การตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินเอ ของ *Staphylococcus aureus* โดยวิธีลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

นางสาวธีระนันท์ สุวรรณอำไพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF ENTEROTOXIN A GENE OF *Staphylococcus aureus* BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD

Miss Theeranan Suwanampai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร โดยวิธีลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน
โดย	นางสาวธีระนันท์ สุวรรณอำไพ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

…… กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. อรษา สุตเธียรกุล)

ธีระนันท์ สุวรรณอำไพ : การตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินเอ ของ *Staphylococcus aureus* โดยวิธีลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (DETECTION OF ENTEROTOXIN A GENE OF *Staphylococcus aureus* BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, 66 หน้า.

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากสามารถสร้างเอนเทอโรทอกซิน ซึ่งทนต่อความร้อนได้ ดังนั้นเมื่อบริโภคอาหารที่มีเอนเทอโรทอกซินปนอยู่จะทำให้เกิดโรคได้ จึงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับผู้ประกอบอาหารและผู้บริโภคอาหาร ดังนั้น การนำวิธีการตรวจวินิจฉัย *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินในอาหารจึงจำเป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาวิธี Loop- mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ใช้ไพรเมอร์สี่สายและอุณหภูมิคงที่ในการทำปฏิกิริยา เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินเอ ของ *S. aureus* เปรียบเทียบกับวิธี PCR จากการศึกษาความจำเพาะและความไวของวิธี LAMP และ PCR เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินเอ พบว่าทั้งสองวิธีมีความจำเพาะในการตรวจสูง คือ วิธี LAMP และ PCR เกิดผลิตภัณฑ์ เฉพาะกับ *S. aureus* ATCC 13565 ในขณะที่แบคทีเรียอื่นๆ รวม 15 ชนิด ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ใดๆ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า ทั้งสองวิธี มีความจำเพาะสำหรับการตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินเอ ของ *S.aureus* การศึกษาปริมาณเชื้อน้อยที่สุดที่ตรวจพบ พบว่าวิธี LAMP สามารถตรวจเชื้อน้อยที่สุด 10^4 CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่วิธี PCR สามารถตรวจเชื้อน้อยที่สุด 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำวิธีการดังกล่าวไปประยุกต์เพื่อใช้ตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินเอของ *S. aureus* ในเนื้อหมู เพื่อเป็นการประเมินประสิทธิภาพของ วิธี LAMP เปรียบเทียบกับวิธี PCR พบว่าเมื่อบ่มตัวอย่างเนื้อหมูในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ที่ 6 ชั่วโมง ทั้งสองวิธีสามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซิน ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 10^3 และ 10^4 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู ตามลำดับ ซึ่งนับว่าวิธี LAMP มีความไวในการตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินเอของ *S. aureus* ในเนื้อหมูมากกว่าวิธี PCR สิบเท่า

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา..... .ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา…….2552…… ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972330923 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : STAPHYLOCOCCUS AUREUS / LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION / POLYMERASE CHAIN REACTION

THEERANAN SUWANAMPAI : DETECTION OF ENTEROTOXIN A GENE OF *Staphylococcus aureus* BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, THESIS CO-ADVISOR : ASST.PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat., 66 pp.

Staphylococcus aureus is an important pathogen of humans. It is also the most common cause of food–borne illness. Staphylococcal food-borne disease is a typical intoxication due to enterotoxins ingestion performed in food by enterotoxigenic strains. Here we developed a technique for detecting the enterotoxin A gene (*sea*) using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) that amplified DNA with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal amplifications conditions using a set of four specially designed primers and a DNA polymerase with strand displacement activity. In this study, we use LAMP and PCR for detection specificity and limit of detections. The specificity of LAMP was comparable to that conventional PCR method. The LAMP and PCR method correctly identified enterotoxin A gene (*sea*) of *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 but did not detect other 15 non-*Staphylococcus* strains. Limit of detections of LAMP, the assay for direct detection of *S.aureus* in pure culture was 10^4 CFU per milliliter while PCR showed 10^3 CFU per milliliter. Afterward, the methods were employed for the detection *S. aureus* in pork samples to assess efficiencies of both methods. Results obtained show that LAMP was able to detect up to 10^3 CFU per gram of pork sample while PCR could detect only 10^4 CFU per gram of pork sample after incubation in TSB for 6 hours. Therefore it is obvious that LAMP is 10 fold sensitive for the detection of enterotoxin A gene in pork seeding sample than PCR.

Department :…...Microbiology……...Student's Signature……...……

Field of study :….Industrial Microbiology…..Advisor's Signature……..……

Academic Year :..2009……..……..Co-Advisor' Signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ศาสตราจารย์ ดร. อรษา สุตเธียรกุล และ ดร. ปรีเปรม พัฒนมหกุล และ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ในระหว่างการศึกษา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ ที่แสนดี คุณจำรูญศรี พุ่มเทียน คุณผกามาศ ราชมนตรี คุณสายทิพย์ เรืองมา ที่คอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนแท้อย่าง คุณกัลกิยา ชนิตรนันต์ คุณกัญชนิกา รุ่งเริงสุข คุณฐิตรัตน์ เลิศเชาวยุทธ คุณวิลสา คำจริง ที่คอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา และขอบคุณน้องๆที่ห้อง 402 คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1 *Staphylococcus aureus*..... 5

2.2 พยาธิสภาพ (Pathogenicity)..... 8

2.3 อาการของโรค..... 9

2.4 ระบาดวิทยา..... 9

2.5 การตรวจวินิจฉัย..... 10

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 24

3.1แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย..... 28

3.2 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย..... 29

3.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง..... 29

3.4 การสกัดดีเอ็นเอ..... 30

3.5 การเพิ่มจำนวนยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)..... 30

3.6 การเพิ่มจำนวนยีนเอนเทอทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยวิธีปฏิกิริยาลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)..... 31

3.7 ศึกษาความจำเพาะของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจ ยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus*..... 32

หน้า

3.8 ศึกษาความไวของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* 32

3.9 ตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยเติม *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมูโดยใช้วิธี PCR และ LAMP เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง..... 33

4. ผลการทดลอง..... 34

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง..... 34

4.2 ตรวจสอบยีนยันจีโนไทป์ของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆ สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิด(*sea*) ด้วยวิธี PCR และ LAMP..... 35

4.3 ศึกษาความจำเพาะของวิธี PCR และ LAMP พื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดของแบคทีเรีย *S. aureus*..... 37

4.4 ศึกษาความไวของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus*..... 39

4.5 ตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เติมเชื้อในตัวอย่างเนื้อหมูโดยใช้วิธี PCR และ LAMP เปรียบเทียบกับวิธีเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ แข็ง BPA..... 40

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 45

รายการอ้างอิง..... 49

ภาคผนวก..... 56

ภาคผนวก ก..... 57

ภาคผนวก ข..... 60

ภาคผนวก ค..... 59

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 66

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ลักษณะแตกต่างระหว่าง *Staphylococcus* species ที่มีความสำคัญทางอาหาร ... 6

3.1 แบคทีเรียชนิดต่างๆ..... 28

3.2 ลำดับนิวคลีโอด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของ LAMP..... 31

4.1 สมบัติทางชีวเคมีของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆ 35

4.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจวัดได้โดยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เบรด-ปากเกอร์ (BPA)..... 44

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงการติดสีแกรมบวกของ *S. aureus* และลักษณะโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมเลือดและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเบรด-ปากเกอร์..... 5

2.2 Cystine loop ของเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* 8

2.3 การเจริญของ *S. aureus* เปรียบเทียบกับ *S. epidermidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแมนนิทอลซอลท์ (M S A)..... 11

2.4 การแข็งตัวของพลาสมาโดยเอนไซม์โคแอกกูเลสของ *S. aureus*..... 13

2.5 ตำแหน่งไพรเมอร์ทั้งหมดในปฏิกิริยา LAMP..... 17

2.6 ไพรเมอร์ FIP จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายและเกิดการจำลองตัว..... 18

2.7 *Bst* DNA Polymerase เข้าทำปฏิกิริยา เกิดการการจำลองตัว ดีเอ็นเอสายใหม่..... 19

2.8 ไพรเมอร์ F3 แทรกตัวบริเวณปลายเปิด และเกิดการจำลองตัว..... 19

2.9 ไพรเมอร์ F3 จำลองตัวเป็นดีเอ็นเอสายใหม่..... 19

2.10 ดีเอ็นเอที่เกิดการจำลองตัวจากไพรเมอร์ FIP หลุดออก 20

2.11 ไพรเมอร์ BIP จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว บริเวณที่คู่สมกันและเกิดการจำลองตัว..... 20

2.12 หลังจากไพรเมอร์ B3 จำลองตัวเสร็จสมบูรณ์ไพรเมอร์ B3 จำลองตัวเสร็จสมบูรณ์... 20

2.13 ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ไพรเมอร์ BIP จำลองตัว ซึ่งถูกไพรเมอร์ B3 denature ออก ซึ่งมีรูปร่างคล้าย dumbbell..... 21

2.14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา LAMP 22

4.1 ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์การติดสีย้อมแกรมของ *S. aureus* ATCC 13565 และลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BPA และ MSA..... 34

4.2 ภาพอะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR..... 36

4.3 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ตามที่เกิดจากปฏิกิริยา LAMP โดยดูจากความขุ่น..... 36

4.4 อะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR..... 37

4.5 อะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา LAMP..... 38

4.6 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอด้วยวิธี PCR เมื่อใช้จำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน..... 39

รูปที่ หน้า

4.7 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอด้วยวิธี LAMP เมื่อใช้จำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน 40

4.8 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ จากตัวอย่างเนื้อหมู ด้วยวิธี PCR และ LAMP หลังการบ่มตัวอย่างใน TSB เป็นเวลา 0 ชั่วโมง (ก.) และ 2 ชั่วโมง (ข.)..... 42

4.9 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอจากตัวอย่างเนื้อหมู ด้วยวิธี PCR (ก.) และ LAMP (ข.) ที่ชั่วโมงที่ 4..... 42

4.10 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอจากตัวอย่างเนื้อหมู ด้วยวิธี PCR (ก.) และ LAMP (ข.) ที่ชั่วโมงที่ 6..... 43

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันในวงการอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทย จำเป็นต้องมีการประกันคุณภาพอาหารเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร แม้ว่าวิทยาการทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขจะก้าวหน้าไปมาก แต่การเจ็บป่วยจากภาวะอาหารเป็นพิษ (Food – borne illness) ยังเป็นภาวะที่พบได้บ่อยและสร้างปัญหามาก เนื่องจากอาหารอาจเป็นตัวพาแบคทีเรียก่อ โรคไปสู่ผู้บริโภคได้ โดยมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของ แบคทีเรียก่อ โรคในอาหาร ซึ่งโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเซลล์แบคทีเรียเข้าไป และเซลล์แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนในลำไส้และสร้างสารพิษ ก่อให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย และกลุ่มที่ 2 เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษของแบคทีเรีย เกิดจากแบคทีเรียเจริญในอาหารมากพอและสร้างสารพิษขึ้นในอาหาร ก่อให้เกิดพยาธิสภาพโดยตรงต่อลำไส้ สารพิษบางชนิดอาจส่งผลทางอ้อมต่อระบบประสาท มีผลให้ผู้บริโภคเสียชีวิตแบบเฉียบพลันได้

แบคทีเรีย ในจีนัส *Staphylococcus* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่พบในอาหารมีประมาณ 16 สปีชีส์ โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น พบปนเปื้อนได้ทั่วไป ในอากาศและบนผิวหนังของร่างกาย เช่น มือ ใบหน้า เป็นต้น ดังนั้น อาหารที่ใช้มือในการเตรียม จึงมีโอกาสที่จะพบแบคทีเรียดังกล่าวได้ *S. aureus* ชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning disease) เนื่องจากสามารถสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ได้หลายชนิดที่เรียกว่า Staphylococcal enterotoxins และโรคที่เกิดจากการปนเปื้อนของเอนเทอโรทอกซินยังขึ้นกับปริมาณทอกซินที่ได้รับด้วย ซึ่งถ้าได้รับทอกซินมากเกินพอก็จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (Robinson และคณะ, 2000) การบริโภคอาหารที่มีเอนเทอโรทอกซิน ของ *S. aureus* ซึ่งปนเปื้อนมากับอาหารที่ผ่านการเตรียม อาหารที่มีการสัมผัสโดยตรงกับมือผู้ประกอบอาหารที่ปนเปื้อน *S. aureus* และอาหารนั้นไม่มีการแช่เย็นเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมงหรือเก็บในตู้เย็นที่เย็นไม่พอจึงทำให้แบคทีเรียเจริญและสร้างสารพิษได้ อาหารหลายชนิดเหมาะที่ *S. aureus* จะเจริญ แต่ที่เจริญได้ดีมากได้แก่ อาหารที่มีไขมัน และอาหารที่มีแบคทีเรียคู่แข่งน้อย เช่น ผลิตภัณฑ์นม เนยแข็ง คัสตาร์ด ขนมอบ ไอศกรีม และเนื้อสัตว์ อาหารที่มีเอนเทอโรทอกซินปนเปื้อนมักมีกลิ่น รส และสภาพอาหารเป็นปกติ จึงทำ

ให้ผู้บริโภคไม่ได้สนใจว่าอาหารดังกล่าวอาจมีเอนเทอโรทอกซินอยู่ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ, 2549) เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารกำหนดไว้ว่าในอาหารปรุงสุกทั่วไปต้องมี *S. aureus* ต่อกรัมอาหาร น้อยกว่า 100 เซลล์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536) สำหรับเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ เป็นทอกซินที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมากที่สุดในประเทศสหรัฐอเมริกา (Balaban และ Rasooly, 2000) ซึ่งปริมาณสารพิษของเอนเทอโรทอกซินชนิดเอเพียง 100-200 นาโนกรัม สามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ (Asao และคณะ, 2003) อาการของโรคจะเกิดภายใน 2-6 ชั่วโมงหลังการรับประทานอาหารเข้าไป ทำให้เกิดอาการปวดท้อง อาเจียน ท้องร่วง ถึงแม้ว่าในกระบวนการผลิตอาหารนั้นมีการผ่านความร้อนที่เพียงพอจะทำให้เชื้อแบคทีเรียตาย เช่น การพาสเจอไรซ์ แต่เอนเทอโรทอกซินที่ผลิตขึ้นยังคง สภาพเดิม เนื่องจากเอนเทอโรทอกซิน มีคุณสมบัติ ทนต่อความร้อนได้ (Riemann และ Cliver, 2005) จึงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับผู้ประกอบอาหารและผู้บริโภคอาหาร ดังนั้นการตรวจวินิจฉัย *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxigenic strains *S. aureus*) ในอาหารจึงจำเป็นอย่างมากเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

การตรวจหา *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารโดยวิธีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วโลกและนิยมใช้เป็นวิธีอ้างอิง คือวิธี Direct Plate Count Method และ Most Probable Number Method แต่มีข้อเสียคือใช้เวลาหลายวันจึงจะทราบผล (Bennett, 1998) และยังต้องอาศัยการตรวจสอบยืนยันโดยการทดสอบทางชีวเคมี และ วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจเอนเทอโรทอกซินในอาหารนั้นใช้วิธีการทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา โดยให้ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโร ทอกซิน ผลิตเอนเทอโรทอกซินออกมา นำไปทำให้บริสุทธิ์และทำการทดสอบกับแอนติบอดี (antibodies) ที่จำเพาะ ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยไปอย่างมากโดยจัดทำเป็นชุดตรวจสำเร็จรูป Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ชุดตรวจสำเร็จรูป Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) แต่การตรวจวินิจฉัยดังกล่าวก็ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้เวลานาน และไม่สามารถตรวจเอนเทอโรทอกซินได้ทุกชนิด (Bennett, 1998) จึงได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนได้วิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว แม่นยำ มีความจำเพาะ และมีความไวในการตรวจสูง เช่น การตรวจหาการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยตรวจยีนที่มีการสร้างเอนเทอโรทอกซิน ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและถูกพัฒนามากที่สุด ได้แก่ ปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อใช้ในการตรวจ *S. aureus* สายพันธุ์ที่มียีนที่กำหนดการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (Johnson และคณะ,1991; Sharma และคณะ, 2000) แต่อย่างไรก็ตามการใช้วิธี PCR นั้นการตรวจผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจหานิวคลีโอไทด์ใหม่เกิดขึ้น ได้แก่เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi และคณะ, 2000) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหา การเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิค (DNA) ตรงบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ เป็นเป้าหมาย โดยอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยา auto-cycling stand displacement ของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ได้ ปริมาณมาก และปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปที่อุณหภูมิคงที่ระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส ซึ่งขั้นตอนการเพิ่ม ปริมาณกรดนิวคลีอิค และขั้นตอนการตรวจสอบเกิดขึ้นสมบูรณ์ในขั้นตอนเดียวกัน ภายในเวลา 15-60 นาที ซึ่งต่างจากการทำ PCR และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้เลยโดยดูจากความขุ่นซึ่งเกิดจาก magnesium pyrophosphate (Mori และคณะ, 2001) ดังนั้นเทคนิค LAMP จึงน่าจะสามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร และการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีรายงานที่ใช้วิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจในอาหาร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธี LAMP เพื่อไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซิน เอ ของ *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษในอาหาร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไปในการตรวจเชื้อ แบคทีเรีย ในอุตสาหกรรมอาหารและการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ ส่งผลให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์มากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินเอ ของ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหารโดยใช้วิธีลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP)

บทที่ 2

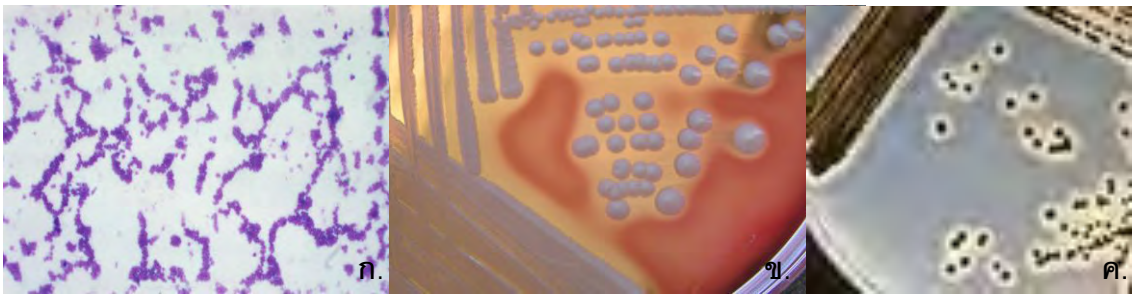
ปริทรรศน์วรรณกรรม

“อุตสาหกรรมอาหาร ” หมายถึง อุตสาหกรรมที่นำผลผลิตจากภาคเกษตร ซึ่งได้แก่ ผลผลิตจากพืช ปศุสัตว์ และ ประมง มาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต โดยอาศัยเทคโนโลยีต่างๆ ในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สะดวกต่อการบริโภค หรือการนำไปใช้ในขั้นต่อไป และเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตจากพืช ปศุสัตว์ และประมง โดยผ่านกระบวนการแปรรูปขั้นต้น หรือขั้นกลางเป็นสินค้ากึ่งสำเร็จรูป หรือขั้นปลายที่เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปได้ (อุษามาส วังชัยสุนทร, 2547) อุตสาหกรรมอาหารเป็ นอุตสาหกรรมลำดับแรกที่ได้รับการสนับสนุน เนื่องจากเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้เงินลงทุนน้อยใช้วัตถุดิบภายในประเทศสูง และสามารถนำเอาทรัพยากรที่อุดมสมบูรณ์ของประเทศไปพัฒนาเพื่อ ให้เกิด ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้มาก ทำให้อุตสาหกรรมการส่งออกอาหารและสินค้าการเกษตรมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ ของประเทศอย่างยิ่ง ส่งผลให้ประเทศไทยได้รับการจัดให้อยู่ในอันดับต้นๆของประเทศผู้ส่งออกอาหารและสินค้าเกษตรของโลก ดังนั้น การเข้มงวดในด้านมาตรฐานการผลิตและคุณภาพของสินค้าโดยเฉพาะในด้านความสะอาด และความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทำให้ มาตรฐานการควบคุมและตรวจสอบคุณภาพของวัตถุ กระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งโดยเฉพาะมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ก่อเชื้อโรคแล้ว อาจทำให้ผู้บริโภคมีอาการเจ็บป่วย และอาจเกิดแพร่ระบาดได้ ทำให้ประเทศผู้นำเข้าเป็นจำนวนมากต้องการรับรองการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าเกษตรปราศจากจุลินทรีย์ที่ก่อโรค หรือมีปริมาณจุลินทรีย์อ ยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด นอกจากคุณภาพของสินค้าแล้วการส่งสินค้าให้ได้ทันตามที่ได้ระบุในหนังสือสัญญาซื้อขาย ก็เป็นสิ่งที่ผู้ส่งออกต้องคำนึงถึงมากเช่นกัน เพราะนอกจากมีผลกระทบต่อสินค้ารุ่นต่อไปแล้วยังอาจต้องชดเชยด้วยเงินเป็นจำนวนมาก หากไม่สามารถส่งสินค้าได้ทันตามที่กำหนด ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นวิธีการตรวจสอบคุณภาพของสินค้า จึงต้องมีความเหมาะสม ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องน่าเชื่อถือและยอมรับได้

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 ลักษณะของ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่มๆทำให้ดูเหมือนพวงองุ่น แต่จะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ และเป็นสายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เซลล์) อยู่ปะปนด้วยเสมอ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนไหว ส่วนใหญ่ไม่มีแคปซูล เจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย ซึ่งอาจจะใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการสร้างพลังงานก็ได้ โดยทั่วไปแล้ว *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอากาศ จึงพบ *S. aureus* ได้เสมอในปริมาณไม่มาก สามารถอาศัยได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะ จมูก ผิวหนัง มือ และซอกเล็บ จึงเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เชื้อแพร่กระจายในอาหาร (Genigeorgis, 1989). โดยทั่วไปแบคทีเรียชนิดนี้จะทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และ *S. aureus* บางสายพันธุ์ สามารถสร้าง เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี (Hilker และคณะ,1968) และเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) ของมนุษย์



รูปที่ 2.1 แสดงการติดสีแกรมบวกของ *S. aureus* (ก) ลักษณะโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมเลือด (ข) และ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเบรด-ปากเกอร์ (BPA) (ค)

แหล่งที่มา : http://www.labm.com2images2news_press_releases/t54_1.jpg

http://www.ctdslab.co.uk/staph_haem.html

http://www.sms-home.com/thumbnails/Baird-Parker%2520Medium_jpg

2.1.2 การจัดจำแนก

โคโลนีของแบคทีเรีย S. aureus มีขนาดเล็ก กลม และมีสีเหลืองทอง มีการสร้าง beta-hemolysis เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมเลือด (blood agar plates) ซึ่งจากลักษณะที่ปรากฏ แบคทีเรียชนิดนี้จึงได้ชื่อว่า aureus ซึ่งแปลว่า สีทอง ตามรากศัพท์ในภาษาละติน S. aureus สามารถย่อยน้ำตาลแมนนิทอลได้ และทนเกลือสูงถึง 7.5 - 10 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบคาตาเลสให้ผลเป็นบวกคือ สามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้เป็นน้ำและออกซิเจนได้ ซึ่งผลของการทดสอบ เอนไซม์คาตาเลส ทำให้ Staphylococci มีความแตกต่างจาก Enterococci และ Streptococci (Goh, Byrne และ Zhang,.1992) การแยก S. aureus ออกจาก Staphylococcus สายพันธุ์ อื่นๆ ทำได้โดยการ ทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์โคแอคกูเลส (coagulase test) ซึ่ง S. aureus จะให้ผลของการทดสอบเอนไซม์โคแอคกูเลส เป็นบวก ในขณะที่ Staphylococcus สายพันธุ์อื่นๆจะให้ผลเป็นลบ (Sneath, 1986) อย่างไรก็ตามขณะที่ S. aureus ส่วนใหญ่สามารถผลิต coagulase ได้ แต่ยังมี S. aureus บางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้าง coagulase ได้ และในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะสลายน้ำตาลกลูโคสให้กรด (Robinson และคณะ, 2000)

ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะแตกต่างระหว่าง *Staphylococcus* species ที่มีความสำคัญทางอาหาร (Robinson และคณะ, 2000)

คุณสมบัติ	*S.aureus*	*S.intermedius*	*S.hyicus*	*S.epidermidis*
Pigment	+	-	-	-
Coagulase	+	+	±	-
TNase	+	+	±	-
Enterotoxin	+	+	+	+
Mannitol(anaerobic)	+	-	-	-
Hemolysins	+	+	-	±
Acetoin production	+	-	-	-

หมายเหตุ + มี - ไม่มี ± ไม่แน่นอน

S. aureus เป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญหลายชนิดของมนุษย์ เช่น toxic shock syndrome toxin, epidermolytic toxin, membrane-damaging toxin, Staphylococcal enterotoxin แบคทีเรียชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food – borne illness) เนื่องจาก *S. aureus* สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ได้หลายชนิดซึ่งเรียกว่า Staphylococcal enterotoxins (SEs) ซึ่งเอนเทอโรทอกซิน เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี ทำให้อาหารเป็นพิษ เอนเทอโรทอกซินที่ผลิต โดยแบคทีเรียนี้มีหลายชนิด แต่ชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษบ่อย คือ ชนิดเอและดี โดยช่วงอุณหภูมิที่แบคทีเรียชนิดนี้จะผลิตเอนเทอโรทอกซิน ได้อยู่ระหว่าง 15.6 - 46.1 องศาเซลเซียส และผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Tranter และ Brehm, 1990)

Staphylococcal enterotoxins (SEs) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. Classical SEs ซึ่งแบ่งเป็น 5 กลุ่มตามหลักทาง serological types (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) ตามสมบัติความเป็นแอนติเจน

2. New SEs เอนเทอโรทอกซินกลุ่มนี้เริ่มมีการแบ่งเมื่อไม่นานมานี้ เช่น SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIU and SEIV และ SE-like toxins (Omoe และคณะ, 2002, Omoe และคณะ, 2003; Lina และคณะ, 2004;Thomas และคณะ, 2006)

มีการศึกษาลักษณะของเอนเทอโรทอกซิน และมีการผลิตเป็นโปรตีนบริสุทธิ์แล้วทั้งหมด 7 ชนิด คือ entrotoxins A (SEA), B (SEB) (Casman และ Bennett, 1963), C (SEC) (Bergdoll ,1983), D (SED) (Casman และคณะ, 1995), E (SEE) (Bergdoll และคณะ,1967),G (SEG) (Munson และคณะ,1998) และ H (SEH) (Su และ Wong, 1998) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น superantigens เพราะสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดที (T-cell) อย่างไม่จำเพาะ ซึ่งโครงสร้างหลักของเอนเทอโรทอกซินจะมี cystine loop อยู่ตรงกลางของโมเลกุล ทำให้โมเลกุลเสถียรและทนต่อการย่อยของเอนไซม์โปรตี-เอส การระบาดส่วนใหญ่จะเป็น เอนเทอโรทอกซินชนิดเอ (SEA) ซึ่งเป็นทอกซินชนิดที่พบว่าเป็นสาเหตุอาหารเป็นพิษมากที่สุดในสหรัฐอเมริกา (Balaban และ Rasooly, 2000) และเอนเทอโรทอกซินชนิดดี (SED) เอนเทอโรทอกซินชนิดเอ (SEA) มีสมบัติทนต่อความร้อน สามารถละลายน้ำได้ เป็น single-chain globular proteins ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 28,000-35,000 ดาลตัน เอนเทอโรทอกซินจะถูกสังเคราะห์ระหว่างการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ในอาหาร ซึ่ง เอนเทอโรทอกซินชนิดเอ (SEA) จะถูกหลั่งในช่วง

logarithmic phase ขณะที่ SEB และ SEC จะถูกหลั่งในช่วง late logarithmic (early stationary phase) เอนเทอโรทอกซินชนิดเอ มียีนประมวลรหัส 771 เบส ถอดรหัสเป็นอะมิโนแอซิด 257 ชนิด (Bergdoll, 1983) สามารถทนต่อความร้อนได้ที่ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที และทนต่อเอนไซม์ในกระเพาะอาหารได้ การทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษ (food – borne illness) พบว่าจะเกิดเมื่อ *S. aureus* เจริญในอาหารที่มีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต โดย เอนเทอโรทอกซิน อาจมีผลไปกระตุ้นศูนย์กลางการอาเจียนที่ระบบประสาทส่วนกลาง และไปยับยั้งการดูดน้ำกลับจากลำไส้ จึงทำให้ขับถ่ายของเหลวออกมา

รูปที่ 2.2 แสดง Cystine loop ของเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* (Bergdoll, 1983)

2.2 **พยาธิสภาพ** (Pathogenicity)

กลไกการทำงานของเอนเทอโรทอกซิน คือจะไปรบกวนการทำงานของเซลล์ และแมคโครฟาจ นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางที่สมองโดยการส่งสัญญาณประสาทผ่านลำไส้ทำให้เกิดอาการปวดท้อง อาเจียน ท้องร่วง อาจมีอาการเหงื่อออกและปวดศีรษะแต่มักไม่มีไข้ (Riemann และ Cliver, 2005) โดยอาหารที่มีเอนเทอโรทอกซินปนเปื้อนมักมีกลิ่น รส และสภาพอาหารเป็นปกติ จึงทำให้ผู้บริโภคไม่ได้สนใจว่าอาหารดังกล่าวอาจมีเอนเทอโรทอกซิน ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

2.3 อาการของโรค

การเกิดโรคอาหารเป็นพิษ *Staphylococcus aureus* food poisoning เกิดอาการขึ้นหลังจากรับประทานอาหารที่ มีการปนเปื้อนของเอนเทอโรทอกซิน เป็นเวลา 30 นาที – 7 ชั่วโมง (ส่วนใหญ่ประมาณ 2-4 ชั่วโมง) มีรายงานเกี่ยวกับ ปริมาณการปนเปื้อนของ แบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้น ในอาหารที่มีปริมาณเอนเทอโรทอกซินต่ำสุดที่ทำให้ก่อให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษอยู่ที่ 20-100 นาโนกรัม หรือ มีรายงานว่าการที่ผู้บริโภคจะเกิดอาการ อาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* จะต้องรับประทานสารพิษมากพอในช่วง 0.1-1 ไมโครกรัมต่ออาหาร 100 กรัม โดยมีปริมาณ *S. aureus* ประมาณ $1.0x10^5$ – $1.0x10^6$ โคโลนีต่อกรัม (Doyle, 1989; Jay, 1992) โรคอาหารเป็นพิษ เป็นสาเหตุของอาการ gastroenteritis คือ อาการผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร มีอาการปวดท้อง ท้องเสีย ถ่ายอุจจาระเหลวและบ่อย นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้อง อ่อนเพลีย และอาจจะมีอาการไข้ร่วมด้วย ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน หลายรายจะมีอาการปวดหัว เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะ ๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน

2.4 ระบาดวิทยา

การระบาดของ *S. aureus* พบได้ทั่วโลก และการระบาดมักเกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการรับประทานอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียและ เอนเทอโรทอกซิน เกิดการระบาดครั้งใหญ่ในอเมริกา เด็ก 1364 คนป่วยเป็นโรคอาหารเป็นพิษหลังจากรับประทานสลัดไก่ (Holmberg, และ Blake, 1984) ในปี1976 บราซิลมีการระบาดเนื่องจากรับประทานเนยแข็ง (Kluytmans, Belkum และ Verbrugh, 1997) ในปี 1990 พบว่ามีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย เนื่องจากการบริโภค เอแคลร์ และในญี่ปุ่นปี 1999 มีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากการรับประทานข้าวปั้น (Bennett, 1992)

สาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การใช้ความเย็นในการเก็บรักษาอาหารไม่เพียงพอ การเตรียมอาหารล่วงหน้านานเกินไป การใช้อุณหภูมิในการอุ่นอาหารและการทำให้อาหารสุกไม่ถูกต้อง หรือ บุคลากรที่มี *S.aureus* อยู่ตามร่างกาย มีพฤติกรรมอนามัยไม่เหมาะสมกับหน้าที่สัมผัสกับอาหาร ก็มีโอกาสทำให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนและผลิตเอนเทอโรทอกซินได้

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536) ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร ดังนี้

1. อาหารดิบ หมายถึง อาหารที่ยังบริโภคไม่ได้ต้องผ่านกระบวนการทำให้สุกก่อน ได้แก่ นมดิบ ปลาหมึกแห้ง ไก่ดิบ เป็นต้น ควรพบ *S. aureus* น้อยกว่า 200 CFUต่อกรัมอาหาร

2. อาหารที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ เช่น ปลา กุ้ง หอย เป็นต้น ควรพบ *S. aureus* ต่อกรัม น้อยกว่า 100 CFUต่อกรัมอาหาร

3. อาหารปรุงสุกทั่วไป ได้แก่ อาหารปรุงสำเร็จ ไส้กรอก แฮม นมที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ ขนม เป็นต้น ควรพบ *S. aureus* ต่อกรัม น้อยกว่า 100 CFUต่อกรัมอาหาร

4. อาหารปรุงสุกแล้วแช่เย็น ต้องอุ่นก่อนบริโภค ได้แก่ พิซซ่า ขนมจีบ ซาลาเปา เป็นต้น ควรพบ *S. aureus* น้อยกว่า 100 CFUต่อกรัมอาหาร (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536)

2.5 การตรวจวินิจฉัย

เนื่องจาก *S. aureus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์และความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยวิธีมาตรฐาน ที่ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วโลกและนิยมใช้เป็นวิธีอ้างอิง การตรวจวิเคราะห์สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.5.1 การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (Convention identification method)

การวิเคราะห์แบคทีเรีย *Staphylococcus* ชนิดต่างๆใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี ในการตรวจวิเคราะห์ จำแนก และระบุชนิดของแบคทีเรีย คือวิธี Direct Plate Count Method และ Most Probable Number Method แต่มีข้อเสียคือใช้ เวลานาน (Bennett, 1998) วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและมีราคาไม่แพง ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการตรวจแบคทีเรียในตัวอย่างอาหาร แต่เป็นวิธีที่มีความยุ่งยากซับซ้อน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะหลายชนิดในการตรวจสอบ อีกทั้งใช้ระยะเวลานานในการทดสอบ จึงมักไม่นิยมทำในห้องปฏิบัติการเพราะเสียเวลาและค่าใช้จ่าย การตรวจวินิจฉัย เช่น การตรวจลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง ความต้องการออกซิเจน การย่อยสลายของเม็ดเลือดแดง การสร้าง acetoin การทดสอบความไวต่อ lysostaphin การสร้างเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (thermostable endonuclease) และการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส

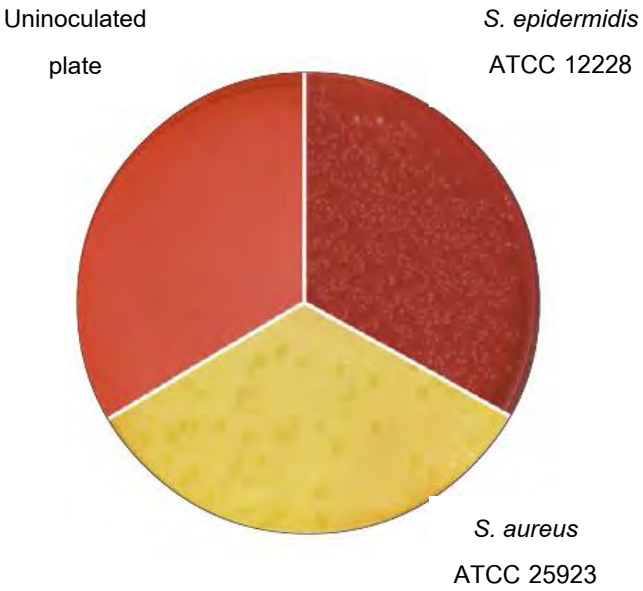
การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ด้วยวิธีมาตรฐาน ที่นิยมใช้ทั่วไปมีดังนี้

- ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง

1.ลักษณะโคโลนีบน Blood Agar

ลักษณะเฉพาะ คือ โคโลนีสีเหลือง กลม นูน เมื่อมีขนาดใหญ่ขึ้น รอบโคโลนีจะเห็นเป็นลักษณะใสเนื่องจากมีการย่อยสลายของเม็ดเลือดแดงแบบ beta-hemolysis (Frenay, Bunschoten, และ Schouls, 1996)

2.การทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแมนนิทอลซอลท์ การใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแมนนิทอลซอลท์ (MSA) เป็นอาหารประเภท selective medium เนื่องจากประกอบด้วย เกลือเข้มข้น 7.5% เพราะฉะนั้นจุลินทรีย์ที่จะเจริญได้ ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อความเข้มข้นของเกลือดังกล่าวได้ *S. aureus* สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้ เนื่องจาก *S. aureus* สามารถทนภาวะที่มีเกลือสูง บริเวณรอบๆโคโลนีจะเป็นสีเหลือง เนื่องจากส่วน ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ประกอบด้วยน้ำตาลแมนนิทอล ซึ่งถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทำให้เกิดกรด ซึ่งกรดจะส่งผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ ฟีนอลเรด เปลี่ยนจากสีแดง เป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 2.3



รูปที่2.3 การเจริญของ *S.aurues* เปรียบเทียบกับ *S.epidermidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแมนนิทอลซอลท์ (MSA)

แหล่งที่มา: www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Mannitol_Salt_Agar.pdf

3.การทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Baird-Parker (ประกอบด้วย egg yolk และ tellurite) (BPA) เป็นอาหารประเภท Selective medium ประกอบด้วยโซเดียมไพรูเวต ที่กระตุ้นการเจริญของ *S. aureus* และป้องกันการถูกทำลายเซลล์ และประกอบด้วย Egg yolk emulsion ที่ช่วยในการตรวจสอบ organisms นอกจากนี้ยังมี ไกลซีน ลิเทียม และ tellurite ซึ่งช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยจะไม่ยับยั้ง *S. aureus* เนื่องจาก *S. aureus* สามารถรีดิวซ์ tellurite ได้ ทำให้มีโคโลนีสีเทาดำ และยังเกิดโซนใสรอบๆโคโลนี เนื่องจาก Proteolytic activity บน egg yolk

- การตรวจวิเคราะห์

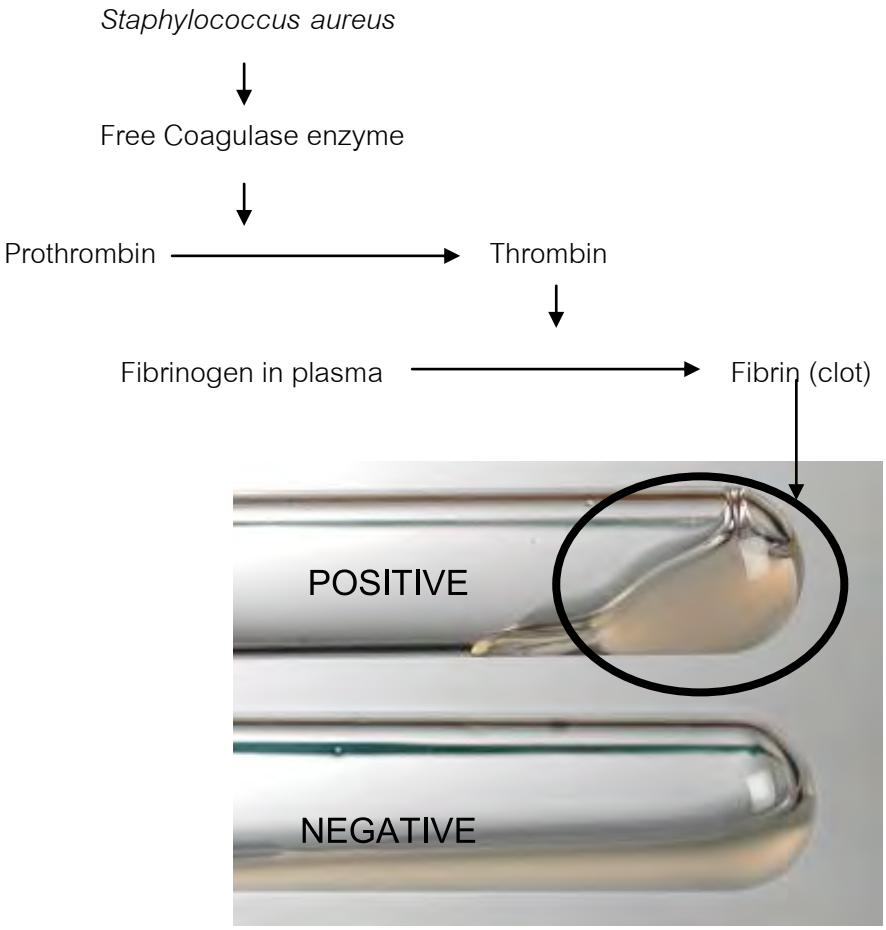
หลังจากการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยมีความถูกต้องแม่นยำ จึงต้องทำการตรวจยืนยัน โดยนำโคโลนีที่สงสัยมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญดังนี้

1. การทดสอบคาตาเลส (Catalase)

แบคทีเรียกลุ่ม Micrococci และ Staphylococci สามารถสร้างเอนไซม์ค าตาเลส ซึ่งสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปเป็นน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) Micrococci และ Staphylococci จะสร้างเอนไซม์ ค าตาเลส ในขณะที่แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ค าตาเลสได้ การตรวจสอบหาเอนไซม์คาตาเลสทำได้โดยหยด 3% Hydrogen peroxide ลงไปทำปฏิกิริยา และจะเกิดฟองแก๊สออกซิเจนขึ้นทันที

2. การทดสอบโคแอกกูเลส (Coagulase)

เนื่องจากลักษณะการสร้างโคแอกกูเลส เป็นลักษณะสำคัญที่สามารถแยกได้ระหว่างเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค ใน Genus *Staphylococcus* แบคทีเรีย ก่อโรคคือ *S. aureus* ซึ่งมีความสามารถในการสร้างโคแอกกูเลส (coagulase) ยิ่งสร้างโคแอกกูเลสนี้จะทำให้พลาสมาแข็งตัว ทำให้เม็ดเลือดขาวไม่สามารถจำกัดแบคทีเรียได้ เอนไซม์จะไปจับกับ coagulase reacting factor (CRF) ในพลาสมาทำให้โปรทรอมบิน (prothrombin) เปลี่ยนไปเป็นทรอมบิน (thrombin) และไฟบริโนเจน (fibrinogen) เป็น ไฟบริน (fibrin) ทำให้พลาสมาแข็งตัว (Bennett , 1998) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การแข็งตัวของพลาสมาโดยเอนไซม์โคแอกกูเลสของ *S.aureus*
แหล่งที่มา: www.medtechzone.com/data/bac/coagulase.php

3. การทดสอบ Thermostable endonuclease test (TNase)

เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ DNase ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็น Thermostable endonuclease โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาเจาะหลุม จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว มาต้มให้เดือดนาน 15 นาที หยอดเชื้อที่ต้มแล้วลงในหลุมที่เจาะไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งผลบวกคือ อาหารเลี้ยงเชื้อรอบหลุมจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู ซึ่งแสดงถึงมีการย่อยสลายดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ Thermostable endonuclease ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ดีเอ็นเอ เมื่อราดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง จะเห็นโซนของดีเอ็นเอที่ถูกไฮโดรไลซ์ เป็นโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย (Bennett, 1998)

2.5.2 การวิเคราะห์เอนเทอโรทอกซิน

วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจเอนเทอโรทอกซินในอาหารนั้นจะใช้วิธีการทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นวิธีที่อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยให้ enterotoxingenic strains *S. aureus* ผลิตเอนเทอโรทอกซินออกมานำไปทำให้บริสุทธิ์และทำการทดสอบกับแอนติบอดี (antibodies) ที่มีความจำเพาะต่อเอนเทอโรทอกซินชนิดนั้นๆ โดยเริ่มแรกนิยมใช้วิธี gel diffusion และ double gel diffusion (Bannerman, Hancock และ Tenover, 1995) แต่วิธีเหล่านี้จำเป็นต้องสกัดเอนเทอโรทอกซินให้บริสุทธิ์ จึงสามารถจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะได้ ต่อมาพัฒนามาใช้วิธี Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) (Fujikawa และ Igarashi, 1988) และ Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Park, Akhtar และ Rayman, 1993) ตรวจเอนเทอโรทอกซิน ของ *S. aureus* ในอาหาร ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยไปอย่างมากโดยจัดทำ เป็นชุดตรวจสำเร็จรูป ELISA (Chang และ Huang, 1994) สำหรับตรวจเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในอาหาร ชุดตรวจสำเร็จรูป RPLA (Chang และ Huang, 1993) (Atanassova และคณะ 2001) แต่การตรวจวินิจฉัยดังกล่าวก็ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้เวลานาน ในการผลิตเอนเทอโรทอกซิน และไม่สามารถตรวจเอนเทอโรทอกซินได้ทุกชนิด และยากที่จะผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบได้ และต้องมีความบริสุทธิ์สูง จึงได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว แม่นยำ มีความจำเพาะ และมีความไวในการตรวจสูง

2.5.3 วิธีการตรวจวินิจฉัยแบบรวดเร็ว (Rapid identification methods)

เนื่องจากการตรวจหาเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ค่อนข้างยุ่งยากเนื่องจากต้องให้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวผลิตทอกซินที่เป็นโปรตีนออกมาก่อนถึงจะทำการตรวจสอบได้และยังมีความจำเพาะต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วเพื่อเพิ่มความไว และความจำเพาะ ในขณะเดียวกันก็ลดปริมาณงาน และเวลาที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัย (Fang และ Hedin, 2003) วิธีการส่วนใหญ่อาศัยหลักการทางอณูชีววิทยา เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เป็นเทคนิคทางโมเลกุลที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อระบุชนิดแบคทีเรียหรือตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร (Ercolini และคณะ, 2004)

งานวิจัยที่ผ่านมา Atanassova และคณะ (2001) ตรวจ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินในแฮมรมควัน เนื้อหมู และอาหารพร้อมรับประทาน โดยใช้วิธีมาตรฐานในการ

ตรวจเอนเทอโรทอกซินชนิดต่างๆในอาหารดังกล่าว (classical culturing detection) เปรียบเทียบกับวิธี PCR พบว่าจากตัวอย่างอาหาร 135 ตัวอย่างวิธี PCR ตรวจได้ 34.8 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด ในขณะที่วิธี มาตรฐานคือใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (SET-RPLA) ตรวจได้ 28.6 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด ดังนั้นวิธี PCR จึงมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีมาตรฐาน เนื่องจากมีความไวในการตรวจมากกว่า

Cremonesi และคณะ(2005) ได้พัฒนาวิธี PCR ให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้นโดยการใช้ไพรเมอร์หลายคู่ ทำให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายต่างๆที่มีความสำคัญ ในการตรวจเพียงครั้งเดียว คือ วิธี Multiplex-PCR ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ 11 ชุดในการตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดต่างๆ ของ *S. aureus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์จากนม เปรียบเทียบกับการใช้ชุดทดสอบ ตรวจสำเร็จรูป ELISA และ ชุดตรวจสำเร็จรูป (SET-RPLA) พบว่าวิธี Multiplex-PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินได้ทั้ง Classical SEs และ New SEs แต่ขณะที่การตรวจโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปมีข้อจำกัดคือตรวจได้เฉพาะ Classical SEs ใช้เวลานานในการตรวจสอบ เกิดปฏิกิริยาข้ามและผลบวกปลอม

Nakayama และคณะ(2006) ใช้วิธี real-time PCR ตรวจยีนเอนเทอโรทอกซิน 8 ชนิด ในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ ที่มีเซลล์ *S. aureus* ตั้งแต่ 10 – 10^6 CFU/มิลลิลิตร พบว่าวิธีนี้มีความไวในการตรวจสูงคือตรวจได้ 1.1×10^2 – 1.0×10^4 CFU/มิลลิลิตร แต่มีราคาแพงในการตรวจสอบ และต้องอาศัยนักเทคนิคที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน

Rall และคณะ(2008) ใช้วิธี PCR ตรวจ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำนมดิบ น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดต่างๆทั้ง Classical SEs และ New SEs ทั้งหมด 9 คู่ (*sea*, *seb, sec*, *sed*, s*ee*, *seg*, *seh*, *sei,* และ*sej*) พบยีนเอนเทอโรทอกซินทั้งหมด 38 ตัวอย่างคิดเป็น 70.4 เปอร์เซ็นต์จากน้ำนมดิบ 54 ตัวอย่าง น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ พบยีนเอนเทอโรทอกซิน ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยในน้ำนมมดิบที่ตรวจ มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมากกว่า 8.9×10^5 CFU/มิลลิลิตร น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ มีเซลล์ประมาณ 8.7×10^3 CFU/มิลลิลิตรผลการทดลองพบยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอบ่อยที่สุด ใน *S. aureus* และบางสายพันธุ์มียีนเอนเทอโรทอกซินมากกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้นวิธี PCR จึงเหมาะเป็นวิธีในการตรวจเบื้องต้น พบว่ามียีนเอนเทอโรทอกซินชนิดใหม่เพิ่มขึ้นใน *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนม

Lin และคณะ (2009) ได้ใช้วิธี chromogenic macroarray ตรวจยีนเอนเทอโรทอกซิน A, B, C, D, E, C และ G ของ *S. aureus* ในเนื้อ และนม ออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุดและติดฉลากด้วยไบโอตินเพื่อเพิ่มจำนวนยีนเอนเทอโรทอกซิน ด้วยวิธี PCR จากนั้นนำไปไฮรบริไดซ์กับ SE gene-specific probes ที่จับอยู่บน nitrocellulose membrane ผลการทดลอง ตรวจยีนของ

*S. aureus*ได้ในช่วง 10 –10^4 CFU/กรัม หรือ มิลลิลิตร แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์ถึง 12 ชั่วโมงจึงจะตรวจพบได้

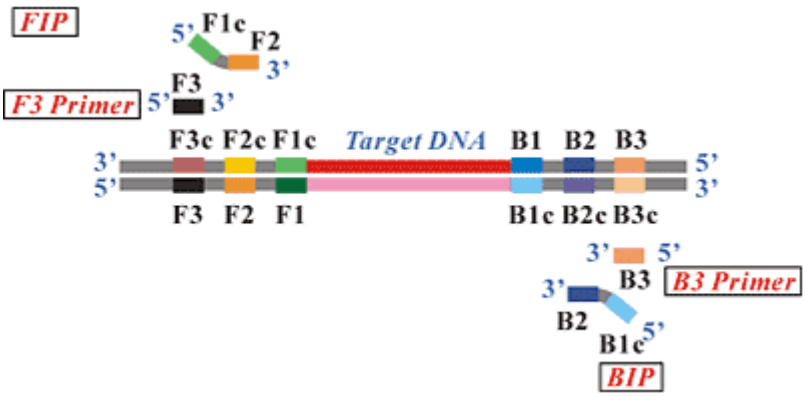
จากงานวิจัยที่กล่าวมาวิธีการที่ใช้หลักทางอณูชีววิทยานี้ ต้องทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสที่สนใจก่อนจึงสามารถออกแบบไพรเมอร์ไปใช้ในปฏิกิริยา งานวิจัยนี้จึงต้องทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสของเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอได้ เพื่อใช้ในการตรวจ enterotoxinegenic *S. aureus* ในปี 1991 Johnson และคณะ ได้ออกแบบไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อเอนเทอโรทอกซินยีน ทั้งสี่ชนิด คือ *sea, seb, sec* และ *sed* เพื่อตรวจหายีนทอกซินชนิดต่างๆที่ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆสร้างขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ไพรเมอร์สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ Johnson และคณะ (1991)สำหรับปฏิกิริยา PCR

วิธี PCR จึงเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และมีความไวสูง แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ต้องอาศัยนักเทคนิคที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน มีราคาสูงในการตรวจสอบ และมีหลายขั้นตอนในการดำเนินการ ทั้งการสกัดตัวอย่าง การเพิ่มจำนวนรหัสพันธุกรรม และการตรวจสอบผล นอกจากนี้ความไวที่สูงของเทคนิค PCR อาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false-positive) อันเนื่องมาจากการตรวจสอบเซลล์ที่ตายแล้วหรือการมีลำดับเบสเป้าหมายที่เหมือนกันของแบคทีเรียชนิดอื่น (Lazcka และคณะ, 2007) อีกทั้งสารบางอย่างที่มีอยู่ในตัวอย่างตรวจสอบอาจไปขัดขวางหรือลดประสิทธิภาพในการเพิ่มรหัสพันธุกรรมของเทคนิค PCR จึงทำให้เกิดผลลบปลอม (false-negative) ได้ (Lantz และคณะ, 2000)

2.5.4 เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจหานิวคลีโอไทด์ใหม่เกิดขึ้น ได้แก่ เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi และคณะ, 2000) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิค (DNA) ตรงบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่สนใจ โดยอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยา auto-cycling stand displacement ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ทำให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอที่อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว 60 องศาเซลเซียส ถึง 65 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ได้มาก ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน กรดนิวคลีอิค (DNA) ด้วยเทคนิค LAMP ใช้ไพรเมอร์ 4 สาย ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมาย 6 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยที่ไพรเมอร์ Forward Inner Primer (FIP) และ Backward Inner Primer (FIP) ประกอบด้วยสองบริเวณคือ F1c F2 และ B1c B2 ตามลำดับ ซึ่งมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบโดยช่วย

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลักษณะเป็น loop ตรงส่วนปลายของยีนที่ไพรเมอร์ไปเกาะไพรเมอร์ Forward Outer Primer (F3) และ Backward Outer Primer (B3) ช่วยสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในลักษณะที่แทรกตัวส่งผลให้สายดีเอ็นเอที่เกิดจากการสังเคราะห์ จาก ไพรเมอร์ FIP และ BIP เกิดการ denature หลุดออกจากดีเอ็นเอต้นแบบ



รูปที่ 2.5 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ทั้งหมดในปฏิกิริยา LAMP (http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html)

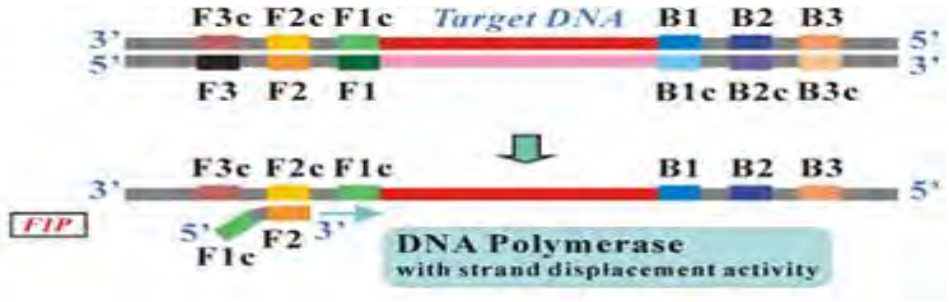
ปฏิกิริยา LAMP จะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นมากไม่เกิน 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้จากความขุ่น ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวขึ้นในสารละลาย (Mori และคณะ, 2001) ดังสมการ

$$(DNA)_{n-1} + dNTP \longrightarrow (DNA)_n + P_2O_7^{4-}P_2O_7^{4-} + 2Mg^{2+} \longrightarrow Mg_2P_2O_7$$

การตกตะกอนที่เกิดขึ้นนี้นับ เป็นข้อได้เปรียบของปฏิกิริยา LAMP กล่าวคือ ความขุ่นที่เกิดขึ้นเป็นตัวชี้ให้เห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เนื่องจากไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง มีความจำเพาะมีความไวสูง และไม่ต้องใช้เวลานานในการทดสอบ จึงสามารถพัฒนาเป็น การตรวจวัดแบบง่าย ซึ่งจะมุ่งเน้นให้มีราคาถูกและสามารถพกพาได้สะดวก

หลักการทำงานของ ปฏิกิริยา LAMP

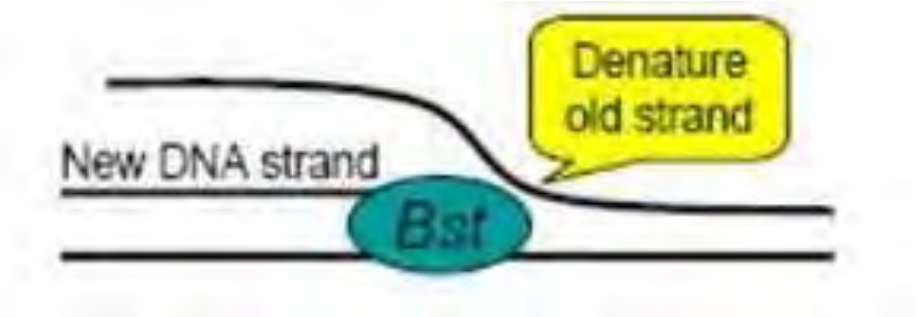
ดีเอ็นเอเป้าหมายของปฏิกิริยา LAMP จะเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double strand DNA) ซึ่งถ้าเป็น PCR จะต้องนำมา denature ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single strand DNA) ก่อน เนื่องจากในปฏิกิริยาของ LAMP นั้นเราใช้สาร Betaine ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้สายดีเอ็นเอสายคู่นั้นจะจับตัวกันอย่างหลวมๆ (Ohtsuka, Yanagawa, Takatori, และ Hara-Kudo, 2005) ซึ่งจากสาเหตุนี้เองทำให้เราสามารถที่จะใช้ อุณหภูมิเดียวได้ทั้งปฏิกิริยา และจากการที่ ดีเอ็นเอแม่แบบจับตัวกันหลวมๆ ทำให้ Forward Inner Primer (FIP) ซึ่งประกอบด้วย บริเวณ F1c และ F2 นั้นสามารถแทรกตัวเข้าจับกับบริเวณที่ Complementary คือ บริเวณ F2c ได้ ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ไพรเมอร์ FIP จับกับ ดีเอ็นเอเป้าหมายและเกิดการการจำลองตัว

และ *Bst* DNA Polymerase เข้าทำปฏิกิริยา และ เกิดการจำลองตัวจาก 5'→3' เป็นสายดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งสายนี้จะเป็นการ denature ทำให้สายดีเอ็นเอ ที่เป็นสายคู่แยกออกจากกัน ดังรูปที่ 2.7

ก.

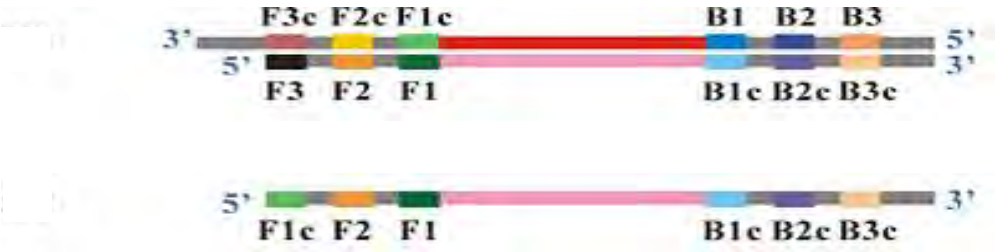


ข.

รูปที่ 2.7 *Bst* DNA Polymerase เข้าทำปฏิกิริยา จะเกิดการการจำลองตัวดีเอ็นเอสายใหม่ ส่งผลให้ดีเอ็นเอสายเก่าหลุดออก (ก.) และหลังจากที่ FIP จำลองตัวเสร็จสมบูรณ์ (ข.)

จาก รูปที่ 2.7 จะสังเกตเห็นว่าบริเวณ F1c ของไพรเมอร์ FIP นั้นเป็นปลายเปิด ส่งผลให้ไพรเมอร์ F3 ซึ่งประกอบด้วย บริเวณ F3 ซึ่ง Complementary กับบริเวณ F3c จะจับกัน ดังรูปที่ 2.8 และเกิดการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป ดังรูปที่ 2.9

รูปที่ 2.8 ไพรเมอร์ F3 จะแทรกตัวบริเวณปลายเปิด และเกิดการจำลองตัว



รูปที่ 2.9 หลังจากที่ ไพรเมอร์ F3 ทำให้มีการจำลองตัวดีเอ็นเอสายใหม่เสร็จสมบูรณ์ ดีเอ็นเอสายนี้ จะทำให้สายดีเอ็นเอ ที่เกิดการจำลองตัวจากไพรเมอร์ FIP หลุดออก ดังรูปที่ 2.10

รูปที่ 2.10 ดีเอ็นเอที่เกิดการจำลองตัวจากไพรเมอร์ FIP หลุดออก

จากรูปที่ 2.10 สายดีเอ็นเอที่เกิดการจำลองตัวจากไพรเมอร์ FIP หลุดออก ทำให้กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว แต่เนื่องจาก ที่ปลาย 5' ของสายดีเอ็นเอนั้น บริเวณ F1c กับ F1 นั้น มีลำดับเบสคู่สมกัน (Complementary) เพราะฉะนั้น 2 บริเวณนี้จะมาจับกัน ทำให้เกิดสายดีเอ็นเอ ที่มีลักษณะเป็นลูป (loop) ดังรูปที่ 2.11

รูปที่ 2.11 ไพรเมอร์ BIP จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว บริเวณที่คู่สมกันและเกิดการจำลองตัว

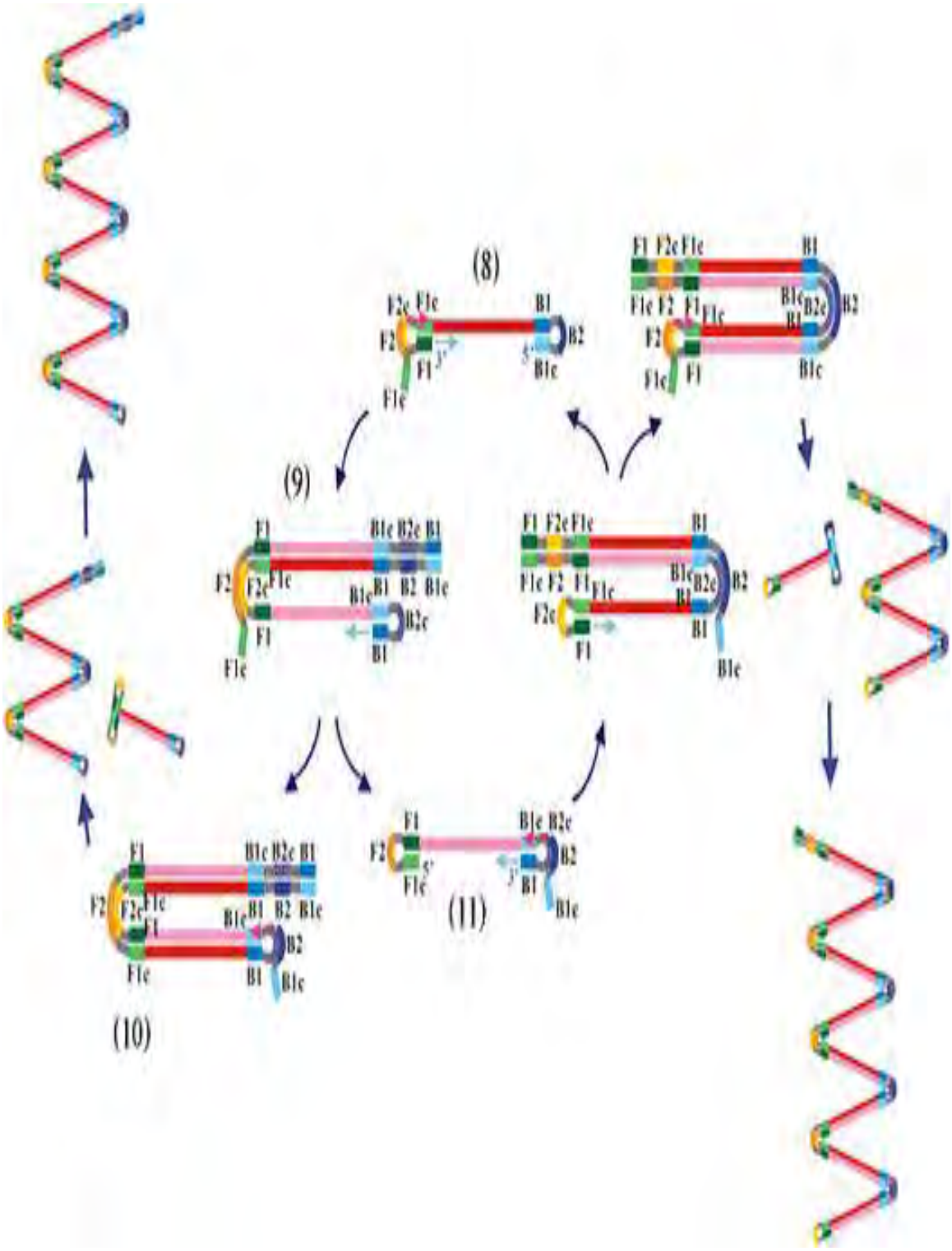
หลังจากนั้นไพรเมอร์ Backward Inner Primer (BIP) ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ B2 และ B1c ซึ่ง บริเวณ B2 ของไพรเมอร์ BIP จะComplementary กับบริเวณ B2c ของสายดีเอ็นเอที่เป็นลูป ทำให้เกิดการการจำลองตัว จาก 5'→3' เป็นสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ ซึ่งจะเป็นการ denature loop ที่เกิดจากการจับกันของ บริเวณ F1C กับ F1 ดังรูปที่ 2.13 และเนื่องจากบริเวณไพรเมอร์ B1c ของ BIP นั้น เป็นปลายเปิดทำให้ ไพรเมอร์ B3 ซึ่งประกอบด้วย บริเวณ B3 ซึ่ง Complementary กับบริเวณ B3c จะจับกัน และจะเกิดการการจำลองตัวต่อไปดังรูป 2.12

ดังรูปที่ 2.12 หลังจากไพรเมอร์ B3 จำลองตัวเสร็จสมบูรณ์

ซึ่งจะเป็นการทำให้สายดีเอ็นเอที่จำลองตัวจากไพรเมอร์ BIP ให้หลุดออกดังรูปที่ 2.13 และบริเวณที่ Complementary กันจะมาจับกัน ทำให้เห็นเป็นลักษณะของลูป 2 ลูป ซึ่งมีลักษณะคล้าย dumbbell ดังรูป

รูปที่ 2.13 ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ไพรเมอร์ BIP จำลองตัว ซึ่งถูกไพรเมอร์ B3 denature ออก ซึ่งมีรูปร่างคล้าย dumbbell

ซึ่งสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้าย dumbbell จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการจำลองตัวต่อไปของปฏิกิริยา LAMP cycle ซึ่ง ผลสุดท้ายจะได้ ดีเอ็นเอที่มีความยาวของสาย DNA fragment ที่ไม่เท่ากันมากมาย ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา LAMP

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

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร และการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ เช่น Song และคณะ (2005) ใช้เทคนิค LAMP ตรวจสอบแบคทีเรีย *Shigella* และ Enteroinvasive *E. coli* โดยการตรวจสอบยีน *ipa*H ที่มีในแบคทีเรียทั้งสองชนิด จากเสมหะ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบยีนดังกล่าวได้ภายในเวลา 2 ชั่วโมง โดย ตรวจพบแบคทีเรีย *Shigella* 6.5 x 10^5 CFU/มิลลิลิตรในตัวอย่างเสมหะ

Hara-Kudo และคณะ (2005) ใช้เทคนิค LAMP ตรวจสอบ แบคทีเรีย *Salmonella enteritidis* ในไข่โดยการใส่เชื้อลงไป ซึ่งสามารถตรวจพบ แบคทีเรียได้ที่ความเจือจาง 10^{-6} CFU/มิลลิลิตร โดยมีเซลล์ 4.34 X 10^2 CFU/มิลลิลิตร และพบว่าเทคนิคนี้มีความจำเพาะเท่ากับเทคนิค PCR แต่มีความไวมากกว่าเทคนิค PCR

Goto และคณะ (2007) ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจสอบยีนเอนเทอโรทอกซิน 4 ชนิดใน *Staphylococcus aureus* พบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินทั้ง 4 ชนิดได้ไวและมีความจำเพาะมากกว่าเทคนิค PCR

Misawa และคณะ (2007) ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจสอบยีน *spa* และ ยีน *mec*A ใน methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) จากวัตถุส่งตรวจทางการแพทย์ เปรียบเทียบกับวิธี duplex real-time polymerase chain reaction (Drt-PCR) พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการทดลองโดยรวมเหมือนกันคือมีความจำเพาะเท่ากัน แต่เทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบยีน *spa* และ ยีน *mec*A ได้ที่ 10^3 และ 10^2 copies ซึ่งมีความไวน้อยกว่าอีกวิธี 10 เท่าแต่วิธี LAMP ตรวจได้เร็วและใช้ค่าใช้จ่ายถูกกว่าวิธี duplex real-time polymerase chain reaction (Drt-PCR)

Yamazaki และคณะ (200 8) ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งโดยการใส่เชื้อลงไป พบว่าสามารถตรวจได้ 5.3 x 10^2 CFU/มิลลิลิตร และตรวจสอบได้เร็วกว่าเทคนิค PCR 10 เท่า

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีรายงานที่ใช้วิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจ *S. aureus* ในอาหาร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธี LAMP เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ในเนื้อหมู เพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในการตรวจแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารและการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- เครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส (Agarose Gel Electrophoresis Apparatus) รุ่น Gelmate 2000 บริษัท Toyobo, Japan
- เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) รุ่น Gene Amp PCR system 2400 ของบริษัท Applied Biosystem, USA
- เครื่องอ่านเจล (Gel Reader) ของบริษัท BioRad, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น J 2-21 ของบริษัท Beckman, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อยแบบตั้งโต๊ะ (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- ตู้นึ่งความดันไอน้ำฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy, Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U356 D ของบริษัท Sanyo, Japan
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cuberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybermatics, Singapore

- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA

- เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ระบบรีเวอร์สออซโมซีส รุ่น Option 3A ของบริษัท Elga, England

- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, USA

- เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, Korea

- เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502-P ของบริษัท PMC, USA

- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P2, P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

- เครื่อง Stomacher ของบริษัท BEC-Thai, Thailand

- ถุง Stomacher ของบริษัท Seward LIMITED,UK

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB 15 ของบริษัท Metrology Technical, Thailand

2. เคมีภัณฑ์

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง Mannital Salt Agar (MSA) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง Baird-Parker Agar (BPA) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- ทริปโตน (Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- สารสกัดจากเนื้อ (Beet extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
- โพแทสเซียมเทลลูไรด์ ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany

เคมีภัณฑ์สำหรับการย้อมสีแกรมและการทดสอบทางชีวเคมี

- คริสตอลไวโอเล็ต ของบริษัท Sigma, USA
- ซาฟรานิน โอ ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
- เกล็ดไอโอดีน ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
- กรดไฮโดรคลอริเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany

เคมีภัณฑ์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และปฏิกิริยาลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน(LAMP)

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
- โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
- ทริสมาเบส (Trisma base ; Tris-Hydroxymetyhl-aminomethane) ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, USA

- 95% เอทานอล ของบริษัท AlcoX

- อีดีทีเอ (EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$. $2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA

- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan

- *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Fermentus, Canada

- *Bst* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, UK

- Betaine ของบริษัท Sigma, USA

- Lysozyme ของบริษัท Sigma, USA

- Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA

- โปรตีเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Qiagen, Germany

- ดีเอ็นทีพี (dNTP; Deoxymucleotidetriphosphate) ของบริษัท Promega, USA

- อะกาโรสเจล (Agarose gel) ของบริษัท Sigma, USA

- 1kb DNA Ladder ของบริษัท Fermentus, Canada

- 100 bp DNA Ladder ของบริษัท Fermentus, Canada

- Triton X-100 ของบริษัท Merck, Darmstadt, Germany

- กลีเซอรอล ของบริษัท Difco Laboratories, USA

3. วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยทั้งหมด ได้รับความอนุเคราะห์จาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ **กระทรวงสาธารณสุข**, **ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล** **และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยสายพันธุ์อ้างอิงของ** *S. aureus* **ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินเอคือ** *Staphylococcus aureus* ATCC 13565

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียชนิดต่างๆ

แบคทีเรีย	แหล่งที่ให้ความอนุเคราะห์
Staphylococcus aureus ATCC 13565 (*sea*)	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
Staphylococcus aureus ATCC 14458	
Staphylococcus aureus ATCC 25923	
Staphylococcus epidermidis ATCC12228	
Streptococcus agalactiae DMST 16992	**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล**
Listeria monocytogenes	
Enterococus faecalis	
Escherichia coli ATCC 25922	
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	
Enterotoxigenic E. coli	
Vibrio parahaemolyticus	
Shigella sonnei	
Micrococcus luteus MSCU0350	**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Yersinia enterocolitica ATCC27729	
Klebsiella pneumoniae	
Salmonella Typhimurium ATCC 13311	
Pseudomonas aeruginosa MSCU0359	
Serratia marcescens	

3.2 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.2.1 เลี้ยงแบคทีเรีย *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ และแบคทีเรียทุกชนิดตามตารางที่ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *S. aureus* ทุกสายพันธุ์และแบคทีเรียทุกชนิดตามตารางที่ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.3.1 นำมาผสมกับกลีเซอรอล ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อกลีเซอรอลเป็น 2:8 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส เป็นเวลาหกเดือน

3.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่าง ๆที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 นำ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ATCC 13565, ATCC 14458 และ ATCC 25923 มาทำให้บริสุทธิ์และนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (TSA) อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเบรด-ปากเกอร์ที่ผสมไข่แดง (BPA) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแมนนิทอลซอลท์ (MSA) สังเกตลักษณะการเจริญและลักษณะของโคโลนี เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง Baird Parker Agar (BPA) ให้ลักษณะโคโลนีสีดำ ล้อมรอบด้วยวงใส และเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mannitol salt agar ซึ่งมีปริมาณเกลือสูง 7.5% และมีน้ำตาลแมนนิทอล เชื้อ *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารนี้และสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้กรด ทำให้โคโลนีเกิดเป็นสีเหลือง

3.3.2 การย้อมติดสีแกรม นำ *S. aureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์และแบคทีเรียชนิดอื่นๆตามตารางที่ 3.1 มาย้อมสีแกรม สำหรับ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆ ทำการทดสอบทางชีวเคมี โดยทดสอบ Catalase test, Coagulse test และ TNase test โดยเฉพาะ *S. aureus* จะติดสีแกรมบวก ให้ผลการทดสอบต่างๆเป็นบวก (Bennett, 1998)

3.4 การสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Reischl และคณะ (2000)

3.4.1 เลี้ยงแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 13565 (SEA) และ แบคทีเรียทุกชนิดตามตารางที่ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าว 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (xg) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเซลล์ไปแขวนลอยในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (ภาคผนวก ข) 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (xg) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำใสที่ได้เป็นส่วนของดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งนำไปตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และปฏิกิริยาลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน (LAMP)

3.5 การเพิ่มจำนวนยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ปฏิกิริยาของ PCR ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่ระบุตาม วิธีของ Johnson และคณะ (1991) 1 µl ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.2 mM dNTPs 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 50 mM KCl 1.5 mM $MgCl_2$ 2.5 U และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

ดำเนินปฏิกิริยา PCR ตามวิธีของ Johnson และคณะ (1991) ดังต่อไปนี้

denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 2 นาที
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 2 นาที
extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 1 นาที
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 7 นาที

ดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Applied Biosystem, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ 35 รอบ ตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟเรซิส (Johnson และคณะ, 1991)

3.6 การเพิ่มจำนวนยีนเอนเทอทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยวิธีปฏิกิริยาลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

ปฏิกิริยาของ LAMP ทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่ระบุตา มวิธีของ Goto และคณะ (2007) 1 µl ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 mM dNTPs 5 M betaine 8 U/µl และเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ดำเนินปฏิกิริยาโดยนำหลอดปฏิกิริยาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส 2 นาทีตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยดูจากความขุ่น และ 2.0% อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟเรซิส

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Loop-mediated isothermal amplification

เลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ของ Goto และคณะ (2007) ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 4 สาย แต่ละสายออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ ยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer Explorer V3 (Fujitsu, Tokyo, Japan) โดยใช้ฐานข้อมูล DNA จาก DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของ LAMP

ไพรเมอร์	Primer sequences (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
FIP	5'-GAT CCA ACT CCT GAA CAG TTA CAA TAC AGT ACC TTT GGA AAC G-3'	Goto และคณะ, 2007
BIP	5'-CTG ATG TTT TTG ATG GGA AGG TTC CCG AAG GTT CTG TAG AAG T-3'	
F3	5'-TCA ATT TAT GGC TAG ACG GT-3'	
B3	5'-CTT GAG CAC CAA ATA AAT CG-3'	

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา PCR และ LAMP

โดยตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดย 1.5% อะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส และผลิตภัณฑ์ LAMP ใช้ 2% อะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (Ramesh, Padmapriya, Chandrashekar, และ Varadaraj, 2002) ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 % และ 2.0% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1x TAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัววางอะกาโรสเจลในแบบพิมพ์ที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1x TAE ให้ท่วมอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมผลิตภัณฑ์ PCR และ LAMP ปริมาณที่เหมาะสมกับสีติดตามความเข้มข้น 6 เท่า (bromophenol blue และ xylene cyanol FF) หยอดสารละลายผสมลงในช่องวิ่งโดยปฏิกิริยา PCR ใช้ 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับปฏิกิริยา LAMP ใช้ 1 Kb DNA ladder (Fermentas,Canada) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซีสด้วยชุดทำอีเลคโทรโฟเรซีส Mini Sub-Cell GT หรือ ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซีส Gel Mate 2000 ใช้ความต่างศักย์ 50 - 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของสีติดตามเคลื่อนที่ลงมาจนเกือบสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และถ่ายภาพด้วยยเครื่องอ่านเจล Gel Documentation (Biorad, USA) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 (Biorad, USA)

3.7 ศึกษาความจำเพาะของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจ ยีนเอนเทอโรทอกซินซนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus*

ศึกษาความจำเพาะของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจ ยีนเอนเทอโรทอกซินซนิดเอของ *S. aureus* โดยนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียต่างๆ ตามข้อ 3.1 มาสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.4 เพื่อเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาทั้งสอง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ตามที่ระบุในข้อ 3.6

3.8 ศึกษาความไวของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินซนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus*

3.8.1 เลือก *S. aureus* ATCC 13565 มาเป็นตัวแทนสำหรับดำเนินการทดลอง โดยเลี้ยง *S. aureus* ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง OD_{600} = 1.5 จากนั้นเจือจางระดับ 10 เท่าตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-9} ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆข้างต้นมาสกัดดีเอ็นเอ ตามข้อ 3.4 ดำเนินปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Loop-mediated isothermal

amplification (LAMP) ตามข้อ 3. 5.และ 3.6 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส และตรวจสอบความขุ่น ที่เกิดจาก magnesium pyrophosphate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ตามที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา

3.8.2 ตรวจนับจำนวนเชื้อโดยวิธี Viable plate count นำเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นคำนวณเป็น CFU ต่อมิลลิลิตร

3.9 ตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยเติม *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมูโดยใช้วิธี PCR และ LAMP เปรียบเทียบกับวิธี มาตรฐานทางจุลชีววิทยาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

3.9.1 นำตัวอย่างเนื้อหมูมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แบ่งเนื้อหมู 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag กลุ่มทดลองเลือกใช้ *S. aureus* ATCC 13565 เป็นตัวแทน กลุ่มควบคุมลบ (Negative control) ใช้น้ำกลั่นแทนการใส่เชื้อ เลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 13565 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และนำมาเจือจางใน NSS ด้วยวิธี serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 10^9 CFU จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเจือจางแล้วข้างต้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในเนื้อหมู 25 กรัม ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^6 CFU ต่อกรัม เติมลงในตัวอย่างเนื้อหมูที่เตรียมไว้ และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีผสมให้เข้ากันด้วย stomacher ของบริษัท BEC-Thai เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง

เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.5.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทดสอบโดยใช้วิธี PCR และ LAMP เปรียบเทียบกับวิธีเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

3.9.2 ตรวจจุลินทรีย์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบทั่วไป (conventional method)

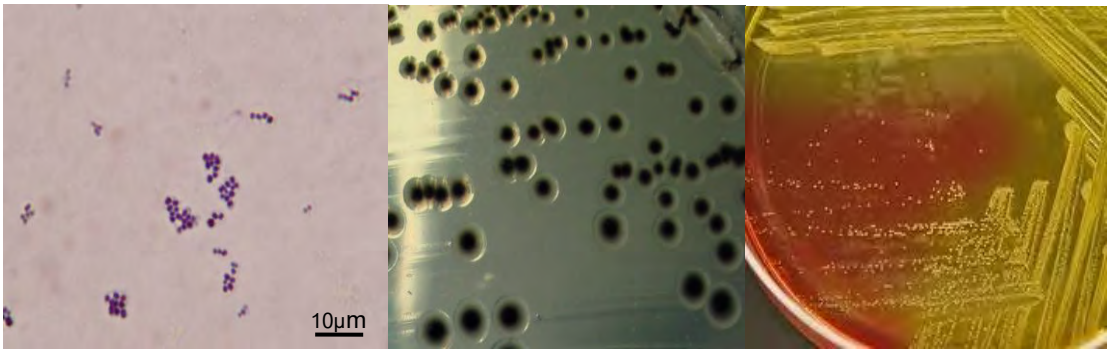
เก็บตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดตัวอย่างในหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PCA และ BPA บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PCA และ BPA ตามลำดับ และนำโคโลนีสีดำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเชื้อนำมาตรวจสอบหาเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีเดียวกัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่าง ๆที่ใช้ในการทดลอง

เมื่อนำ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ATCC 13565, ATCC 14458 และ ATCC 25923 มาทำให้บริสุทธิ์ และนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (TSA) อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Baird Parker Agar (BPA) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mannitol salt agar (MSA) สังเกตลักษณะการเจริญ ลักษณะของโคโลนี และการติดสีย้อมแกรม พบว่า *S. aureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะกลม (0.5 – 1.0 ไมครอน) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ให้ลักษณะบนอาหาร TSA โคโลนีที่มีสีครีม เหลือง ขนาดเล็ก (0.5 -1 มิลลิเมตร) กลม นูน ขอบเรียบ (Reginald, และ Steven, 2003) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง Baird Parker Agar (BPA) ให้ลักษณะโคโลนีสีดำ ล้อมรอบด้วยวงใส และเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mannitol salt agar ซึ่งมีปริมาณเกลือสูง 7.5% และมีน้ำตาลแมนนิทอล เชื้อ *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารนี้และสามารถใช้ น้ำตาลแมนนิทอลได้ กรด ทำให้โคโลนีเกิดเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4.1) จากนั้นนำแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ได้ไปทดสอบยืนยันโดยใช้ Catalase test, Coagulase test และ TNase test ซึ่งแบคทีเรีย *S. aureus* จะให้ผลบวกให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.1



ก. ข. ค.

รูปที่ 4.1 ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์การติดสีย้อมแกรมของ *S. aureus* ATCC 13565 (กำลังขยาย 1,000X) (ก.) ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เบรด-ปากเกอร์ BPA (ข.) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแมนนิทอลซอลท์ MSA (ค.)

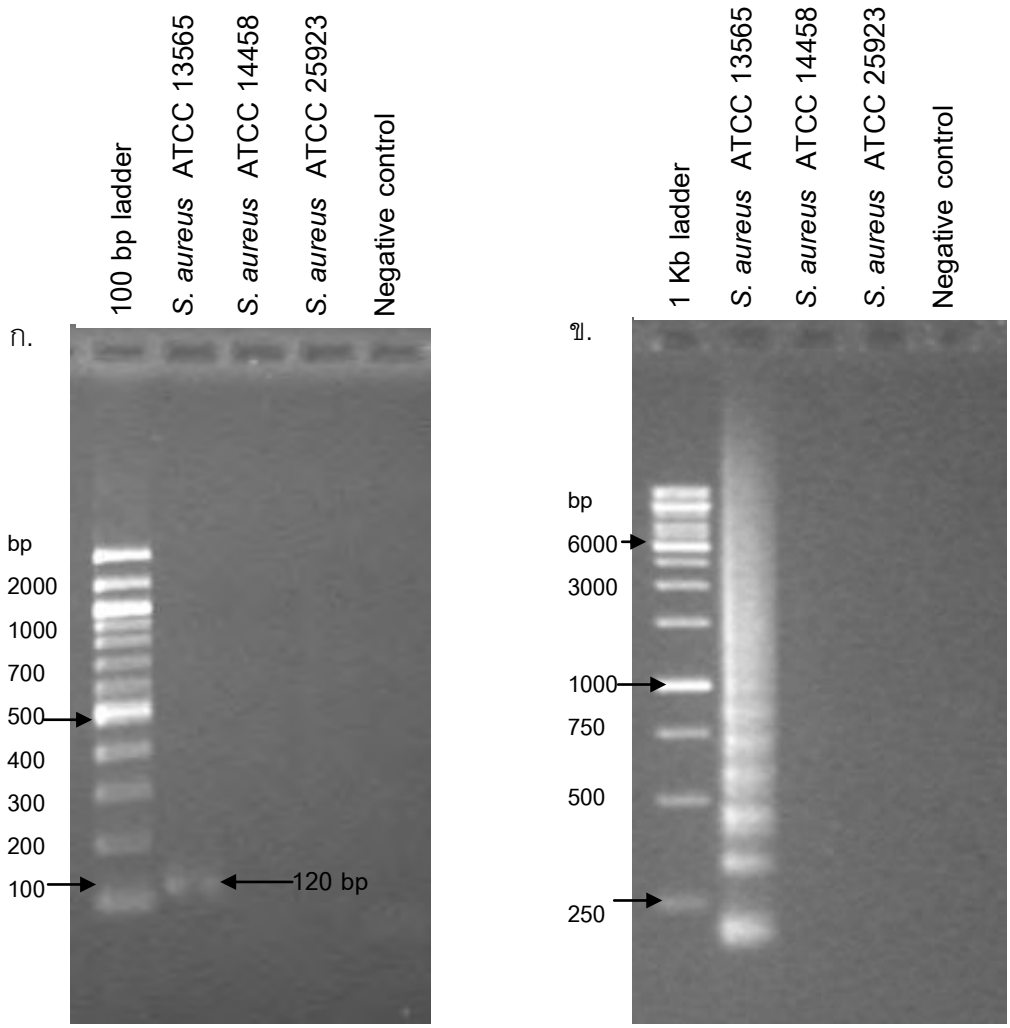
ตารางที่ 4.1 สมบัติทางชีวเคมีของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆ

การทดสอบ	*S. aureus*			*S. epidermidis*
	ATCC 13565	ATCC 14458	ATCC 25923	ATCC 12228
Catalase test	+	+	+	+
Coagulase test	+	+	+	-
TNase test	+	+	+	-

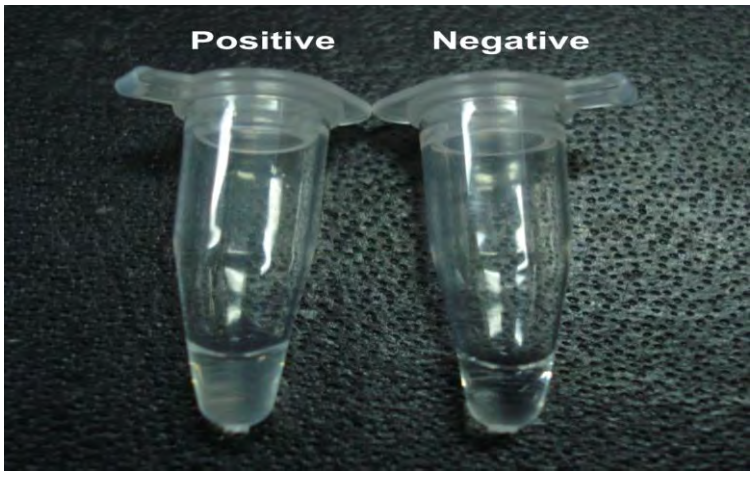
หมายเหตุ + = ผลบวก, - = ผลลบ

4.2 ตรวจสอบยีนยันจีโนไทป์ของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่าง ๆ สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ (*sea*) ด้วยวิธี PCR และ LAMP

ตรวจสอบยีนยันจีโนไทป์ของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆว่ามีเอนเทอโรทอกซินเอยีน โดยวิธี PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3. 5 ซึ่งสามารถตรวจจีโนไทป์ ของ *S.aureus* ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหมายของเอนเทอโรทอกซินเอ ยีน (*sea*) มีขนาด 120 bp ในขณะที่วิธี LAMP ได้ผลิตภัณฑ์ที่คาดหมายโดยมีลักษณะเป็นขั้นบันได เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีหลายขนาดดังรูปที่ 4.2 ก. และ ข. นอกจากนี้ยังสามารถดูผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยดูจากความขุ่นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ตามในปฏิกิริยา LAMP ดังรูปที่ 4.2



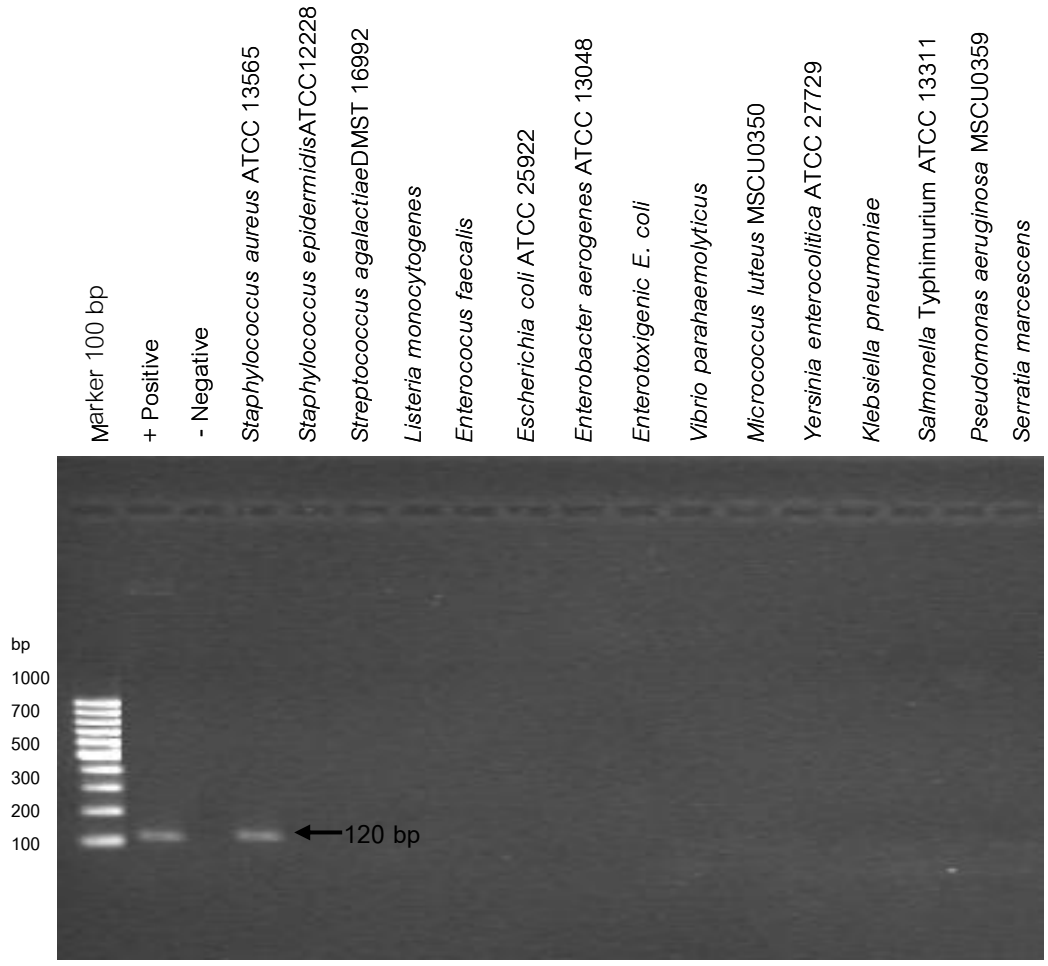
รูปที่ 4.2 ภาพอะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ ของ *sea* ของ *S. aureus* ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR (ก.) และ LAMP (ข.)



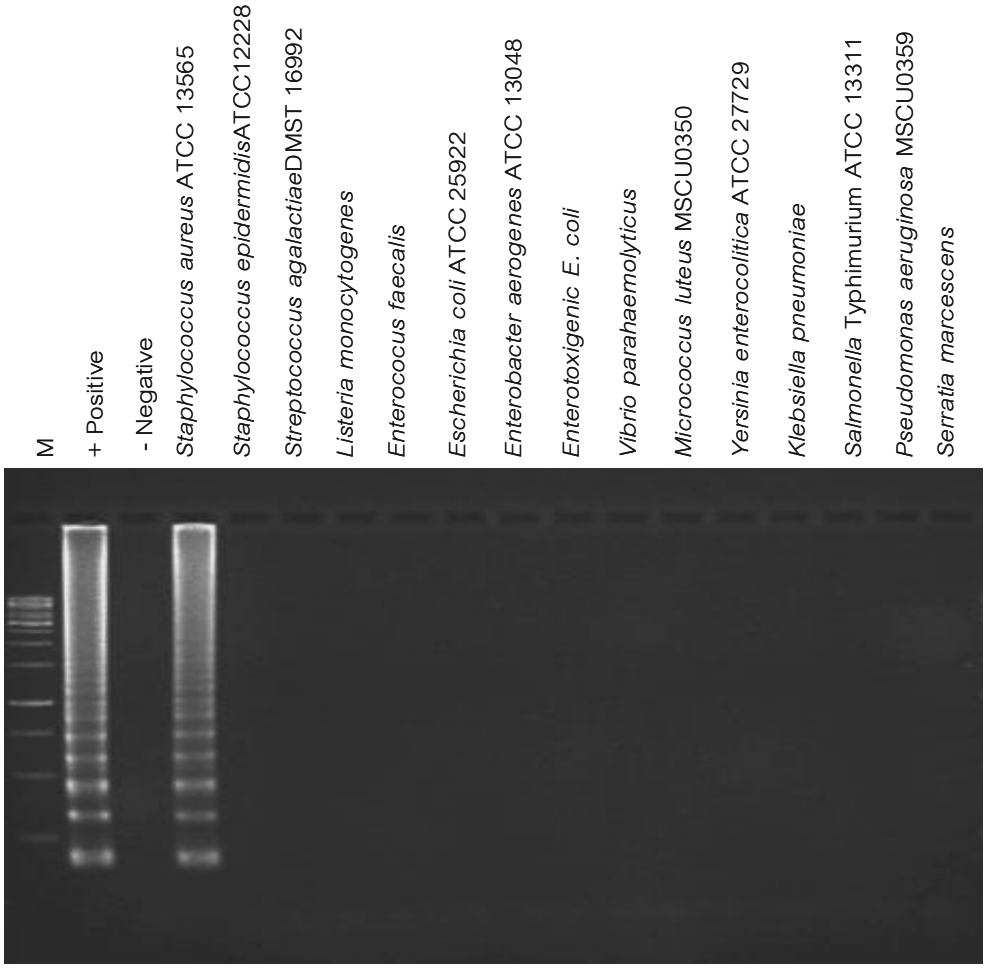
รูปที่ 4.3 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ตามที่เกิดจากปฏิกิริยา LAMP โดยดูจากความขุ่น

4.3 ศึกษาความจำเพาะของวิธี PCR และ LAMPเพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus*

ศึกษาความจำเพาะโดยนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตาม ตารางที่ 3.1 เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาโดยวิธี PCR และ LAMP ตามข้อ 3.4 และ 3.5 ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์จาก PCR และ LAMP เกิดขึ้นเฉพาะ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 13565 ที่มียีนเอนเทอโรทอกซิน ชนิดเอ ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive Control) ในขณะที่แบคทีเรียอื่นๆไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR และ LAMP ใดๆ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า วิธี PCR และ LAMP มีความจำเพาะสำหรับการตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus*



รูปที่ 4.4 อะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR

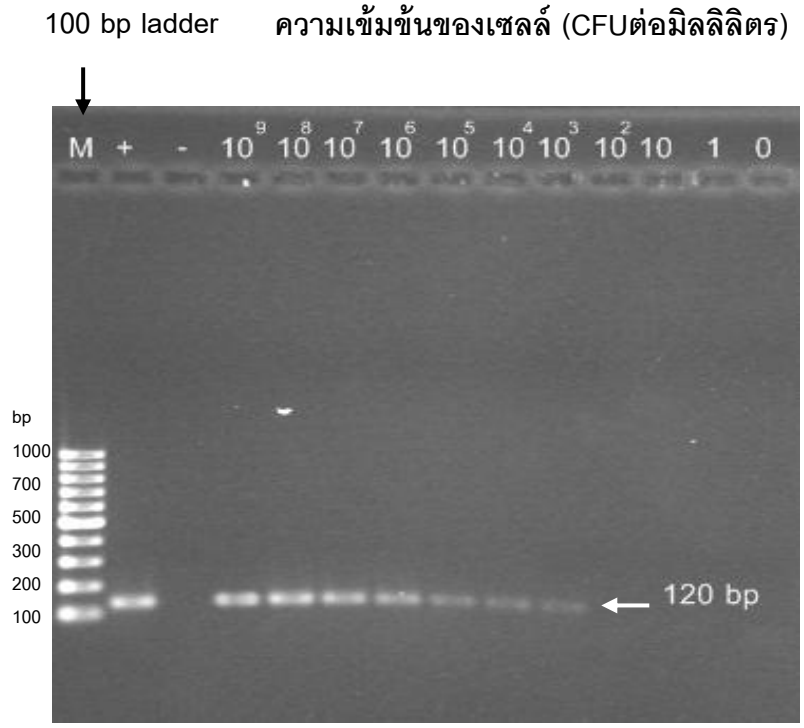


รูปที่ 4.5 อะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา LAMP

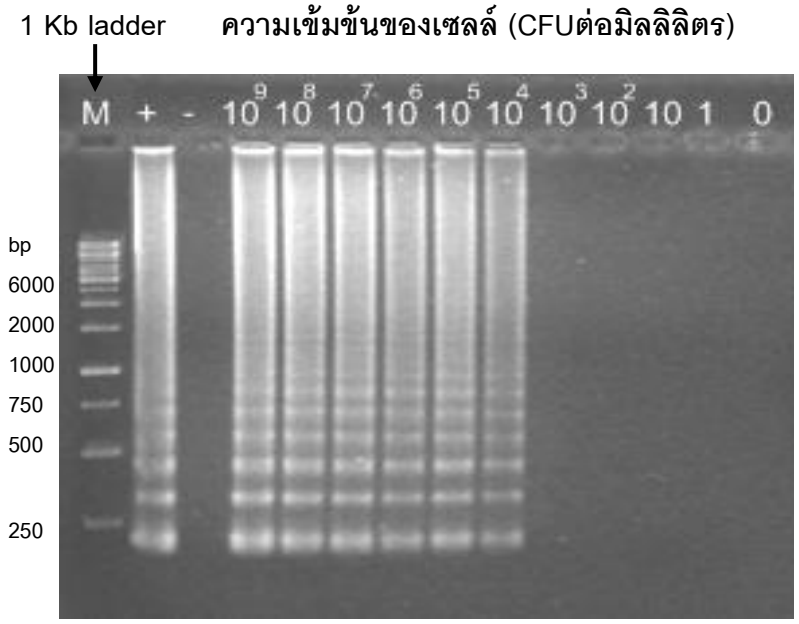
4.4 ศึกษาความไวของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus*

ศึกษาความไวของวิธี PCR และ LAMP โดยตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 ที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^0 ถึง 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร โดยวิธี PCR ด้วยภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4. 6 พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ 120 bp คือ1000 CFUต่อมิลลิลิตร

สำหรับวิธี LAMP เกิดผลิตภัณฑ์ที่คาดหมายโดยมีลักษณะเป็นขั้นบันได ดังรูปที่ 4.7 พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบโดยวิธี LAMP คือ 10000 CFUต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.6 อะกาโรสเจลแสดง ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอด้วยวิธี PCR เมื่อใช้จำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.7 อะกาโรสเจลแสดง ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอด้วยวิธี LAMP เมื่อใช้จำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน

4.5 ตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เติมเชื้อ ในตัวอย่างเนื้อหมูโดยใช้วิธี PCR และ LAMP เปรียบเทียบกับวิธีเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BPA

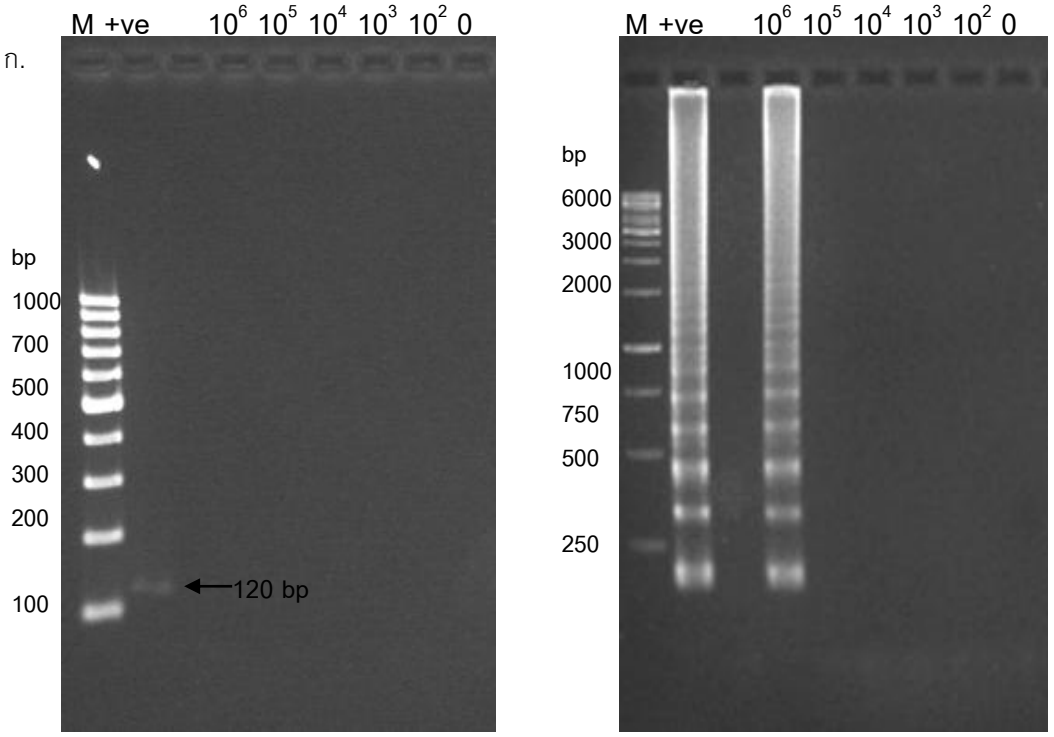
หลังจากนำตัวอย่างเนื้อหมูมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แบ่งเนื้อหมู 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย โดยกลุ่มทดลองเลือกใช้ *S. aureus* ATCC 13565 เป็นตัวแทน กลุ่มควบคุมลบ (Negative control) ใช้น้ำกลั่นแทนการใส่เชื้อ *S. aureus* ATCC 13565 เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาสกัดดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทดสอบตรวจ ยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* ในเนื้อหมูด้วยวิธี PCR และ LAMP ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7

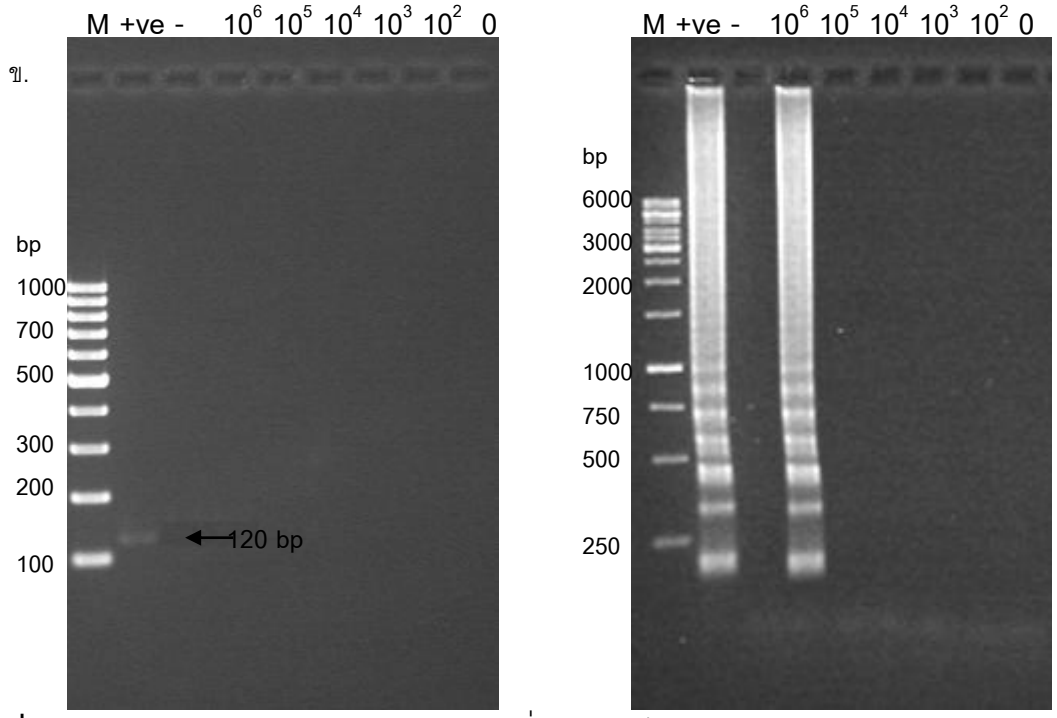
ผลการทดลองวิธี PCR และ LAMP โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 10^2 ถึง 10^6 CFUต่อกรัม ซึ่งใส่ลงในเนื้อหมูที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ซึ่งได้แปรผันเวลาในการบ่มตั้งแต่ 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปตรวจด้วยวิธี PCR และ LAMP และตรวจนับจำนวนด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BPA (Direct plating)

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเก็บตัวอย่างหลังจากใส่เชื้อ แบคทีเรีย *S. aureus* ทันที (0 ชั่วโมง) พบว่าวิธี PCR ไม่สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆ ในขณะที่วิธี LAMP สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^6 CFUต่อกรัมเนื้อหมู เกิดผลิตภัณฑ์ที่คาดหมายโดยมีลักษณะเป็นขั้นบันได เมื่อเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 2 พบว่าผลการทดลองเป็นเช่นเดียวกับชั่วโมงที่ 0ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8 ก. และ ข.

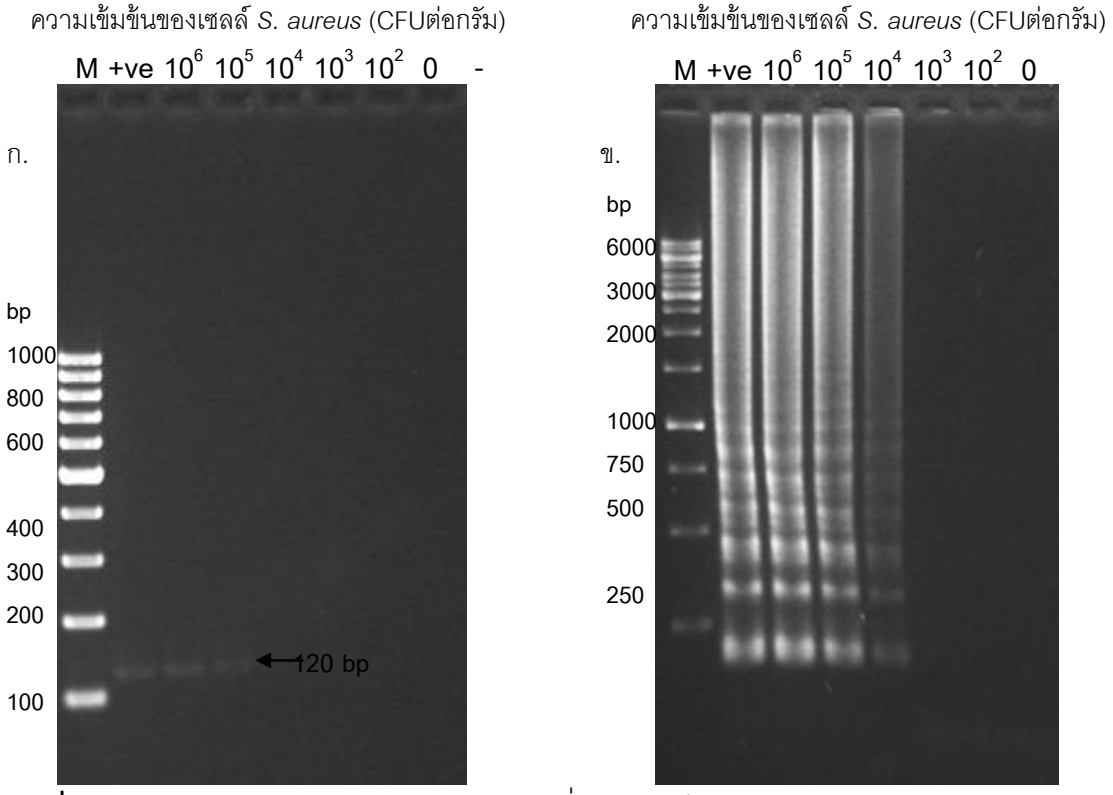
เมื่อเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 4 พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมู ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น10^5 และ 10^6 CFUต่อเนื้อหมู เกิดผลิตภัณฑ์ที่คาดหมาย มีขนาด 120 bp และวิธี LAMP สามารถตรวจได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^4 ถึง 10^6 CFUต่อกรัมเนื้อหมู ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.9 ก. และ ข.

เมื่อเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 6 พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมู ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^4 ถึง 10^6 CFUต่อกรัมเนื้อหมู และวิธี LAMP สามารถตรวจได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^3 ถึง 10^6 CFUต่อกรัมเนื้อหมู ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 ก. และ ข.

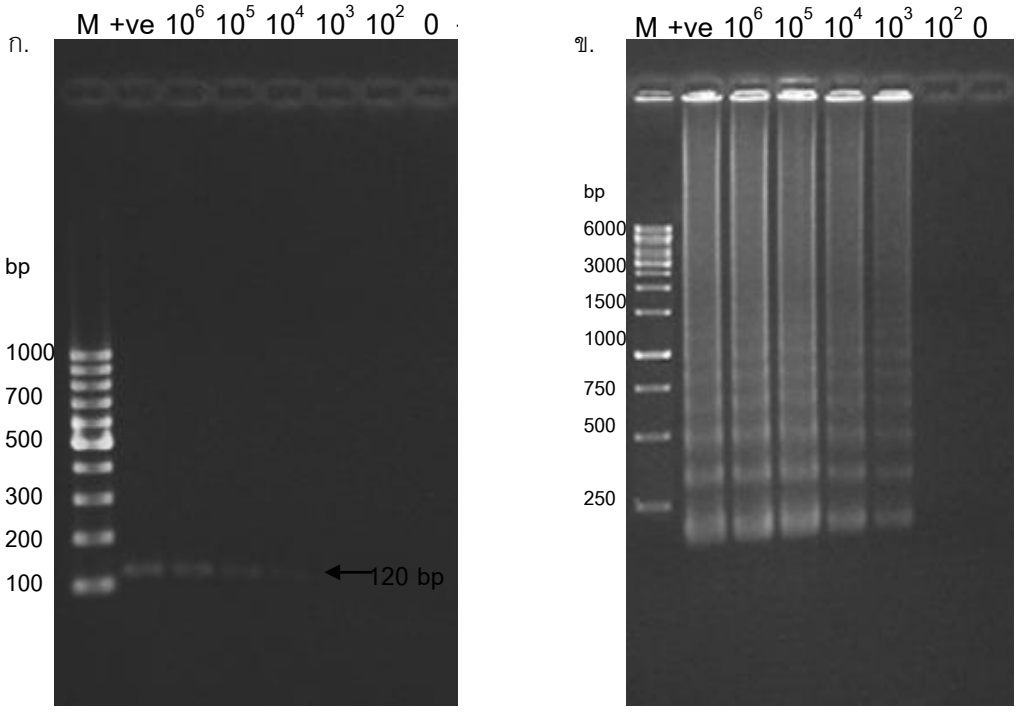




รูปที่ 4.8 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ จากตัวอย่างเนื้อหมู ด้วยวิธี PCR และ LAMP หลังการบ่มตัวอย่างใน TSB เป็นเวลา 0 ชั่วโมง (ก.) และ 2 ชั่วโมง (ข.)



รูปที่ 4.9 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอจากตัวอย่างเนื้อหมู ด้วยวิธี PCR (ก.) และ LAMP (ข.) ที่ชั่วโมงที่ 4



รูปที่ 4.10 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มจำนวนยีน *sea* ของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565 สำหรับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอจากตัวอย่างเนื้อหมู ด้วยวิธี PCR (ก.) และ LAMP (ข.) ที่ชั่วโมงที่ 6

หมายเหตุ M หมายถึง 100 bp Kb DNA ladder (ก.)

M หมายถึง 1 Kb DNA ladder (ข.)

+ve หมายถึง ตัวควบคุมผลบวก (Positive control) ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *S. aureus* (*sea*) ATCC 13565

เมื่อพิจารณาผลร่วมกับการตรวจนับจำนวน *S. aureus* ด้วยวิธีเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BPA (Direct plating) พบว่าชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 6.11 log CFU ต่อกรัมเนื้อหมู (10^6 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู) หลังจากบ่มเนื้อหมูผ่านไป 2, 4 และ 6 ชั่วโมง จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 6.63 log CFU ต่อกรัมเนื้อหมู ผลการทดลองพบจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นทำนองเดียวกันในทุกตัวอย่างที่ทดลอง ดังที่แสดงตามตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าผลการทดลองดังกล่าว ไม่มีความสอดคล้องกับข้อมูล เรื่องการศึกษาความไวของวิธี PCR และ LAMP เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย โดย *S. aureus* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบโดยใช้วิธี PCR และ LAMP คือ 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร และ 10^4 CFUต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อทดสอบในเนื้อหมูพบว่าวิธี LAMP สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^6 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู ในขณะที่วิธี PCR ยังไม่สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^6 CFU ต่อกรัมเนื้อหมูที่ชั่วโมงที่ 0 และ 2 เมื่อชั่วโมงที่ 4 พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมู ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^5 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู และวิธี LAMP สามารถตรวจได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^4 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู เมื่อบ่มตัวอย่างผ่านไป 6 ชั่วโมงทั้งวิธี PCR และ LAMP สามารถตรวจตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมู ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นมากกว่าชั่วโมงที่ 4 สิบเท่า ตรวจได้ 10^4 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู และ 10^3 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจวัดได้โดยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BPA ที่ชั่วโมงต่างๆ

เวลาที่ใช้บ่มตัวอย่าง (ชม.)	**จำนวน *S. aureus* เริ่มต้นที่ใส่ลงในเนื้อหมู (CFU ต่อกรัม)**					
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	0
0	6.11	5.48	4.56	3.60	2.15	0
2	6.63	5.89	4.62	3.77	2.38	0
4	7.43	7.04	6.26	4.52	3.55	0
6	9.08	8.04	7.27	6.48	4.00	0

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แม้ว่าจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีผู้วิจัยหลายคณะได้ศึกษา และ ทำการตรวจวินิจฉัย *S. aureus* จากตัวอย่างหลายประเภท เช่น ผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษ วัสดุส่งตรวจ หรืออาหารที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคเช่น น้ำนม ไข่ และเนื้อสัตว์ ด้วยวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วหลายวิธี เช่น วิธี ELISA SET-RPLA PCR Realtime PCR และ multiplex PCR (Rossen และคณะ 1992) แต่วิธีการเหล่านี้ก็ยังมีข้อจำกัดในการตรวจสอบ วิธีที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เอนเทอโรทอกซินที่ตรวจต้องมีความบริสุทธิ์สูงและยังอาจเกิดปฏิกิริยาไขว้ได้ (Fujikawa และ Igarashi, 1988 ; Park และ Rayman, 1993) วิธีที่ใช้หลักการทางอณูชีววิทยาจะต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนที่ต้องการจะตรวจสอบ (Kitai และคณะ, 2005) หรือบางวิธีต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะหลายคู่ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ต้องปรับภาวะในการทำปฏิกิริยามาก เพื่อให้แยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละยีนได้อย่างชัดเจน และในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบนั้นยังต้องมีกระบวนการหลายขั้นตอนเพื่อทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบมีความบริสุทธิ์ ซึ่งใช้เวลาและสิ้นเปลืองมากขึ้น (Sharma และคณะ, 2000) ในปี 2000 Notomi และคณะได้มีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจหานิวคลีโอไทด์ใหม่ขึ้น ได้แก่เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิค (DNA) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอได้ปริมาณมาก และปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปที่อุณหภูมิคงที่ ซึ่งขั้นตอนการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอ และขั้นตอนการตรวจสอบเกิดขึ้นสมบูรณ์ในขั้นตอนเดียวกัน ภายในเวลา 15-60 นาที ซึ่งต่างจากการทำ PCR ต้องใช้เวลานานถึง 4 ชั่วโมง และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้เลยโดยดูจากความขุ่นซึ่งเกิดจาก แมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต (magnesium pyrophosphate) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาวิธี LAMP ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจ ยีนเอนเทอโร- ทอกซินชนิดเอของแบคทีเรีย *S. aureus* ในเนื้อหมู เพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในการตรวจ แบคทีเรีย ในอุตสาหกรรมอาหารและการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

งานวิจัยครั้งนี้เริ่มทำการตรวจสอบจีโนไทป์ของ *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆ ว่ามีเอนเทอโรทอกซินเอยีน โดยวิธี PCR ในการวิจัยนี้จะใช้ไพรเมอร์ ที่ความจำเพาะกับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของ *S. aureus* ที่ระบุไว้โดย Johnson และ คณะ (1991) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 13565 เป็นแม่แบบ แสดงว่าสายพันธุ์นี้มีจีโนไทป์ตามที่ระบุไว้จริง ผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหมายของเอนเทอโรทอกซินเอ ยีน (*sea*) มีขนาด 120 bp ในขณะเดียวกัน

S. aureus ATCC 14458 และ ATCC 25923 ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR เนื่องจากไม่มีเอนเทอโรทอกซินเอยีน และเมื่อตรวจด้วยวิธี LAMP ใช้ไพรเมอร์ที่ความจำเพาะกับยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอที่ระบุไว้โดย Goto และคณะ (2007) *S. aureus* ATCC 13565 ได้ผลิตภัณฑ์ที่คาดหมายโดยมีลักษณะเป็นขั้นบันได เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีหลายขนาด นอกจากนี้ยังตรวจดูได้จาก ความขุ่น (turbidity) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวขึ้นในสารละลาย ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของปฏิกิริยา LAMP กล่าวคือ ความขุ่นที่เกิดขึ้นเป็นตัวชี้ให้เห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

ศึกษาความจำเพาะของวิธี PCR และ LAMP ในการตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีมีความจำเพาะในการตรวจสูง คือ วิธี PCR เกิดผลิตภัณฑ์ PCR (ขนาด 120 bp) เฉพาะกับ *S. aureus* ATCC 13565 ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ รวม 15 ชนิด ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ใดๆ ในขณะที่วิธี LAMP ได้ผลิตภัณฑ์ที่คาดหมายที่มีลักษณะเป็นขั้นบันไดเฉพาะกับ *S. aureus* ATCC 13565 เช่นเดียวกัน ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า วิธี PCR และ LAMP มีความจำเพาะสำหรับการตรวจ ยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* (รูปที่ 4.4) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Misawa และคณะ (2007) ทำการตรวจ methicillin-resistant *S. aureus* จากวัตถุส่งตรวจทางการแพทย์ ด้วยวิธี LAMP เปรียบเทียบกับวิธี duplex real-time polymerase chain reaction (Drt-PCR) พบว่าทั้งสองวิธีมีความจำเพาะสูงในการตรวจตัวอย่างดังกล่าว เนื่องจากวิธี LAMP ต้องออกแบบไพรเมอร์หลายคู่ในการทำปฏิกิริยาจึงทำให้วิธีนี้มีความจำเพาะสูงเช่นเดียวกับวิธี PCR

จากการตรวจสอบความไวของวิธี PCR เพื่อตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยนี้ มีความไวในการตรวจ เชื้อเริ่มต้นอย่างน้อย 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร คือสามารถพบเชื้อน้อยที่สุด 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร ขณะที่วิธี LAMP ตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยนี้ มีความไวในการตรวจ เชื้อเริ่มต้นอย่างน้อย 10^4 CFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.5) ซึ่งมีความไวต่ำกว่ารายงานของ Goto และคณะ (2007) ศึกษาความไวของ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหาร พบว่าวิธี LAMP สามารถตรวจ *S. aureus* ที่มีเอนเทอโรทอกซินเอยีนได้เมื่อมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่วิธี PCR ตรวจได้เมื่อมีเซลล์เริ่มต้น 10^3 CFUต่อมิลลิลิตร (Klotz และคณะ 2003) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแม้วิธี PCR จะมีความไวในการตรวจมากกว่าวิธี LAMP สิบเท่า แต่เมื่อคำนึงถึงเวลาในการตรวจสอบวิธี LAMP ก็ยังคงเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่า มีความจำเพาะสูงและไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพงในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ถึงอย่างไรก็ตามความชำนาญทางเทคนิค การสุ่มตัวอย่างที่ผิดพลาดก็มีความสำคัญเพราะอาจส่งผลให้ความไวในการตรวจลดลง

จากนั้นจึงนำวิธีการดังกล่าวไปประยุกต์เพื่อใช้ตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* ในเนื้อหมู เพื่อเป็นการประเมินประสิทธิภาพของ วิธี PCR เปรียบเทียบกับวิธี LAMP โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *S. aureus* โดยแปรผันจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น 10^2 ถึง 10^6 CFU ต่อกรัม ใส่ลงในเนื้อหมูที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (TSB) และได้แปรผันเวลาในการบ่มตั้งแต่ 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปตรวจด้วยวิธี PCR และ LAMP และตรวจนับจำนวนด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเบรด-ปากเกอร์ (BPA)(Direct plating)

ผลการทดลองพบว่าวิธี LAMP สามารถตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ ของแบคทีเรีย *S. aureus* ในเนื้อหมูได้ที่มีความเข้มข้นเซลล์อย่างน้อย 10^3 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู ขณะที่วิธี PCR ต้องมีความเข้มข้นเซลล์อย่างน้อย 10^4 CFU ต่อกรัมเนื้อหมู เมื่อบ่มตัวอย่างเนื้อหมูไป 6 ชั่วโมง จากรายงานของ Song และคณะ (2005) ใช้วิธี LAMP ตรวจสอบ แบคทีเรีย *Shigella* และ Enteroinvasive *E. coli* จากเสมหะ โดยตรวจพบแบคทีเรีย *Shigella* sp. 6.5 x 10^5 CFU/มิลลิลิตรในตัวอย่างเสมหะ และ Yamazaki และคณะ (2008) ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งโดยการใส่เชื้อลงไป พบว่าสามารถตรวจได้ 5.3 x 10^2 CFU/กรัม และตรวจสอบได้เร็วกว่าเทคนิค PCR 10 เท่า

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าวิธี LAMP มีความไวในการตรวจในตัวอย่างเนื้อหมูมากกว่าวิธี PCR สิบเท่า และวิธี PCR มีความไวในการตรวจในอาหารต่ำกว่าการตรวจในเชื้อบริสุทธิ์ อาจเป็นเพราะองค์ประกอบ ในเนื้อหมู เช่น ไขมัน เอนไซม์ในเนื้อหมู จึงอาจมีผลไปขัดขวางปฏิกิริยา ทำให้ความไวในการทดสอบในเนื้อหมูลดลง หรือวิธีการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบโดยการต้ม มีความบริสุทธิ์ไม่มากพออาจมีสิ่งเจือปนต่างๆจากเนื้อหมูและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลขัดขวางปฏิกิริยาดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ตาม Kaneko และคณะ (2007) ได้รายงานไว้ว่าส่วนประกอบในอาหารหรือวัตถุส่งตรวจมีผลยับยั้งปฏิกิริยาของ LAMP น้อยกว่า PCR ทำให้ความไวในการตรวจด้วยวิธี PCR ลดลง

ดังนั้นวิธี LAMP จึงเป็นวิธีที่มีความจำเพาะในการตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *S. aureus* ที่รวดเร็ว สะดวก และใช้งานง่ายโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไปในการตรวจเชื้อและ คัดกรองตัวอย่างเบื้องต้นในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อลดความเสี่ยงของผู้บริโภค รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้เนื้อหมูในงานวิจัยนี้ศึกษาโดยการใส่เชื้อลงไปและทำการตรวจสอบ จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธี LAMP ไปใช้ตรวจในตัวอย่างอาหารต่อไป

2. เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Goto และคณะ, 2007 ดังนั้นการจะพัฒนาให้เป็นชุดทดสอบสำเร็จเพื่อใช้ในเชิงการค้าอาจเกิดปัญหาทางด้านสิทธิบัตรทรัพย์สินทางปัญญา จึงอาจทำการวิจัยเพิ่มเติมโดยออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อให้มีความจำเพาะและความไวเพิ่มขึ้นในการตรวจสอบในการพัฒนาต่อไปเป็นชุดทดสอบต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ศูนย์ประสานงานวิชาการ, 2536. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร.

อุษามาส วังชัยสุนทร . 2547. คุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 2 (พฤษภาคม-สิงหาคม): 51-63.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ . 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. แบคทีเรียที่ทำให้ก่อโรค, หน้า 138-148. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ . 2549. ความปลอดภัยของอาหาร. กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพ์ Sister Prints & Media group.

ภาษาอังกฤษ

Atanassova, V., Meindl, A. and Ring, C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. Int J Food Microbiol. 68(1-2):105-113.

Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H. and Kozaki, S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol Infect. 130: 33–40.

Balaban, N. and Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol. 61: 1–10.

Bannerman, T. L., Hancock, G. A. and Tenover, F. C. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 33: 551-555.

Bergdoll, M. S., Borja, C. R., Robbins, R. N. and Weiss, K. F.1967. Identification of Enterotoxin E. J Bacteriol. 94(6): 1875-1882.

Bergdoll, M. S. 1983 Enterotoxins. In: Easmon CSF and Adlam C (eds) Staphylococci and Staphylococcal *Infections,* vol. 2, p. 559. London: Academic Press

Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, ed. Bacterial foodborne pathogens. New York: Marcel Dekker. 464-523.

Bennett, R. W. 1992. The biomolecular temperaments of staphylococcal enterotoxin in thermally processed foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 75: 6-12.

Bennett, R. W. 1998. Current concept in the rapid identification of Staphylococcal enterotoxin in food. Food Testing and Analysis 16-18: 310.

Casman, E. P. and Bennett, R. W.1963. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. J. Clin. Microbiol. 13(2): 2427-2428.

Casman, E. P. Bennett, R. W., Dorsey A.E. and Issa, J.A. 1995. Identification of a Fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin D. Division of Microbiology, Food and Drug Administration, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Washington, D.C. 20204. J. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1438-1443.

Chang, T. C. and Huang, S. H. 1993. Evalution of a latex agglutination test for rapid identification of *Staphylococcus aureus* in process food. J Food Prot. 56: 759-762.

Chang, T. C. and Huang, S. H. 1994. An enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in process food. J Food Prot. 57: 184-189.

Cremonesi, P., Luzzanaa, M., Brascab, M. Morandib, S. and Lodib, R. 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. J Mol Cell Pro. 19: 299-305.

Doyle, M. P. 1989. Foodborne bacterial pathogens., vol. 2, p. 796. Marcel Dekker , New York.

Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V. and Coppola, S. 2004. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. J Appl Microbiol. 96: 1090-1096.

Fang, H. and Hedin, G. 2003. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 41: 2894–2899.

Frenay, H. M., Bunschoten, A. E. and Schouls, L. M. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.15: 60-64.

Fujikawa, H. and Igarashi, H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of Staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2534-2548.

Genigeorgis, C. A. 1989. Present state of knowledge on *Staphylococcal* intoxication. Int J Food Microbiol. 9: 327-360.

Goh, S. H., Byrne, S. K. and Zhang, J. L.1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol. 30: 164216455.

Goto, M., Hayashidani, H., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. 2007. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. Lett App Microbiol. ISSN 0266-8254.

Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T. and Ikedo, M. 2005. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. FEMS Microbiol Lett. 253:155–161.

Hilker, J. S., Heilman, W. R., Denny, C. B., Tan, P. L. and Bohrer, C. W. 1968. Heat Inactivation of Enterotoxin A from *Staphylococcus aureus* in Veronal Buffer. J. Appl. Microbiol.16: 308-310.

Holmberg, S. D. and Blake, P. A. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. JAMA. 251: 487-489.

Jay, J. M. 1992 . Modern food microbiology. p. 701. An AVI Book, New York.

Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R., and Rozee, K. R. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 29: 426–430.

Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E. and Suzutani, T. 2007. Tolerance of Loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substance. J. Biochem Biophys Methods. 70: 499-501.

Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujino, K. and Matsumura, K. 2005. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. J Vet Med Sci. 67: 269–274.

Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., and Zimmermann, S. 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. J Clin Microbiol. 41: 4683–4687.

Kluytmans, J., van Belkum, A., and Verbrugh, H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 10: 505-520.

Lantz, P. G., Abu Al-Soud, W., Knutsson, R., Hahn-Hägerdal, B. and Rådström, P. 2000. Biotechnical use of the polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. Biotechnol. Annu. Rev. 5: 87–130.

Lazcka, O., Campo, F. J. D. and Muñoz, F. X. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosens. Bioelectron. 22: 1205-1217.

Lin, C.M., Chiang Y.C.,and Tsen, H.Y., 2009. Development and use of a chromogenic macroarray system for the detection of Staphylococcus aureus with enterotoxin A, B, C, D, E, and G genes in food and milk samples. Foodborne Pathog Dis. 6(4):445-452

Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E. and Mariuzza, R., 2004. International nomenclature committee for Staphylococcal superantigens. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. J Infect Dis. 189: 2334–2336.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P. and Castiglioni, B., 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. Vet Microbiol. 124: 66–72.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun. 289: 150–154.

Misawa, Y., Yoshida, A. and Saito, R. 2007. Application of loop-mediated isothermal amplification technich to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood culture. J. Infect Chemother. 13: 134-140.

Munson, H. S., Tremaine, M. T., Betley, M. J., and Welch, R. A. 1998. Identification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin Types G and I from *Staphylococcus aureus*. Department of Bacteriology and Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin - Madison.

Nakayama, A., Okayama, A. and Hashida, M. 2006. Development of a routine laboratory direct detection system of staphylococcal enterotoxin genes. J. Med Microbiol. 55: 273–277.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28:e63.

Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. 2005. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. Appl Environ Microbiol. 71: 6730–6735.

Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S. and Shinagawa, K. 2002. Detection of *seg, seh,* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg, seh*, or *sei* genes. J Clin Microbiol. 40: 857–862.

Omoe, K., Hu, D. L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. and Shinagawa, K. 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun. 71: 6088–6094.

Park, C. E., Akhtar, M. and Rayman, M. K. 1993. Non-specific reactions of a commercial enzyme-linked immonoabsorbent assays kit (TECRA) for detection of Staphylococcal enterotoxins in food. Appl Environ Microbiol. 58: 2509-2512.

Rall, V. L., Vieira, F. P., Rall R, Vieitis, R. L., Fernandes, A. Jr., Candeias, J. M., Cardoso, K. F., and Araújo, J. P. Jr. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Vet Microbiol. 132: 408-413.

Ramesh, A., Padmapriya, B. P., Chandrashekar, A. and 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. Mol Cell Probes 16:307-314.

Riemann, H. P. and Cliver, D. O. 2005. Foodborne Infections and Intoxications. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.

Reginald, W. B. and Steven, R. M. 2003. *Staphylococcus aureus*. In International Hand Book of Foodborne Pathogens. ed. Marianne, D.M. and Jeffrey, W.B. pp. 41–60. Basel, NY: Marcel Dekker, Inc.

Reischl, U., Linde, H.J., Metz, M., Leppmeier, B. and Lehn, N. 2000. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fl uorescence PCR. J Clin Microbiol. 38: 2429–33.

Robinson, R. K., Batt, C. A. and Patel, P. D. 2000. *Staphylococcus*, p.2062-2083, Vol.3. *In* Robinson,R. K.(ed.), Batt, C.A. and Patel, P.D.,Encyclopedia of food microbiology. San Diego, Academic press, London.

Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. and Rasmussen, O. F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int J Food Microbiol. 17:37–45.

Sharma, N. K., Rees, C. E. and Dodd, C. E. 2000. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. Appl Environ Microbiol. 66: 1347–1353.

Song, T., Toma, C., Nakasone, N. and Iwanaga, M. 2005. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Microbiol Lett. 243: 259–263.

Sneath, P. A, Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. Section 12 Gram-positive Cocci. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2,p.999. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

Su, Y. C. and Wong, A. C. 1998. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. Department of Food Microbiology and Toxicology, Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, USA. 66: 3337-3348.

Thomas, D. Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M. L., Lina, G. *et al*. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2
and V, two new Staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect Immun. 74: 4724–4734.

Tranter, H. S. and Brehm, R. D. 1990. Production, purification and identification of the Staphylococcal enterotoxin. In: Jones D, Board BG and Sussman M (eds) Staphylococci Society for Applied Bacteriology symposium series number 19. P. 109S, Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Yang, S. E., Yu, R. C. and Chou, C. C. 2001. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products.Int J Food Microbiol. 63: 99–107.

Yamazaki, W., Ishibashi, M., Kawahara, R., and Inoue, K. 2008, Development of a loop-mediated Isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. BMC Microbiol. 8:163-170.

Yoshida, T., Kondo, N., Hanifah, and Y. A., 1997. Combined use of ribotyping, PFGE typing and IS431 typing in the discrimination of nosocomial strains of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol. 41: 687-695.

http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html. Accessed October 2007.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Tryptic soy broth (TSB broth)

เคซีน ที่ถูกย่อยด้วยแพนคลีเอติก (pancreatic digest of casein)	10.0	กรัม
ซอยบีน มิล ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digest of soybean meal)	3.0	กรัม
เดกซ์โทส(dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ 5.0 กรัม		
ไดโพแทสเซียมฟสเฟต	2.5	กรัม

ละลาย อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้น้ำหนัก 30.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไอดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7. 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย** (Tryptic soy agar ,TSA)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเบรด-ปากเกอร์** (Baird-Parker agar, BPA)

เคซีน ที่ถูกย่อยด้วยแพนคลีเอติก (pancreatic digest of casein)	10.0	กรัม
เนื้อสกัด	5.0 กรัม	
ยีสต์สกัด 1.0 กรัม		
ไกลซีน 12.0 กรัม		

โซเดียมไพรูเวต 10.0 กรัม
ลิเทียมคลอไรด์ 5.0 กรัม
วุ้นผง 20.0 กรัม
ไข่แดงผสมกับโพแทสเซียมเทลลูไรด์ 50.0 มิลลิลิตร
(egg york tellurite enrichment)

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้น้ำหนัก 58.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 950 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่ 45-50 องศาเซลเซียส และเติมสารแขวนลอยไข่แดงผสมกับโพแทสเซียมเทลลูไรด์ 50 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

หมายเหตุ Egg York Tellurite Enrichment
ไข่แดง 30.0 %
โพแทสเซียมเทลลูไรด์ 0.15 %

4. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแมนนิทอลซอลท์** (Mannitol Salt Agar, MSA)

โปรทีโอสเปปโตน 10.0 กรัม
เนื้อสกัด 1.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ 75.0 กรัม
ดี-แมนนิทอล 10.0 กรัม
ฟีนอลเรด 0.025 กรัม
วุ้นผง 15.0 กรัม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้น้ำหนัก 108.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7. 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. **สารละลายแกรมคริสตอลไวโอเล็ต** (Gram's Crytal Violet Solution)

สารละลาย ก	
คริสตัลไวโอเล็ต	3.0 กรัม
เอธานอล 95%	20.0 มิลลิลิตร
สารละลาย ข	
แอมโมเนียมออกซาเลต 0.8 กรัม	
น้ำกลั่น	50.0 มิลลิลิตร

ละลายคริสตัลไวโอเล็ต 3 กรัม ในเอธานอล 95% 20.0 มิลลิลิตร(สารละลาย ก) ผสมสารละลาย ก และ สารละลาย ข เข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชา

2. **สารละลายแกรมไอโอดีน** (Gram's Iodine Solution)

ไอโอดีนคริสตัล 1.0 กรัม	
โปตัสเซียมไอโอไดด์ 2.0 กรัม	
น้ำกลั่น	300.0 มิลลิลิตร

ละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นเติมไอโอดีนคริสตัล 1 กรัม ลงในสาร ละลายข้างต้น ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมน้ำกลั่น 275 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

3. **สารละลายแกรมซาฟรานินโอ** (Gram's Safranin Straining Solution)

ซาฟรานิน 0.25 กรัม
เอธานอล 95% 10.0 มิลลิลิตร

ละลายซาฟานิน 0.25 กรัม ในเอธานอล 95 % 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายข้างต้น1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

4. **สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3%**

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (30%) 3.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น 27.0 มิลลิลิตร

นำสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (30%) 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

5. 0.85% w/v **สารละลายโซเดียมคลอไรด์**

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม
น้ำกลั่น 100 0 ลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ น้ำหนัก 8.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. **กลีเซอรอล**

นำกลีซอรอลไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้ออีกรอบหนึ่ง

7. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trismabase ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

8. สารละลาย EDTA เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$)	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์คนให้เข้ากันรอให้เย็นแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

9. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0 โมลาร์
EDTA	1.0 โมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 1.0 โมาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็นปริมาตร 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

10. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base 242 กรัม

กรดอะซิติกเข้มข้น 57.1 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

11. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2

<u>สารละลาย ก</u>

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 27.8 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

<u>สารละลาย ข</u>

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮบตะไฮเดรต 53.65 กรัม

($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

นำสารละลาย ก และ สารละลาย ข มาผสมรวมกันดังนี้

สารละลาย ก 28.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 72.0 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

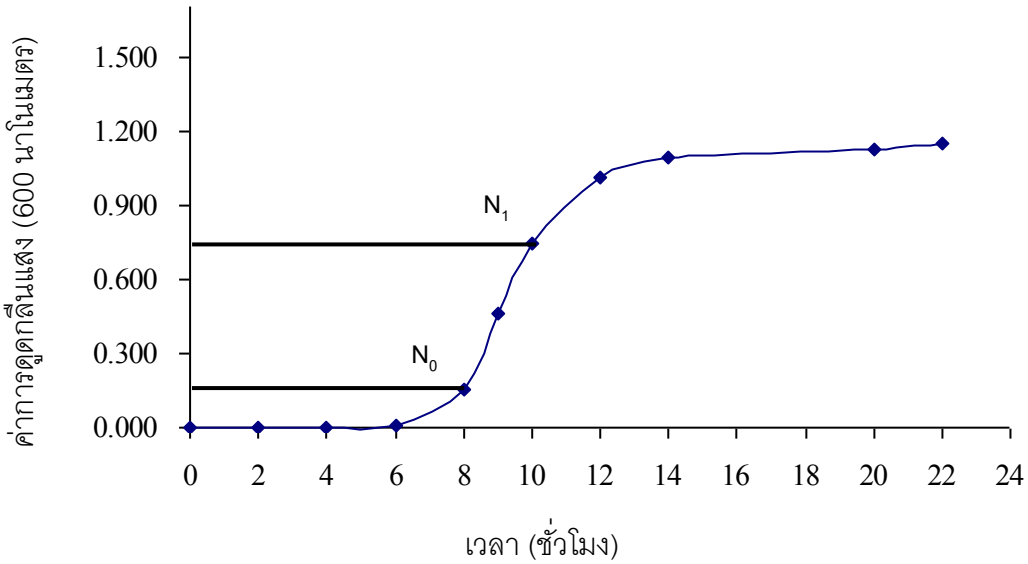
12. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ 0.01 กรัม

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ น้ำหนัก 0.01 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

1. การคำนวณ specific growth rate



การคำนวณ

$$\mu = \frac{(\ln N_1 - \ln N_0)}{(t_1 - t_0)}$$

N_1 = Absorbance at time 1

N_0 = Absorbance at time 0

T_1 = Time 1

T_0 = Time 0

2. การคำนวณ doubling time

$$T = \frac{0.693}{\mu}$$

เมื่อ

T = Doubling time (hour)

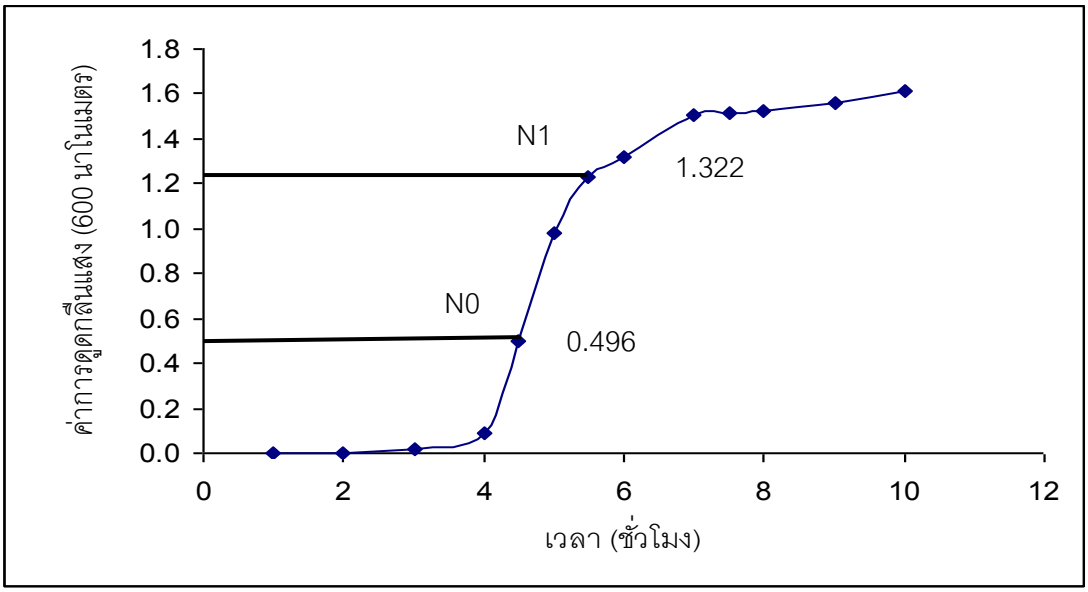
μ = Specific growth rate ($hour^{-1}$)

3. ตาราง แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของ *Staphylococcus aureus* ATCC13565 ที่ชั่วโมงต่างๆ

Time (hour)	Absorbance (600 nm)	Total bacteria count (log $CFUml^{-1}$)
0	0.003 ± 0.002	4.46
2	0.004 ± 0.001	6.06
3	0.015± 0.004	6.80
4	0.093 ± 0.004	7.76
4.5	0.496 ± 0.003	ND
5	0.982 ± 0.002	8.25
5.5	1.228 ± 0.004	ND
6	1.322 ± 0.002	9.11
6.5	1.468 ± 0.003	ND
7	1.502 ± 0.019	9.28
8	1.523 ± 0.009	ND
9	1.562 ± 0.010	9.42
10	1.612 ± 0.014	ND

ND = “Not Done”

กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 13565



Doubling time ของ *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 คือ 1 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธีระนันท์ สุวรรณอำไพ เกิดวันที่ 14 ตุลาคม 2527 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2548 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 และสำเร็จการศึกษาในภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2552

Academic Presentation

Theeranan Suwanampai, Kobchai Pattaragulwanit, Preprame Pattanamahakul, Orasa Sutheinkul and Jiraporn Thaniyavarn. Detection of enterotoxins A gene in *Staphylococcus aureus* by Polymerase chain reaction and Loop-mediated isothermal amplification. In the Proceedings of the 21th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology (TSB). September 24-25, 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. p. 563 (poster presentation) (Full text in CD-ROM)

Teaching Assistance in Department of Microbiology

2312571 Microbiology of Food during 2007 and 2008.