ melting profile ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่ามีไอโซเลทที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอไม่สอดคล้องกับ melting profile จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ที่ตำแหน่ง TR5 และ TR13 โดยพบว่าที่ตำแหน่ง TR5 *L. innocua* ทั้งหมด 11 ไอโซเลทมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป็น 125 bp ในทุกๆไอโซเลทแต่เกิด melting profile 2 รูปแบบ โดยที่ไอโซเลท 60 มี melting profile ที่แตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ (รูป 4-2 VII-VIII) และตำแหน่ง TR13 ซึ่งไอโซเลท 18, 28, 52 และ 60 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 167 bp แต่ไอโซเลท 60 มี melting profile แตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากัน (รูป 4-2 XV-XVI) ในกรณีนี้ไอโซเลท 60 จะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) เปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้นดีเอ็นเอที่อาจส่งผลต่อ melting profile



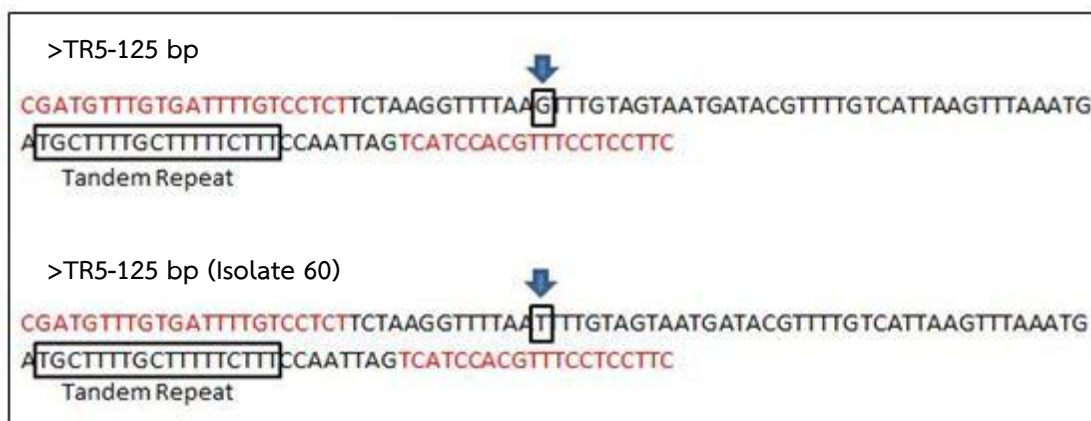




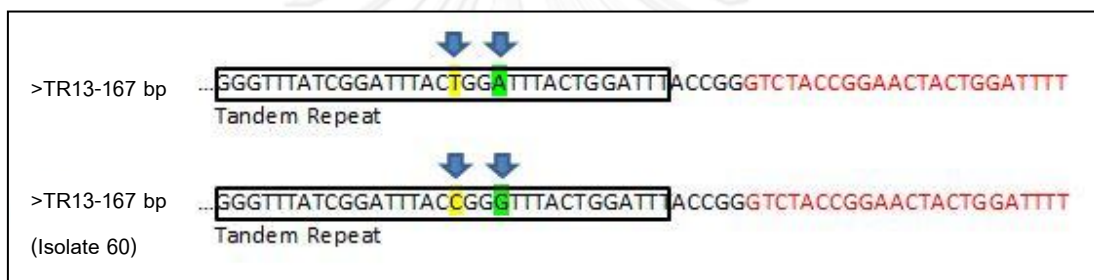
รูป 4- 2 แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์โดย Capillary electrophoresis (ซ้าย) และ melting peak จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM (ขวา) ของ *L. innocua* 11 ไอโซเลท กำหนดให้รูป I, II = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR1 รูป III, IV = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR2 รูป V, VI = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR3 รูป VII, VIII = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR5 รูป IX, X = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR6 รูป XI, XII = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR10 รูป XIII, XIV = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR12 รูป XV, XVI = ผลการทดสอบที่ตำแหน่ง TR13 โดยแถบดีเอ็นเอ Lane1 = ไอโซเลท 24 Lane2 = ไอโซเลท 58 Lane3 = ไอโซเลท 05 Lane4 = ไอโซเลท 28 Lane5 = ไอโซเลท 52 Lane6 = ไอโซเลท 18 Lane7 = ไอโซเลท 59 Lane8 = ไอโซเลท 55 Lane9 = ไอโซเลท 60 Lane10 = ไอโซเลท 67 Lane11 = ไอโซเลท 91

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR5 และ TR13 พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์แบบ point mutation ภายในชิ้นดีเอ็นเอของไอโซเลท 60 (รูป 4-3 และรูป 4-4) ซึ่ง point mutation คือการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เพียงโมเลกุลเดียวภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนการจำลองตัวของดีเอ็นเอหรือเกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น X-ray หรือ UV radiation โดยการเกิด point mutation มี 2 ประเภท คือ i) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ และ ii) การเพิ่มขึ้น (Insertion) หรือขาดหายไป (Deletion) ของนิวคลีโอไทด์ (Lodish et al., 2000) การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง TR5 และ TR13 นี้เป็นการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดชิ้นดีเอ็นเอจึงไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วย CE แต่การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์นี้อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณ G/C และอุณหภูมิหลอมเหลวของชิ้นดีเอ็นเอทำให้สามารถตรวจสอบได้ด้วย HRM โดยไอโซเลทที่เกิด point mutation จะมี melting profile ที่มีรูปแบบแตกต่างจากไอโซเลทที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Distefano, Caruso, La Malfa, Gentile, and Wu (2012) และ Ganopoulos, Argiriou, and Tsaftaris (2011) ที่พบว่า CE ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างที่เกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้นดีเอ็นเอได้ แต่เทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างได้จากรูปแบบ melting profile ที่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง TR5 พบว่าเกิด point mutation ขึ้นนอกบริเวณ TR ในไอโซเลท 60 (รูป 4-3) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น T ( $G \rightarrow T$ ) ในชิ้นดีเอ็นเอมีผลให้ปริมาณ G/C โดยรวมของชิ้นดีเอ็นเอลดลง ทำให้อุณหภูมิหลอมเหลวของชิ้นดีเอ็นเอต่ำกว่าไอโซเลทอื่นๆ และที่ตำแหน่ง TR13 (รูป 4-4) พบว่าเกิด point mutation 2 ตำแหน่งภายใน TR ซึ่งเกิดการแทนที่จาก T เป็น C ( $T \rightarrow C$ ) และ A เป็น G ( $A \rightarrow G$ ) ภายในชิ้นดีเอ็นเอของไอโซเลท 60 ส่งผลให้อุณหภูมิหลอมเหลวของชิ้นดีเอ็นเอสูงขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์นี้ทำให้ปริมาณ G/C ในชิ้นดีเอ็นเอของไอโซเลทนี้เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความแตกต่างของรูปแบบ melting profile ถึงแม้ว่าชิ้นดีเอ็นเอจะมีขนาดเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Derzelle, Mendy, Laroche, and Madani (2011) ที่ได้รายงานว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก G หรือ C เป็น A หรือ T ภายในชิ้นดีเอ็นเอจะทำให้อุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอต่ำลง ในขณะที่การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก A หรือ T เป็น G หรือ C มีผลให้อุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอสูงขึ้น



รูป 4- 3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง TR5



รูป 4- 4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง TR13

#### 4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* ด้วยเทคนิค HRM

##### 4.3.1 ผลการวิเคราะห์ขนาดของซันตีเอ็นเอด้วย Capillary Electrophoresis (CE)

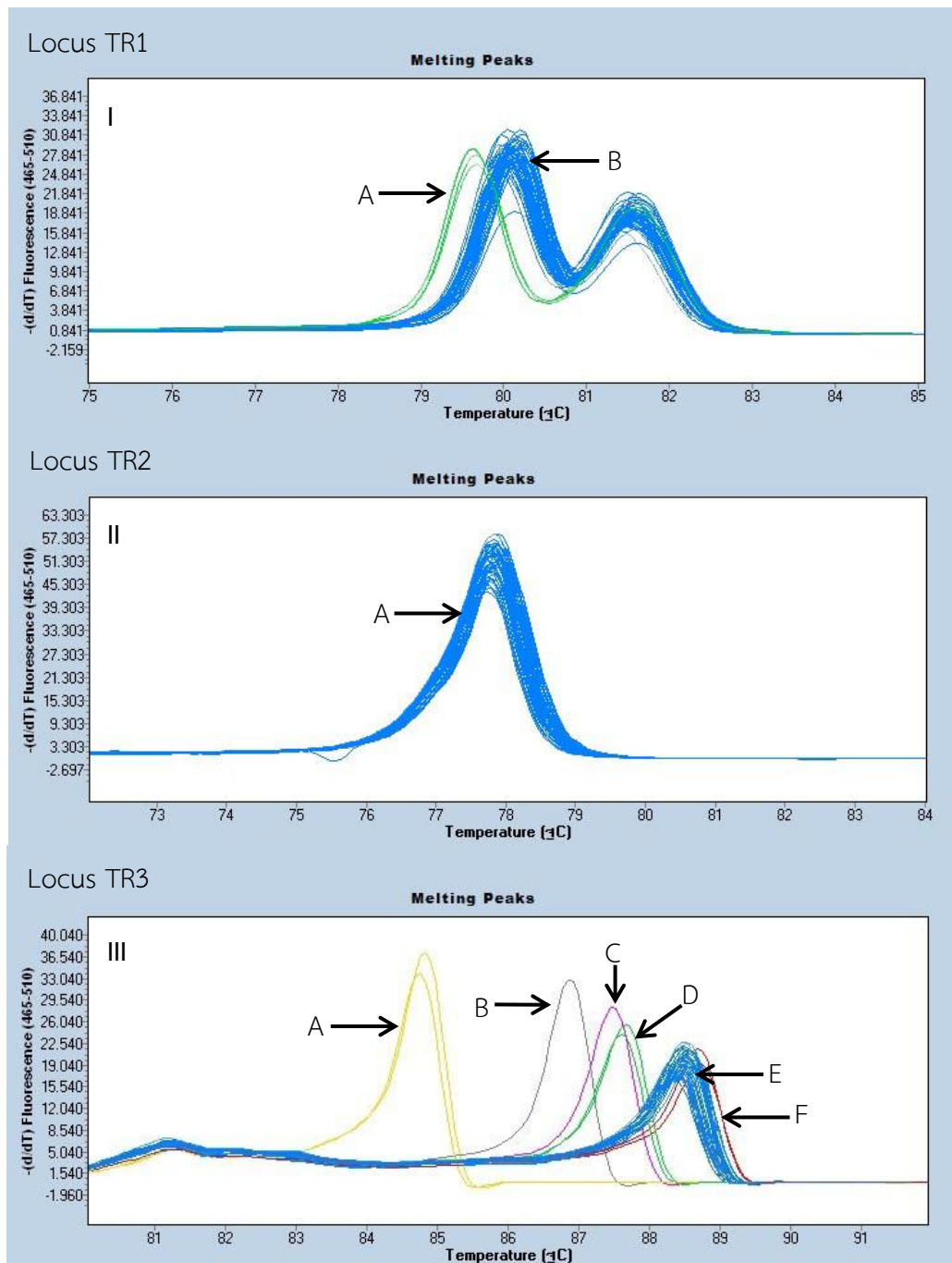
จากผลการพัฒนาเทคนิค HRM ในหัวข้อ 4.2 พบว่า TR 8 ตำแหน่ง (TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณ TR ได้ใน *L. innocua* ทั้ง 11 ไอโซเลท ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงได้วิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดซันตีเอ็นเอที่บริเวณ TR ทั้ง 8 ตำแหน่งด้วย CE เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของขนาดซันตีเอ็นเอทั้งหมดใน *L. innocua* ทั้ง 93 ไอโซเลท ผลการวิเคราะห์ขนาดของซันตีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 8 ตำแหน่งแสดงในตาราง 4-2 โดยตำแหน่ง TR1 มีขนาดซันตีเอ็นเอเป็น 250 และ 256 bp คิดเป็น 3 และ 4 RU ตามลำดับ ตำแหน่ง TR2 มีขนาดซันตีเอ็นเอเป็น 140 bp คิดเป็น 3 RU ทั้ง 93 ไอโซเลท ตำแหน่ง TR3 มีขนาดซันตีเอ็นเอเป็น 395, 431, 449, 458, 485 และ 494 bp คิดเป็น 4, 8, 10, 11, 14 และ 15 RU ตามลำดับ ตำแหน่ง TR5 มีขนาดซันตีเอ็นเอเป็น 125 bp คิดเป็น 2 RU ตำแหน่ง TR6 มีขนาดซันตีเอ็นเอเป็น 226, 238, 244 และ 256 bp คิดเป็น 7, 9, 10 และ 12 RU

ตามลำดับ ตำแหน่ง TR10 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 99 bp คิดเป็น 3 RU ตำแหน่ง TR12 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 124 bp คิดเป็น 3 RU และตำแหน่ง TR13 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 77, 104, 140, 149 167 bp คิดเป็น 2, 5, 9, 10 และ 12 RU ตามลำดับ

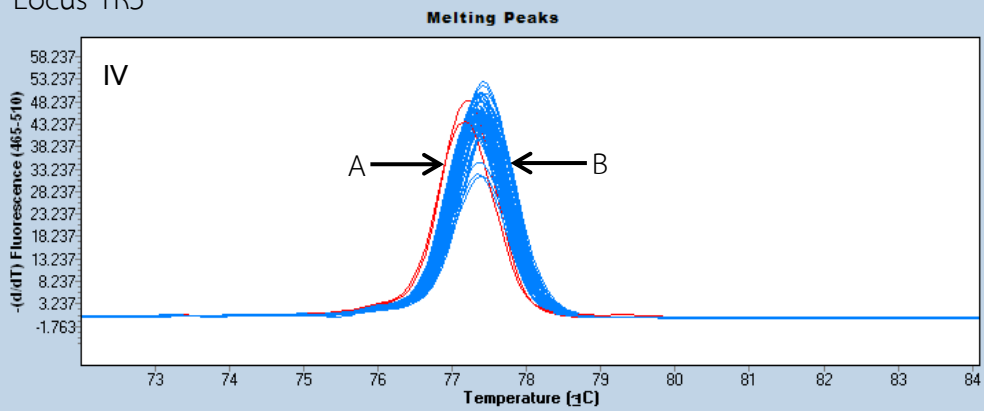
#### 4.3.2 ผลการวิเคราะห์การจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM

การวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ของ *L. innocua* ทั้ง 93 ไอโซเลทด้วยเทคนิค HRM ที่ตำแหน่ง TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13 ได้ผลดังแสดงในรูป 4-5 พบว่าที่ตำแหน่ง TR1, TR3, TR5, TR6 และ TR13 เกิด melting profile หลายรูปแบบ โดยที่ตำแหน่ง TR1 เทคนิค HRM สามารถจำแนก *L. innocua* 93 ไอโซเลท ได้เป็น 2 รูปแบบ คือ A และ B ตำแหน่ง TR3 จำแนกได้เป็น 6 รูปแบบ คือ A, B, C, D, E และ F ตำแหน่ง TR5 จำแนกได้ 2 รูปแบบ คือ A และ B ตำแหน่ง TR6 จำแนกได้ 4 รูปแบบ คือ A, B, C และ D และตำแหน่ง TR13 จำแนกได้ 6 รูปแบบ คือ A, B, C, D, E และ F ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบ melting profile ที่ตำแหน่ง TR2, TR10 และ TR12 ใน *L. innocua* ทั้ง 93 ไอโซเลท

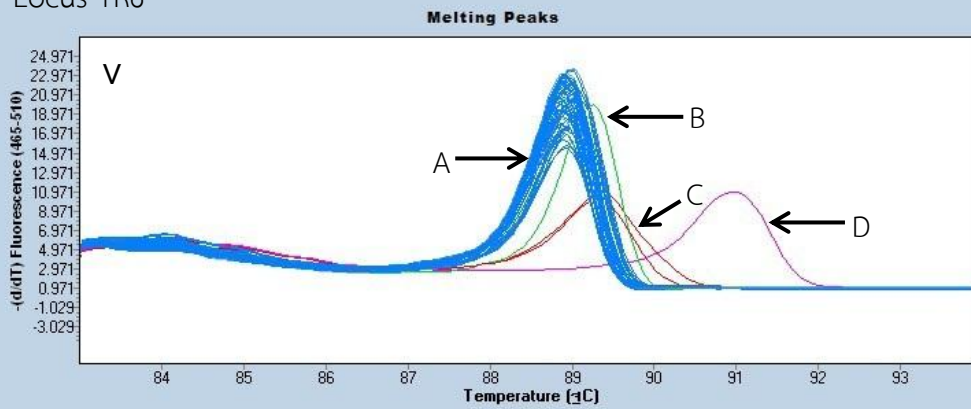
ในงานวิจัยนี้ เทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 77 bp จนถึง 494 bp ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liew et al. (2004) และ Chou, Lyon, and Wittwer (2005) ที่รายงานว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ควรมีขนาดน้อยกว่า 500 bp ซึ่งจะให้เห็นความแตกต่างของ melting profile ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม Stephens, Inman-Bamber, Giffard, and Huygens (2008) และ Naze et al. (2010) พบว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 168 bp ถึง 890 bp ได้



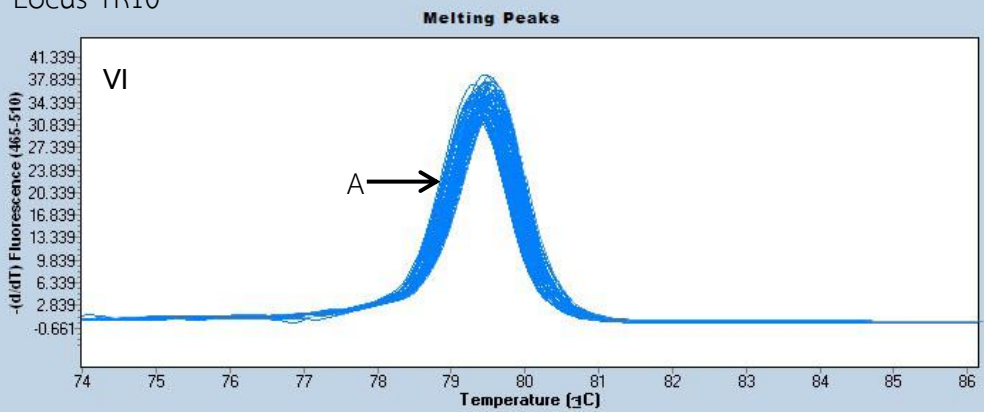
## Locus TR5

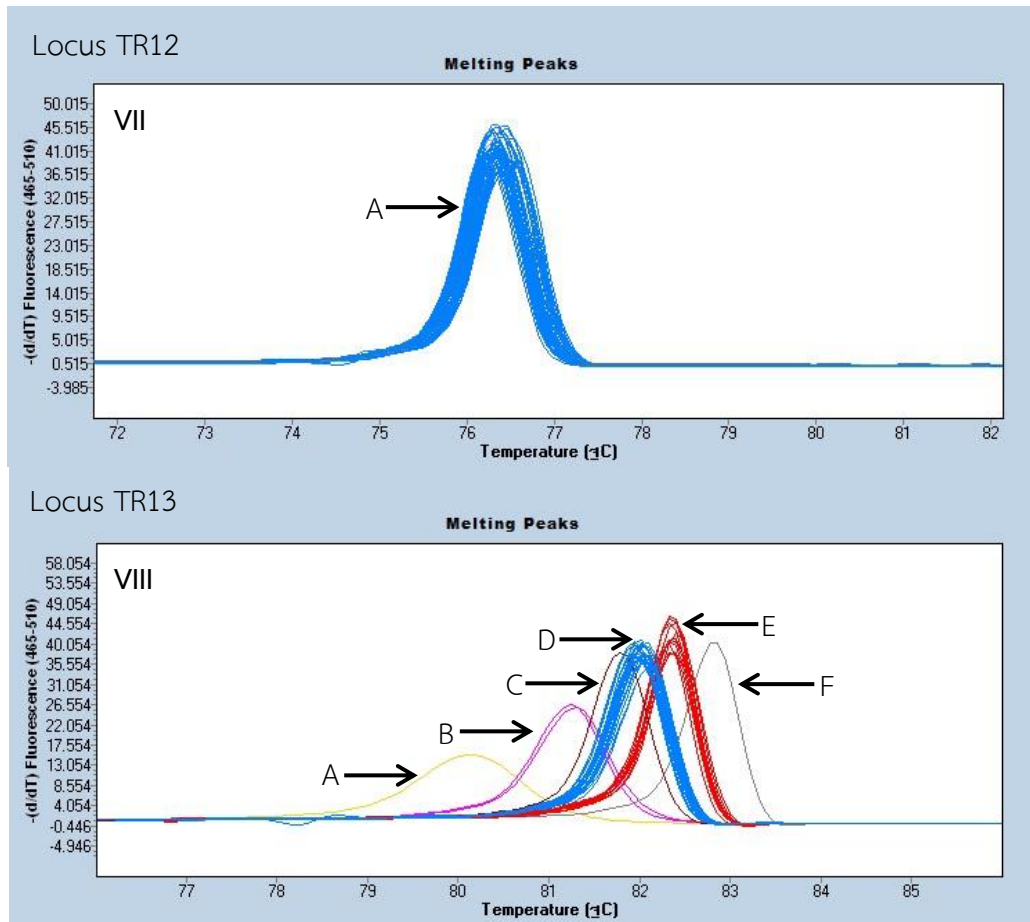


## Locus TR6



## Locus TR10





รูป 4- 5 melting peak จากการวิเคราะห์ความแตกต่างที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ *L. innocua* 93 ไอโซเลท กำหนดให้ I =locus TR1, II=locus TR2, III=locus TR3, IV=locus TR5, V=locus TR6, VI=locus TR10, VII=locus TR12, VIII=locus TR13

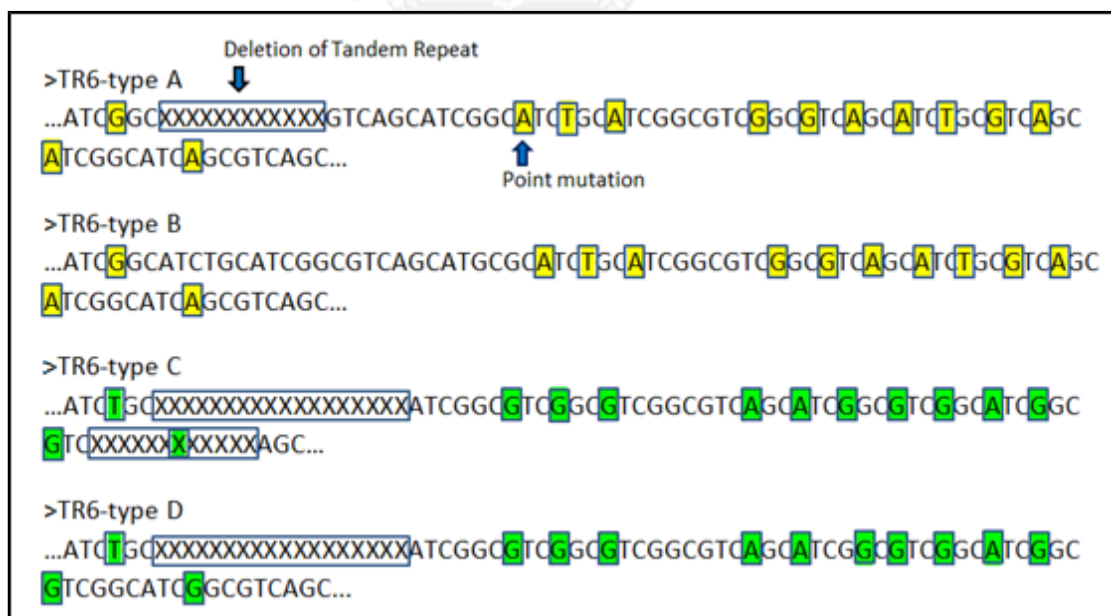


#### 4.3.3 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE และ HRM

จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13 ด้วย CE กับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของ melting profile ด้วยเทคนิค HRM (ตาราง 4-2) พบว่าตำแหน่ง TR1 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 250 (3 RU) และ 256 bp (4 RU) ซึ่งสอดคล้องกับ melting profile ในรูปแบบ B และ A ตามลำดับ ตำแหน่ง TR2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 140 bp (3 RU) ในทุกไอโซเลทซึ่งสอดคล้องกับ melting profile ที่มีเพียงรูปแบบเดียวคือรูปแบบ A ตำแหน่ง TR3 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 395 (4 RU), 431 (8 RU), 449 (10 RU), 458 (11 RU), 485 (14 RU) และ 494 bp (15 RU) ให้ผลสอดคล้องกับ melting profile รูปแบบ A, B, C, D, E และ F ตามลำดับ ตำแหน่ง TR5 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 125 bp (2RU) ในทุกไอโซเลท อย่างไรก็ตามพบว่ามี melting profile 2 รูปแบบ (A และ B) ซึ่งความแตกต่างของ melting profile ที่ตำแหน่งนี้ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างบริเวณ TR แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์นอกบริเวณ TR ดังที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 4.2.3 ดังนั้นตำแหน่ง TR5 จะไม่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ร่วมกับตำแหน่ง TR อื่นๆ สำหรับตำแหน่ง TR6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 226 (7 RU), 238 (9 RU), 244 (10 RU) และ 256 bp (12 RU) สอดคล้องกับ melting profile รูปแบบ C, D, A และ B ตามลำดับ ตำแหน่ง TR10 และ TR12 ไม่มีความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยทั้ง 93 ไอโซเลทมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 99 bp (3 RU) และ 124 bp (3 RU) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ที่มีรูปแบบของ melting profile เพียงรูปแบบเดียวคือรูปแบบ A และที่ตำแหน่ง TR13 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 77 (2 RU), 104 (5 RU), 140 (9 RU), 149 (10 RU) และ 167 bp (12 RU) ซึ่งไอโซเลทที่มีขนาดเป็น 77, 104, 140 และ 149 bp ให้ผลตรงกับ melting profile รูปแบบ A, B, C, D ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลทที่มีขนาด 167 bp เกิด melting profile 2 รูปแบบ คือ E และ F เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ภายใน TR ตามที่อธิบายในหัวข้อ 4.2.3

การจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM ที่ตำแหน่ง TR1, TR3 และ TR6 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ciammaruconi et al. (2009) ซึ่งพบว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกไอโซเลทที่มีจำนวน repeat unit ต่างกันได้อย่างถูกต้องเมื่อทดสอบกับ *Yersinia pestis* ในขณะที่ melting profile ที่เกิดจาก point mutation ภายในชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR5 และ TR13 นั้นให้ผลไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Distefano et al. (2012) ที่รายงานว่า การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้นดีเอ็นเอไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ด้วย CE เนื่องจาก CE จำแนกความแตกต่างโดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ในขณะที่เทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างจากอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ ซึ่งขึ้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้นดีเอ็นเอ นั้น ทำให้เกิดรูปแบบของ melting profile เพิ่มขึ้น ถือว่าเป็นข้อได้เปรียบของเทคนิค HRM ที่เหนือกว่า CE

เมื่อพิจารณาระหว่างขนาดของซันดีเอ็นเอและอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ พบว่า ที่ตำแหน่ง TR3 และ TR13 การเพิ่มขึ้นของจำนวน repeat unit จะแปรผันกับอุณหภูมิหลอมเหลวของซันดีเอ็นเอ ในขณะที่ตำแหน่ง TR1 เมื่อจำนวน repeat unit เพิ่มขึ้น อุณหภูมิหลอมเหลวของซันดีเอ็นเอกลับมีค่าลดลง เนื่องจาก repeat sequence ที่ตำแหน่ง TR1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น ACAAAT (ตาราง 3-1) การเพิ่มขึ้นของ repeat unit จะเพิ่มปริมาณของนิวคลีโอไทด์ A/T ในซันดีเอ็นเอและทำให้อัตราส่วนของปริมาณ G/C ลดลง ส่งผลให้อุณหภูมิหลอมเหลวของซันดีเอ็นเอลดลงด้วย นอกจากนี้ ที่ตำแหน่ง TR6 จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอไม่ได้แปรผันตามจำนวน TR ซึ่งเกิดจาก 2 ปัจจัย คือ i) ความแตกต่างของจำนวน TR ในไอโซเลทที่ทดสอบ และ ii) เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (point mutation) หลายตำแหน่งภายในซันดีเอ็นเอทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบ A และ B แตกต่างจากรูปแบบ C และ D (รูป 4-6) ถึงแม้ว่ารูปแบบ C และ D จะมีขนาดซันดีเอ็นเอที่สั้นกว่ารูปแบบ A และ B แต่การเกิด point mutation ทำให้ปริมาณ G/C ภายในซันดีเอ็นเอสูงกว่ารูปแบบ A และ B จึงทำให้อุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอในรูปแบบ C และ D สูงกว่ารูปแบบ A และ B ซึ่งสนับสนุนทฤษฎีที่ว่า นอกจากความยาวของซันดีเอ็นเอแล้ว ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งปริมาณ G/C ภายในซันดีเอ็นเอก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ



รูป 4- 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง TR6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์และความแปรผันของจำนวน Tandem Repeat ในแต่ละรูปแบบ

ตาราง 4- 2 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย Capillary Electrophoresis และเทคนิค HRM

Isolate	Locus TR1			Locus TR2			Locus TR3			Locus TR5		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
1	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
2	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
3	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
4	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
5	250	3	B	140	3	A	458	11	D	125	2	B
6	250	3	B	140	3	A	458	11	D	125	2	B
7	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
8	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
9	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
10	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
11	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
12	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
13	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
14	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
15	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
16	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
17	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B

Isolate	Locus TR6			Locus TR10			Locus TR12			Locus TR13		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
1	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
2	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
3	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
4	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
5	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
6	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
7	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
8	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
9	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
10	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
11	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
12	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
13	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
14	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
15	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
16	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
17	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D

Isolate	Locus TR1			Locus TR2			Locus TR3			Locus TR5		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
18	250	3	B	140	3	A	494	15	F	125	2	B
19	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
20	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
21	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
22	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
23	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
24	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
25	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
26	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
27	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
28	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
29	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
30	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
31	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
32	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
33	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
34	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
35	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
36	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B

Isolate	Locus TR6			Locus TR10			Locus TR12			Locus TR13		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
18	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
19	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
20	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
21	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
22	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
23	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
24	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
25	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
26	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
27	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
28	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
29	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
30	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
31	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
32	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
33	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
34	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
35	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
36	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D

Isolate	Locus TR1			Locus TR2			Locus TR3			Locus TR5		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
37	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
38	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
39	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
40	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
41	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
42	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
43	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
44	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
45	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
46	256	4	A	140	3	A	395	4	A	125	2	A
47	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
48	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
49	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
50	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
51	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
52	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
53	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
54	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
55	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B

Isolate	Locus TR6			Locus TR10			Locus TR12			Locus TR13		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
37	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
38	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
39	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
40	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
41	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
42	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
43	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
44	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
45	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
46	226	7	C	99	3	A	124	3	A	104	5	B
47	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
48	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
49	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
50	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
51	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
52	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
53	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
54	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
55	244	10	A	99	3	A	124	3	A	77	2	A



Isolate	Locus TR1			Locus TR2			Locus TR3			Locus TR5		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
56	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
57	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
58	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
59	256	4	A	140	3	A	395	4	A	125	2	B
60	250	3	B	140	3	A	431	8	B	125	2	A
61	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
62	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
63	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
64	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
65	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
66	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
67	250	3	B	140	3	A	449	10	C	125	2	B
68	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
69	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
70	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
71	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
72	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
73	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
74	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B

Isolate	Locus TR6			Locus TR10			Locus TR12			Locus TR13		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
56	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
57	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
58	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
59	226	7	C	99	3	A	124	3	A	104	5	B
60	256	12	B	99	3	A	124	3	A	167	12	F
61	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
62	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
63	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
64	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
65	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
66	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
67	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
68	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
69	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
70	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
71	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
72	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
73	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
74	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D

Isolate	Locus TR1			Locus TR2			Locus TR3			Locus TR5		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
75	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
76	250	3	B	140	3	A	494	15	F	125	2	B
77	256	4	A	140	3	A	395	4	A	125	2	B
78	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
79	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
80	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
81	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
82	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
83	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
84	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
85	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
86	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
87	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
88	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
89	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
90	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
91	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
92	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B
93	250	3	B	140	3	A	485	14	E	125	2	B

Isolate	Locus TR6			Locus TR10			Locus TR12			Locus TR13		
	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type	Size (bp)	Repeat Unit	HRM type
75	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
76	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
77	238	9	D	99	3	A	124	3	A	104	5	B
78	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
79	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
80	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
81	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
82	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
83	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
84	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
85	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
86	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
87	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
88	244	10	A	99	3	A	124	3	A	167	12	E
89	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
90	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
91	244	10	A	99	3	A	124	3	A	140	9	C
92	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D
93	244	10	A	99	3	A	124	3	A	149	10	D

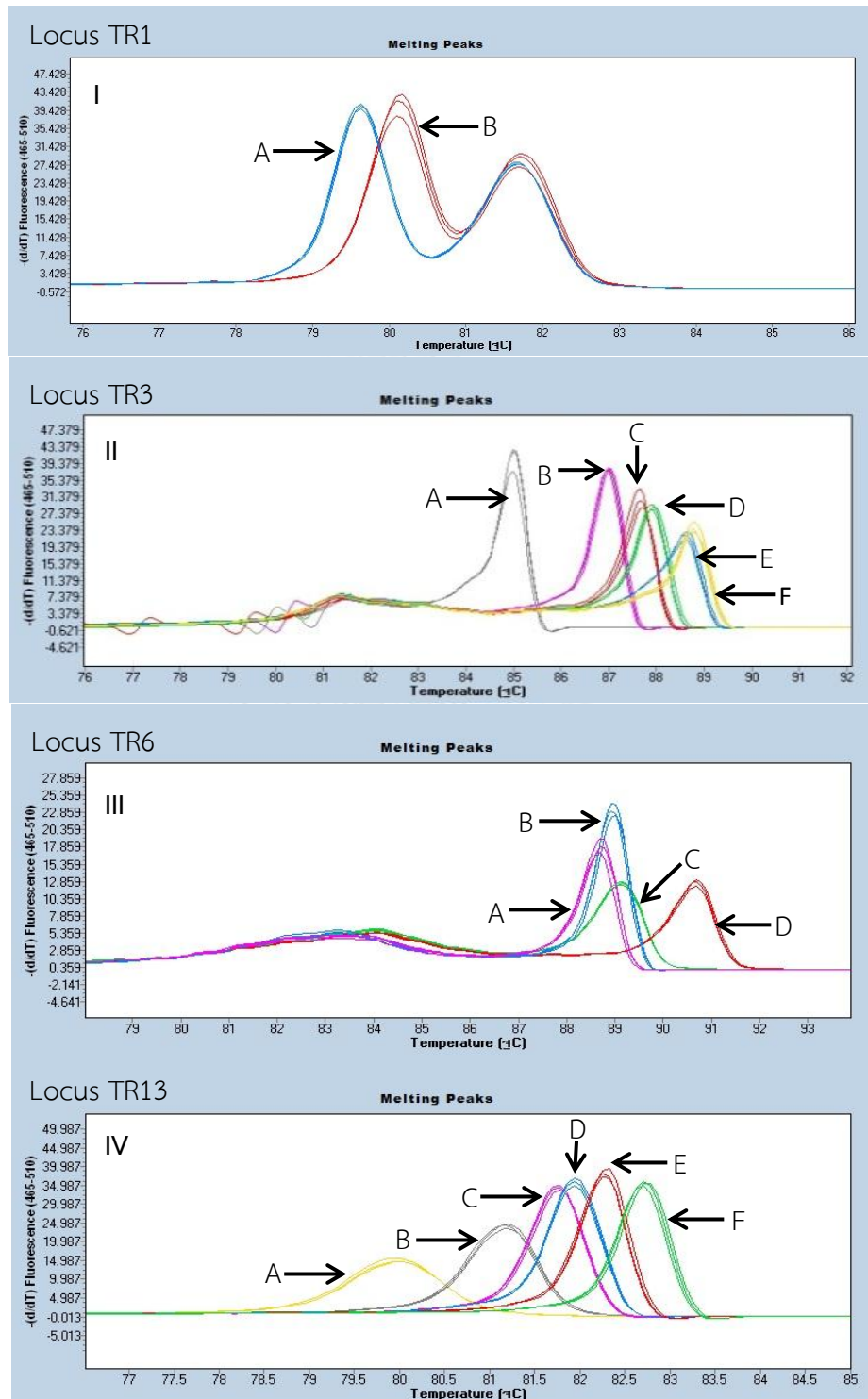
#### 4.4 ผลการประเมินความแม่นยำของเทคนิค HRM

##### 4.4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (Repeatability)

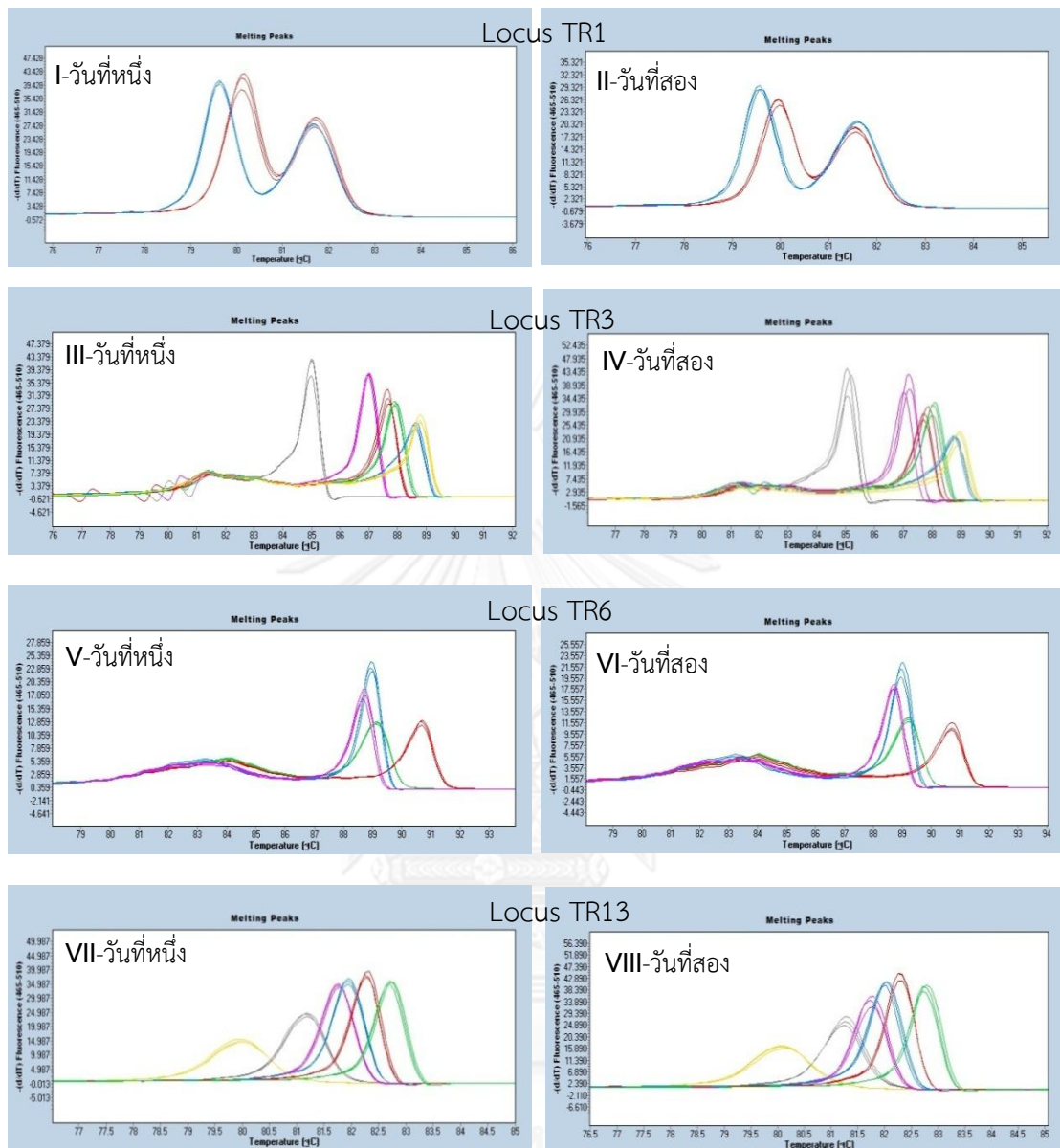
ไอโซเลทที่มีรูปแบบ melting profile แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่ง (TR1, TR3, TR6 และ TR13) ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นตัวแทนของไอโซเลทอื่นๆในการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (Repeatability) ของเทคนิค HRM ผลการวิเคราะห์พบว่า มีความแตกต่างของ melting profile ในไอโซเลทที่ทดสอบดังแสดงในรูป 4-7 โดยตำแหน่ง TR1 เกิด melting profile 2 รูปแบบ (A และ B) ตำแหน่ง TR3 เกิด melting profile 6 รูปแบบ (A, B, C, D, E และ F) ตำแหน่ง TR6 เกิด melting profile 4 รูปแบบ (A, B, C และ D) และตำแหน่ง TR13 เกิด melting profile 6 รูปแบบ (A, B, C, D, E และ F) ซึ่งรูปแบบของ melting profile ที่เกิดขึ้นทุกตำแหน่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 4.3.2 และการวิเคราะห์ทั้ง 3 ซ้ำของแต่ละไอโซเลทมีลักษณะของ melting profile ใกล้เคียงกันและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้อย่างถูกต้อง

##### 4.4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (Reproducibility)

ผลการทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (Reproducibility) เมื่อพิจารณาลักษณะของ melting profile ของวันที่หนึ่งเปรียบเทียบกับวันที่สอง พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของ melting profile ของแต่ละรูปแบบได้อย่างถูกต้องและสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 4.3.2 และการวิเคราะห์ซ้ำทั้งสองวัน ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันในการทดสอบที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 4 ตำแหน่ง (รูป 4-8) ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าการวิเคราะห์ความแตกต่างของ *L. innocua* ที่ตำแหน่ง TR ด้วยเทคนิค HRM มีความสามารถในการทำซ้ำทั้งในการทดลองภายในครั้งเดียวกันและการทดลองในวันที่ต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fortini et al. (2007) และ Ciammaruconi et al. (2009) ที่พบว่าเทคนิค HRM วิเคราะห์ความแตกต่างที่ตำแหน่ง TR ของ *Bacillus anthracis* และ *Yersinia pestis* ซ้ำได้ทั้งในการทดลองภายในครั้งเดียวกันและการทดลองในวันที่ต่างกัน



รูป 4- 7 melting peak จากการวิเคราะห์ที่ตำแหน่ง TR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ *L. innocua* ในการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (repeatability) กำหนดให้ I=locus TR1, II=locus TR3, III=locus TR6, IV=locus TR13



รูป 4- 8 melting peak ที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) ด้วยเทคนิค HRM กำหนดให้ I, II = การทดสอบที่ตำแหน่ง TR1 วันทดสอบที่หนึ่งและสองตามลำดับ III, IV = การทดสอบที่ตำแหน่ง TR3 วันทดสอบที่หนึ่งและสองตามลำดับ V, VI = การทดสอบที่ตำแหน่ง TR6 วันทดสอบที่หนึ่งและสองตามลำดับ VII, VIII = การทดสอบที่ตำแหน่ง TR13 วันทดสอบที่หนึ่งและสองตามลำดับ

#### 4.5 ผลการประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์

ความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ประเมินได้จากการวิเคราะห์จำนวนของสายพันธุ์ (จีโนไทป์) ที่จำแนกได้การวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR จาก *L. innocua* 93 ไอโซเลทด้วย CE และเทคนิค HRM และประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ค่า Discriminatory index (D-value) ซึ่งเป็นค่าบ่งบอกความน่าจะเป็นที่แบคทีเรียสองไอโซเลทจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มต่างกัน เทคนิคที่มีค่า D-value สูงจะถือว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Hunter & Gaston, 1988)

จาก TR ทั้งหมด 8 ตำแหน่งที่นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE และเทคนิค HRM นั้นพบว่ามี 4 ตำแหน่ง ได้แก่ TR1, TR3, TR6 และ TR13 ที่มีความแตกต่างของขนาดขึ้นดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วย CE และสามารถจำแนกความแตกต่างของ melting profile ได้ด้วยเทคนิค HRM จึงได้ใช้ 4 ตำแหน่งนี้สำหรับการประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนจีโนไทป์จากการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE และเทคนิค HRM พบว่าการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE สามารถจัดกลุ่ม *L. innocua* 93 ไอโซเลทได้เป็น 10 จีโนไทป์เช่นเดียวกับการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM ถึงแม้ว่ามีบางไอโซเลทที่ตำแหน่ง TR13 ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วย CE และเทคนิค HRM ไม่สอดคล้องกัน แต่เมื่อพิจารณาจาก TR ทั้ง 4 ตำแหน่งแล้ว ทั้ง 10 จีโนไทป์นั้นมีความสอดคล้องกันระหว่างผลการวิเคราะห์จาก CE และเทคนิค HRM โดยรายละเอียดของแต่ละจีโนไทป์แสดงในตาราง 4-3 สำหรับค่า D-value ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE และเทคนิค HRM มีค่าเป็น 0.45



ตาราง 4- 3 จีโนไทป์ที่จำแนกได้จากการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR โดย CE และเทคนิค HRM

Genotype	CE				HRM				จำนวน (ไอโซเลท)
	TR1	TR3	TR6	TR13	TR1	TR3	TR6	TR13	
1	4	4	7	5	A	A	C	B	2
2	4	4	9	5	A	A	D	B	1
3	3	8	12	12	B	B	B	F	1
4	3	10	10	10	B	C	A	D	1
5	3	11	10	10	B	D	A	D	2
6	3	14	10	2	B	E	A	A	1
7	3	14	10	9	B	E	A	C	1
8	3	14	10	10	B	E	A	D	68
9	3	14	10	12	B	E	A	E	14
10	3	15	10	12	B	F	A	E	2

ผลการจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* ด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR ด้วยเทคนิค HRM พบว่า *L. innocua* ในจีโนไทป์ 8 เป็นจีโนไทป์กลุ่มที่พบมากที่สุด (68 ไอโซเลท) ในกลุ่ม *L. innocua* ที่ศึกษา รองลงมาคือจีโนไทป์ 9 มี 14 ไอโซเลท จีโนไทป์ 1, 5 และ 10 มี จีโนไทป์ละ 2 ไอโซเลท และจีโนไทป์ 2, 3, 4, 6 และ 7 มีจีโนไทป์ละ 1 ไอโซเลท ซึ่งผลการจำแนกสายพันธุ์นี้ สามารถนำมาเชื่อมโยงสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม โดยไอโซเลทที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ในจีโนไทป์เดียวกัน มีความเป็นไปได้ว่าจะปนเปื้อนมาจากแหล่งเดียวกัน ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และบริเวณที่พบ *L. innocua* ในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง แสดงในตาราง 4-4

ตาราง 4- 4 ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และบริเวณที่พบ *L. innocua* ในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

Genotype	จำนวน (ไอโซเลท)	บริเวณที่พบ
1	2	ท่ออากาศ ถุงมือพนักงาน
2	1	ตู้ควบคุม IQF
3	1	พื้นบริเวณผลิต
4	1	รองเท้าบูต
5	2	สายพานเข้า IQF
6	1	เครื่องชั่ง
7	1	แผ่นซูฟี่ลินรองสายพานเข้า IQF
8	68	ผลิตภัณฑ์ พื้นบริเวณผลิต สายพาน ถาด โต๊ะบรรจุผลิตภัณฑ์ เครื่องปิดผนึก น้ำทิ้งจากตู้แช่เยือกแข็ง ถุงมือพนักงาน ท่อระบายอากาศ
9	14	แผ่นสเตนเลส พื้นบริเวณผลิต สายพานออกจาก IQF ถุงมือพนักงาน
10	2	พื้นบริเวณผลิต

จากตาราง 4-4 พบว่าผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนจาก *L. innocua* ในจีโนไทป์ 8 เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบ *L. innocua* ในจีโนไทป์ 8 ปนเปื้อนอยู่ในอุปกรณ์และสิ่งแวดล้อมหลายแห่งภายในโรงงาน เช่น พื้นบริเวณผลิต สายพาน ถาด โต๊ะบรรจุผลิตภัณฑ์ เครื่องปิดผนึก น้ำทิ้งรวมถึงถุงมือของพนักงาน ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่ามือของพนักงานอาจเป็นตัวกลางในการแพร่กระจายของ *L. innocua* ไปยังสิ่งแวดล้อม แล้วปนเปื้อนเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ เช่นเดียวกับจีโนไทป์ 1 และ 9 ซึ่งพบการปนเปื้อนบนมือของพนักงานและสิ่งแวดล้อมในบริเวณผลิต ในขณะที่ *L. innocua* ในจีโนไทป์อื่น ๆ นั้น พบปนเปื้อนอยู่ในอุปกรณ์และสิ่งแวดล้อมภายในบริเวณผลิต แต่ไม่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์

ในงานวิจัยที่ผ่านมา มีการใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *L. innocua* โดยใช้ *L. innocua* ไอโซเลทเดียวกับที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ HLWL74, HLWL85, OPM-01 และ UFS พบว่า เทคนิค RAPD สามารถจำแนก *L. innocua* 93 ไอโซเลทได้เป็น 6 จีโนไทป์ และมีค่า D-value เป็น 0.42 (Keeratipibul & Techaruwichit, 2012) ซึ่งเทคนิค RAPD มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* ต่ำ

กว่าการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วยเทคนิค HRM ที่สามารถจำแนกได้ 10 จีโนไทป์และมีค่า D-value เท่ากับ 0.45 ผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค HRM เปรียบเทียบกับเทคนิค RAPD ในงานวิจัยนี้ ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Dhakal et al. (2013) ที่การวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ของ *Bacillus licheniformis* ด้วยเทคนิค HRM และรายงานว่เทคนิค HRM มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ได้ดีกว่าเทคนิค RAPD

เทคนิคที่ถือว่ามีประสิทธิภาพสูงสำหรับจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียควรมีค่า D-value อย่างน้อย 0.90 (Arricau-Bouvery et al., 2006; Haguenoer et al., 2011) แต่ในงานวิจัยนี้ D-value ที่ได้จากการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค HRM มีค่าเพียง 0.45 เนื่องจาก *L. innocua* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แยกได้จากโรงงานเพียงแห่งเดียว และแบคทีเรียที่กระจายอยู่ในโรงงานอาจมีความหลากหลายต่ำทำให้ D-value มีค่าไม่สูงนัก แต่ผลการวิจัยได้ยืนยันว่าการจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของ TR ด้วยเทคนิค HRM มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์มากกว่าเทคนิค RAPD โดยสามารถจำแนกได้จำนวนจีโนไทป์มากกว่าเทคนิค RAPD ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเชื่อมโยงการปนเปื้อนระหว่างผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการใช้ CE และเทคนิค HRM ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของ TR พบว่าเทคนิค HRM ให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย CE ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วย CE จึงสามารถใช้เทคนิค HRM ในการวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR ทดแทน CE ได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างของ TR ด้วยเทคนิค HRM ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *L. innocua* เพื่อติดตามสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1. การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง TR พบว่า 8 ตำแหน่งจาก 13 ตำแหน่ง ได้แก่ TR1, TR2, TR3, TR5, TR6, TR10, TR12 และ TR13 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในตาราง 3-1 ได้
2. การวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE พบว่าที่ตำแหน่ง TR1, TR3, TR6 และ TR13 มีความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอซึ่งแสดงถึงจำนวน repeat unit ที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง TR2, TR5, TR10 และ TR12
3. เทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างบริเวณ TR ได้ที่ตำแหน่ง TR1, TR3, TR6 และ TR13 โดยให้ผลสอดคล้องกับ CE ในทุกตำแหน่งทั้ง 93 ไอโซเลท ยกเว้นตำแหน่ง TR 13 ที่ผลการวิเคราะห์ด้วย CE ไม่สอดคล้องกับ melting profile ที่ได้จาก HRM ในไอโซเลท 60 เนื่องจากเกิด point mutation ภายในชิ้นดีเอ็นเอ
4. การประเมินความแม่นยำของเทคนิค HRM โดยการวิเคราะห์ซ้ำภายในครั้งเดียวกัน (repeatability) และการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) พบว่า เทคนิค HRM สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ใน *L. innocua* ได้ทุกตำแหน่งอย่างถูกต้องทั้งการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกันและการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน
5. การวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณตำแหน่ง TR โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย CE และการวิเคราะห์ความแตกต่างของ melting profile ด้วยเทคนิค HRM สามารถจำแนก *L. innocua* 93 ไอโซเลทได้เป็น 10 จีโนไทป์และมีค่า D-value เป็น 0.45 ทั้งสองเทคนิค โดยผลการจำแนกสายพันธุ์สามารถนำมาเชื่อมโยงไอโซเลทที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมในบริเวณผลิตได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์ความแตกต่างบริเวณ TR ด้วย CE พบว่าไม่มีความแตกต่างขนาดขึ้นดีเอ็นเอ TR ที่ตำแหน่ง TR2, TR5, TR10 และ TR12 ซึ่งเป็นไปได้ว่า *L. innocua* ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็นเชื้อที่แยกได้จากโรงงานผลิตอาหารเพียงแห่งเดียวทำให้เชื้อมีความหลากหลายต่ำ หากใช้ *L. innocua* ที่แยกได้จากอาหารหรือสิ่งแวดล้อมจากแหล่งที่หลากหลาย อาจพบความแตกต่างของ TR ที่ตำแหน่งดังกล่าว และสามารถใช้ตำแหน่ง TR นั้นในการจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* ได้

2. การจำแนกสายพันธุ์ *L. innocua* โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของ TR โดยเทคนิค HRM มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ศึกษาระบาดวิทยาและติดตามสายพันธุ์ของ *L. innocua* ที่ปนเปื้อนภายในโรงงานผลิตอาหารโดยการเชื่อมโยงสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ทำให้สามารถหาแหล่งต้นกำเนิดของการปนเปื้อนที่แท้จริงได้และสามารถจัดการกับการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## รายการอ้างอิง

- Alessandria, V., Rantsiou, K., Dolci, P., & Cocolin, L. (2010). Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 156-162.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C., & Souriau, A. (2006). Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology*, 6(1), 38.
- Audurier, A., & Martin, C. (1989). Phage typing of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 251-257.
- Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, B., Novara, O., Leone, L., & Salmoso, S. (200). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine*, 342, 827-831
- Bakker, H. C. d., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., . . . Wiedmann, M. (2014). Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., & Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 526-532.
- Blackman, I., & Frank, J. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surface. *Journal of Food Protect*, 59, 827-831.
- Bouayad, L., & Hamdi, T.-M. (2012). Prevalence of *Listeria* spp. in ready to eat foods (RTE) from Algiers (Algeria). *Food Control*, 23(2), 397-399.
- Bouchet, V., Huot, H., & Goldstein, R. (2008). Molecular Genetic Basis of Ribotyping. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 262-273.
- Butler, J. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*: Elsevier Science & Technology Books.
- Cagri-Mehmetoglu, A., Yaldirak, G., Bodur, T., Simsek, M., Bozkir, H., & Eren, N., M. . (2011). Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. *Food Control*, 22, 762-766.
- Capita, R., Prieto, M., Mereghetti, L., & Alonso-Calleja, C. (2005). Characterisation of *Listeria monocytogenes* Isolates from Poultry by Serotyping and Phage Typing. Retrieved 2013. January 28 <http://fst.sagepub.com/content/11/1/55>

- Choi, Y., Cho, S., Park, B., Chung, D., & Oh, D. (2001). Incidence and characterization of *Listeria* spp. from foods available in Korea. *Journal of Food Protection*, 64, 554-558.
- Chou, C., & Wang, C. (2006). Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 135-148.
- Chou, L. S., Lyon, E., & Wittwer, C. T. (2005). A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *American Journal of Clinical Pathology*, 124, 330-338.
- Ciammaruconi, A., Grassi, S., Faggioni, G., De Santis, R., Pittiglio, V., D'Amelio, R., . . . Lista, F. (2009). A rapid allele variant discrimination method for *Yersinia pestis* strains based on high-resolution melting curve analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65(1), 7-13.
- Codex Alimentarius. (2007). Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria Monocytogenes* in Foods. Retrieved May, 2014, from [http://www.codexalimentarius.net/input/download/standards/10740/CXG\\_061e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/input/download/standards/10740/CXG_061e.pdf)
- Curiale, M. S., & Lewus, C. (1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 57, 1048-1051.
- Dalton, C. B., Austin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. B., Bibb, W. F., Graves, L. M., & Swaminathan, B. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine*, 336, 100-105.
- Derzelle, S., Mendy, C., Laroche, S., & Madani, N. (2011). Use of High-Resolution Melting and Melting Temperature-shift assays for specific detection and identification of *Bacillus anthracis* based on single nucleotide discrimination. *Journal of Microbiological Methods*, 87, 195-201.
- Dhakal, R., Chauhan, K., Seale, R. B., Deeth, H. C., Pillidge, C. J., Powell, I. B., . . . Turner, M. S. (2013). Genotyping of dairy *Bacillus licheniformis* isolates by high resolution melt analysis of multiple variable number tandem repeat loci. *Food Microbiology*, 34(2), 344-351. doi: 10.1016/j.fm.2013.01.006
- Distefano, G., Caruso, M., La Malfa, S., Gentile, A., & Wu, S.-B. (2012). High resolution melting analysis is a more sensitive and effective alternative to gel-based platforms in analysis of SSR - An example in Citrus. . *PLoS ONE*, 7(8), e44202.

- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3819-3822.
- Farber, J. M. (1991). *Listeria monocytogenes* in fish products. *Journal of Food Protection*, 54, 922-924, 934.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.
- Food Safety Information Council. *Listeria monocytogenes*. Retrieved February, 2014, from <http://www.foodsafety.asn.au/resources/listeria-monocytogenes/>
- Food Safety News. (2009a). Genetic Testing. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. Retrieved November, 2013, from <http://www.foodsafetynews.com/2009/08/genetic-testing-1/#.UyVOLaiSw6g>
- Food Safety News. (2009b). Genetic Testing *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)*. Retrieved November, 2013, from <http://www.foodsafetynews.com/2009/08/genetic-testing-1/#.UyVOLaiSw6g>
- Fortini, D., Ciammaruconi, A., Santis, R. D., Fasanella, A., Battisti, A., D'Amelio, R., . . . Carattoli, A. (2007). Melting Analysis for Low-cost and Rapid screening of Allelic Variants of *Bacillus anthracis* by Multiple-Locus Variable number Tandem Repeat Analysis. *Chinical Chemistry*, 53, 1377-1380.
- Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2011). Adulterations in Basmati rice detected quantitatively by combined use of microsatellite and fragrance typing with high resolution melting (HRM) analysis. *Food Chemistry*, 129, 652-659.
- Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendeuvre, J.-L., Carlier, V., & Ermelb, G. (1999). *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 127-140.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., . . . Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1280-1288.
- Graves, L. M., Swaminathan, B., & Hunter, S. B. (2007). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In T. E. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Franscis Group.
- Gravesen, A., Jacobsen, T., Møller, P. L., Hansen, F., Larsen, A. G., & Knøchel, S. (2000). Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 43-51.



- Haguenoer, E., Baty, G., Pourcel, C., Lartigue, M. F., Domelier, A. S., & Rosenau, A. (2011). A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiology*, 11(1), 171.
- Harishvasudevan. (2006). DNA Fingerprinting In The Standardization Of Herbs And Nutraceuticals. *Techniques used in DNA Fingerprinting*. Retrieved December, 2013, from <http://www.scq.ubc.ca/dna-fingerprinting-in-the-standardization-of-herbs-and-nutraceuticals/>
- Harvey, J., Norwood, D. E., & Gilmour, A. (2004). Comparison of repetitive element sequence-based PCR with multilocus enzyme electrophoresis and pulsed field gel electrophoresis for typing *Listeria monocytogenes* food isolates. *Food Microbiology*, 21, 305-312.
- Hunter, P., & Gaston, M. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2465-2466.
- ICMSF. (1996). *Micro-organisms in foods 5: characteristics of microbial pathogens*. New York: Blakie Academic and Professional.
- Jadhav, S., Bhawe, M., & Palombo, E. A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods*, 88(3), 327-341. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.002
- Jeršek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., . . . Herman, L. (1999). Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequencebased PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 103-109.
- Jeršek, B., Tcherneva, E., Rijpens, N., & Herman, L. (1996). Repetitive element sequencebased PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria*. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 55-60.
- Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S. P., Son, R., Farinazleen, M. G., & Cheah, Y. K. (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*, 17, 1-11.
- Jiang, L., Chen, J., Xu, J., Zhang, X., Wang, S., Zhao, H., . . . Fang, W. (2008). Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 53-59.
- Jouve, J. L. (1996). *The microbiological quality of food. Master and criteria*. Paris: Polytechnica
- Karakolev, R. (2009). Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, pork, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria. *Food Control*, 20, 953-955.

- Keeratipibul, S., & Techaruwichit, P. (2012). Tracking sources of *Listeria* contamination in a cooked chicken meat factory by PCR-RAPD-based DNA fingerprinting. *Food Control*, 27, 64-72. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.02.026
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., . . . Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *The Journal of Bacteriology*, 182, 2928-2936.
- Lang Halter, E., Neuhaus, K., & Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. 2013, 63, 641-647.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., LeFlèche-Matéos, A., Roche, S. M., . . . Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2210-2214.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. T. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, 50, 1156-1164.
- Lindstedt, B., Tham, W., Danielsson-Tham, M. L., Vardund, T., Helmersson, S., & Kapperud, G. (2008). Multiple-locus variable number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolor capillary electrophoresis and comparison with pulse-field gel electrophoresis typing. *Journal of Microbiological Methods*, 72, 141-148.
- Lindstedt, B., Vardund, T., Aas, L., & Kapperud, G. (2004b). Multiple-locus variable number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 163-172.
- Lindstedt, B., Vardund, T., & Kapperud, G. (2004a). Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 213 – 222.
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645-659.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W. H. Freeman.
- Lomonaco, S., Nucera, D., Parisi, A., Normanno, G., & Bottero, M. T. (2011). Comparison of two AFLP methods and PFGE using strains of *Listeria monocytogenes*

- isolated from environmental and food samples obtained from Piedmont, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 177-182. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.012
- Lukinmaa, S., Nakari, U. M., Eklund, M., & Siitonen, A. (2004). Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 112, 908–929.
- MacGowan, A. P., Bowker, K., & Mclauchlin, J. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought foodstuffs, human faces, sewage and soil from urban sources. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 325-334.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., . . . Spratt, B. G. (1998). *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Paper presented at the The National Academy of Sciences of the United States of America.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., . . . Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5, 607-625.
- Microbe Inotech Laboratory, I. Repetitive Sequence-Based PCR. Retrieved January, 2014, from <http://microbeinotech.com/Default.aspx?tabid=178>
- Miya, S., Sato, B. K., Takahashi, H., Ishikawa, T., Suda, T., Takakura, C., . . . Wiedmann, M. (2008). Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 239-249.
- Moharem, A. F., Charith, A. P., & Janardhana, G. R. (2007). Incidence of *Listeria* species in seafood products of Mysore, India. *Journal of Food Safety*, 27, 362-372.
- Murphy, M., Corcoran, D., Buckley, J. F., O'Mahony, M., Whyte, P., & Fanning, S. (2007). Development and application of Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 187-194. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.022
- Naze, F., Jouen, E., Randriamahazo, R., Simac, C., Laurent, P., & Bleriot, A. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a Neonatal Intensive Care Unit: fast typing by use of high-resolution melting

- analysis of a variable-number tandem-repeat locus. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (9), 3146-3152.
- Nederbragt, A. J., Balasingham, A., Sirevag, R., Utkilen, H., Jakobsen, K. S., & Anderson-Glenna, M. J. (2008). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Legionella pneumophila* using multi-colored capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 73(2), 111-117. doi: 10.1016/j.mimet.2008.02.007
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., . . . Wiedmann, M. (2004). Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4458-4467.
- Norambuena, P. A., Copeland, J. A., Křenková, P., Štambergová, A., & Macek Jr, M. (2009). Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the *MTHFR* gene. *Clinical Biochemistry*, 42, 1308-1316.
- Nørrung, B. (2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 217-221.
- Norton, D. M., McCamey, M. A., Gall, K. L., Scarlett, J. M., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2001). Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 198-205.
- Olsen, J. E., Brown, D. J., Skov, M. N., & Christensen, J. P. (1993). Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *The Veterinary quarterly*, 15, 125-135.
- Palumbo, J. D., Borucki, M. K., Mandrell, R. E., & Gorski, L. (2003). Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixedserotype cultures by colony immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 564-571.
- Pang, Y., Zhou, Y., Wang, S., Lu, J., Lu, B., He, G., . . . Zhao, Y. (2011). A novel method based on high resolution melting (HRM) analysis for MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 291-297.
- Pesavento, G., Ducci, B., Nier, D., Comodo, N., & Lonostro, A. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. Isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, 21, 708-713.

- Petersen, J. R., Okorodudu, A. O., Mohammad, A., & Payne, D. A. (2003). Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, 330, 1-30.
- Pritchard, T. J., Flanders, K. J., & Donnelly, C. W. (1995). Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 375-384.
- Reido, F. X., Pinner, R. W., Tosca, M. L., Cartter, M. L., Graves, L. M., Reeves, M. W., . . . Broome, C. V. (1994). A point-source foodborne outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 170, 693-696.
- Roberts, D. (1989). *Listeria monocytogenes* in food – results of two PHLS (Public Health Laboratory Service) Surveys. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, xix.
- Roberts, D., & Pinner, R. (1990). Economic impact of disease cause by *L. monocytogenes*. In A. J. Miller, Smith, J. L. and Somkuti, G.A. (Ed.), *Topics in industrial microbiology: foodborne Listeriosis* (pp. 137-149). New York: Elsevier Science Publishing.
- Rosset, R. (2001). Microbial growth and cold study of the particular case of *Listeria monocytogenes*. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 185(2), 287-298.
- Rutgers University. RAPD PCR. Retrieved August, 2013, from <http://avery.rutgers.edu/>
- Salamina, G., Donne, E. D., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., . . . Salmaso, S. (1996). A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology and Infection*, 117, 429-436.
- Skipper, E. (2009). Genotyping of the mapping population. *Amplified Fragment Length Polymorphisms*. Retrieved January, 2014, from <http://www2.warwick.ac.uk/alumni/services/eportfolios/hrrgac/research/methods/genotyping/>
- Sperry, K. E. V., Kathariou, S., Edwards, J. S., & Wolf, L. A. (2008). Multiple-locus variable number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 1435-1450.
- Stephens, A., Inman-Bamber, J., Giffard, P., & Huygens, F. (2008). High-resolution melting analysis of the spa repeat region of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Chemistry*, 54 (2), 432-436.
- The Witter Lab. High-Resolution Melting. Retrieved August, 2013, from [https://www.dna.utah.edu/Hi-Res/TOP\\_Hi-Res%20Melting.html](https://www.dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html)

- Todd, E. C. D., & Notermans, S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1484-1490.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65, 479-487.
- Tompkin, R. B., Scott, V. N., Bernard, D. T., Sveum, W. H., & Gombas, K. S. (1999). Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy, Food, and Environmental Sanitation*, 19, 551-552.
- Tyler, K., Wang, G., Tyler, S., & Johnson, W. (1997). Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 339-346.
- Urwin, R., & Maiden, M. C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, 11, 479-487.
- USFDA. (2011). Bacteriological Analytical Manual Online (BAM): Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Retrieved 2014, January 15 <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>.
- Van Renterghem, B., Huysman, F., Rygole, R., & Verstraete, W. (1991). Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 211-217.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., . . . Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584-640.
- Wiedmann, M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 85, 524-531.
- Zadoks, R. N., & Watts, J. L. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*, 134, 20-28.
- กรมปศุสัตว์. (2551). เกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออก (ประกาศกรมปศุสัตว์).  
กรุงเทพมหานคร: กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) + 0.6% Yeast Extract (YE)

1.1.1 ชั่ง Tryptic Soy Broth (Merck, Germany) และ Yeast Extract (Merck, Germany) 4.5 และ 0.9 กรัม ตามลำดับ

1.1.2 เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 150 มิลลิลิตร

1.1.3 เติม Agar (Merck, Germany) 2.25 กรัม

1.1.4 นำสารละลายไปสเตอริไลซ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) + 0.6% Yeast Extract (YE)

2.2.1 ชั่ง Tryptic Soy Broth และ Yeast Extract 4.5 และ 0.9 กรัม ตามลำดับ

2.2.2 เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 150 มิลลิลิตร

2.2.3 นำสารละลายไปสเตอริไลซ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. การเตรียม lysozyme buffer สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

### 2.1 การเตรียม 1 M Tris Hydrochloride buffer (Tris-HCl) pH8

2.1.1 ชั่ง Tris base (Merck, Germany) 12.1 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร

2.1.2 ปรับค่า pH เป็น 8.0 โดยใช้ NaOH หรือ HCl (Merck, Germany)

2.1.3 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.1.4 นำสารละลายไปสเตอริไลซ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2.2 การเตรียม 0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH8

2.2.1 ชั่ง Disodium Ethylene Diamine Tetraacetate (EDTA) (Merck, Germany) 18.61 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร

2.2.2 ปรับค่า pH เป็น 8.0 โดยใช้ NaOH ประมาณ 2 กรัม

2.2.3 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2.4 นำสารละลายไปสเตอริไลซ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2.3 การเตรียม lysozyme buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประกอบด้วย

2.3.1 Lysozyme (Amresco, USA) 0.020 กรัม



2.3.2 Tris-HCl	20 ไมโครลิตร
2.3.3 EDTA	4 ไมโครลิตร
2.3.4 น้ำปราศจากไอออน	976 ไมโครลิตร

3. การสกัดดีเอ็นเอจาก *L. innocua* ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC Real Genomic (RBC bioscience, Taiwan)

3.1 เติมสารละลาย lysozyme 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตรในหลอดเซลล์ ปั่นผสม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

3.2 เติม GB buffer 200 ไมโครลิตร ปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที พลิกหลอดทุกๆ 3 นาที

3.3 เติมเอทานอล (Merck, Germany) 200 ไมโครลิตร ปั่นผสม แล้วดูดสารละลายใส่ใน CD column ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง

3.4 เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง

3.5 เติม wash buffer 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง

3.6 ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 3 นาที วาง column ลงบนหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

3.7 เติมน้ำปราศจากไอออน 40 ไมโครลิตร ลงใน column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

3.8 ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ได้สารละลายดีเอ็นเอในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกฤตาภรณ์ ถนัดสร้าง เกิดเมื่อวันที่ 4 พฤศจิกายน 2531 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 ผลงานที่ผ่านมาได้นำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในหัวข้อ “Variant Detection of Variable Number Tandem Repeat Loci of *Listeria innocua* by High Resolution DNA Melting Analysis” ในการประชุมวิชาการ International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP 2013) วันที่ 21-23 สิงหาคม 2556 ณ โรงแรมเซ็นทาราคอนเวนชันเซ็นเตอร์ จังหวัดขอนแก่น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY