

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ตรวจยืนยันและแยก Serotype เชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

วัชร จันทร์วัชรกาล¹ ณัฐพล บุศยรัตน์¹

บทคัดย่อ

Salmonella enterica เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษทั่วโลก *Salmonella* ถูกจำแนกออกได้กว่า 2,500 Serovars ซึ่ง serovars ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร และห้ามตรวจพบในอาหารพร้อมบริโภคและเนื้อสัตว์ดิบคือ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ Enteritidis ซึ่งการตรวจยืนยันชนิดเชื้อโดยสังเกตการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีจนทราบผลระดับ serovar ใช้เวลา 10-12 วัน การศึกษานี้เป็นการนำเทคนิคการยืนยันเชื้อแบคทีเรียด้วย Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ประกอบกับการตรวจยืนยัน serovars ด้วยวิธีทางชีววิทยา Kauffman-White มาตรวจเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์เพื่อบริโภคภายในประเทศและเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในตลาดสดซึ่งจะลดเวลาตรวจวิเคราะห์ลงตลอดขั้นตอนเหลือ 7 วัน พบว่าสามารถแยกและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในตัวอย่างว่าเป็น *Salmonella enterica* จำนวน 108 ตัวอย่างจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้งหมด 560 ตัวอย่าง และสามารถระบุตัวอย่างถูกปนเปื้อนด้วย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ Enteritidis จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.25 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด พบว่าการใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ทันสมัยสามารถตรวจวิเคราะห์เชิงลึกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดเวลาในการตรวจ และตอบสนองต่อข้อกำหนดด้านอาหารปลอดภัยได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ MALDI-TOF MS, *Salmonella enterica*, Method adaptation

¹ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ศูนย์ราชการกรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000

Method Development and Adaptation of *Salmonella* spp. Confirmation and Serotyping by Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to Routine Analysis.

Watchara Janwatcharagan¹ Nattaphon Busayarat¹

Abstract

Salmonella enterica is a major cause of worldwide food poisoning. *Salmonella* is divided by 2,500 serovars, one of them which important to food manufacturing and detection of them in ready to eat food and raw poultry meat are *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis. Recent analytical method is a phenotypic biochemical test that required 10-12 days until serovar identification process finished, then we brings a Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to assist the microbial identification. Samples are came from local slaughter house and fresh market in Thailand provinces totally 560 samples, in this amount we found *Salmonella enteric* contamination 108 samples, classified as *Salmonella enteric* serovar Typhimurium and Enteritidis amount of 7 samples (1.25%). A modern technology in bacterial identification can improved an analytical process significantly especially time reduction and in depth analysis which serve food safety regulations and requirement excellently.

Keywords MALDI-TOF MS, *Salmonella enterica*, Method adaptation

¹Laboratory analyst of Bureau of Quality Control of Livestock Products, Bangkadee, Mueng Pathum-Thani, Pathum-Thani Province 12000, Thailand.

บทนำ

Salmonellosis เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญด้านสาธารณสุขทั่วโลกอย่างต่อเนื่อง โดยก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ เชื้อ *Salmonella* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2423 ใน Peyer's patches และม้ามของผู้ป่วยโรคไข้รากสาดน้อย (Typhoid) โดย Karl Joseph Eberth นักพยาธิวิทยาชาวเยอรมนี และได้มีการวิจัยศึกษาอย่างจริงจังโดยนายสัตวแพทย์ Daniel Elmer Salmon ร่วมกับ Theobald Smith โดยแยกเชื้อสาเหตุของโรคอหิวาต์สุกรออกมาจากสุกรที่ป่วยในปี พ.ศ. 2428

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* เป็น genus หนึ่งของ family Enterobacteriaceae มีลักษณะเป็นแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แต่เจริญเติบโตได้ดีกว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ บางรูปแบบของเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella สามารถสร้างกรด และบางครั้งก๊าซจากกลูโคส และบางสายพันธุ์สร้างก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen sulphide) ได้ เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25 ถึง 43 องศาเซลเซียส

เชื้อ *Salmonella* ถูกแบ่งออกเป็น 7 subspecies คือ subsp. Enterica (I), subsp. Salamae (II), subsp. Arizonae (monophasic arizonae IIIa), subsp. Diarizonae (diphaseic arizonae IIIb), subsp. Houtenae (IV), subsp. Bongori (V), และ subsp. Indica (VI) และถูกจัดแบ่งเป็น Serovar ย่อยอีกกว่า 2,500 serovars ซึ่ง serovar ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร และถูกห้ามตรวจพบในเนื้อสัตว์ดิบและอาหารพร้อมบริโภคตาม Commission regulation (EC) No 2073/2005 Microbiological criteria for foodstuffs คือ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ Enteritidis

การตรวจยืนยันชนิดเชื้อ *Salmonella* ด้วยการสังเกตปฏิกิริยาชีวเคมีจะใช้เวลาในการทดสอบจนถึงทราบผล serovar ประมาณ 10-12 วัน ซึ่งห้องปฏิบัติการให้บริการทดสอบสินค้าปศุสัตว์ที่มีแผนการทดสอบตัวอย่างรายสัปดาห์จะประสบปัญหาภาระงานทดสอบซ้อนทับกับตัวอย่างสินค้าที่จะเข้าทดสอบในสัปดาห์ถัดไป ดังนั้นการนำเทคนิคการยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วย Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียภายในเวลาไม่เกิน 2 นาที จะสามารถประหยัดเวลาในการรอสังเกตการณ์เกิดปฏิกิริยาชีวเคมีซึ่งใช้เวลา 1-2 วัน และนำเวลาที่ประหยัดได้ดังกล่าวไปทดสอบหา serovar ซึ่งจะทำให้การตรวจวิเคราะห์จบได้ภายใน 7 วัน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย นำมาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ดิบเพื่อการบริโภคที่ส่งมาทดสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง

ปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี ซึ่งตัวอย่างเนื้อสัตว์ดิบเพื่อการบริโภคทั้งหมดถูกเก็บจากโรงฆ่าสัตว์เพื่อบริโภคภายในประเทศและแผงจำหน่ายเนื้อสัตว์ในตลาดสดภายในประเทศไทยโดยเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ประจำจังหวัดและเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ประจำอำเภอ

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเพาะเชื้อตามวิธี ISO 6579-2017 โดยใช้ Xylose Lysine Deoxycholate agar และ Brilliant Green agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใช้บ่งชี้ colony ของเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* มาทดสอบยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยใช้โหมดการทำงานแบบ linear เร่งอนุภาคประจุบวก ปรับความถี่ของแสงเลเซอร์ที่ 50 เฮิร์ตซ์ ตรวจจับโมเลกุลที่มีน้ำหนักตั้งแต่ 2,000 – 20,000 Dalton ใช้ความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าในการเร่งอนุภาค 20,000 โวลต์ ตั้งค่าความหน่วงในการแตกตัวของอนุภาคให้หลุดจากมวลตัวอย่าง 200 nanoseconds เก็บข้อมูล mass spectrum profile 100 ชุดต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ประมวลผล mass spectrum profile ด้วยซอฟต์แวร์ Launchpad™ v.2.8 แล้วส่งถ่ายข้อมูล protein mass fingerprint มายังซอฟต์แวร์ Spectral Archive And Microbial Identification System (SARAMIS™) และวิเคราะห์ protein mass fingerprint ในช่วงความคลาดเคลื่อนน้ำหนักโมเลกุลที่ 700 ppm ระบบ Cluster analysis โดยใช้ single-link agglomerative algorithm ของซอฟต์แวร์ SARAMIS™ จะเปรียบเทียบ mass fingerprint ของตัวอย่างกับ super spectrum ของฐานข้อมูล แล้วรายงานว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย family, genus, และ species ได้

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับการทดสอบทราบว่าเป็นเชื้อ *Salmonella enterica* subspecies *enterica* จะถูกนำมาทดสอบชี้รั่ววิทยาตามวิธีทดสอบแยก serovar ของ Kauffman-White หากเป็นเชื้อ *Salmonella* serovar Typhimurium หรือ Enteritidis จะรายงานผู้ให้ผลทดสอบในระดับ serovar แต่หากเป็น *Salmonella* นอกเหนือจากนั้นจะรายงานระบุเพียง O antigen

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างจำนวน 560 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์เพื่อส่งขายภายในประเทศ และเนื้อสัตว์ที่วางขายในตลาดสดในประเทศไทย โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจะถูกนำมาทดสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Salmonella enterica* subspecies *enterica* หรือไม่โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS และทดสอบแยก serovar ตามวิธีของ Kauffman-White ได้ผลตามตารางที่ 1 ตารางที่ 1 ผลการทดสอบยืนยันเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อสัตว์

	จำนวน ตัวอย่าง	พบ <i>Salmonella</i> spp.	พบ <i>Salmonella</i> Group B และ D	พบ <i>Salmonella</i> Typhimurium และ Enteritidis
ตัวอย่างเนื้อสัตว์จากโรงฆ่าสัตว์	221	68 (30.77%)	24 (10.86%)	3 (1.36%)
ตัวอย่างเนื้อสัตว์จากตลาดสด	339	40 (11.80%)	21 (6.19%)	4 (1.18%)
รวม	560	108 (19.28%)	45 (8.04%)	7 (1.25%)

จากผลการทดลองพบว่า ร้อยละการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์อยู่ที่ 30.77 และในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากตลาดสดอยู่ที่ 11.80 สอดคล้องกับการศึกษาของสรรพเพชญ และคณะ (2556) ที่ทำการศึกษาความชุกของ *Salmonella enterica* ในเนื้อดิบในร้านอาหารบริการตนเองแบบไทยในเทศบาลเมืองขอนแก่น โดยเก็บตัวอย่างเนื้อสุกร 54 ตัวอย่าง เนื้อโค 54 ตัวอย่าง และเนื้อไก่ 50 ตัวอย่าง รวม 158 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella enterica* ในเนื้อสุกร 32 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 59 ในเนื้อโค 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 52 และในเนื้อไก่ 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18

และหากนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกับอัตราการปนเปื้อนของ *Salmonella* จะพบว่า การพบ *Salmonella* serogroup B และ D มีอัตราส่วนร้อยละ 35.29 ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ และร้อยละ 52.5 ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากตลาดสด เมื่อเทียบกับปริมาณตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. และหากเปรียบเทียบอัตราการปนเปื้อนของ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ Enteritidis จากจำนวนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* serogroup B และ D จะพบว่า ตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์มีอัตราการปนเปื้อนร้อยละ 12.5 และตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เก็บจากตลาดสดมีอัตราการปนเปื้อนร้อยละ 19.05 ตามสรุปดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราส่วนร้อยละการปนเปื้อนของ *Salmonella* จำแนกตามความละเอียดของการวิเคราะห์

	อัตราส่วนตัวอย่างที่พบ <i>Salmonella</i> spp.	อัตราส่วนตัวอย่างที่พบ <i>Salmonella</i> Group B และ D	อัตราส่วนตัวอย่างที่พบ <i>Salmonella</i> Typhimurium และ Enteritidis
ตัวอย่างเนื้อสัตว์จากโรงฆ่าสัตว์	68 (100%)	24 (35.29%)	3 (4.41%, 12.5%)
ตัวอย่างเนื้อสัตว์จากตลาดสด	40 (100%)	21 (52.5%)	4 (10%, 19.05%)

สรุปผลการทดลอง

วิธียืนยันเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นเทคโนโลยีใหม่ในการทดสอบยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารโดยเปรียบเทียบชนิดและอัตราส่วนของโปรตีนโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย กับฐานข้อมูลรูปแบบชนิดและอัตราส่วนของโปรตีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ (SARAMIS™) ทำให้สามารถลดขั้นตอนในการทดสอบ ย่นระยะเวลาในการทดสอบจาก 1-2 วัน เหลือเพียงไม่เกิน 2 นาที เทคโนโลยีนี้จึงเริ่มมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง และประยุกต์ใช้ในงานที่หลากหลาย รวมทั้งเริ่มมีการนำมาศึกษาและพัฒนาเพื่อใช้ในงานด้านสุขอนามัยและความปลอดภัยทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งปัจจุบันนี้ข้อกำหนดด้านสุขอนามัยอาหารระดับสากลได้มีความก้าวหน้าขึ้นอย่างมากตามเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้น ความต้องการการตรวจวิเคราะห์ที่ละเอียดถี่ถ้วน ความเจาะลึกของการตรวจวิเคราะห์เริ่มปรากฏในข้อกำหนดระดับสากล ซึ่งประเทศที่เป็นสมาชิกขององค์การที่ตั้งข้อกำหนดมีข้อมูลพื้นที่จะต้องนำไปปฏิบัติและปรับใช้ รวมทั้ง

เป็นมาตรฐานในการกำหนดคุณภาพของสินค้าอาหารนำเข้าและส่งออกของประเทศสมาชิก หอปฏิบัติการ
ตรวจวิเคราะห์สินค้าอาหารจึงจำเป็นต้องค้นคว้า ศึกษา นำวิธีวิเคราะห์ทดสอบที่มีความทันสมัย
ไปใช้ปฏิบัติการทดสอบ และพัฒนาองค์ความรู้ในการตรวจวิเคราะห์ให้ทันสมัยอยู่เสมอ เพื่อตอบสนองความ
ต้องการความปลอดภัยในอาหาร ทั้งการบริโภคภายในประเทศ การนำเข้าและส่งออกสินค้าอาหารระหว่าง
ประเทศ และข้อกำหนดด้านความปลอดภัยอาหารในระดับสากล

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ศึกษาวิจัยโครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ตรวจยืนยันและแยก Serotype เชื้อ
Salmonella spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ขอขอบคุณ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุ
สัตว์ ผู้ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Cowan, S.T., 1974. Part & Gram-negative facultatively anaerobic rods, pp. 290-383.
In S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin and R.Y. Stanier, ed.
Bergey's manual of determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Robert, T.A., A.C. Baird-Parker and R.B. Tompkin, ed., 1996. **Micro-organism in
foods 5 Characteristics of microbial pathogens**. Blackie Academic & Professional, United Kingdom.
- Garcia, S. and N. Heredia, 2009. Foodborne pathogens and Toxins: an overview,
pp. 15-52. In N. Heredia, I. Wesley and S. Garcia, ed. **Microbiologically safe foods**. A John Wiley &
sons, inc., publication, New Jersey.
- Haroun, N.S., C. Chilton, L. Rajakaruna, T. Gaulton, G. Hallas, H. Atanassov, G.
Khoder, P.D. Rakowska, E. Cerasoli and S.E. Gharbia, 2010. Changing Concepts in the
Characterisation of Microbes and the Influence of Mass Spectrometry, pp. 3-34. In H.N. Shah and
S.E. Gharbia, ed. **Mass Spectrometry for Microbial Proteomics**. A John Wiley & sons Ltd.,
Publication, Singapore.
- Franz, H., T.W. Jaskolla and M. Karas, 2014. The MALDI Process and Method,
pp. 1-40. In F. Hillenkamp and Peter-Katalinic, ed. **MALDI MS A Practical Guide to Instrumentation,
Methods, and Applications**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Singapore.
- European Commission, 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15
November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**.
L338, 1-26.

European Commission, 2017. **International Standard ISO 6579 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp.**. International Organization for Standardization, Switzerland.

Andrés-Barrao, C., C. Benagli, M. Chappuis, R.O. Pérez, M. Tonolla and F. Barja, 2013. Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**. 36, 75-81.

Angkititrakul, S., A. Polpakdee and R. Chuanchuen, 2013. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in Raw Meat in Thai Self-Service Style Restaurants in KhonKaen Municipality. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**. 43(2), 265-268.

Tanaka, K., 2003. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation. **Angewandte Chemie International Edition**. 42(33), 3860-3870.