การพัฒนาเทคนิคอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะและความไว ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

DEVELOPMENT OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUE FOR SPECIFIC AND SENSITIVE DETECTION OF FOODBORNE BACTERIAL PATHOGENS

ณรงค์ อรัญรุตม์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การพัฒนาเทคนิคอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะและความไว ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

ณรงค์ อรัญรุตม์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะและความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร Development of Molecular Biology Technique for Specific and Sensitive Detection of Foodborne Bacterial Pathogens
ชื่อ-นามสกุล	นายณรงค์ อรัญรุตม์
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา, Ph.D.
ปีการศึกษา	2560

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์, ปร.ด.)

..... กรรมการ

(อาจารย์อัษฎาวุธ อารีสิริสุข, Ph.D.)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา, Ph.D.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ปร.ด.)

วันที่ 30 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2561

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะและความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร
ชื่อ-นามสกุล	นายณรงค์ อรัญรุตม์
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา, Ph.D.
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยาในการตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารและเปรียบเทียบผลการตรวจตัวอย่างกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาเป็น 2 เทคนิค ได้แก่ เทคนิคที่ 1 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่สามารถตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ แบบพร้อมกันโดยประกอบด้วย *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และเทคนิคที่ 2 การพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายที่มีความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร โดยการพัฒนาเทคนิคทั้งสองได้ศึกษาหาสภาวะและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา อีกทั้งนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร

ผลการวิจัยในการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์พบว่ามีความไวในการตรวจดีเอ็นเอบริสุทธิ์เชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ได้ที่ระดับ 10^3 CFU/mL และการตรวจเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ในรูปแบบจำลองร่วมกับการบ่มเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 10 CFU/mL และการทดสอบความจำเพาะพบว่าให้ผลบวกกับแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายจำนวน 33 สายพันธุ์ และไม่ให้ผลบวกกับแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ จำนวน 33 สายพันธุ์ แสดงว่ามีความจำเพาะในการตรวจ 100% ในการพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. พบว่ามีความไวในการตรวจดีเอ็นเอบริสุทธิ์ได้ที่ระดับ 1.2 CFU/mL และการตรวจเชื้อแบคทีเรียรูปแบบจำลองร่วมกับการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 7 CFU/mL และไม่ให้ผลบวกกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้ในการตรวจเปรียบเทียบเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในเนื้อไก่จำนวน 120

ตัวอย่าง พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 94.02% มีความจำเพาะที่ระดับ 86.79% และมีความแม่นยำที่ระดับ 90.83%

สรุปผลได้ว่าการพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยาในการตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและปนเปื้อนในอาหารมีข้อดีหลายประการ เช่น มีความไวในการตรวจสูง มีความจำเพาะในการตรวจ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารได้

คำสำคัญ: Multiplex PCR, LAMP, Turbidimeter, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*

Thesis Title	Development of Molecular Biology Technique for Specific and Sensitive Detection of Foodborne Bacterial Pathogens
Name - Surname	Mr. Narong Arunrut
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Assistant Professor Chiraporn Ananchaipattana, Ph.D.
Academic Year	2017

ABSTRACT

The aim of this study was to develop the technique of molecular biology for detection of foodborne bacterial pathogens and then compare the results with a conventional culture based method. There were two different techniques developed in this study. First, the multiplex PCR (m-PCR) assay was developed for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Second, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay combined with portable turbidimeter was developed for sensitive detection of *Salmonella* spp. For achievement, those assays were developed after optimization of the reaction conditions and incubation time. Further, we validated our developed methods by testing food samples.

For the first optimum condition of m-PCR assay, the results revealed that the detection limit was 10^3 CFU/mL for mixed genomic DNA in pure culture. Detection sensitivities of fresh mixes were able to simultaneously detect 10 CFU/mL of each pathogen in artificially inoculated samples after enrichment for 6 h. All tested target strains (n=33) were correctly detected by m-PCR assay, whereas non-target strains (n=33) demonstrated no cross-reactivity representing 100% specificity. Secondly, the result of LAMP combined turbidimeter did not show cross-reactivity with several common bacterial pathogens and the detection limit was 1.2 CFU/mL for genomic DNA in pure culture. Spiked samples accurately detected 7 CFU/mL of *Salmonella* spp. pathogen in artificially inoculated samples after enrichment for 6 h. Compared to standard culture-based methods, the sensitivity, accuracy and specificity test of real-time LAMP assay for 120 raw chicken meat samples were 94.02, 90.83 and 86.79% respectively.

In conclusion, the results demonstrated that those methods are both sensitive and specific and can be used for rapid detection and differentiation of foodborne diseases.

Keywords: Multiplex PCR, LAMP, Turbidimeter, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ไปได้เนื่องด้วยได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี นอกจากนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และด้วยความกรุณาและอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา ที่ปรึกษาที่คอยให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์ ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.อัษฎาวุธ อารีสิริสุข กรรมการสอบ ที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งเสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้การสนับสนุนส่งเสริมจนผู้วิจัยสามารถนำเอาความรู้และหลักการต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี อีกทั้งผู้วิจัยยังได้รับความช่วยเหลือจากครอบครัว เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ตลอดจนบุคลากรทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในหลายประการ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจและสามารถนำความรู้ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาประเทศชาติต่อไป และถ้าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดหรือบกพร่องประการใด ผู้วิจัยกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้

ณรงค์ อรัญรุตม์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… (3)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..... (5)

กิตติกรรมประกาศ……. (7)

สารบัญ…….. (8)

สารบัญตาราง…… (11)

สารบัญภาพ……... (12)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ……... (14)

บทที่ 1 บทนำ…… 15

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……. 15

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……... 17

1.3 ขอบเขตของการศึกษา……..... 17

1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย……... 18

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……..... 20

บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….. 21

2.1 โรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย……... 21

2.2 วิธีการตรวจแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร……... 24

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย…….. 31

3.1 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) ตรวจเชื้อแบบพร้อมกันในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร…… 33

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลอง……. 33

3.1.2 การออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์…… 33

3.1.3 วิธีการตรวจสอบแบคทีเรียด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ……... 34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.4 การทดสอบความไวของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์……. 36

3.1.5 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์…….. 36

3.2 การพัฒนาเทคนิคแลมป์ (LAMP) ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร…….. 36

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลอง…… 36

3.2.2 การออกแบบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคแลมป์….. 37

3.2.3 การทดสอบความจำเพาะ…….. 37

3.2.4 การทดสอบความไวในการตรวจ…….. 37

3.2.5 การตรวจวัดเชิงปริมาณ……. 38

3.2.6 การทดสอบเปรียบเทียบความไวในตัวอย่างอาหาร…….. 38

3.2.7 การตรวจในตัวอย่างอาหาร……... 38

3.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง……... 38

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล…….. 39

4.1 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) ตรวจเชื้อแบบพร้อมกันในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร…… 39

4.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์…. 39

4.1.2 การหาองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR)……... 39

4.1.3 การทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค m-PCR…… 41

4.1.4 การทดสอบความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR…… 45

4.2 การพัฒนาเทคนิคแลมป์ (LAMP) ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร……. 48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 การออกแบบไพรเมอร์แลมป์สำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* 48

4.2.2 การหาองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแลมป์….. 49

4.2.3 การทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่น….. 51

4.2.4 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย…….. 54

4.2.5 การสร้างกราฟสมการความขุ่นมาตรฐาน……... 56

4.2.6 ผลการทดสอบหาสภาวะความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารด้วยสถานการณ์จำลองโดยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย…… 57

4.2.7 ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐาน……. 59

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ…… 61

บรรณานุกรม……. 63

ภาคผนวก…….. 69

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี…… 70

ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ…… 72

ประวัติผู้เขียน…… 77

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา m-PCR……... 40

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR…… 41

ตารางที่ 4.3 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์แลมป์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp……..... 49

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิคแลมป์โดยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นและเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและเทคนิคพีซีอาร์..... 51

ตารางที่ 4.5 แสดงการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงแบบมาตรฐาน…. 60

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp ……..... 22
ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของเชื้อ *S. aureus*…….. 23
ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะของเชื้อ *B. cereus*……... 23
ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)…… 25
ภาพที่ 2.5 แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Multiplex-PCR…… 26
ภาพที่ 2.6 แผนผังแสดงการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP……. 27
ภาพที่ 2.7 หลักการของเทคนิค LAMP: โครงสร้างเริ่มต้นขั้นตอนการผลิต (A-H)……... 29
ภาพที่ 2.8 หลักการของเทคนิค LAMP: ขั้นตอนการขยายวงจร…… 30
ภาพที่ 2.9 แสดงการอ่านผลผลิตภัณฑ์แลมป์ด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย……..... 32
ภาพที่ 4.1 แสดงการอ่านผลเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในการทำปฏิกิริยา Single PCR และ m-PCR……..... 40
ภาพที่ 4.2 แสดงผลการตรวจความไวด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus*…….. 45
ภาพที่ 4.3 แสดงความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจการติดเชื้อในอาหาร โดยไม่มีการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C……. 47
ภาพที่ 4.4 แสดงความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจการติดเชื้อในอาหาร เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง…… 47
ภาพที่ 4.5 แสดงความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจการติดเชื้อในอาหาร เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง…… 48
ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงเครื่องวัดความขุ่นในการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจ เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp…….. 50
ภาพที่ 4.7 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. โดย เทคนิคแลมป์ร่วมกับการอ่านผลโดยใช้ 2% Agarose gel……. 50
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงการทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วย

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

เครื่องวัดความขุ่นโดยใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เจือจางลงทีล่ะสิบเท่าเป็นต้นแบบ..... 55
ภาพที่ 4.9 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์และอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส..... 55
ภาพที่ 4.10 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส..... 56
ภาพที่ 4.11 แสดงการสร้างกราฟความขุ่นมาตรฐานโดยแกน X คือค่า log (log CFU/mL) ความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น และแกน Y คือ เวลาเฉลี่ยที่วัดได้ (นาที)..... 56
ภาพที่ 4.12 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง..... 57
ภาพที่ 4.13 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..... 58
ภาพที่ 4.14 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง..... 58
ภาพที่ 4.15 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 59

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

mL	มิลลิลิตร
G	กรัม
CFU	โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิท
CFU/mL	โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิทต่อมิลลิลิตร
µl	ไมโครลิตร
min	นาที
Mean	ค่าเฉลี่ย
SD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Nm	นาโนเมตร
$^{\circ}C$	องศาเซลเซียส
dNTP	ดีเอ็นทีพี
Ng	นาโนกรัม
h	ชั่วโมง
mM	มิลลิโมล่าร์
µM	ไมโครโมล่าร์
OD_{600}	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
DNA	ดีเอ็นเอ
g	กราวิตี้
PCR	พีซีอาร์
LAMP	แลมป์
Real-time	เรียลไทม์
m-PCR	มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์
UV	แสงยูวี
primer	ไพรเมอร์

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ปัญหาและความสำคัญของปัญหา

การระบาดของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเป็นปัญหาที่สำคัญต่อหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยซึ่งปัญหาดังกล่าวไม่เพียงส่งผลกระทบทางตรงต่อด้านสาธารณสุข แต่ปัญหาดังกล่าวยังส่งผลกระทบทางอ้อมในด้านเศรษฐกิจของประเทศด้วย จากรายงานของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) ประมาณการว่าทุกปีจะมีประชากรชาวอเมริกันเจ็บป่วยเพราะแบคทีเรียก่อโรค 48 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 3,000 คน [1] นอกจากนี้กรมการเกษตร ประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Department of Agriculture: USDA) ระบุว่าในแต่ละปีจะมีคนป่วยจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ประมาณ 700,000 ถึง 3.8 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 870-2,000 คน ก่อให้เกิดความสูญเสียประมาณ 0.9-12.2 พันล้านเหรียญ [2] ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ได้รับผลกระทบจากการระบาดของแบคทีเรียก่อโรคเนื่องจากตั้งอยู่ในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีลักษณะภูมิอากาศร้อนชื้นเหมาะแก่การเจริญและแพร่กระจายของแบคทีเรียหลากหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ในปี พ.ศ. 2552 สำนักระบาดวิทยา กลุ่มโรคจากอาหารและน้ำ รายงานว่ามีจำนวนผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน 1.2 ล้านราย คิดเป็นอัตราป่วย 2,023.64 ต่อประชากรแสนคน ในจำนวนนี้เสียชีวิต 65 ราย โดยพบว่าปัญหาเกิดจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหารซึ่งจุลินทรีย์ที่สำคัญ ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* spp. นอกจากนี้กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข เสนอข้อมูลผู้ป่วยด้วยระบบทางเดินอาหารในปี 2555 พบว่า มีผู้ป่วยทั้งหมด 1,164,902 ราย เสียชีวิต 38 ราย โรคที่พบมากกว่า 90% ของผู้ป่วยทั้งหมด ได้แก่ โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน เสียชีวิต 37 ราย รองลงมาคือโรคอาหารเป็นพิษพบผู้ป่วยประมาณ 98,000 ราย เสียชีวิต 1 ราย และโรคบิด จำนวน 5,645 ราย สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดท้องร่วงมาจากหลายปัจจัย แต่ที่สำคัญคือน้ำแข็งที่มักปนเปื้อน และอาหารที่เสียได้ง่ายเนื่องจากอากาศร้อน นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าอาหารหลายประเภทที่จำหน่ายในตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในประเทศไทยมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียก่อการเน่าเสียในปริมาณสูง [3-5] ในช่วงธันวาคม 2555 ถึง กุมภาพันธ์ 2557 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้สำรวจการปนเปื้อนเชื้อ

โรคอาหารในเนื้อสัตว์ดิบที่จำหน่ายในตลาดสด เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล พบมีการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7 และ *Salmonella* spp. ในอัตราสูงและสรุปว่าเนื้อดิบเสี่ยงต่อโรคอาหารเป็นพิษ [6] นอกจากนี้ในปี 2558 ประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจากระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา (รายงาน 506) รวมทั้งสิ้น 19,612 ราย จากทุกจังหวัดทั่วประเทศ อัตราป่วย 30.4 ต่อประชากรแสนคน ไม่มีผู้เสียชีวิต [7] นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบางสายพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น [8] ซึ่งมีสาเหตุจากการที่เกษตรกรหรือผู้ประกอบการอาหารนิยมให้อาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์เพื่อลดการป่วยของสัตว์จึงส่งผลให้แบคทีเรียที่ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นประจำเกิดการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งเมื่อพิจารณาตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจากฟาร์มจนกระทั่งถึงผู้บริโภครับประทานเข้าไปก็พบว่าอาหารมีโอกาสปนเปื้อนได้หลายสาเหตุ แม้ว่าปัจจุบันภาคอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้ระบบควบคุมคุณอาหารปลอดภัย เช่น ระบบ Good manufacturing practice (GMP) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด ดังนั้นการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบหาสาเหตุการปนเปื้อนจึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการควบคุมคุณภาพอาหาร

วิธีทั่วไปที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารคือการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture based method) แต่พบว่าวิธีนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการดำเนินการนานประมาณ 5-12 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการดำเนินงานมีหลายชนิด อีกทั้งผู้วิเคราะห์จะต้องมีความชำนาญในการอ่านผลโคโลนีของแบคทีเรียที่ทำการตรวจ และต้องส่งตัวอย่างอาหารไปตรวจในห้องปฏิบัติการเท่านั้น นอกจากนี้มีเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา (Immunological methods) ที่เป็นวิธีการที่มีความจำเพาะและความไวในการตรวจสูงและใช้เวลาในการดำเนินการอย่างน้อย 1-2 วัน แต่ยังต้องใช้แรงงานคนจำนวนมากในการดำเนินงาน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารโดยวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology technique) ที่เป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจ มีความจำเพาะสูงและใช้ระยะเวลาสั้นในการดำเนินงาน จึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์คือ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* แบบพร้อมกันต่ออาหาร 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. เพื่อให้ได้เทคนิคที่มีความจำเพาะ มีความไว ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการดำเนินงานสามารถตรวจอาหารจำนวนมากได้โดยไม่ต้องใช้แรงงานคนจำนวนมากและสามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจแบบเชิงปริมาณได้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) ที่สามารถตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ คือ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* แบบพร้อมกันต่ออาหาร 1 ตัวอย่าง

1.2.2 เพื่อพัฒนาเทคนิคแลมป์ (Loop-mediated isothermal amplification; lamp) ร่วมกับการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายที่มีความไวในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

1.3.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

(1) ศึกษายีนเป้าหมายที่เลือกใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

(2) ทดสอบออกแบบชุดไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Premier 5.0 software (Premier Biosoft International)

(3) ตรวจสอบความจำเพาะชุดไพรเมอร์ในระบบฐานข้อมูล NCBI, nucleotide BLAST

1.3.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์

(1) ทดสอบปริมาตรที่เหมาะสมของเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์

(2) ทดสอบสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์ที่เหมาะสม

(3) ทดสอบหาอุณหภูมิในการจับกันระหว่างไพรเมอร์และสายดีเอ็นเอ (annealing temperature; Ta) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์

(4) ทดสอบหาจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์

1.3.1.3 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

1.3.1.4 การทดสอบความไวของเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ในการตรวจดีเอ็นบริสุทธิ์

1.3.1.5 การทดสอบสภาวะและความไวของเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ในการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* รูปแบบจำลองในตัวอย่างอาหาร

1.3.2 การพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร

1.3.2.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

(1) ศึกษายีนเป้าหมายที่เลือกใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร

(2) ทดสอบออกแบบชุดไพรเมอร์แลมป์ด้วยโปรแกรม Explorer version 3 (https://primerexplorer.jp/lamp 3.0.0 / index.html)

(3) ตรวจสอบความจำเพาะชุดไพรเมอร์ในระบบฐานข้อมูล NCBI, nucleotide BLAST

1.3.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคแลมป์

(1) ทดสอบหาอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาแลมป์ที่เหมาะสม

(2) ทดสอบหาเวลาในการทำปฏิกิริยาแลมป์ที่เหมาะสม

(3) ทดสอบสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมป์ที่เหมาะสม

1.3.2.3 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคแลมป์

1.3.2.4 การทดสอบความไวของเทคนิคแลมป์ในการตรวจดีเอ็นบริสุทธิ์

1.3.2.5 ทดสอบสร้างสมการกราฟความขุ่นมาตรฐานเพื่อใช้ในการตรวจวัดเชิงปริมาณ

1.3.2.6 ทดสอบสภาวะและความไวของเทคนิคแลมป์ในการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. รูปแบบจำลองในตัวอย่างอาหาร

1.3.2.7 ทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคแลป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นและเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อในการตรวจตัวอย่างอาหารจำนวน 120 ตัวอย่าง

1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย

1.4.1 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

เนื่องจากการตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารวิธีการที่นิยมในปัจจุบันใช้ การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture Method) ร่วมกับการตรวจสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Test) โดยวิธีการดังกล่าวใช้ระยะเวลาในการดำเนินการนานประมาณ 5-12 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการดำเนินงานมีหลายชนิด อีกทั้งผู้วิเคราะห์จะต้องมีความชำนาญในการอ่านผลการทดสอบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดเพื่อที่จะพัฒนาวิธีการตรวจที่ใช้ระยะเวลาสั้นลง โดยมีความจำเพาะ (Specificity) และความไว (Sensitivity) ในการตรวจสูง อีกทั้งสามารถตรวจแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้พร้อมกัน 3 สายพันธุ์ในการตรวจเพียงครั้งเดียว โดยอาศัยหลักการทำงานของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ การทำงานวิจัยขั้นตอนแรกจะทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร จากนั้นทำการหาสภาวะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่เหมาะสมในการตรวจ จากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอแบคทีเรียสายพันธุ์เป้าหมาย (Inclusivity Test) จำนวน 33 สายพันธุ์ และดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ที่ก่อโรคในอาหาร (Exclusivity Test) จำนวน 33 สายพันธุ์ จากนั้นทำการทดสอบความไวในการตรวจดีเอ็นที่บริสุทธ์ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ และทำการทดสอบสภาวะและความไวในการตรวจแบคทีเรียในอาหารด้วยสถานการณ์จำลองเพื่อให้ทราบความสามารถในการตรวจของวิธีการที่พัฒนาขึ้นและนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ ที่พัฒนาแล้วในอดีต

1.4.2 การพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร

เนื่องจากเทคนิคแลมป์เป็นเทคนิคในการเพิ่มขยายยีนด้วยอุณหภูมิเดียวที่มีความไวและความจำในการตรวจจึงไม่ต้องใช้ทั้งเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่มีราคาแพงเช่นเครื่องพีซีอาร์และชุดอ่านผลเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดเพื่อที่จะพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหารด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่น การทำงานวิจัยเริ่มด้วยขั้นตอนแรกจะทำการออกแบบไพรเมอร์แลมป์ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Salmonella* ที่ก่อโรคในอาหาร จากนั้นทำการหาสภาวะของเทคนิคแลมป์ที่เหมาะสมในการตรวจ จากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะของเทคนิคแลมป์โดยใช้ดีเอ็นเอแบคทีเรียสายพันธุ์เป้าหมาย (Inclusivity Test) จำนวน 27 สายพันธุ์ และดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ที่ก่อโรคในอาหาร (Exclusivity test) จำนวน 39 สายพันธุ์ จากนั้นทำการทดสอบความไวในการตรวจดีเอ็นเอบริสุทธ์ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย และทำการสร้างกราฟสมการความขุ่นมาตรฐานเพื่อใช้ในการตรวจ

เชิงปริมาน แล้วทำการทดสอบสภาวะและความไวในการตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในอาหารด้วยสถานการณ์จำลองเพื่อให้ทราบความสามารถในการตรวจและนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ ที่พัฒนาแล้วในอดีต จากนั้นทำการทดสอบเปรียบเทียบเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นและเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อในการตรวจในตัวอย่างอาหารจำนวน 120 ตัวอย่าง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่สามารถตรวจหาเชื้อได้พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาครั้งเดียว ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

1.5.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคแลมป์ที่มีความไวและจำเพาะและสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร

1.5.3. สามารถตีพิมพ์ผลงานที่เป็นองค์ความรู้ใหม่นี้ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับได้

1.5.4. ผู้ประกอบการผลิตอาหารสามารถประยุกต์ใช้ชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ได้นี้ในการตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารของโรงงานอาหาร ช่วยให้ตรวจสอบอาหารได้พร้อมกันจำนวนมากและสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ

บทที่ 2
วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

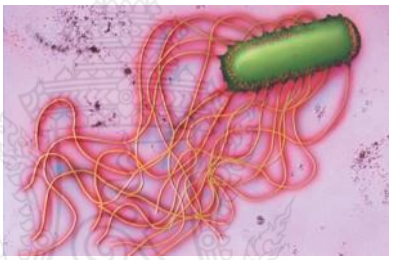
2.1 โรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย

โรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อจุลินทรีย์มีสาเหตุสำคัญจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อและชนิดของสารพิษที่เชื้อขับออกมา เมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในอาหารจะทำให้เชื้อโรคสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและผลิตสารพิษได้อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณมากพอที่จะทำให้เกิดอาการป่วยได้ โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญ ได้แก่ *Salmonella enterica, Staphylococcus aureus, Campylobacter* spp. และ *Escherichia coli* [9]

ปัจจุบันประชากรโลกเพิ่มมากขึ้นการผลิตอาหารจึงมากขึ้นตามไปด้วยซึ่งการผลิตอาหารที่มากขึ้นมักจะส่งผลต่อคุณภาพของอาหารโดยเฉพาะปัญหาคุณภาพด้านจุลชีววิทยา ในประเทศไทยโรคหรือปัญหาในระบบทางเดินอาหารนับเป็นปัญหาทางสาธารณสุข จากรายงานประจำปี 2554 ประเทศไทยพบการป่วยของผู้ป่วยจากโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในประเทศไทยปี 2554 จำนวน 742 ราย ในจำนวนนี้พบว่า 134 ราย คิดเป็นอัตราการป่วย 1 ราย และมีผู้เสียชีวิตจำนวน 31 ราย คิดเป็น 0.05 รายต่อแสนประชากร [10] นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยพบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์จากโรงฆ่าสัตว์และสถานที่จำหน่ายสัตว์ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียรวม, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Coliform*, *Escherichia coli* และ *Enterococcus* [11] อีกทั้งยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* แล *Salmonella* spp. ในตัวอย่างเนื้อสุกร ไก่ และโค จากตลาดสดและตลาดนัดในพื้นที่จังหวัดราชบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555 [12] และในปี พ.ศ. 2557 จากการสำรวจผลิตภัณฑ์ชุมชนด้านอาหารโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จำนวน 8 จังหวัด ได้แก่ นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา สระบุรี ลพบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง นครนายกและกรุงเทพมหานคร พบว่าอาหารเหล่านั้นไม่ผ่านมาตรฐานจำนวนหนึ่งซึ่งมีสาเหตุเกิดจากการปนเปื้อนยีสต์รา, *E. coli, B. cereus, C. perfringens* เกินเกณฑ์กำหนดและพบการปนเปื้อน *Salmonella* spp. และ *S.aureus* ร่วมด้วย [13]

2.1.1 *Salmonella* spp. เป็นจีนัสหนึ่งในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริเอซี (Enterobacteriaceae) ดำรงชีวิตเป็นแบบแฟคัลเตตีฟแอนแอโรบ (Facultative anaerobe) เชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่มี

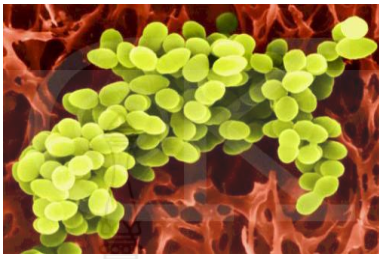
รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมลบสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว ลักษณะแสดงดังภาพที่ 2.1 เจริญของเชื้อได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนในที่ที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเชื้อชนิดนี้ยังสามารถเจริญได้ *Salmonella* spp. มีหลายสายพันธุ์แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะความเป็นอยู่หรือการดำรงชีวิตที่ต่างกันไป เช่น *Salmonella* Typhimurium ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่เรียกว่า ไข้ไทฟอยด์ โดยพบในมนุษย์มากกว่าสัตว์อื่น ๆ อย่างไรก็ตามจะพบเชื้อจากสัตว์ติดต่อสู่มนุษย์ และสัตว์อื่น ๆ เช่น หนู สัตว์ปีก แมลง วัว ควาย สุนัข แมว และม้า เป็นต้น สำหรับการติดเชื้อในมนุษย์นั้นส่วนมากจะได้รับเชื้อปนเปื้อนมาในน้ำและอาหาร บางครั้งอาจเกิดจากสัตว์เลี้ยงที่อาศัยตามอาคารบ้านเรือน ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อ Salmonella เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงประกอบกับเชื้อมีอัตราการแพร่ระบาดสูง จึงสามารถพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ในอัตราสูงและเรียกโรคที่เกิดจาก *Salmonella* spp. ว่า salmonellosis [14]



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp.
ที่มา: http://odpc3.ddc.moph.go.th/DataCenter/outbreak/agentinformation.php?idagg=15

2.1.2 *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันเป็นสายสั้น ๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่นลักษณะแสดงดังภาพที่ 2.2 บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งทนต่อความร้อนได้ดีและเป็นสาเหตุให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ ซึ่งโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *S. aureus* นั้นมีชื่อเรียกคือ Stapyhloenterotoxicosis และ Staphylorenterotoxemia แบคทีเรีย *S. aureus* จะมีชีวิตอยู่ในอากาศฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหาร หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งปฐมภูมิของเชื้อชนิดนี้ โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ เส้นผม และผิวหนัง อาจพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ถึง 60-80 % ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหาร รวมทั้งในขั้นตอนของการบรรจุและ

สภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่ง คือการเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม เป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษอย่างรวดเร็ว [14]



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของเชื้อ *S. aureus*

ที่มา: https://queenofsheeba.wordpress.com/2008/07

2.1.3 *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (Rod) สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ลักษณะแสดงดังภาพที่ 2.3 และ sporangium ในสปอร์จะไม่บวมลักษณะพิเศษเหล่านี้รวมถึงลักษณะสำคัญทางชีวเคมี และการวิเคราะห์การเคลื่อนไหวสามารถใช้บอกความแตกต่างและยืนยันลักษณะเฉพาะของ *B. cereus* ได้ โดย *B. cereus* สามารถพบได้ในอาหารทั่วไป ตัวอย่างเช่น เนื้อสัตว์ นม ผัก ล้วนมีส่วนทำให้เกิดอาการท้องร่วงจากอาหารเป็นพิษได้ การระบาดของอาหารที่ทำให้เกิดโรคโดยทั่วไปจะเกิดจากผลิตภัณฑ์จากข้าว และอาหารจำพวกแป้งอื่น ๆ เช่น มันฝรั่ง พาสต้า และผลิตภัณฑ์เนยแข็งรวมทั้งอาหารปรุงแต่ง เช่น ซอส พุดดิ้ง ซุป ลูกชิ้น พาย และสลัด โดยปริมาณที่เชื้อก่อโรคได้คือมากกว่า 10^6 เซลต่อกรัมอาหาร [5]

ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะของเชื้อ *B. cereus*

ที่มา: http://www.microbiologynetwork.com

2.2 วิธีการตรวจแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร

การตรวจแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารและรีบกำจัดก่อนถึงผู้บริโภคจึงจะช่วยในการลดปัญหาการแพร่ระบาดของแบคทีเรียได้ทันท่วงที นอกจากนั้นยังช่วยลดปัญหาการสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องมาจากการถูกตีกลับสินค้าอาหารที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียจากประเทศต่างๆ ปัจจุบันวิธีที่ตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ วิธีเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ วิธีดั้งเดิม หรือวิธี conventional ร่วมกับวิธีทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งต้องอาศัยเวลานานตั้งแต่ 5 ถึง 12 วัน [15] ทำให้อาหารบางชนิดที่รอผลการตรวจสอบการปนเปื้อนอาจเกิดการเน่าเสียระหว่างการรอผล ดังนั้นการใช้เวลาในการรอผลการตรวจสอบนานจึงส่งผลกระทบต่อการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจของผู้ประกอบการผลิตหรือจำหน่ายอาหารทั้งในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ปัจจุบันพบว่ามีการค้นคว้าหาวิธีการเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารแบบรวดเร็วและให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำสามารถใช้ในการตรวจแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอาหาร โดยนำเทคนิคด้านชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร [16] เช่น การนำเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR, Multiplex PCR) และเทคนิคแลมป์ (Loop-mediated isothermal amplification; lamp) มาใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายของแบคทีเรียก่อโรคที่สนใจภายในหลอดทดลองทำให้สามารถตรวจสอบผลได้รวดเร็วและมีความจำเพาะกว่าวิธีดั้งเดิม

2.2.1 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ Polymerase chain reaction เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นภายในหลอดทดลอง ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี ค.ศ. 1983 โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติ ของกระบวนการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ในหลอดทดลอง อาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น โดยอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ หรือ primer จับเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ และมีเอนไซม์ DNA polymerase [16] ช่วยต่อสายดีเอนเอโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ ซึ่งจะได้ดีเอนเอสายใหม่เกิดขึ้น เมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นองค์ประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา primer ซึ่งเป็น oligonucleotide ท่อนสั้นๆขนาดประมาณ 18-30 base pair, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polymerase

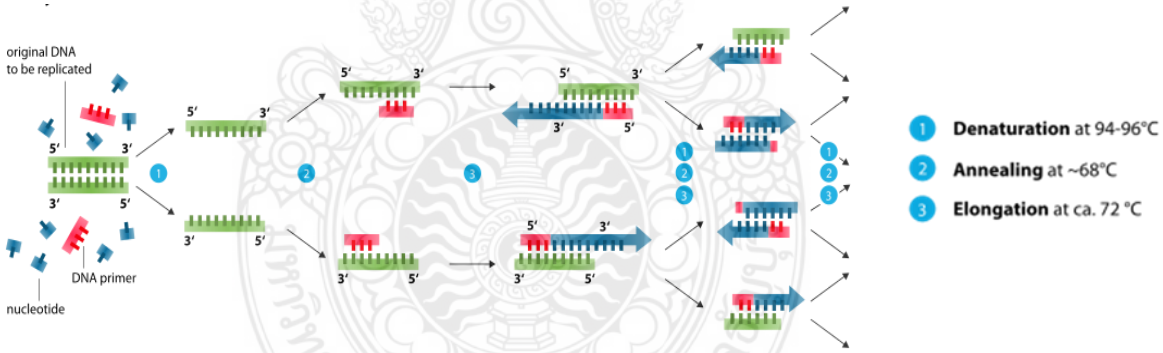
และ Buffer ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบแสดงการทำงานดังภาพที่ 2.4 ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

(1) Denaturation เป็นขั้นตอนการคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ ออกเป็นเส้นเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

(2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่มีเบสคู่สม โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำกว่าค่าอุณหภูมิแยกตัว (temperature melting; Tm) ของ primer ประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส

(3) Extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับเบสเข้าที่ปลาย 3' ของ primer และมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase ซึ่งอุณหภูมิปกติประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ โดยจำนวนผลผลิต (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n=จำนวนรอบ) จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตโดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกตามขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน

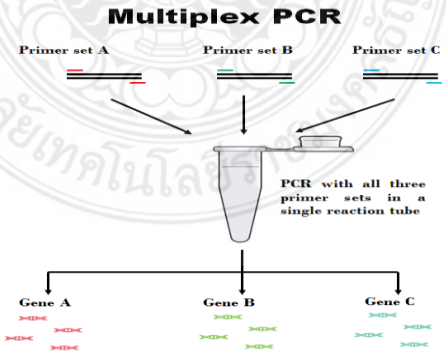


ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)
ที่มา: http://www.microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle

2.2.2 เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR, Multiplex PCR)

การพัฒนาเทคนิค PCR ให้มีประสิทธิภาพและความสามารถมากขึ้นในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ทีละหลายชนิดในการตรวจสอบเพียงครั้งเดียว โดยเทคนิคนี้เป็นที่รู้จักกันในชื่อที่เรียกว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR, Multiplex PCR) เทคนิคนี้เป็นการเพิ่ม

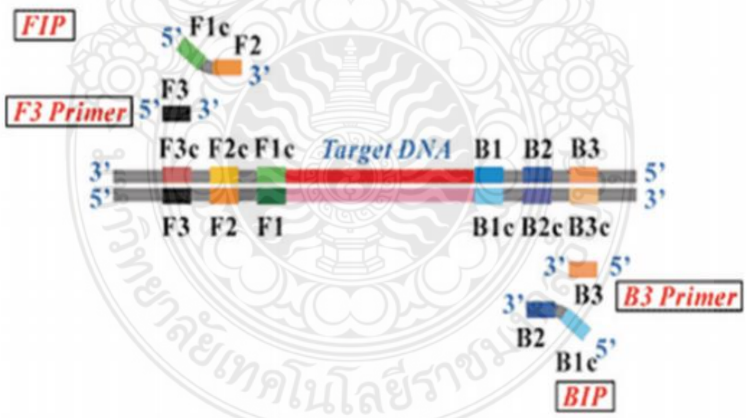
ขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าหนึ่งเป้าหมายพร้อมกันในหลอดทดลองที่ใช้ปฏิกิริยาเดียวกัน และอุณหภูมิที่เหมาะสมแสดงดังภาพที่ 2.5 ดังนั้นข้อดีของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์คือสามารถตรวจหากรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่สนใจมากกว่าหนึ่งเป้าหมายในเวลาเดียวกัน ใช้ปริมาณตัวอย่างตรวจที่น้อยกว่า ลดปริมาณน้ำยา เวลา ค่าใช้จ่ายและลดการการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นได้ ปัจจุบันมีหลายประเทศทั่วโลกให้ความสนใจค้นคว้าพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร [17-21]โดยได้มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการตรวจสอบจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมบ้างแล้ว อาทิเช่น การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR สำหรับตรวจสอบ *Staphylococcus aureus* และ *Yersinia enterocolitica* โดยตรวจบางส่วนของยีน *endonuclease* และ *attachment invasion locus protein* ขนาด 482 และ 359 bp [22] การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจผักและผลไม้ที่ปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. และ *Shigella* [23] การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจ *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* spp. ใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งสิ้น 3 ชั่วโมง หลังจากบ่มตัวอย่างใน enrichment media (TA10) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง [9] การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจสอบ และตรวจหา *Vibrio* spp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Vibrio alginoliticus* และ *Vibrio mimicus* ในปลาและในอาหารทะเล [24] การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจสอบของ 7 serogroups ของ *E. coli* ได้แก่ O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157 จาก อุจจาระวัว 216 ตัวอย่าง [25] และการพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR โดยตรวจแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* 0157:H7, *Campyrobacter jejuni* และ *Listerria monocytogenes* [26] เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านนิติวิทยาศาสตร์ เป็นต้น



ภาพที่ 2.5 แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Multiplex-PCR

2.2.3 เทคนิคแลมป์ (Loop-mediated isothermal amplification; lamp)

เทคนิคแลมป์เป็นเทคนิคในการเพิ่มขยายยีนจะใช้อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส และใช้ปฏิกิริยา strand displacement ในการแยกสายดีเอ็นเอจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวเพื่อการเข้าจับของไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase [24] Primers ของวิธีการแลมป์ที่ใช้มีจำนวน 4 เส้น จะถูกออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายทั้ง 6 ตำแหน่ง ประกอบไปด้วย outer primers (F3 และ B3) มีความยาวประมาณ 17 - 21 base pairs (bp) และ inner primers (FIP = forward inner primer, BIP = backward inner primer) โดยที่ FIP ประกอบ ด้วย F1c กับ F2 และ BIP ประกอบด้วย B1c กับ B2 และความยาวของเส้นไพรเมอร์ inner primer (FIP และ BIP) มีความยาวประมาณ 40 – 50 base pairs ทำให้ใช้ primer ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อ target sequence ถึง 4 ตัว ซึ่งจะประกอบด้วย 6 ตำแหน่งของ target sequence นั้น ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่จำเพาะอย่างยิ่ง โอกาสการเกิดผลบวกลวง (false positive) จึงน้อยมากจนแทบไม่มีเลย เทคนิคนี้ได้ถูกนำไปใช้เพื่อพัฒนาการตรวจไวรัสทั้งในคนและสัตว์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไว (sensitive) จำเพาะ (specific) และเร็ว (Rapid) กว่าเทคนิค PCR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ถึง 10^9 เท่า ในเวลาเพียง 1 ชั่วโมง ปฏิกิริยาของ LAMP จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase (ดังภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 แผนผังแสดงการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP

ที่มา: http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html

กลไกการทำงานของเทคนิคแลมป์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ

(1) Starting structure producing step เพื่อสร้าง stem-loop ทั้งสองข้างของยีนเป้าหมายการทำงานประกอบด้วยขั้นตอนย่อยต่าง ๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1.1 ที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส DNA สายคู่จะอยู่ในสภาวะ dynamic equilibrium คือมีการจับกันแบบสายคู่ (double stranded DNA) และคลายบางส่วนเป็นสายเดี่ยว (single stranded DNA) ตลอดเวลา ทำให้ FIP primer มีโอกาสเข้าไป anneal กับ complementary sequence ของยีนเป้าหมายได้ (ดังรูปที่ 2.7A) จากนั้น DNA polymerase with strand displacement จะเริ่มทำงานเกิด displacing และแยกสายคู่ของดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว

ขั้นตอนที่ 1.2 มีการสร้าง DNA สายใหม่ขึ้น (สายที่ 1) (ดังภาพที่ 2.7B)

ขั้นตอนที่ 1.3 ต่อมา F3 Primer (outer primer) จะเข้าไปจับ (ดังภาพที่ 2.7C)

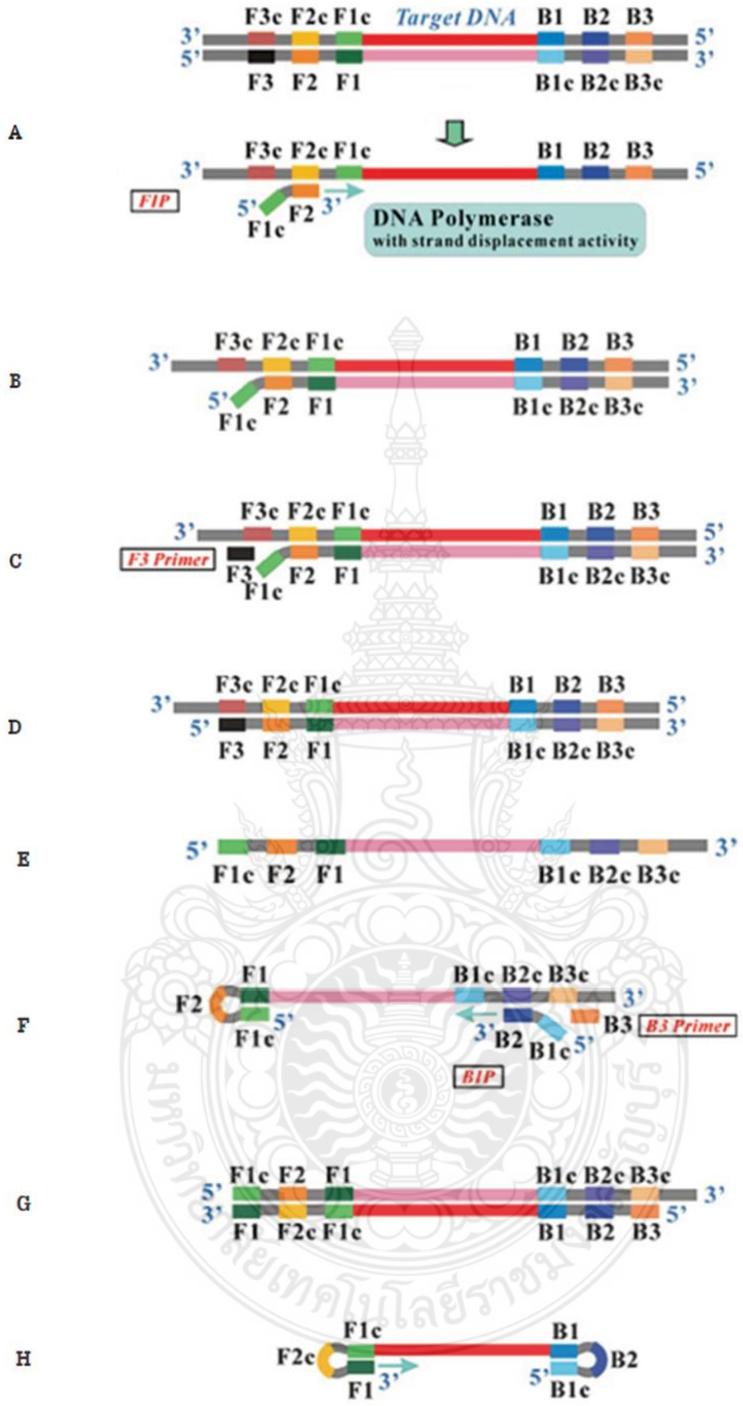
ขั้นตอนที่ 1.4 F3 Primer เริ่มสร้าง DNA สายใหม่โดยอาศัยคุณสมบัติของ DNA polymerase with strand displacement ได้ DNA ลักษณะเหมือน template (ดังภาพที่ 2.7D)

ขั้นตอนที่ 1.5 ขณะเดียวกันสายที่ 1 จะถูกปล่อยออกมาเป็น single strand (ดังภาพที่ 2.7E)

ขั้นตอนที่ 1.6 ทางด้าน 5’ ของสายที่ 1 จะเป็นส่วนของ F1c (ปลายของ FIP) สามารถเข้าจับกับ F1 สร้าง loop ขึ้นทางด้าน Forward จากนั้น BIP primer จะเข้าจับและสร้าง DNA สายที่ 2 ขึ้นมา (ดังภาพที่ 2.7F)

ขั้นตอนที่ 1.7 ทำนองเดียวกัน B3 Primer จะเข้าไปจับและเริ่มสร้าง DNA สายใหม่ (ดังภาพที่ 2.7G)

ขั้นตอนที่ 1.8 ขณะเดียวกันจะปลดปล่อยสายที่ 2 ออกมาเป็น single strand ขณะนี้ที่ปลายด้าน forward จะเป็น F1 ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ F1c ทำนองเดียวกันด้าน backward จะเป็น B1c ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ B1 ทำให้ได้ stem loop ที่มีรูปคล้าย dumbbell shape เพื่อใช้ในขั้นตอน LAMP cycling (ดังภาพที่ 2.7H)

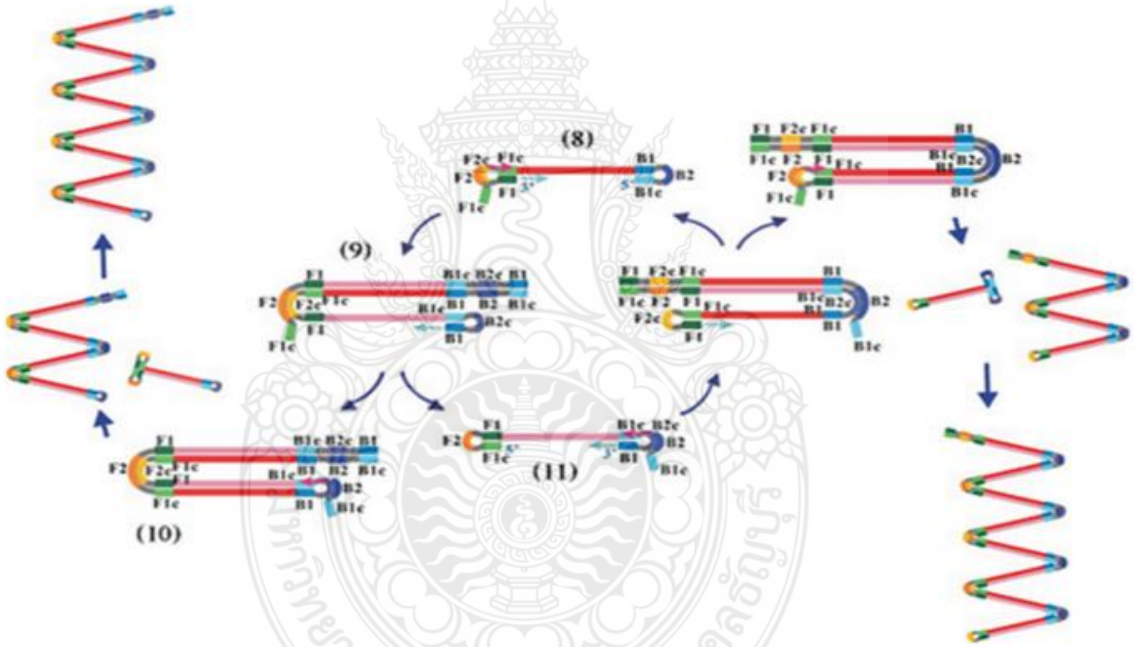


ภาพที่ 2.7 หลักการของเทคนิค LAMP: โครงสร้างเริ่มต้นขั้นตอนการผลิต (A-H)

ที่มา: http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html

(2) Cycle amplification step เป็นการเพิ่มขยายยีนจาก stem-loop โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase with strand displacement activity แสดงการทำงานดังภาพที่ 2.8

ขั้นตอนนี้สามารถเกิด cycle amplification step (8-11) ด้านปลายของ loop forward ก่อน คือสามารถมี self-primed strand displacement DNA synthesis สร้าง DNA จาก F1 ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง B1c ขณะ เดียวกัน FIP primer ก็สามารถ hybridize กับ F2c ที่ loop forward (9) และสร้าง DNA สายใหม่ ได้เป็น 3 copies (10) และมี stem loop แบบ dumbbell (11) ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ (11) การทำงานจะต่อเนื่องกันตลอดเวลา วนเวียนกันอยู่ ทำให้ได้ target DNA ที่ยาวขึ้นหลายๆ copies ทำให้อัตราการสร้าง DNA ยิ่งมากขึ้น พบว่าสามารถสร้างได้ 10^{9}-10^{10} copies ภายในเวลา 15-60 นาที



ภาพที่ 2.8 หลักการของเทคนิค LAMP: ขั้นตอนการขยายวงจร
ที่มา: http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html

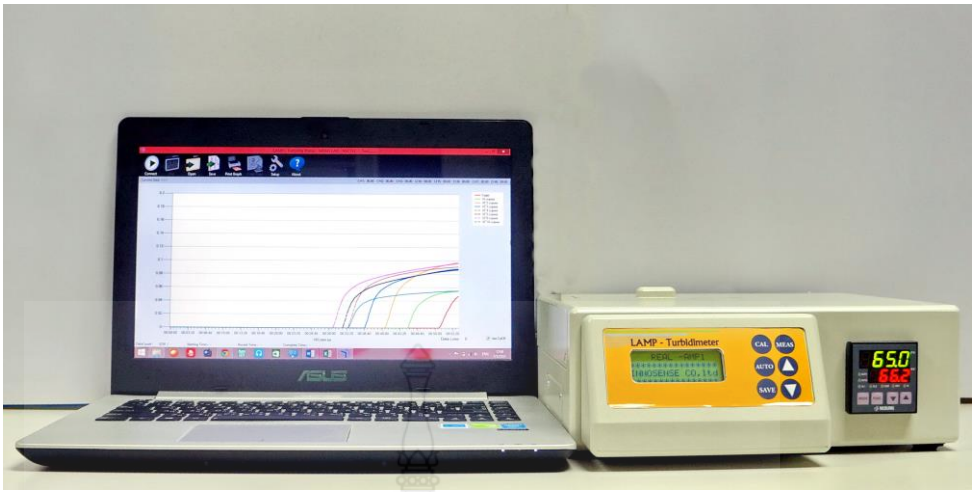
การตรวจสอบยีนที่เพิ่มขยายได้จากเทคนิคแลมป์สามารถทำได้หลายวิธีเช่น เจลอิเลคโตรโฟลิซิส นอกจากนี้สามารถดูความขุ่นที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากการเพิ่มขยายยีนในเทคนิค LAMP ทำให้มีสาร pyrophosphate เป็น by product ที่สารดังกล่าวสามารถจับกับ magnesium กลายเป็น magnesium

pyrophosphate [27] ซึ่งจะตกตะกอนเป็นสีขาวสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณการเพิ่มขยายยีนนั้นๆ ดังสมการ

$$(DNA)_{n-1} + dNTPs \longrightarrow (DNA)_n + P_2O_7^{-4} \quad (1)$$

$$P_2O_7^{-4} + 2Mg^{+2} \longrightarrow Mg_2P_2O_7 \quad (2)$$

การดูความขุ่นที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าในกรณีที่มีการติดเชื้อในปริมาณที่ต่ำหรือความขุ่นน้อยจะไม่สามารถแยกได้และนอกจากนี้ไม่สามารถตรวจวัดแบบเชิงปริมาณได้จึงมีความจำเป็นต้องใช้การอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย โดยเครื่องวัดความขุ่นเป็นการผนวกหลักการของ heating block และ spectrophotometer ไว้ด้วยกัน [28] แล้วต่อเข้ากับเครื่องรายงานผลเป็นจอ LCD บอกผลการติดเชื้อว่าบวกหรือลบแสดงดังภาพที่ 2.9 การทำงานของเครื่องเริ่มจากส่วนควบคุมอุณหภูมิที่สามารถควบคุมอุณหภูมิของสารละลายได้ โดยในสารละลายนี้จะมีตัวอย่าง DNA ของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบบรรจุอยู่ในหลอดทดลองโปร่งแสง (PCR tube) ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ควบคุมให้อยู่ที่ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที เมื่อสารละลายอยู่ในอุณหภูมิที่ต้องการแล้ว ส่วนต่อไปก็คือส่วนตรวจวัดความขุ่นของสารละลายก็จะทำงานโดยการยิงแสงสีแดงจากหลอด light emitting diode (LED) [29] ซึ่งเป็นแสงหาซื้อง่ายและมีราคาถูก แสงจะถูกยิงผ่านสารละลายมาตกกระทบตัวรับแสงโดยปริมาณแสงที่ตกกระทบนี้จะขึ้นอยู่กับความขุ่นของสารละลาย ถ้าสารละลายมีความขุ่นเกิดขึ้นแสดงว่าตัวอย่างมี DNA ของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ ส่วนวัดแสงและประมวลผล (Microcontroller) จะทำงาน 2 โหมด คือ โหมด Calibration คือโหมดที่จะต้องทำการวัดค่าเมื่อสารละลายมีค่าความเข้มมากที่สุดและเมื่อสารละลายมีค่าความเข้มน้อยที่สุดเก็บไว้ เพื่อทำการคำนวณเทียบกับค่าที่วัดได้ ส่วนอีกโหมดคือ โหมด Normal เมื่อได้ข้อมูลดิจิตอลของแรงดันที่ตกคร่อมตัวรับแสงหรือหมายถึงค่าความเข้มของสารละลาย ข้อมูลดังกล่าวจะถูกประมวลผลด้วย Microcontroller เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแสงที่วัดได้เมื่อเทียบกับค่าของสารละลายที่เข้มที่สุดและแสดงผลบนหน้าจอ LCD



ภาพที่ 2.9 แสดงการอ่านผลผลิตภัณฑ์แลมป์ด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย
ที่มา: Arunrut et al. [29]

เพื่อเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจและลดระยะเวลาอีกทั้งไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงในการทดสอบจึงมีการพัฒนาเทคนิคแลมป์ในการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร เทคนิคแลมป์เป็นเทคนิคในการเพิ่มขยายยีนที่อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียวโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอภายใน 1 ชั่วโมง [24] โดยเทคนิคแลมป์ถูกนำมาใช้ตรวจแบคทีเรียก่อโรคในอาหารครั้งแรกในการตรวจยีน *Shiga toxin 2 subunit A* ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 [22] เนื่องด้วยเทคนิคแลมป์เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคพีซีอาร์จะมีความไวและความจำเพาะมากกว่าจึงมีการนำเทคนิคแลมป์ไปใช้ในการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหารเป็นจำนวนมาก [30-32] อย่างไรก็ตามที่ผ่านมาการพัฒนาเทคนิคแลมป์ในการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหารจะตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแต่วิธีการดังกล่าวใช้เวลานานและต้องใช้เอธิเดียมโบรไมด์ที่เป็นสารก่อมะเร็งร่วมด้วยอีกทั้งไม่สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้ด้วย ต่อมามีการพัฒนาการอ่านความขุ่นของผลิตภัณฑ์แลมป์ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย การพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นในการตรวจเชื้อ *Shigella* [33], *verotoxigenic Escherichia coli* O157 and O26 [30] และ *Campylobacter* [33] โดยเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจวัดแบบเชิงปริมาณได้ด้วย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) ตรวจเชื้อแบบพร้อมกันในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลอง

3.1.1.1 แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษา 3 สายพันธุ์ คือ *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* และ *S. aureus* โดย *Salmonella* spp. จะเลือกสายพันธุ์ *S.* Typhimurium ATTC 13311 ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus cereus* จะเลือกสายพันธุ์ *B. cereus* BCC 6386 และ *S. aureus* จะเลือกสายพันธุ์ TBRC4930 เป็นสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบ

3.1.1.2 เลี้ยงแบคทีเรียมาตรฐานแยกแต่ละสายพันธุ์ที่ประกอบด้วย *S.* Typhimurium ATTC 13311 และ *B. cereus* BCC 6386 และ *S. aureus* TBRC 4930 ในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Dilution plate count ให้ได้เป็น colony forming unit (CFU/mL) แล้วเจือจางทีละ 10 เท่า (10-fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10 CFU/mL ตามลำดับ จากนั้นนำทุกความเข้มข้นของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen Biotech, Taiwan) เริ่มด้วยการปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Lysis buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์มแล้วเขย่าด้วยเครื่อง Vortex แล้วไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาทีแล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนลงบน FATG Columns นำไปปั่นอีกรอบที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเออีก 2 รอบ แล้วทำการละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ทุกความเข้มข้นและทุกสายพันธุ์ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความไวของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ต่อไป

3.1.2 การออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

3.1.2.1 การออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ออกแบบจากยีนเป้าหมายที่มีคุณสมบัติในการก่อโรค (virulence gene) ของแต่ละเชื้อและมีรายงานการวิจัยมาแล้วดังนี้

(1) *Salmonella* spp. มียีนเป้าหมายคือ 62181533 gene [34]

(2) *S. aureus* มียีนเป้าหมายคือ *sensory box histidine kinase (VicK)* gene [35]

(3) *B. cereus* มียีนเป้าหมายคือ *hemolysin BL lytic component L1* gene [36]

3.1.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ทำการทดสอบปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของกระบวนการ Denature ตั้งแต่ 90-94 องศาเซลเซียส และ Anealing ตั้งแต่ 50-60 องศาเซลเซียส และ Extention ตั้งแต่ 68-72 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการเป็นเวลาตั้งแต่ 20-60 วินาที เพื่อศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ต่อจากนั้นจะทำการทดสอบสภาวะต่างๆ เช่น ปริมาณไพร์เมอร์ ปริมาณเอ็นไซม์ โดยภายใน 50 ไมโครลิตร ของปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่ประกอบด้วย primers forward-Sal, primer reward-Sal, primer forward-hb1d, primer reward-hb1d, primer forward-Sa และ primer reward-Sa อย่างละ 0.2-0.5 uM, dNTPs 180-250 uM, $MgCl_2$ 1.2-1.8 mM, 1x PCR buffer และ *Taq* DNA polymerase 0.5-1 U โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดมาจากเซลล์แบคทีเรียที่จากการทดลองข้างต้น แล้วนำไปทดสอบโดยใช้เครื่อง Thermal cycler และอ่านผลผลิตด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยสังเกตจากขนาด ดีเอ็นเอ เป้าหมายของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ปรากฏบนแผ่น Agarose gel ภายใต้รังสี UV

3.1.3 วิธีการตรวจสอบแบคทีเรียด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (conventional culture based method)

3.1.3.1 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐานจะปรับใช้ตามหลักการของ ISO6579:2002(E) [37] โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม เติมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ buffer peptone water (BPW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วตีบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง stomacher ใช้เวลา 2 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

(2) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin broth (MKTTn) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis broth (RV) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

(3) เขี่ยเชื้อ 1 loop จากทั้ง MKTTn broth และ RV broth ลงบนอาหาร Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) และอาหาร Hektoen enteric agar (HE) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

(4) ตรวจสอบโคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* spp. แล้วถ่ายเชื้อลงใน Triple sugar iron agar (TSI) และ Lysine indole motile (LIM) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(5) นำตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบการใช้น้ำตาล TSI และ LIM ไปยืนยันผลการทดสอบด้วยเทคนิค API system โดยใช้ชุดตรวจ API 20 E kits

3.1.3.2 การตรวจสอบแบคทีเรีย *B. cereus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐานจะปรับใช้ตามหลักการของ ISO7932:2004(E) [38] โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม เติมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ dilution buffer (DF) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วตีบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง stomacher ใช้เวลา 2 นาที

(2) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol egg yolk polymyxin agar (MYPEY) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

(3) ตรวจสอบโคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของเชื้อ *B. cereus* แล้วเขี่ยเชื้อลงในอาหาร nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

(4) เขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล presumptive *B. cereus* จะมี clear zone รอบ ๆ ซึ่งเกิดจากการย่อยเม็ดเลือด

(5) นำตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นยืนยันผลการทดสอบด้วยเทคนิค API system โดยใช้ชุดตรวจ API 50 CH kits

3.1.3.3 การตรวจสอบแบคทีเรีย *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อใช้วิธี spread plate (ดัดแปลงจาก วีรานุช, 2552) [39] โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม เติมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ buffer peptone water (BPW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วตีบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง stomacher ใช้เวลา 2 นาที

(2) ทำการเจือจางตัวอย่างอาหารที่ระดับ 1:10 1:100 และ 1:1000 แล้วดูดแต่ละระดับที่ทำการเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Baird Parker agar (BP) และ mannitol

salt egg yolk agar (MSEY) ด้วยเทคนิค spread plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(3) ตรวจสอบโคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของเชื้อ *S. aureus* โดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงแล้วนำไปทดสอบ coagulase test

(4) นำตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบ ไปยืนยันผลการทดสอบด้วยเทคนิค API system โดยใช้ชุดตรวจ API Staph kits

3.1.4. การทดสอบความไวของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

นำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มาผสมกัน แล้วปรับความเข้มข้นแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผสมกันแล้วเป็น 10^{10}, 10^{9}, 10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3}, 10^{2} และ 10 CFU/mL ใช้ไพร์เมอร์และสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความไวในการตรวจวัดเชื้อแบบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ นอกจากนี้แล้วนำส่วนผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ความเข้มเข้นต่างๆ (10^{10}, 10^{9}, 10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3}, 10^{2} และ 10 CFU/mL) มาผสมลงในอาหาร (หมูยอ) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสี UV และผ่านการทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐานดังที่กล่าวในหัวข้อ 3.1.3 จากนั้นทำการทดสอบด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อหาความไวในการตรวจวัดเชื้อโดยการอ่านผลด้วย gel electrophoresis

3.1.5 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ทำการทดสอบความจำเพาะทั้งแบบ inclusivity และ exclusivity ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยแบบ inclusivity ใช้ DNA ต้นแบบที่เป็นเชื้อ *Salmonella* spp. *Bacillus cereus* และ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆที่ก่อโรค ส่วน exclusivity ใช้ DNA template ที่เป็นเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ที่พบการปนเปื้อนในอาหาร

3.2 การพัฒนาเทคนิคแลมป์ (LAMP) ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาคือ *Salmonella* spp. จะเลือกสายพันธุ์ *S. typhimurium* ATTC 13311 เป็นสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบ

3.2.1.2 เลี้ยงแบคทีเรียมาตรฐานในอาหาร TSB โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี dilution plate count ให้ได้เป็น colony forming unit (CFU/mL) แล้วเจือจางทีละ 10 เท่า (10-

fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10 CFU/mL ตามลำดับ จากนั้นนำทุกความเข้มข้นของแบคทีเรียมาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen Biotech, Taiwan) เริ่มด้วยการปั่นตกเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Lysis buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายยคลอโรฟอร์มแล้วเขย่าด้วยเครื่อง Vortex แล้วไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาทีแล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนลงบน FATG Columns นำไปปั่นอีกรอบที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเออีก 2 รอบ แล้วทำการละลายดีเอ็นด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ทุกความเข้มข้นและทุกสายพันธุ์ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความไวของเทคนิคแลมป์ต่อไป

3.2.2 การออกแบบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคแลมป์

เริ่มจากการออกแบบ primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Salmonella* spp ที่ก่อโรคในอาหารจากส่วนของ 62181533 of protein-coding sequences gene (GenBank accession no.CP016581.1) โดยใช้โปรแกรม Explorer version 3 (https://primerexplorer.jp/lamp 3.0.0 / index.html) ต่อจากนั้นทำการทดสอบปฏิกิริยา LAMP ที่ 60 63 และ 65 °C เพื่อดูว่าอุณหภูมิใดเหมาะสมที่สุดหรือเวลาที่ใช้เป็นต้นต่อจากนั้นจะทำการทดสอบสภาวะต่างๆเช่น ปริมาณไพรเมอร์ ปริมาณเอ็นไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมป์ โดยประกอบด้วย inner primers FIP และ BIP อย่างละ 2 µM, outer primers F3 และ B3 อย่างละ 0.2 µM, dNTPs mix 1.4 mM, betaine 0.6-0.8 M, $MgSO_4$, 6 mM, *Bst* DNA polymerase 8-10 unit, 1x of the supplied buffer โดยใช้ DNA ที่สกัดจากแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ATTC 13311 ปริมาณ 100 ng เป็นต้นแบบ

3.2.3 การทดสอบความจำเพาะ

ทำการทดสอบความจำเพาะทั้งแบบ inclusivity และ exclusivity ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นเปรียบเทียบผลกับเทคนิคพีซีอาร์ โดยแบบ inclusivity ใช้ DNA template ที่เป็นเชื้อ *Salmonella* spp. สายพันธุ์ต่างๆที่ก่อโรค ส่วน exclusivity ใช้ DNA template ที่เป็นเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp. หรือสายพันธุ์ที่ก่อโรค

3.2.4 การทดสอบความไวในการตรวจ

ทำการทดสอบความไวในการตรวจผลผลิต LAMP ด้วยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย เปรียบเทียบกับการ run gel electrophoresis และเปรียบเทียบความไวในการตรวจกับเทคนิค PCR

3.2.5 การตรวจวัดแบบเชิงปริมาณ

ทำการสร้างกราฟสมการความขุ่นมาตรฐาน จากการวัดผลผลิต LAMP ด้วยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายโดยนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ATTC 13311 ที่เตรียมไว้เป็น 10-fold dilution มาทดสอบแล้วอ่านผลกราฟที่เกิดขึ้นจากความขุ่นและบันทึกเวลาที่วัดได้ ณ เวลาจริง แล้วนำค่าที่ได้ทั้งสองไปสร้างเป็นกราฟ โดยแกน X เป็นความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น (CFU/mL) แกน Y เป็นเวลาที่วัดได้ (นาที) แล้วสร้างสมการเส้นตรงมาตรฐานเพื่อนำไปใช้ตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียแบบเชิงปริมาณ

3.2.6 การทดสอบเปรียบเทียบความไวในตัวอย่างอาหาร

นำแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ATTC 13311 ที่ความเข้มเข้นต่างๆ (10^{10}, 10^{9}, 10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3}, 10^{2} และ 10 CFU/mL) มาผสมลงในเนื้อไก่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสี UV และผ่านการทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐานดังที่กล่าวในหัวข้อ 3.1.3.1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่เก็บไว้ทุกช่วงเวลาไปสกัดดีเอ็นเอแล้วทดสอบด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายเปรียบเทียบกับการทำ gel electrophoresis และเปรียบเทียบความไวในการตรวจ

3.2.7 การตรวจในตัวอย่างอาหาร

นำเนื้อไก่สดจากตลาดสดและตลาดนัดในเขตพื้นที่จังหวัดปทุมธานีและกรุงเทพมหานคร จำนวน 120 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม 2560 แล้วทำการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่ด้วยวิธีแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นเปรียบเทียบผลกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐาน

3.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

ทำการวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) ตรวจเชื้อแบบพร้อมกันในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

4.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR)

ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา m-PCR โดยในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ใช้ยีนเป้าหมายเป็น 62181533 แล้วทำการออกแบบด้วยโปรแกรม Primer premier 5.0 software (Premier Biosoft International) เมื่อได้ข้อมูลไพรเมอร์แล้วทำการทดสอบเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI, nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) และในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *B. cereus* จะใช้ไพรเมอร์ที่มีการรายงานการทดสอบแล้วพบว่ามีความจำเพาะสูงมาใช้ในการตรวจร่วมสำหรับปฏิกิริยา m-PCR ที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรีย *S. aureus* ใช้ยีนเป้าหมายคือ *sensory box histidine kinase (VicK)* gene [35] และแบคทีเรีย *B. cereus* ใช้ยีนเป้าหมายคือ *hemolysin BL lytic component L1* gene (*hb1d*) [36] โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.1.2 การหาองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

จากการศึกษาพบว่าในปฏิกิริยา m-PCR หนึ่งๆ ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต้องมีองค์ประกอบต่าง ๆ ในสัดส่วนดังนี้

ก. ไพรเมอร์อย่างละ 0.14 ไมโครโมล่าร์

ข. สาร dNTPs 2 มิลลิโมล่าร์

ค. สารละลายแมกนีเซียมคลอไร 6 มิลลิโมล่าร์

ง. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 หน่วย

จ. บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 2 เท่า

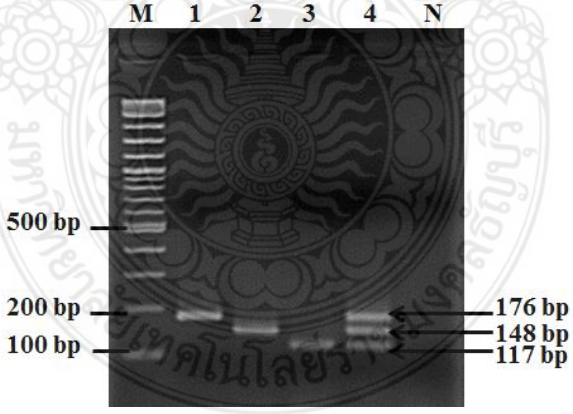
ฉ. น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปรับปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตร

การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยา m-PCR แต่ละขั้นตอนโดยใช้ DNA ที่สกัดจากแบคทีเรียแต่ละชนิดความเข้มข้น 100 ng เป็นต้นแบบ ผลการทดสอบพบว่าอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยา m-PCR คือ ขั้นตอน denaturation

ใช้อุณหภูมิ 94 ˚C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน anualing ใช้อุณหภูมิ 60 ˚C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension 72 ˚C เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำปฏิกิริยา m-PCR ทั้งหมด 30 รอบ ในการอ่านผลด้วยเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาขึ้นจะอ่านผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยขนาดแบนพีซีอาร์ของ *Salmonella* ขนาด 117 bp, *B. cereus* ขนาด 148 bp และ *S. aureus* ขนาด 176 bp แสดงผลรายละเอียดดังภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา m-PCR

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ความยาว (bp)	ยีนเป้าหมาย (target gene)
F-xcd	CCACCCGGTCGCTGAAAAAC	20	xcd
R-xcd	TGATACTGTGTCTGCGTCCCC	21	
mp3L1R1F	AGTTATTGCAGCTATTGGAGG	21	hb1d
mp3L1R1R	GTCCATATGCTTAGATGCTGTGA	23	
F-Sa5	AAAGGTGTAGGTTGGAAAGTAGAAG	25	Vick
R-Sa5	GTTACAGGCATTTTGTCTTTAG	22	



ภาพที่ 4.1 แสดงการอ่านผลเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในการทำปฏิกิริยา Single PCR และ m-PCR (lane M คือ DNA marker; lane 1 คือ 176 bp for *S. aureus*; lane 2 คือ 148 bp for *B. cereus*; lane 3 คือ 117 bp for *Salmonella* spp.; lane 4 คือ m-PCR; lane N คือ ตัวควบคุมลบ)

4.1.3 การทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค m-PCR

ในการทดสอบความจำเพาะสำหรับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) ได้ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียทั้งหมด 66 สายพันธุ์ โดยประกอบด้วยดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. จำนวน 27 สายพันธุ์ ดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวน 4 สายพันธุ์ และดีเอ็นเอ *B. cereus* จำนวน 2 สายพันธุ์ และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ก่อโรคและปนเปื้อนในอาหารรวม 33 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยเทคนิค m-PCR พบว่าไพรเมอร์สำหรับการตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp. (F-xcd/R-xcd) ให้ผลบวกจำนวน 27 สายพันธุ์ ไพรเมอร์สำหรับตรวจแบคทีเรีย *S. aureus* (F-Sa5/R-Sa5) ให้ผลบวกจำนวน 4 สายพันธุ์ และ *B. cereus* (mp3L1R1F / mp3L1R1R) ให้ผลบวกจำนวน 2 สายพันธุ์ โดยไม่ให้ผลบวกเมื่อใช้ดีเอ็นที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบความจำเพาะในงานวิจัยของ Wehrle *et al*. [36] ที่ทำการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ด้วยยีนเป้าหมาย *hb1d* ในการตรวจแบคทีเรีย *B. cereus* พบว่าให้ผลบวกเฉพาะในแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. cereus* และงานวิจัยของ Yu *et al.* [35] ที่พัฒนาการตรวจแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยยีนเป้าหมาย *VicK* พบว่าให้ผลบวกเฉพาะในแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. aureus* และงานวิจัยของ Kong *et al.* [34] ในการตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยยีนเป้าหมาย 62181533 ในการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยให้ผลการตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp. มีความจำเพาะสูงถึง 100% แสดงให้เห็นว่าเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูงในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella spp., S. aureus* และ *B. cereus* ที่ก่อโรคในอาหาร

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Multiplex PCR detection		
		Salmonella	*S. aureus*	*Bacillus*
Salmonella enterica strains (n= 27)				
S. Typhimurium	ATCC 13311	+	-	-
S. Typhimurium	RMUTTS-153	+	-	-
S. Wadar	RMUTTS- 4	+	-	-
S. Saintpaul	RMUTTS-33	+	-	-
S. Welterreden	RMUTTS-71	+	-	-

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Multiplex PCR detection		
		Salmonella	*S. aureus*	*Bacillus*
S. Rissen	RMUTTS-16	+	-	-
S. Ohio	RMUTTS-139	+	-	-
S. Stanley	RMUTTS-17	+	-	-
S. Antum	RMUTTS-35	+	-	-
S. Brunei	RMUTTS-141	+	-	-
S. Corvallis	RMUTTS-2	+	-	-
S. ParatyphiB	RMUTTS-155	+	-	-
S. Mbandaka	DMST 17377	+	-	-
S. Mbandaka	RMUTTS-47	+	-	-
S. Hadar	DMST 10634	+	-	-
S. Hadar	RMUTTS-11	+	-	-
S. Hritlingfoss	RMUTTS-75	+	-	-
S. Agona	RMUTTS-60	+	-	-
S. Orion	RMUTTS-144	+	-	-
S. Livingstone	RMUTTS-67	+	-	-
S. Bardo	RMUTTS-56	+	-	-
S. Choleraesuis	DMST 5580	+	-	-
S. Dublin	DMST 30404	+	-	-
S. Enteritidis	ATCC 13076	+	-	-
S. Infantis	DMST 26426	+	-	-
S. Senftenberg	DMST 17013	+	-	-
S. Virchow	DMST 17013	+	-	-
Bacillus cereus (n=2)				
B. cereus	RMUTT-BC2	-	-	+

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Multiplex PCR detection		
		Salmonella	*S. aureus*	*Bacillus*
B. cereus	BCC 6386	-	-	+
Staphylococcus aureus				
(n=4)				
S. aureus	TBRC 4930	-	+	-
S. aureus	RA 024122	-	+	-
S. aureus	RA 024123	-	+	-
S. aureus	RA 024121	-	+	-
Other strains (n=33)				
V. parahaemolyticus	ATCC 17802	-	-	-
V. mimicus	DMST 22089	-	-	-
V. vulnificus	DMST 5258	-	-	-
V. fluvialis	DMST 24049	-	-	-
V. fluvialis	DMST 22085	-	-	-
E. coli 0157:H7	ATCC 35150	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120116-4	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120118-5	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120113-4	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120113-4	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120201-4	-	-	-
Enterobacter aerogenes	DMST 1333	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110909-8	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110909-4	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110825-4	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110909-2	-	-	-

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR (ต่อ)

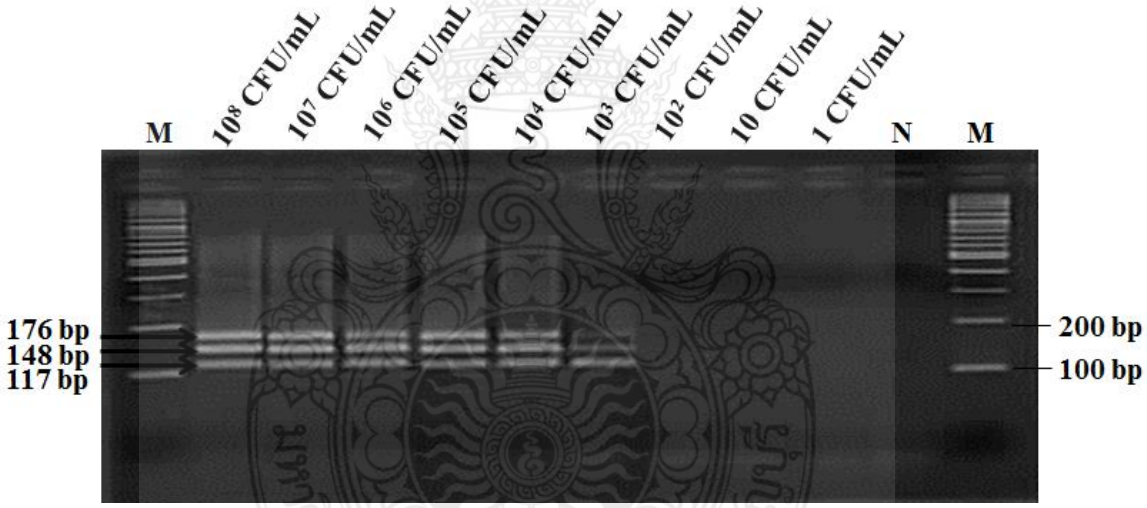
สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Multiplex PCR detection		
		Salmonella	*S. aureus*	*Bacillus*
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110512-4.2	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110124-6	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110205-8	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-120112-1	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-120201-7	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110205-4	-	-	-
Listeria monocytogenes	ATCC 700402	-	-	-
Listeria monocytogenes	RMUTT-Lis	-	-	-
Listeria ivanovii	ATCC 700402	-	-	-
Listeria innocua	DMST 9011	-	-	-
Listeria welshimeri	DMST 20559	-	-	-
Yersinia enterocolitica	RMUTT-Yer	-	-	-
Cronobacter sakazaki	RMUTT-Cro	-	-	-
Lactococcus lactis	RMUTT-Lac	-	-	-
Pseudomonas sp.	RMUTT-Pse120111-5	-	-	-
Pseudomonas sp.	RMUTT-Pse100913-4	-	-	-
Pseudomonas sp.	RMUTT-Pse110427-1	-	-	-

+ หมายถึง การทดสอบด้วยเทคนิค m-PCR ให้ผลบวก (*Salmonella* spp. ขนาด 117 bp, *B. cereus* ขนาด 148 bp และ *S. aureus* ขนาด 176 bp)

- หมายถึง การทดสอบด้วยเทคนิค m-PCR ให้ผลลบ

4.1.4 การทดสอบความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR

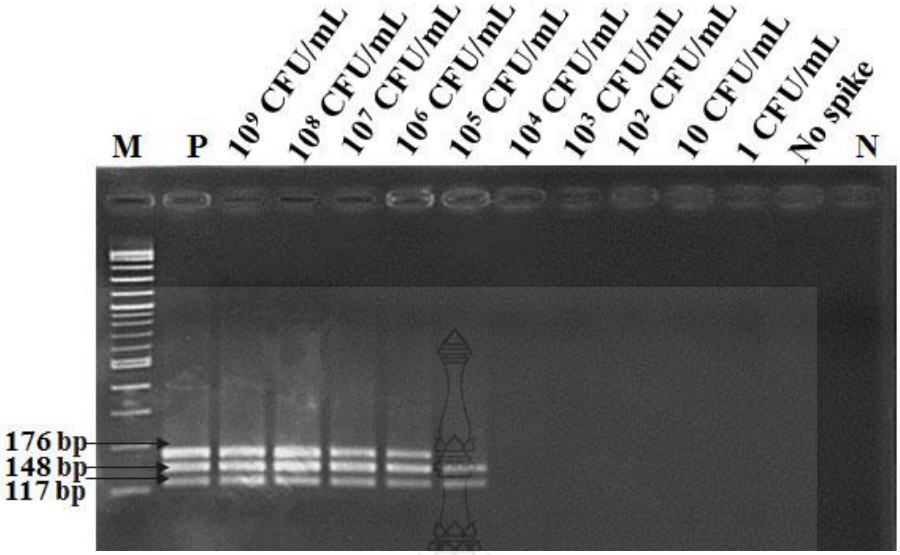
การทดลองเพื่อทดสอบความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR จะใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่เลี้ยงและนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี plate count โดยเจือจางแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ตั้งแต่ 1 ถึง 10^8 CFU/mL แล้วนำมาตรวจโดยเทคนิค m-PCR จากนั้นนำผลผลิต m-PCR ที่ได้ตรวจด้วยวิธีการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า ผลการทดสอบมีความไวในการตรวจแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ที่จำนวน 10^3 CFU/mL ดังภาพที่ 4.2 ในการทดสอบความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR ให้ผลเทียบเท่างานวิจัยของ Yu *et al.* [35] ที่พัฒนาเทคนิค m-PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *S. aureus*, *Salmonella* spp. และ *L. monocytogenes* พบว่ามีความไวในการตรวจดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ที่จำนวน 10^3 CFU/mL แสดงให้เห็นว่าเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจสูง



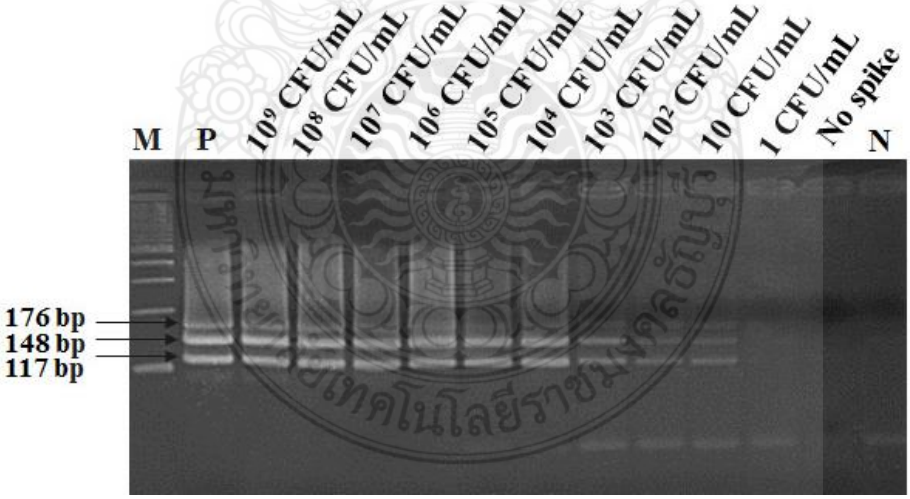
ภาพที่ 4.2 แสดงผลการตรวจความไวด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella, S. aureus* และ *B. cereus* (*Salmonella* ขนาด 117 bp *B. cereus* ขนาด 148 bp และ *S. aureus* ขนาด 176 bp)

ผลการทดลองเพื่อทดสอบความไวในการตรวจด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) ในการตรวจสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างอาหาร โดยนำส่วนผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มเข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 1-10^9 CFU/mL มาผสมลงในหมูยอที่ผ่านการฆ่า

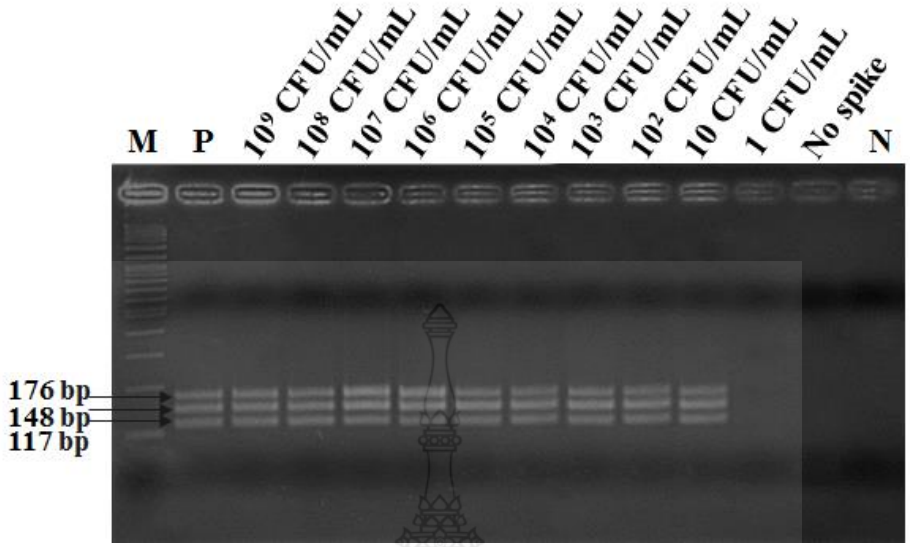
เชื้อด้วยรังสี UV แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง แล้วนำส่วนสารผสมอาหารที่เก็บไว้แต่ละช่วงเวลาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วทดสอบด้วยเทคนิค m-PCR ผลการทดสอบพบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการเติมแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ความเข้มเข้นต่าง ๆ โดยไม่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C สามารถตรวจแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ที่จำนวน 10^5 CFU/mL ดังภาพที่ 4.3 ในขณะที่เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนสารผสมอาหารที่บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถตรวจแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ที่จำนวน 10 CFU/mL แสดงดังภาพที่ 4.4 และภาพที่ 4.5 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจการติดเชื้อในอาหารเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถึง 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ผลการทดสอบความไวด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างอาหาร ให้ผลเทียบเท่ากับงานวิจัยของ Yang *et al.* [40] ในการตรวจการปนเปื้อนตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากนมของแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีความไวในการตรวจที่ 10 CFU/mL เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Wehrle *et al.* [36] ที่พัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์ในการตรวจแบคทีเรีย *B. cereus* ด้วยยีนเป้าหมาย 3 ชนิด ที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยพบว่ามีความไวในการตรวจที่ 10 CFU/mL เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาในการดำเนินการสั้นกว่าเนื่องจากใช้เวลาในการบ่มเพียง 6 ชั่วโมง ให้ผลการตรวจแบคทีเรียได้ที่ 10 CFU/mL ดังนั้นเทคนิค m-PCR เหมาะสมที่จะนำไปตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* เพื่อการป้องกันการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร ในการลดความเสียหายทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสุขภาพอนามัยที่อาจจะเกิดขึ้นจากการระบาดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักข้างต้นนี้ เนื่องจากเทคนิคมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีทั้งมีความไวในการตรวจสูงและความจำเพาะสูงและใช้ระยะเวลาในการดำเนินการสั้น



ภาพที่ 4.3 แสดงความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจการติดเชื้อในอาหารโดยไม่มีการบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C



ภาพที่ 4.4 แสดงความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจการติดเชื้อในอาหารเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.5 แสดงความไวในการตรวจด้วยเทคนิค m-PCR ในการตรวจการติดเชื้อในอาหารเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.2 การพัฒนาเทคนิคแลมป์ (LAMP) ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร

4.2.1 การออกแบบไพรเมอร์แลมป์สำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp.

ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาแลมป์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella spp.* ที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสของแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ใช้ยีนเป้าหมายคือ 62181533 of protein-coding sequences (xcd) โดยใช้โปรแกรมการออกแบบไพรเมอร์ Primer explorer version 4 (https://primerexplorer.jp/ /elamp4.0.0/) แล้วนำข้อมูลไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบได้ทดสอบความจำเพาะในฐานข้อมูล Pubmed NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าชุดไพรเมอร์แลมป์ที่ทำการออกแบบมีความจำเพาะสูงในการตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp. เนื่องจากผลการทดสอบไม่มีส่วนลำดับเบสของไพรเมอร์แลมป์ให้ผลตรงกับลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์แลมป์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp.

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ความยาว (bp)
F3-salmo	CTGCCAGATTTGCTTCTCCT	20
B3-salmo	TCTGGAAGTGCCACCGATA	19
FIP-salmo	GCCCAGTTACGCTTGCTTCAGGTTTTA	
	TTCAGCCTTCCACACAACG	46
BIP-salmo	CACTCCGCATGCCAGTATCTCCTTTTC	
	AATCCGAAGCGGTTGATGA	46
LF-salmo	CCGTGGACGAGGAAGGTTGTC	21
LB-salmo	TCAACTGATCCATATAGTTCATC	23

4.2.2 การหาองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแลมป์

จากการทดสอบปฏิกิริยาแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

ก. อินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP และ BIP) อย่างละ 2 ไมโครโมล่าร์

ข. เอาท์เทอร์ไพรเมอร์ (F3 และ B3) อย่างละ 0.2 ไมโครโมล่าร์

ค. ลูปไพรเมอร์ (LF และ LB) อย่างละ 2 ไมโครโมล่าร์

ง. สาร dNTPs 1.6 มิลลิโมล่าร์

จ. สารเบตาอีน 0.2 โมล่าร์

ฉ. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟส 6 มิลลิโมล่าร์

ช. เอ็นไซม์ *Bst* DNA polymerase 8 หน่วย

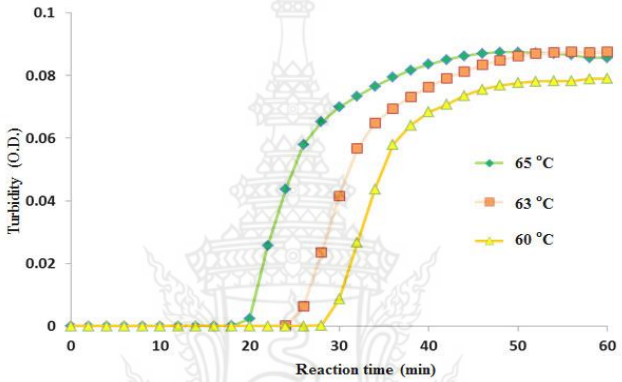
ซ. บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 1 เท่า

ฌ. สารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบ 2 ul

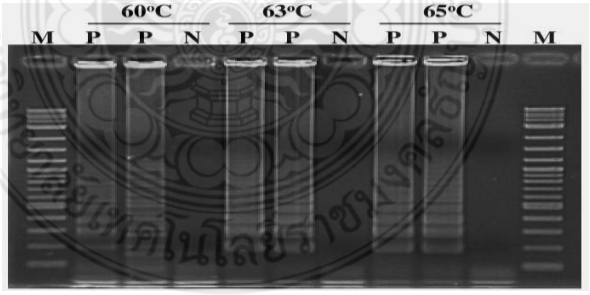
ญ. น้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรรวมให้ได้ 25 ไมโครลิตร

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 60-65 ^{o}C ใช้เวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ DNA ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ความเข้มข้น 100 ng เป็นต้นแบบในการศึกษา พบว่าเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ 65 ^{o}C เนื่องจากให้ผลกราฟความขุ่นเกิดขึ้นเร็วสุดโดยใช้เวลาเพียง 18 นาที ในขณะที่อุณหภูมิ 63 และ 60 ^{o}C เกิดผลกราฟที่เวลา 24 และ 28 นาที ตามลำดับแสดงดังภาพที่ 4.6 โดยผลการทดสอบให้ผลสอดคล้องกับการอ่านผลด้วยวิธีอิเล็ก

โตรโฟรีซิสดังแสดงในภาพที่ 4.7 อย่างไรก็ตามวิธีการอ่านผลด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสไม่สามารถแยกความแตกต่างของอุณหภูมิที่เหมาะสมได้เนื่องจากเป็นการอ่านผลผลิตที่ปฏิกิริยาแลมป์เสร็จสิ้น (end point) แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้รายงานการวิจัยของ Jaroenram *et al.* [41] การทำงานของปฏิกิริยาแลมป์ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในกุ้งพบว่าที่อุณหภูมิที่สูงระดับ 65 °C จะให้ผลการทดสอบความจำเพาะที่ดีกว่าการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะที่สูงในการตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp.



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงเครื่องวัดความขุ่นในการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp.



ภาพที่ 4.7 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. โดยเทคนิคแลมป์ร่วมกับการอ่านผลโดยใช้ 2% Agarose gel, M= 2 log marker, N= negative control, P= ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 100 ng

4.2.3 การทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่น

ในการทดสอบความจำเพาะสำหรับเทคนิคแลมป์ได้ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียทั้งหมด 66 สายพันธุ์ โดยประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. จำนวน 27 สายพันธุ์ และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ รวม 39 สายพันธุ์ จากการทดสอบแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นให้ผลบวกจำนวน 27 สายพันธุ์ และผลเป็นลบจำนวน 39 สายพันธ์ และให้ผลสอดคล้องกับการอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส นอกจากนี้ให้ผลสอดคล้องกับการอ่านผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับการอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยไม่ให้ผลบวกเมื่อใช้ดีเอ็นที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยผลการทดสอบสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kong *et al*. [34] ในการหาตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยยีนเป้าหมาย 62181533 ในการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยให้ผลบวกกับแบคทีเรีย *Salmonella* spp. จำนวน 32 สายพันธุ์ และไม่ให้ผลบวกต่อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ก่อโรคและปนเปื้อนในอาหารแสดงผลการตรวจความจำเพาะสูง 100 % แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูงในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในอาหาร เนื่องจากไม่ให้ผลบวกต่อแบคทีเรียที่ไม่ใช่เป้าหมายในการตรวจ

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิคแลมป์โดยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นและเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและเทคนิคพีซีอาร์

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Lamp-Turbid	Lamp-AGE	PCR
Salmonella enterica strains (n= 27)				
S. Typhimurium	ATCC 13311	+	+	+
S. Typhimurium	RMUTTS-153	+	+	+
S. Wadar	RMUTTS- 4	+	+	+
S. Saintpaul	RMUTTS-33	+	+	+
S. Welterreden	RMUTTS-71	+	+	+
S. Rissen	RMUTTS-16	+	+	+
S. Ohio	RMUTTS-139	+	+	+
S. Stanley	RMUTTS-17	+	+	+
S. Antum	RMUTTS-35	+	+	+

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิคแลมป์โดยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นและเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและเทคนิคพีซีอาร์ (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Lamp-Turbid	Lamp-AGE	PCR
S. Brunei	RMUTTS-141	+	+	+
S. Corvallis	RMUTTS-2	+	+	+
S. ParatyphiB	RMUTTS-155	+	+	+
S. Mbandaka	DMST 17377	+	+	+
S. Mbandaka	RMUTTS-47	+	+	+
S. Hadar	DMST 10634	+	+	+
S. Hadar	RMUTTS-11	+	+	+
S. Hritlingfoss	RMUTTS-75	+	+	+
S. Agona	RMUTTS-60	+	+	+
S. Orion	RMUTTS-144	+	+	+
S. Livingstone	RMUTTS-67	+	+	+
S. Bardo	RMUTTS-56	+	+	+
S. Choleraesuis	DMST 5580	+	+	+
S. Dublin	DMST 30404	+	+	+
S. Enteritidis	ATCC 13076	+	+	+
S. Infantis	DMST 26426	+	+	+
S. Senftenberg	DMST 17013	+	+	+
S. Virchow	DMST 17013	+	+	+
Other strains (n=39)				
B. cereus	RMUTT-BC2	-	-	-
B. cereus	BCC 6386	-	-	-
S. aureus	TBRC 4930	-	-	-
S. aureus	RA 024122	-	-	-
S. aureus	RA 024123	-	-	-
S. aureus	RA 024121	-	-	-

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิคแลมป์โดยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นและเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและเทคนิคพีซีอาร์ (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Lamp-Turbid	Lamp-AGE	PCR
V. parahaemolyticus	ATCC 17802	-	-	-
V. mimicus	DMST 22089	-	-	-
V. vulnificus	DMST 5258	-	-	-
V. fluvialis	DMST 24049	-	-	-
V. fluvialis	DMST 22085	-	-	-
E. coli 0157:H7	ATCC 35150	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120116-4	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120118-5	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120113-4	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120113-4	-	-	-
E. coli	RMUTTE-120201-4	-	-	-
Enterobacter aerogenes	DMST 1333	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110909-8	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110909-4	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110825-4	-	-	-
Enterococus faccium	RMUTTEn-110909-2	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110512-4.2	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110124-6	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110205-8	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-120112-1	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-120201-7	-	-	-
Enterococcus faecalis	RMUTTEn-110205-4	-	-	-
Listeria monocytogenes	ATCC 700402	-	-	-
Listeria monocytogenes	RMUTT-Lis	-	-	-

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะในการตรวจด้วยเทคนิคแลมป์โดยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นและเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและเทคนิคพีซีอาร์ **(ต่อ)**

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Lamp-Turbid	Lamp-AGE	PCR
Listeria ivanovii	ATCC 700402	-	-	-
Listeria innocua	DMST 9011	-	-	-
Listeria welshimeri	DMST 20559	-	-	-
Yersinia enterocolitica	RMUTT-Yer	-	-	-
Cronobacter sakazaki	RMUTT-Cro	-	-	-
Lactococcus lactis	RMUTT-Lac	-	-	-
Pseudomonas sp.	RMUTT-Pse120111-5	-	-	-
Pseudomonas sp.	RMUTT-Pse100913-4	-	-	-
Pseudomonas sp.	RMUTT-Pse110427-1	-	-	-

Lamp-Turbid คือ เทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย

Lamp-AGE คือ เทคนิคแลมป์ร่วมกับการอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

PCR คือ เทคนิคพีซีอาร์

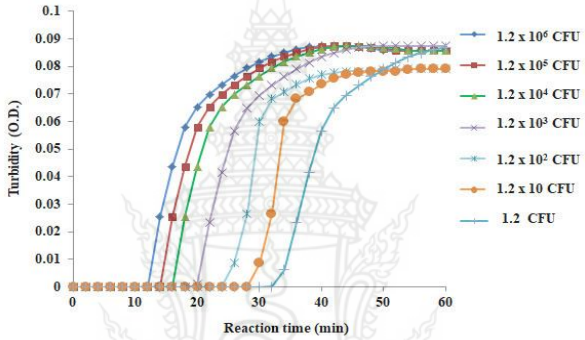
+ หมายถึง การทดสอบด้วยเทคนิค Lamp-Turbid และ Lamp-AGE และ PCR ให้ผลบวก

- หมายถึง การทดสอบด้วยเทคนิค Lamp-Turbid และ Lamp-AGE และ PCR ให้ผลลบ

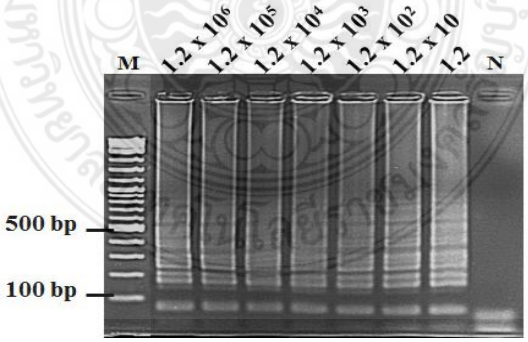
4.2.4 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย

การทดลองเพื่อทดสอบความไวในการตรวจด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นจะใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Salmonella* spp. โดยใช้สายพันธุ์ *S.*Typhimurium ATCC 13311 เป็นมาตรฐานนำมาเลี้ยงและนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี plate count โดยเจือจางแบคทีเรียตั้งแต่ 1.2 ถึง1.2 x 10^8 CFU/mL แล้วสกัดดีเอ็นเอแต่ละความเข้มข้นแล้วนำมาตรวจโดยเทคนิคแลมป์แล้วอ่านผลด้วยกราฟเครื่องวัดความขุ่นและยืนยันผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ผลการทดสอบมีความไวในการตรวจแบคทีเรียด้วยเครื่องวัดความขุ่นมีความสามารถตรวจได้ต่ำสุดที่จำนวน 1.2 CFU/mL ดังภาพที่ 4.8 โดยให้ผลสอดคล้องกับการอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเร

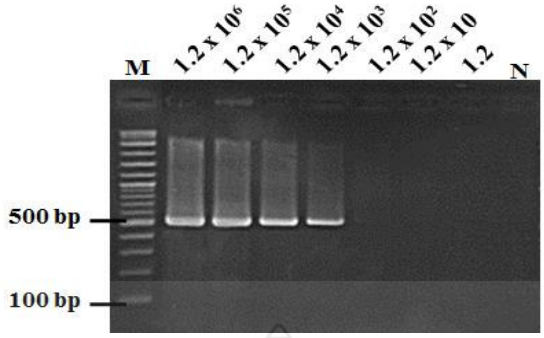
ซิส ดังภาพที่ 4.9 แต่เมื่อนำดีเอ็นของแบคทีเรียที่สกัดแต่ละความเข้มข้นทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 1.2 x 10^3 CFU/mL ดังภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในระดับดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์ 1000 เท่า นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Zhang *et al.* [42] ได้พัฒนาเทคนิคแลมป์ในการตรวจแบคทีเรีย *Salmonella* โดยใช้ยีนเป้าหมายเป็น *hisJ* พบว่าสามารถตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอบริสุทธิ์ได้ที่ระดับ 800 CFU/mL และในงานวิจัยของ Zhuang *et al.* [43] ใช้ยีนเป้าหมายเป็น *bcfD* พบว่าสามารถตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอบริสุทธิ์ได้ที่ระดับ 5 CFU/mL แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจมากกว่า ดังนั้นวิธีการดังกล่าวเหมาะที่จะนำไปใช้ในการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp.



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงการทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเครื่องวัดความขุ่นโดยใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เจือจางลงตามลำดับสิบเท่าเป็นต้นแบบ



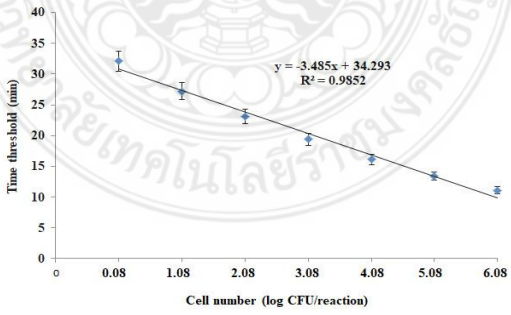
ภาพที่ 4.9 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์และอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส



ภาพที่ 4.10 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และอ่านผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

4.2.5 การสร้างกราฟสมการความขุ่นมาตรฐาน

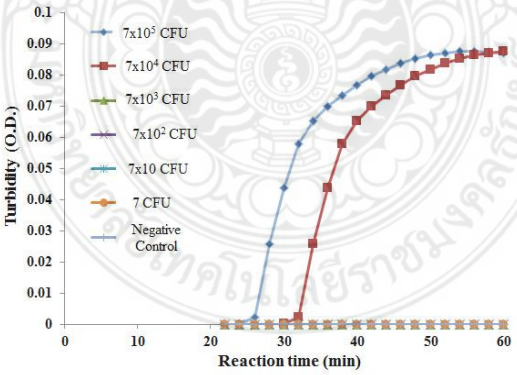
จากการทดสอบความไวในหัวข้อ 4.2.4 จะได้กราฟความขุ่นที่วัดผลผลิตแลมป์ด้วยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นโดยการทำการทดสอบจำนวนสามครั้ง แล้วนำค่าเวลา (time threshold) ที่ตรวจด้วยเครื่องวัดความขุ่นบันทึกเวลาที่วัดได้ ณ เวลาจริง มาหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ นำค่าที่ได้ไปสร้างเป็นกราฟ โดยแกน X เป็นค่า log ความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น (log CFU/mL) แกน Y เป็นเวลาเฉลี่ยที่วัดได้ (นาที) พบว่าได้สมการเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธการตัดสินใจเป็น 0.9852 (R^2) ดังภาพที่ 4.11 เนื่องจากค่าที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 0.854 - 1 [29] แสดงให้เห็นว่าสมการเส้นตรงมาตรฐานที่ได้มีความน่าเชื่อถือในระดับสูง ดังนั้นสามารถนำไปใช้ตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียแบบเชิงปริมาณในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ต่อไป



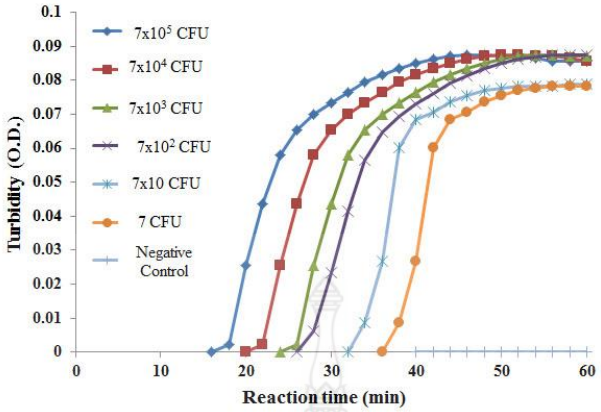
ภาพที่ 4.11 แสดงการสร้างกราฟความขุ่นมาตรฐานโดยแกน X คือค่า log (CFU/mL) ความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น และแกน Y คือ เวลาเฉลี่ยที่วัดได้ (นาที)

4.2.6 ผลการทดสอบหาสภาวะความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารด้วยสถานการณ์จำลองโดยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย

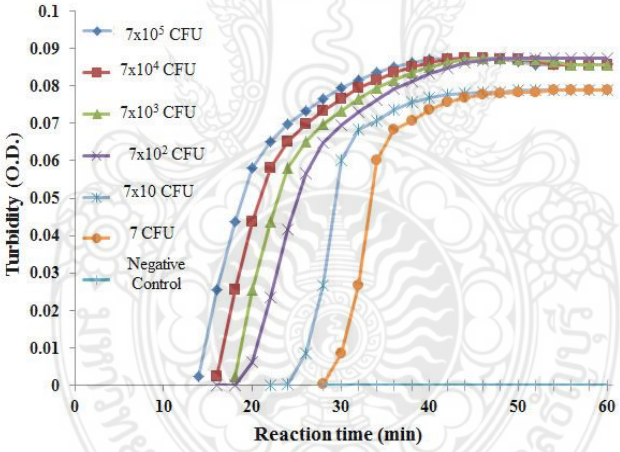
ผลการทดลองเพื่อทดสอบความไวในการตรวจด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย ในการตรวจสถานการณ์จำลองการติดเชื้อในตัวอย่างอาหาร โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงและนับจำนวน แล้วนำมาเจือจางตั้งแต่ 7 ถึง 7 x 10^5 CFU/mL แล้วมาผสมลงในเนื้อไก่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสี UV แล้วนำไปบ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ BPW ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนสารละลายผสมอาหารที่เก็บไว้แต่ละช่วงเวลาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วทดสอบด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย ผลการทดสอบพบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการเติมแบคทีเรียแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สามารถตรวจแบคทีเรียได้ที่จำนวน 7 x 10^4 CFU/mL ดังภาพที่ 4.12 ในขณะที่เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนสารผสมอาหารที่บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถตรวจแบคทีเรียได้ที่จำนวน 7 CFU/mL แสดงดังภาพที่ 4.13 ภาพที่ 4.14 และภาพที่ 4.15 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจตัวอย่างอาหารของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นคือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในบัฟเฟอร์เปปโตนวอร์เทอที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang *et al.* [44] ในการตรวจ *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้ โดยให้ผลความไวในการตรวจที่เท่ากัน ดังนั้นเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นเหมาะที่จะนำไปใช้ตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในอาหารได้



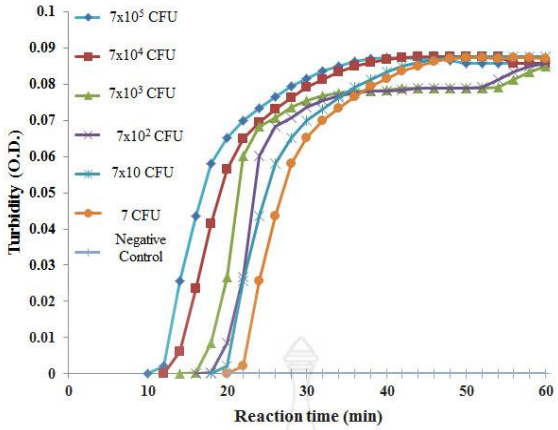
ภาพที่ 4.12 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.13 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.14 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.15 กราฟความขุ่นแสดงความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสถานการณ์จำลองการปนเปื้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.7 ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐาน

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อไก่จำนวน 120 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยการนำตัวอย่างเนื้อไก่ 25 กรัม มาตีบดให้ละเอียดแล้วนำไปบ่มกับบัฟเฟอร์ BPW เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำส่วนสารละลายผสมอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย พบว่าให้ผลบวกจำนวน 63 ตัวอย่าง และให้ผลลบจำนวน 57 ตัวอย่าง โดยผลการทดสอบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐานให้ผลบวกจำนวน 67 ตัวอย่าง และให้ผลลบจำนวน 53 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 4.5 ดังนั้นการทดสอบเปรียบเทียบเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม ในการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารจริง โดยคำนวณตามหลักการของวิธีการมาตรฐาน ISO16140 [45] พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 94.02%, มีความจำเพาะที่ระดับ 86.79% และความแม่นยำที่ระดับ 90.83% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงในการนำไปประยุกต์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนในอาหาร

ตารางที่ 4.5 แสดงการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงแบบมาตรฐาน

Total	**Culture base method**		**LAMP-Turbid**		**TP**	**TN**	**FN**	**FP**	**Sensitivity (%)** [TP/(TP+FN)] x 100	**Specificity (%)** [TN/(TN+FP)] x 100	**Accuracy (%)** [(TP+TN) / (TP+TN+FN+FP)] x 100
	No. of positive result	No. of negative result	No. of positive result	No. of negative result							
120	67	53	63	57	63	46	4	7	94.02	86.79	90.83

Culture base method คือวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐาน

Lamp-Turbid คือ เทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่น

TP คือ ผลบวกจริง

TN คือ ผลลบจริง

FN คือ ผลลบปลอม

FP คือ ผลบวกปลอม

Sensitivity คือ ความไวในการตรวจวัด

Specificity คือ ความจำเพาะในการตรวจวัด

Accuracy คือ ความแม่นยำในการตรวจวัด

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการทางอณูชีววิทยาในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และเทคนิคแลมป์ร่วมกับการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย โดยปัจจุบันวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ใช้แพร่หลายคือการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมี วิธีการดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลาในการดำเนินการ 5 ถึง 10 วัน อีกทั้งใช้แรงงานคนในการดำเนินการ ทำให้การนำไปประยุกต์ใช้ต้องรอผลการตรวจสอบนานอาจส่งผลกระทบต่อการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจของผู้ประกอบการผลิตหรือการจำหน่ายอาหารทั้งในประเทศและส่งออกต่างประเทศ การพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจเชื้อแบคทีเรียจะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีทั้งความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจ อีกทั้งใช้ระยะเวลาในการดำเนินการสั้น

การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่สามารถตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ คือ *Salmonella* spp. *S. aureus* และ *B. cereus* การดำเนินงานเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายโดยเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. จะใช้ยีนเป้าหมายเป็น 62181533 gene เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จะใช้ยีนเป้าหมายเป็น *sensory box histidine kinase (VicK)* gene และ *B. cereus* จะใช้ยีนเป้าหมายเป็น *hemolysin BL lytic component L1* gene และได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ จากการทดสอบความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์พบว่าให้ผลบวกกับเชื้อในกลุ่ม Inclusivity จำนวน 33 สายพันธุ์ และไม่ให้ผลบวกกับเชื้อในกลุ่ม Exclusivity จำนวน 33 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง 100 % นอกจากนี้ในการทดสอบตรวจดีเอ็นเอบริสุทธิ์พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 1000 CFU/mL และเมื่อตรวจการติดเชื้อในอาหารโดยการบ่มร่วมกับบัฟเฟอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ที่ระดับ 10 CFU/mL

การพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นแบบง่ายในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. การดำเนินงานเริ่มด้วยการไพรเมอร์แลมป์ใช้ยีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะสูงโดยใช้ยีนเป้าหมายเป็น 62181533 gene จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแลมป์พบว่าเป็นอุณหภูมิ 65°C ใช้เวลา 1 ชั่วโมง จากการทดสอบความจำเพาะของเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความ

ขุ่นแบบง่ายในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. พบว่าให้ผลบวกกับเชื้อในกลุ่ม Inclusivity จำนวน 27 สายพันธุ์ และไม่ให้ผลบวกกับเชื้อในกลุ่ม Exclusivity จำนวน 39 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง 100 % นอกจากนี้ในการทดสอบตรวจดีเอ็นเอบริสุทธิ์พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 1.2 CFU/mL และเมื่อตรวจการปนเปื้อนในอาหารโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับบัฟเฟอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียได้ที่ระดับ 7 CFU/mL นอกจากนี้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในเนื้อไก่จำนวน 120 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับ 94.02% มีความจำเพาะที่ระดับ 86.79% และมีความแม่นยำที่ระดับ 90.83% แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์ร่วมกับเครื่องวัดความขุ่นที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรค

จึงสรุปได้ว่าการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร ทั้งเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และเทคนิคแลมป์ร่วมกับการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถนำไปตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้เพื่อทดแทนวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม เนื่องจากเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นมีทั้งความไว ความจำเพาะ ใช้ระยะเวลาสั้น และไม่ต้องใช้แรงงานคนจำนวนมากในการดำเนินการ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นการอ่านผลยังใช้เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ต้องใช้เวลาในการดำเนินการนานเพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าวอาจพัฒนาวิธีการอ่านผลด้วยแผ่นจุ่มวัดแบบง่าย เนื่องจากใช้เวลาในการอ่านผลเพียง 5 นาที ทำให้เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ได้

บรรณานุกรม

[1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Foodborne disease active surveillance network: Food Net surveillance report for 2012 (Final report). Atlanta, Georgia:U.S. Department of Health and Human Services.

[2] Chapter 36 *Salmonella*. (2015). In: Salfinger, Y. & Tortorello, M.L. Compendium of method for the microbiological examination of foods. 5th ed. Wachington, DC: American Public Health Association (APHA).

[3] Ananchaipattana, C., Hosotani, Y., Kawasaki, S., Pongswat, S., Latiful, M.B., Isobe, S., & Inatsu, Y. (2012). Bacterial contamination in retail foods purchased in Thailand. Food Science and Technology Research, 18(5), 705-712.

[4] Ananchaipattana, C., Hosotani, Y., Kawasaki, S., Pongswat, S., Latiful, M.B., Isobe, S., & Inatsu, Y. (2012). Bacterial contamination of soybean curd (Tofu) sold in Thailand. Food Science and Technology Research, 18(6), 843-848.

[5] Ananchaipattana, C., Hosotani, Y., Kawasaki, S., Pongswat, S., Latiful, M.B., Isobe, S., & Inatsu, Y. (2012). Prevalence of Foodborne Pathogens in Retailed Foods in Thailand. Journal of Foodborne pathogen and disease, 9(9), 835-840.

[6] รัชฎาพร สุวรรณรัตน์ และ ดวงดาว วงศ์สมมาตร์. (2559). การสำรวจการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* และ *E. coli* O157: H7 ในเนื้อสัตว์ดิบที่จำหน่ายในตลาดสด เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ปีที่ 58, ฉบับที่ 3.

[7] สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2558). อาหารเป็นพิษ…โรคสุดฮิตช่วงฤดูร้อน. รายงานการเฝ้าระวังการระบาดวิทยาประจำสัปดาห์, ปีที่ 46, ฉบับที่ 14. (Online), Available: http://www.boe.moph.go.th/

[8] Boonyasiri, A., Tangkoskul, T., Seenama, C., Saiyarin, J., Tiengrim, S., & Thamlikitkul, V. (2014). Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals, and the environment in selected areas in Thailand. Pathogens and Global Health, 108, 235-245.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[9] Nguyen, T.T., Giau, V.V., & Vocorresponding, T.K. (2016). Multiplex PCR for simultaneous identification of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in food. 3 Biotech NLM, 6(2), 205.

[10] สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2554). โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (Acute diarrhoea), สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคที่สำคัญ ปี 2554, ISSN 0857-6521.

[11] ปภาสพงษ์ จงชานสิทโธและ สุภลักษณ์ ตันประยูร. (2556). การปนเปื้อนของปริมาณเชื้อก่อโรคที่พบในเนื้อสัตว์จากโรงฆ่าสัตว์และสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ในจังหวัดแม่ฮ่องสอน ระหว่างเดือนตุลาคม 2554 กันยายน 2555, วารสารสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดแม่ฮ่องสอน, ฉบับที่ 2.

[12] สุวัฒน์ มลิจารย์และ ศิรินทร์ทิพย์ วนาประเสริฐศักดิ์. (2556). การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดราชบุรี, วารสารสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดราชบุรี, ฉบับที่ 2.

[13] สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2558).รายงานประจำปี 2558 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ISBN 978-616-11-2915-6. Available: http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/index.html.

[14] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

[15] Zhao, X., Lin, C.W., Wang, J., & Oh, D.H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(3), 297-312.

[16] Mandal, P.K., Biswas, A. K., Choi, K., & Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. American Journal of Food Technology, 6, 87-102.

[17] Germini, A., Masola, A., Carnevali, P., & Marchelli, R. (2009). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. Food Control, 20, 733–738.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[18] Jofre, A., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Pla, M., Rodriguez-Lazaro, D., & Aymerich, T. (2005). Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. Food Microbiology, 22, 109-115.

[19] Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., & Kawamoto, S. (2005). Multiplex PCR for Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria*

[20] Lin, Y., Zhuang, S., & Mustapha, A. (2005). Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready- to-eat meat products. Meat Science, 71, 402-406.

[21] Son, I., Binet, R., Maounounen-Laasri, A., Lin, A., Hammack, T., & Kase, J.A. (2014). Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR. Food Microbiology, 40, 31-40.

[22] Ramesh, A., Padmapriya, B.P., Chrashekar, A., & Varadaraj, M. C. (2002). Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia Enterocolitica* in milk samples. Molecular and Cellular Probes, 16 (4), 307-314.

[23] Li, Y., & Mustapha, A. (2004). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in apple cider and produce by a multiplex PCR. Journal of Food Protection, 67, 27-33.

[24] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic acids research, 28, E63.

[25] Nyachuba D. G. (2010). Foodborne illness: Is it on the rise? Nutrition Reviews, 68(5), 257-269.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[26] Paddock, Z.D., Bai, J., Shi, X., & Renter, D.G. (2013). Nagaraja TG. Detection of *Escherichia coli* O104 in the feces of feedlot cattle by a multiplex PCR assay designed to target major genetic traits of the virulent hybrid strain responsible for the 2011 German outbreak. Applied and environmental microbiology, 79(11), 3522–5.

[27] Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Ohtsuka, K., Hiramatsu, R., Tanaka, H., Konuma, H., & Takatori, K. (2008). Detection of verotoxigenic *Eschericchia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method. International Journal of Food Microbiology, 122, 156-161.

[28] Sappat, A., Jaroenram, W., Puthawibool, T., Lomas, T., Tuantranont, A., & Kiatpathomchai, W. (2011). Detection of shrimp Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multi-channel turbidimeter. Journal of Virological Methods, 175, 141-148.

[29] Arunrut, N., Suebsing, R., Withyachumnarnkul, B., & Kiatpathomchai, W. (2014). Demonstration of a very inexpensive, turbidimetric, real-time, RT-LAMP detection platform using shrimp laem-singh virus (LSNV) as a model. PLoS ONE, 9, e108047.

[30] Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., & Ikedo, M. (2005). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella. FEMS Microbiology Letters, 253, 155-161.

[31] Wang, L., Shi, L., Alam, M.J., Geng, Y., & Li, L. (2008). Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. Food Research International, 41, 69-74.

[32] Yamazaki, W., Ishibashi, M., Kawahara, R., & Inoue, K. (2008). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. BMC Microbiology, 8, 163.

[33] Song, T., Toma, C., Nakasone, N., & Iwanaga, M. (2005). Sensitive and rapid detection of *Shigella* and *enteroinvasive Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Microbiology Letters, 243, 259-263.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[33] Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K., & Misawa, N. (2009). Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. Applied and Environmental Microbiology, 75, 1597-1603.

[34] Kong, X., Lu, Zh., Zhai, L., Yao, S., Zhang, C., Lv, F., & Bie, X. (2013). Mininh and evaluation of new specific molecular targets for the PCR detection of *Salmonella* spp. Genome. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 29, 2219-2226.

[35] Yu, Q., Zhai, L., Bie, X., Lu, Zh., Zhang, Ch., Tao, T., & Li, J. (2016). Survey of five food-borne pathogens in commercial cold food dishes and their detection by multiplex PCR. Food Control, 59, 862-869.

[36] Wehrle, E., Didier, A., Moravek, M., Dietrich, R., & Martbauer, E. (2010). Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I. Molecular and Cellular Probe, 24, 124-130.

[37] ISO 6579:2002. Specifies a horizontal method for the detection of *Salmonella*, including *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi.

[38] ISO7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs, Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*, Colony count technique at 30 degrees C.

[39] วีรานุช หลาง. (2552). คู่มือตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 35-48.

[40] Yang, Y., Su, X, Yang, Y, Kang, C.-y., Li, Y, Zhang, w., & Zhong, X. (2007). Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay. Agricultural Sciences in China, 6(7), 857–862.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[41] Jaroenram, W., Arunrut, N. & Kiatpathomchai, W. (2012). Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus using loop-mediated isothermal amplification and a colorogenic nanogold hybridization probe. Journal of Virological Methods,186(1-2), 36–42.

[42] Zhang, L., Pan, Z., Geng, S., Chen, X., Liu, Z.-Y., Zhao, F., & Jiao, X. (2012). A loop-mediated isothermal amplification method targets the *HisJ* gene for the detection of foodborne *Salmonella*. European Food Research and Technology, 234(6), 1055–1062.

[43] Zhuang, L., Gong, J., Li, Q., Zhu, C., Yu, Y., Dou, X., Liu, X., Xu, B., & Wang, C. (2014). Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcfD* gene. Letters in Applied Microbiology, 59(6), 658–664.

[44] Yang, Q., Wang, F., Jones, K.L., Meng, J., Prinyawiwatkul, W., & Ge, B. (2015). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of *Salmonella* in produce. Food Microbiology, 46, 485–493.

[45] ISO16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - protocol for the validation of alternative methods.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. 10X TBE buffer 1,500 ml

Tris base	162.0	กรัม
Boric acid	82.5	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	60.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้	1,500	มิลลิลตร

2. 0.5 M EDTA (pH 8.0) 500 ml

EDTA	93.05	กรัม
Distilled water	500.00	มิลลิลิตร

Adjust pH with NaOH to 8.0

3. 6x loading dye 20 ml

10M Tris-HCl (pH 6.4)

0.25% Bromophenol blue

0.25% Xylene cyanol FF

0.25% Orange G

60% Glycerol

60 mM EDTA (pH 8.0)

4. 0.1 M Tris-HCl (pH 6.4) 500 ml

Tris base	6.057	กรัม
Distilled water	500.00	มิลลิลิตร

Adjust pH with HCl to 6.4

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptone soya agar (TSA)

Tryptone	15.0 กรัม
Soya peptone	5.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ปั่นละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำมาเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Buffer peptone water (BPW)

Peptone	25.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Disodium phosphate	3.5 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ปั่นละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Rappaport Vassiliadis broth (RVS)

Peptone from soymeal	4.5 กรัม
Magnesium chloride-haxahydrate	28.6 กรัม
Sodium chloride	7.2 กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	0.18 กรัม
Patassium dihydogen phosphate	1.26 กรัม
Malachite green oxalate	0.036 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 155 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin broth (MKTTn)

Brilliant green	0.0095 กรัม
Calcium carbonate	38.7 กรัม
Casein enzymic hydrolysate	8.6 กรัม
Ox bile	4.75 กรัม
Peptic digest of animal tissue	4.3 กรัม
Sodium chloride	2.6 กรัม
Sodium thiosulphate, pentahydrate	47.8 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ปั่นละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันและต้มให้เดือดหลังจากนั้นนำมาเทในหลอดทดลอง

5. Xylose lysine deoxycholate agar (XLD)

Yeast extract	3.0 กรัม
L-Lysine HCl	5.0 กรัม
Xylose	3.75 กรัม
Lactose	7.5 กรัม
Sucrose	7.5 กรัม
Sodium deoxycholate	1.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Sodiu m thiosulphate	6.8 กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8 กรัม
Phenol red	0.08 กรัม
Agar	12.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ต้มจนส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเดือด แล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. Hektoen enteric agar (HE)

Peptic Digest of Animal Tissue	12.0 กรัม
Lactose	12.0 กรัม
Sucrose	12.0 กรัม

Bile Salts	9.0 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Sodium Thiosulfate	5.0 กรัม
Yeast Extract	3.0 กรัม
Salicin	2.0 กรัม
Ferric Ammonium Citrate	1.5 กรัม
Acid Fuchsin	0.1 กรัม
Bromothymol Blue	0.064 กรัม
Agar	13.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ต้มจนส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเดือด แล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

7. Triple sugar iron agar (TSI)

Lab-Lemco'powder	3.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
Peptone	20.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Lactose	10.0 กรัม
Sucrose	10.0 กรัม
Glucose	1.0 กรัม
Ferric citrate	0.3 กรัม
Sodium thiosulphate	0.3 กรัม
Phenol red	0.024 กรัม
Agar	12.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. Lysine iron agar (LIA)

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
L-lysine	10.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Sodium thiosulphate	0.04	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายณรงค์ อรัญรุตม์
วัน เดือน ปีเกิด	31 มกราคม 2527
สถานที่ติดต่อ	8/24 หมู่ 5 ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง
	จ.ปทุมธานี 12120
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ)
	มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2550
ประวัติการทำงาน	ตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย
	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
	พ.ศ. 2550-ปัจจุบัน
เบอร์โทรศัพท์	090-9870940
อีเมล์	narong.aru@gmail.com