การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

นางสาว จิราภรณ์ เหรียญทอง
นางสาว นภสร จรุงธนาภิบาล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549

DETECTION OF FOOD-BORNE PATHOGENS BY MULTIPLEX PCR

MISS JIRAPORN RIANTHONG
MISS NAPASORN JAROONGTANAPHIBARN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULITY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

.....

(นางสาวจิราภรณ์ เหรียญทอง)

.....

(นางสาวนภสร จรุงธนาภิบาล)

.....

(ผศ.ดร.มัลลิกา ชมนาวัง)

อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ
การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

จิราภรณ์ เหรียญทอง, นภสร จรุงธนาภิบาล
อาจารย์ที่ปรึกษา: มัลลิกา ชมนาวัง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ: multiplex PCR, food-borne pathogen, DNA polymerase

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่ก่อให้เกิดปัญหาได้บ่อยในระบบสาธารณสุขของไทย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Salmonella* spp. อาจพบปนเปื้อนในอาหารทั่วไป เช่น ผัก เนื้อสัตว์ต่างๆ ไข่ ผลิตภัณฑ์จำพวกนมและอาหารปรุงสำเร็จบางชนิด หากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เข้าไปอาจทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ เกิดท้องร่วงรุนแรง คลื่นไส้อาเจียน และปวดท้อง ได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีความจำเพาะเจาะจงและให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วมากขึ้นกว่าวิธีที่เคยมีในอดีต การทำ PCR นั้นสามารถเจาะจงไปถึงยีนก่อโรคของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆได้ เช่น ยีน *sea* ของเชื้อ *S.aureus* ยีน *invA* ของเชื้อ Salmonella หรือ ยีน *nheA* สำหรับ *B. cereus* เป็นต้น ซึ่งการที่สามารถกำหนด sequence ของยีนในการทำ PCR นี้ทำให้การตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีความจำเพาะเจาะจงและมีความไวต่อเชื้อสูง จากการทดลองพบว่าการใช้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงขึ้นในหลอดทดลองให้ผลที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและเป็นที่น่าเชื่อถือ แต่เมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างอาหารจริงโดยใช้ผักสดหลายๆชนิด พบว่า ผลการทดลองที่ได้นั้นยังไม่เป็นที่น่าพอใจเนื่องจาก ผลการทดลองที่ได้ในแต่ละครั้งยังมีความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสภาวะการตรวจสอบตัวอย่างอาหารจริงที่นำมาทดลองนั้นยังไม่เหมาะสมเพียงพอต่อการนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบ ซึ่งหากนำสภาวะการตรวจสอบนี้มาศึกษาปรับปรุงเพิ่มเติม ก็จะสามารถพัฒนาไปเป็นสภาวะมาตรฐานในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้ต่อไป

Abstract

Detection of food-borne pathogens by multiplex PCR

Jiraporn Rianthong, Napasorn Jaroongtanaphibarn

Project advisor: Mullika T. Chomnawang

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: multiplex PCR, food-borne pathogen, DNA polymerase

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* spp., the most common examples of food-borne pathogens, have frequently caused problems in the public health system of Thailand. They can be contaminated in common foods on a daily basis, for example; fresh vegetables, meat, eggs, dairy products, and some cooked foods. Consumption of such food could lead to various symptoms including food poisoning, stomachache, nausea, vomiting, and severe diarrhea.

The objective of this study is to detect food-borne pathogens by using multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR). Multiplex PCR is a modern method which is more specific to the genetic level and requires less time to perform than the conventional method. These food-borne pathogens have their own toxic genes, such as *sea* for *S. aureus, invA* for *Salmonella*, or *nheA* for *B. cereus*. Once these gene sequences are specified, PCR method would be applied and yield high specific result with high sensitivity to each pathogen. According to the experiments, using multiplex PCR with pure culture bacteria yielded specific and credible results. However, with real food samples, such as various fresh vegetables, the results were still unsatisfactory due to slight error in each experiment. It is possible that the testing conditions for real food samples are still not good enough to provide a standard protocol for this detection method. If given more time to investigate these testing conditions, it is very likely that they could be developed into a standard protocol for food-borne pathogen detection.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง ภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และแนวทางในการทำงานวิจัย นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือจาก คุณพัชรวลัย วาสนารุ่งโรจน์ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ ในการให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการทดลอง การใช้เครื่องมือต่างๆ รวมทั้ง ความช่วยเหลือด้านอื่น ๆ อีกเป็นจำนวนมาก จึงขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

จิราภรณ์ เหรียญทอง

นภสร จรุงธนาภิบาล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	2
วัสดุและวิธีดำเนินการทดลอง	9
ผลการทดลอง	12
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
ข้อเสนอแนะ	21
เอกสารอ้างอิง	22

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างอุบัติการณ์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารในประเทศไทย ปี 2548	6
2	เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร	7
3	เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	9
4	ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารที่ 0 ชั่วโมง	17
5	ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารที่ 18 ชั่วโมง, Positive Control และ Pure Culture	17

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus*	2
2	แสดงลักษณะของเชื้อ *Bacillus cereus*	3
3	แสดงลักษณะของเชื้อ *Salmonella*	5
4	ผลแสดงความจำเพาะเจาะจงของ primer sea1-sea2 ต่อเชื้อต่าง ๆ	12
5	ผลแสดงความจำเพาะเจาะจงของ primer invA1-invA2 ต่อเชื้อต่าง ๆ	13
6	ผลแสดงความจำเพาะเจาะจงของ primer nheA1-nheA2 ต่อเชื้อต่าง ๆ	14
7	ผลการทำ multiplex PCR จาก pure culture ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด	15
8	ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารด้วยวิธี multiplex PCR	16

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	ร้อยละ
^{o}C	=	องศาเซลเซียส
^{o}F	=	องศาฟาเรนไฮต์
N/A	=	ไม่มีการดำเนินการสำรวจ
PCR (Polymerase Chain Reaction)	=	ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
S. aureus	=	*Staphylococcus aureus*
B. cereus	=	*Bacillus cereus*
S. typhi	=	*Salmonella typhi*
Multiplex-PCR	=	Multiplex-Polymerase Chain Reaction
DNA	=	Deoxyribonucleotide acid
dNTPs	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
S. typhimurium	=	*Salmonella typhimurium*
S. paratyphi A	=	*Salmonella paratyphi A*
S. Enteritidis	=	*Salmonella Enteritidis*
S. choleraesuis	=	*Salmonella choleraesuis*
B. thuringiensis ATCC10792	=	*Bacillus thuringiensis* ATCC10792
B. thuringiensis	=	*Bacillus thuringiensis*

บทนำ

จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารนั้นถือเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในระบบสาธารณสุขของไทย ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่พบได้บ่อย คือ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียคอคไคแกรมบวก สามารถพบได้ในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ไข่ และผลิตภัณฑ์จำพวกนม[1] โดยเชื้อ *S. aureus* จะสร้าง enterotoxin ปนเปื้อนในอาหาร[2] หากรับประทานเข้าไปจะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ เกิดท้องร่วงรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน และปวดท้อง[3] นอกจาก *S. aureus* แล้วยังมีเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ นั่นคือ Salmonella spp. และ *Bacillus cereus* โดยเชื้อ salmonella นั้นเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ถือว่ามีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากเชื้อนี้ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงจากการรับประทานอาหารที่ไม่สุก(Gastroenteritis)[4] อาการที่สำคัญ คือ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงเป็นน้ำหรือมูกเลือด ปวดท้องและมีไข้ ส่วน *B. cereus* นั้นเป็นเชื้อแบซิลไลแกรมบวก พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ จึงมักปนเปื้อนในอาหารจำพวกนม ไข่ และอาจพบได้ในอาหารปรุงสำเร็จเช่น ข้าวผัด ไอศกรีม ซอส เป็นต้น

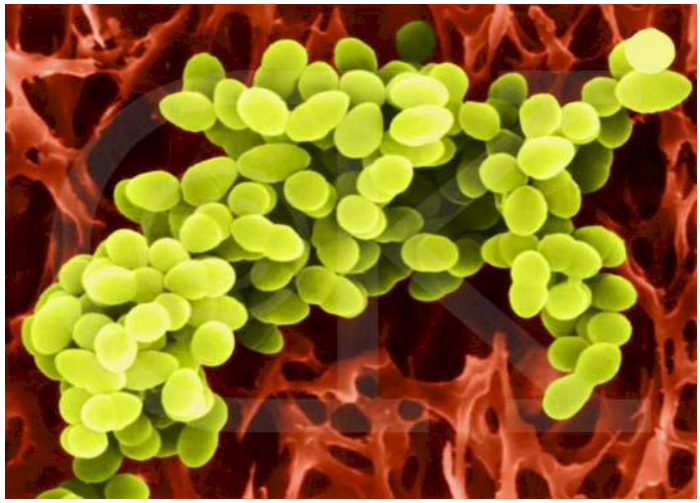
แม้ว่าการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นมีการกระทำกันมาเป็นเวลานานแต่เนื่องจากวิธีที่ปฏิบัติกันมานั้นจะเป็นแบบ Conventional method นั่นคือการนำตัวอย่างมาเพาะเชื้อลงบน plate ในช่วงระยะเวลาต่างๆกัน จากนั้นจึงนำตัวอย่างโคโลนีของเชื้อที่เพาะได้ไปทำการทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมีเพิ่มเติม ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานานประมาณ 4 ถึง 7 วัน และส่วนใหญ่มักจะทราบผลการตรวจสอบก็ต่อเมื่อผลิตภัณฑ์อาหารนั้นได้วางขายหรือบริโภคไปแล้ว[5] ดังนั้นจึงมีการคิดค้นวิธีตรวจสอบวิธีใหม่ที่เห็นผลได้เร็ว และมีความไวต่อเชื้อสูงนั่นคือการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) เนื่องจากการทำ PCR นั้นสามารถวิเคราะห์เจาะจงไปถึงยีนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นจะมียีนที่ให้ก่อเกิดโรคอยู่ เช่น invA ของเชื้อ *Salmonella* หรือ nheA สำหรับ *B. cereus* เป็นต้น ซึ่งการที่สามารถกำหนด sequence ของยีนในการทำ PCR นี้ทำให้การตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น[5]

ทบทวนวรรณกรรม

โรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อจุลินทรีย์

โรคอาหารเป็นพิษมีสาเหตุสำคัญจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อ และชนิดของสารพิษที่เชื้อขับออกมา เมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในอาหารจะทำให้เชื้อโรคสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และผลิตสารพิษได้อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณมากพอที่จะทำให้เกิดอาการป่วยได้ ตัวอย่างเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญ ได้แก่

1. ***Staphylococcus aureus*** เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้น ๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่น บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ ซึ่งโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ Staphylococcus นั้นมีชื่อเรียกคือ Stapyhloenterotoxicosis และ Staphylorenterotoxemia[6]



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

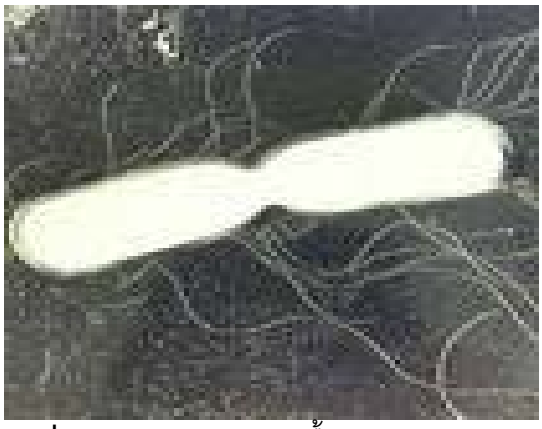
1.1 **แหล่งที่พบและสาเหตุการเกิดโรค** เชื้อ *S. aureus* จะมีชีวิตอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหาร หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งปฐมภูมิของเชื้อชนิดนี้ โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ เส้นผมและผิวหนัง อาจพบเชื้อชนิดนี้ได้ถึง 60-80 %ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับ

สภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหาร รวมทั้งในขั้นตอนของการบรรจุและสภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่ง คือการเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม เป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ และสร้างสารพิษอย่างรวดเร็ว

1.2 **อาการของโรค** ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อ *S.aureus* นั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็ว และรุนแรงในหลาย ๆ กรณี โดยทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วย อาการทั่วไปที่พบ คือ หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าประมาณ 2-4 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้อง และอ่อนเพลีย ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน เช่น ภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง ปวดหัว เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะ ๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติ ซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน

1.3 **การป้องกัน** สามารถทำได้โดยอบรมให้ผู้ประกอบอาหารมีความรู้ และเห็นถึงความสำคัญของการรักษาความสะอาดในขณะปรุงอาหารเพื่อเป็นการลดโอกาสในการปนเปื้อนของเชื้อ ส่วนในการบริโภคนั้นให้รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ ๆ หรือนำอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำเพียงพออย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อ หากยังไม่รับประทานในทันที และทำการอุ่นอาหารให้ร้อนก่อนรับประทานทุกครั้ง

2. *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งขนาดใหญ่ และ sporangium ในสปอร์จะไม่บวม ลักษณะพิเศษเหล่านี้รวมถึงลักษณะสำคัญทางชีวเคมี และการวิเคราะห์การเคลื่อนไหวสามารถใช้บอกความแตกต่างและยืนยันลักษณะเฉพาะของ *B. cereus* ได้[7]



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของเชื้อ *Bacillus cereus*

2.1 **แหล่งที่พบและสาเหตุการเกิดโรค** เชื้อ *B. cereus* สามารถพบได้ในอาหารทั่วไป ตัวอย่างเช่น เนื้อสัตว์ นม ผัก ล้วนมีส่วนทำให้เกิดอาการท้องร่วงจากอาหารเป็นพิษได้ การระบาดของอาหารที่ทำให้เกิดโรคโดยทั่วไปจะเกิดจากผลิตภัณฑ์จากข้าว และอาหารจำพวกแป้งอื่น ๆ เช่น มันฝรั่ง พาสต้า และผลิตภัณฑ์เนยแข็งรวมทั้งอาหารปรุงแต่ง เช่น ซอส พุดดิ้ง ซุป ลูกชิ้น พาย และสลัด

2.2 **อาการของโรค** จะเหมือนกับอาการท้องร่วงที่เกิดจากการได้รับเชื้อ *Clostridium perfringens* คือ ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ มีอาการปวดเกร็งที่ช่องท้อง ซึ่งจะเกิดภายใน 6 - 15 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน อาจมีอาการคลื่นไส้พร้อม ๆ กับปวดท้อง แต่อาการอาเจียนเกิดขึ้นไม่บ่อยนัก

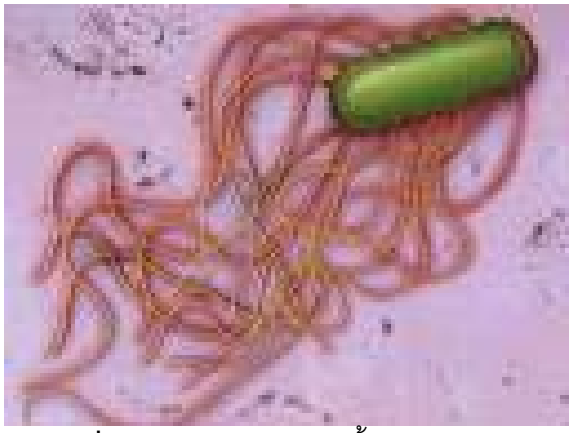
อาการของโรคจะยังคงอยู่นานที่สุด 24 ชั่วโมง อาหารเป็นพิษชนิดที่ทำให้เกิดอาการอาเจียนจะมีลักษณะเฉพาะ คือ มีอาการคลื่นไส้ และอาเจียนภายในเวลา 0.5 - 6 ชั่วโมงหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน

2.3 **การป้องกัน** ทำได้โดยการเก็บอาหารที่ปรุงเสร็จแล้วไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 °C (4-6°F) หรือเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า 55-60°C (131-140°F) และควรจะมีการอุ่นอาหารที่เก็บไว้ก่อนที่จะนำมารับประทานเสมอเพื่อป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อชนิดนี้

3. ***Salmonella* spp.** เชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนในที่ที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเชื้อชนิดนี้ยังสามารถเจริญได้ เชื้อ *Salmonella* มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีลักษณะความเป็นอยู่หรือการดำรงชีวิตที่ต่างกันไป เช่น เชื้อ *S. typhi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่เรียกว่า ไข้ไทฟอยด์ โดยพบในมนุษย์มากกว่าสัตว์อื่น ๆ อย่างไรก็ตามจะพบเชื้อจากสัตว์ติดต่อสู่มนุษย์ และสัตว์อื่น ๆ เช่น หนู สัตว์ปีก แมลงวัน ควาย สุนัข แมว และม้า เป็นต้น สำหรับการติดเชื้อในมนุษย์นั้นส่วนมากจะได้รับเชื้อปนเปื้อนมาในน้ำ และอาหาร บางครั้งอาจเกิดจากสัตว์เลี้ยงที่อาศัยตามอาคารบ้านเรือน ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อ *Salmonella* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงประกอบกับเชื้อมีอัตราการแพร่ระบาดสูง จึงสามารถพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ในอัตราสูงด้วย และเรียกโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ว่า salmonellosis[8]

3.1 **แหล่งที่พบและสาเหตุการเกิดโรค** อาหารที่เป็นสาเหตุได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อไก่ ไข่ นม ผลิตภัณฑ์จากนม เนื้อปลา และอาหารทะเลที่ไม่ได้ผ่านความร้อนอย่างเพียงพอ ซึ่งการรับประทานอาหารสุก ๆ ดิบ ๆ ไม่ว่าจะเป็นแหนม ลาบ ยำ ปูเค็ม ปูดอง ผักสด หากมีเชื้อโรค

ก็มีโอกาสติดโรคได้เท่ากัน สำหรับไข่นั้น หากเปลือกไข่มีเชื้อ Salmonella อยู่ เชื้อจะสามารถผ่านเข้าไปในไข่ขาวและไข่แดงได้ ดังนั้นในการปรุงอาหารที่มีไข่เป็นส่วนประกอบจึงควรจะปรุงให้สุกด้วยความร้อนที่พอเหมาะ นอกจากนี้หากมีบุคคลที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหารแล้วมีสุขลักษณะไม่ดีพอ เช่น ไว้เล็บยาว หลังกลับจากห้องน้ำมิได้มีการล้างมือให้สะอาดและเป็นโรค salmonellosis ด้วย เชื้อ Salmonella ก็มีโอกาสที่จะปนเปื้อนลงไปยังอาหารได้



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้อ *Salmonella*

3.2 **อาการของโรค** อาการจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนแล้วประมาณ 6-48 ชั่วโมง และจะมีอาการอยู่ในระหว่าง 1-5 วัน สำหรับอาการของโรค salmonellosis ที่พบได้ทั่วไปคือ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดศีรษะ ปวดท้อง มีไข้ หนาวสั่น และอ่อนเพลีย ความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นนั้นจะแตกต่างไปตามปริมาณเชื้อที่บริโภค ชนิดของเชื้อที่บริโภค และความต้านทานของผู้บริโภค ถ้าหากเป็นผู้สูงอายุ หรือเด็กทารก จะพบว่ามีอาการรุนแรงกว่าคนในวัยอื่นที่บริโภคเชื้อชนิดเดียวกันในปริมาณที่เท่ากัน และยังพบอีกว่าผู้ป่วยโรค AIDS มีโอกาสเกิดโรคแทรกซ้อนจากเชื้อ Salmonella ได้มากกว่าคนธรรมดาถึง 20 เท่า

3.3 **การป้องกัน** เชื้อ *Salmonella* ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 4-5 นาที หรือที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 นาที ดังนั้น การรับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ ๆ และรับประทานในขณะที่ยังร้อน จะช่วยลดการติดเชื้อ *Salmonella* ได้เป็นอย่างมาก ส่วนการแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* ได้ นอกจากนี้ควรใช้ภาชนะบรรจุอาหารที่สะอาดถูกสุขลักษณะและทำความสะอาดหลังใช้แล้วทุกครั้ง

อุบัติการณ์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารในประเทศไทย[9]

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอุบัติการณ์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารในประเทศไทยในปี 2548

การสำรวจ	**ผลการตรวจพบเชื้อ (%ของตัวอย่างทั้งหมด)**	**%ที่พบ *S. aureus***	**%ที่พบ *B. cereus***	**%ที่พบ *Salmonella***
อันตรายจากเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในแผ่นใยขัดและฟองน้ำที่ใช้ทำความสะอาดภาชนะบรรจุอาหาร	53.92	N/A	7.27	45.45
การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในอาหารที่จำหน่ายในโรงเรียน	18.54	16.22	24.32	51.35
การปนเปื้อน *Salmonella serovars* ในอาหารพร้อมปรุงที่จำหน่ายในศูนย์การค้า	26	N/A	N/A	26
คุณภาพทางจุลชีววิทยาของส้มตำปรุงสำเร็จในเขตจังหวัดสมุทรสงคราม	30.88	10.29	N/A	5.88

หมายเหตุ: N/A ไม่มีการดำเนินการสำรวจ

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารทั่วไปที่มิใช่อาหารควบคุมเฉพาะกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์[12]

ตารางที่ 2 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร			
ประเภทอาหาร	**ค่ากำหนด**		
1. อาหารดิบ หมายถึง อาหารที่ยังบริโภคไม่ได้ ต้องผ่านการทำสุกหรือการเตรียมด้วยกรรมวิธีใดๆ ก่อนบริโภค ได้แก่ เนื้อสด ปลาสด ไส้กรอกอีสานดิบ ปลาแห้ง และเนื้อเค็มดิบ ไข่ เครื่องแกง เป็นต้น	MPN E. coli/กรัม	น้อยกว่า	50
	S. aureus/กรัม	น้อยกว่า	200
	B. cereus/กรัม	น้อยกว่า	200
	V. parahaemolyticus/กรัม	น้อยกว่า	200
	C. perfringens/0.001กรัม	ไม่พบ	
	Salmonellae/25 กรัม	ไม่พบ	
	V. cholerae/25 กรัม	ไม่พบ	

ที่มา : สำนักงานคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

การตรวจสอบจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารนั้น วิธีที่ใช้กันมานานและให้ผลถูกต้องน่าเชื่อถือ คือ วิธี Conventional method ซึ่งมีขั้นตอนคือ นำตัวอย่างอาหารมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อที่จะเพิ่มปริมาณเชื้อที่ต้องการจะตรวจสอบ แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาทำ culture ลงใน plate ที่มี selective หรือ differential agar เพื่อที่จะแยก pure culture ของเชื้อออกมา และตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ใน culture โดยวิธีการวิเคราะห์แบบ phenotypic analysis หรือทำ metabolic fingerprinting (ตรวจดูปริมาณการใช้คาร์บอนและไนโตรเจนของเชื้อ) [10]

ข้อเสียหลักของวิธีการตรวจสอบนี้คือ ใช้แรงงานมากซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 วันในการรอผลทดสอบและใช้เวลาอีก 7-10 วันในการยืนยันผลการทดสอบ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดความล่าช้าที่เกิดขึ้น จึงมีผู้คิดค้นวิธีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารใหม่ ๆ ขึ้นมาโดยใช้เวลาในการทดสอบน้อยลง เช่นการใช้ antibody และการนำวิธีทางชีวเคมีมาประยุกต์ใช้

ปัจจุบันวิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลที่เรียกว่า Multiplex-PCR เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและรวดเร็วกว่า โดยที่สามารถตรวจหาปริมาณ DNA ได้หลายชนิดจากการเพิ่มปริมาณ DNA เพียงครั้งเดียว ซึ่งในการเพิ่มขยายปริมาณ DNA นี้ ต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ คือ Template DNA, Oligonucleotide primer, เอนไซม์ DNA polymerase และ Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ซึ่งในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนแยกสายคู่ของ Template DNA ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 $^{\circ}$C จากนั้นเป็นขั้นตอน Annealing คือ การลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 $^{\circ}$C เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับ Template DNA สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่ผสม ขั้นตอนสุดท้ายคือ Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสาย DNA ใหม่ต่อจาก Primer ในทิศทางจาก 5’ ไป 3’ อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 $^{\circ}$C ในการสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนนี้ซ้ำกันเป็นจำนวนหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ Amplified product หรือที่เรียกว่า amplicon ซึ่งเป็น DNA สายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก [11]

วัสดุและวิธีวิธีดำเนินการทดลอง

1.วัสดุ

ตารางที่ 3 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและสารเคมี	ผู้ผลิต/ผู้จัดจำหน่าย
1. PCR reagents	
1.1 Deoxynucleotide Solution Mix (N 04475 Lot 18 Assayed 5/06)	BioLabs (New England) , USA
1.2 Taq DNA Polymerase (MO267S Lot:7 Assayed 6/06)	BioLabs (New England) , USA
1.3 Thermopol Buffer (B9004S Lot:0206)	BioLabs (New England) , USA
2. Culture media	
2.1 Certified™ Molecular Biology Agarose (Catalog 16T3101)	Bio-Rad Laboratories, USA
2.2 Soybean-Casein Digest Medium (Bacto™ Tryptic Soy Broth) (Lot 5321341)	Difco Laboratories, USA
2.3 Bismuth sulfite agar (BS Difco) (Lot 2142718)	Becton, Dickenson and company. USA
2.4 Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxine-Agar (M.Y.P.-agar) (Lot VM357067 451)	Merck KGaA, Germany
3. Instruments	
3.1 เครื่องชั่ง Sartorius (รุ่น TE313S)	Scientigic Promotion Co.,LTD. Germany
3.2 Shaking water bath (รุ่น GFL 1086)	Siam&Co.,ltd, Thailand
3.3 Incubator Memmert (รุ่น 100-800)	Beschickung-Loading, USA
3.4 Brushless microcentrifuge	Danville scientific inc.

(รุ่น 260D)	Bio-Active Co., Ltd., USA
3.5 Laminar Air Flow (Model 1.2)	Holten, Denmark
3.6 เครื่อง PCR Primus96^{plus} (Model MWGAG)	Biotech, USA
3.7 เครื่องถ่ายรูป Image Analyzer Image Master (รุ่น VDS-CL 18-1130-55)	USA

2. วิธีการวิจัย

การศึกษานี้แบ่งการวิจัยออกเป็น 2 ส่วนคือ

2.1 การตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่เป็น Positive Control

2.1.1 นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ได้แก่ *S. aureus, B. cereus* และ *Salmonella spp.* มาใส่ใน Tryptic Soy Broth ทิ้งไว้ 1 คืน

2.1.2 นำเชื้อใน Tryptic Soy Broth มาลง Tryptic Soy Broth ใหม่อีกครั้ง

2.1.3 นำ 1ml ของ mixed culture (จะมี *S. aureus, B. cereus* และ *Salmonella spp* อย่างละ 400mcl) มาผสมลงในเนื้อ 10 กรัม แล้วเติม Tryptic Soy broth ลงไปอีก 90 ml

2.1.4 เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.5 นำ culture broth ที่ได้จากการ incubate มา 1 ml ไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.1.6 ทำการ resuspend ส่วนของชิ้นที่ตกตะกอนด้วย Double distilled water 100 mcl

2.1.7 นำชิ้นส่วนที่ตกตะกอนนั้นมาแยกเป็น whole cell และอีกหนึ่งไปทำ heat treatment ก่อนที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำทั้งสองส่วนนั้นไปทำ PCR

2.2 การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) สำหรับตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

2.2.1 คำนวณปริมาณสารต่างๆที่จะต้องใช้ในการทดลองโดยให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 mcl ซึ่งในแต่ละหลอดจะใช้ ThermolPol buffer จำนวน 5 mcl, dNTP mix 1 mcl, Primer A และ B ของแต่ละเชื้ออย่างละ 1 mcl, Taq DNA polymerase enzyme เชื้อละ 0.25 mcl, Template DNA ของแต่ละเชื้อ (*S. aureus* 1.11mcl, Salmonella spp. 0.5 mcl และ *B. cereus* 1.28 mcl) และน้ำกลั่น double distilled water

2.2.2 เตรียมเชื้อที่ได้จากการทำ culture ไว้มาเชื้อละ 0.05 mcg จำนวน 3 หลอด หลอดละ 1 เชื้อ และหลอดที่มีเชื้อทั้ง 3 ชนิด 1 หลอด

2.2.3 เติมน้ำกลั่น (Double distilled water) ลงในแต่ละหลอดตามปริมาณที่คำนวณได้

2.2.4 เติม ThermolPol buffer และ dNTP mix ตามปริมาณที่กำหนด

2.2.5 เติม Primer A และ B ของแต่ละเชื้ออย่างละ 1 mcl

2.2.6 เติม Template DNA ของแต่ละเชื้อลงไป จากนั้นเติม Taq DNA polymerase

2.2.7 นำหลอดเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งค่าให้เป็น 30 cycles

2.2.8 นำ PCR product ที่ได้มาทำ Gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบดู base pair

ผลการทดลอง

1. ผลการการทดสอบความจำเพาะของ Primers ต่อเชื้อต่างๆ

1.1 sea1-sea2 primer sets ของเชื้อ *S. aureus*

รูปที่ 4 แสดงความจำเพาะเจาะจงของ primer sea1-sea2 ต่อเชื้อต่าง ๆ

Lane 1 : DNA ladder 100 bp

Lane 2 : *S. aureus* ATCC13565

Lane 3 : *S. aureus* ATCC14458

Lane 4 : *S. aureus* ATCC25923

Lane 5 : *E. Coli*

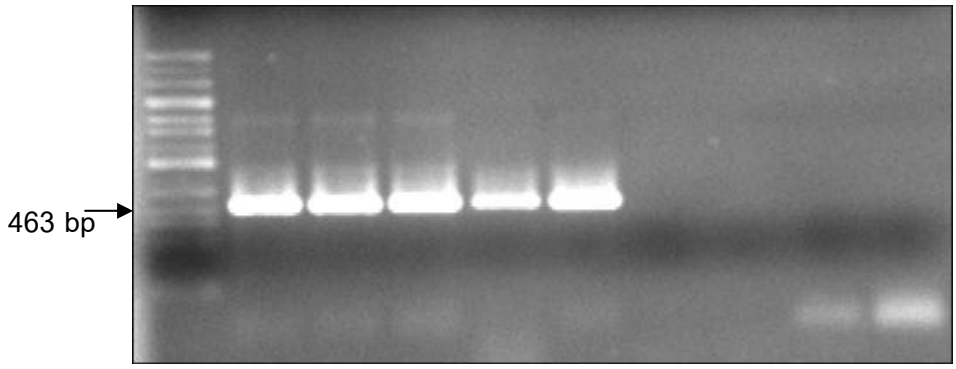
Lane 6 : *S. flexneri*

Lane 7 : *S. Sonnei*

Lane 8 : *P. Aeruginosa*

จากรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่า target gene ของเชื้อ *S. aureus* คือ sea1 และ sea2 นั้นจะจับกับ *S. aureus* ATCC13565 ได้เท่านั้น เนื่องจาก target gene sea1 และ sea2 นี้เป็นส่วนของ gene ในเชื้อ S. aureus ที่สร้าง enterotoxin และสายพันธุ์ ATCC13565 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง enterotoxin ได้มาก และมียีนที่สร้าง enterotoxin อยู่มากกว่าครึ่งหนึ่งของทั้งหมด จึงสามารถตรวจเจอได้ง่าย สำหรับสายพันธุ์อื่น ๆ ใน Lane ที่ 3 ถึง 8 นั้นเป็นเชื้อที่ไม่มีการสร้าง enterotoxin ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาใด ๆ ต่อ primer sea1 และ sea2

1.2 invA1-invA2 primer set **ของเชื้อ** *Salmonella spp*.

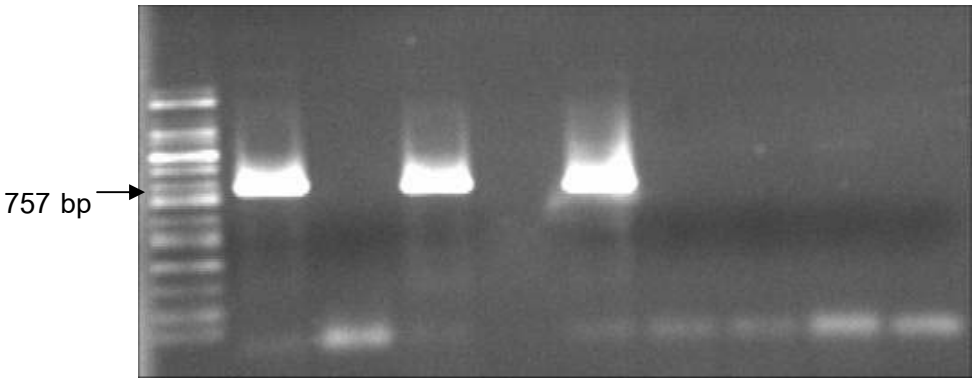


รูปที่ 5 แสดงความจำเพาะเจาะจงของ primer invA1-invA2 ต่อเชื้อต่าง ๆ

Lane 1	: DNA ladder 100 bp	Lane 6	: *S. choleraesuis*
Lane 2	: *S. typhimurium*	Lane 7	: *E. coli*
Lane 3	: *S. paratyphi* A	Lane 8	: *S. flexneri*
Lane 4	: *S. typhi*	Lane 9	: *S. sonnei*
Lane 5	: *S. Enteritidis*	Lane 10	: *P. aeruginosa*

จากรูปจะเห็นว่า target gene invA1-invA2 ซึ่งเป็น invasive gene ของเชื้อ *Salmonella spp*. ที่ก่อให้เกิด food poisoning จะสามารถจับกับเชื้อใน lane ที่ 2 ถึง 6 นั่นคือเชื้อ Salmonella ในสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มี invasive gene อยู่ สำหรับเชื้ออื่น ๆ เช่น *E. coli, P.aeruginosa* เป็นต้น จะไม่มีการตอบสนองใด ๆ ในการทำ PCR เนื่องจากเชื้อเหล่านั้นไม่มี invasive gene นั่นเอง

1.3 nheA1-nheA2 primer sets **ของเชื้อ** *B. cereus*

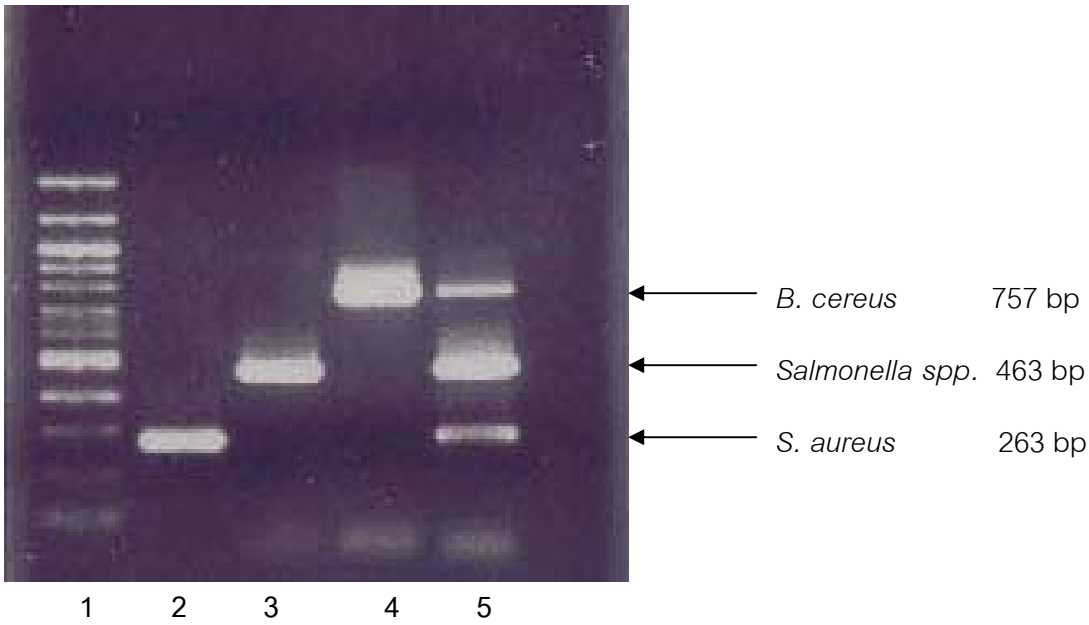


รูปที่ 6 แสดงความจำเพาะเจาะจงของ primer nheA1-nheA2 ต่อเชื้อต่าง ๆ

Lane 1 : DNA ladder 100 bp	Lane 6 : *B. thuringiensis*
Lane 2 : *B. cereus*	Lane 7 : *E. coli*
Lane 3 : *B. subtilis*	Lane 8 : *S. flexneri*
Lane 4 : *B. Thuringiensis* ATCC10792	Lane 9 : *S. Sonnei*
Lane 5 : *B. coagulans*	Lane 10 : *P. Aeruginosa*

สำหรับ target gene nheA1-nheA2 นี้เป็น target gene ที่ถูกออกแบบมาเพื่อให้มีความจำเพาะเจาะจงกับ non-hemolytic enterotoxin A ที่พบใน *B.cereus* ที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียเมื่อรับประทานเข้าไป ซึ่งเมื่อทำการทดสอบความจำเพาะเจาะจงแล้ว พบว่า lane ที่ 2 4 และ 6 นั่นคือเชื้อ *B. cereus*, *B. Thuringiensis* ATCC10792 และ *B. Thuringiensis* แสดงผลการจับกับ target gene ขึ้น เนื่องจากเชื้อทั้ง 3 นี้ต่างมี non-hemolytic enterotoxin A ทั้งสิ้น

2. ผลการทำ Pure Culture ของเชื้อทั้งสามชนิด จากการทำ multiplex PCR



รูปที่ 7 แสดงผลการทำ multiplex PCR จาก pure culture ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด

Lane 1 : DNA Ladder 100 bp

Lane 2 : *S. aureus*

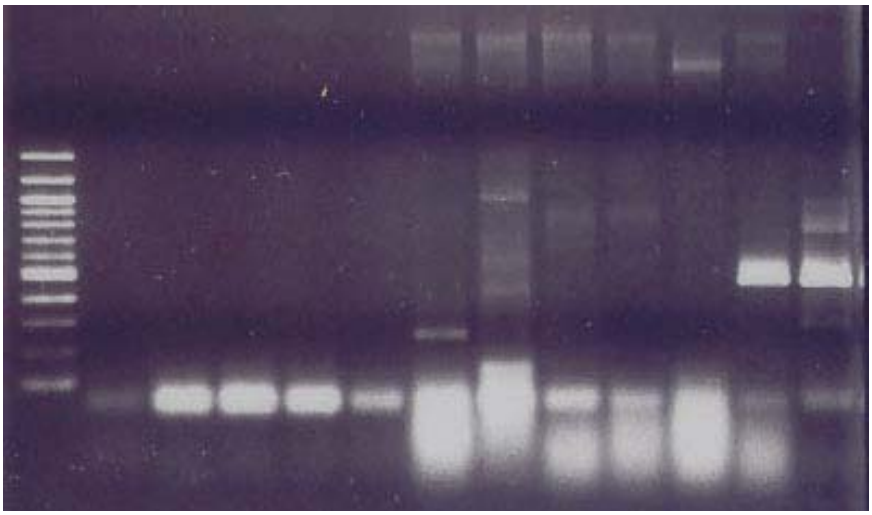
Lane 3 : *Salmonella spp.*

Lane 4 : *B. cereus*

Lane 5 : Mixed culture of *S. aureus, Salmonella spp., and B. cereus*

เมื่อทดสอบโดยใช้ multiplex PCR คือใช้ target gene ทั้ง 3 ชนิด ตรวจสอบกับเชื้อเดี่ยวๆ และเชื้อที่รวมกัน พบว่า *S. aureus* จะตอบสนองต่อ sea1-sea2 เท่านั้นซึ่งมีคู่ base pair อยู่ที่ 263 base pairs ใน lane ที่ 1 ส่วน *Salmonella spp.* ใน lane ที่ 2 จะตอบสนองกับ invA1-invA2 เท่านั้นที่ 463 base pairs และ *B.cereus* ใน lane ที่ 3 จะตอบสนองต่อ nheA1-nheA2 เท่านั้นที่ 757 base pairs และเมื่อทดสอบกับเชื้อทั้ง 3 ชนิดก็จะพบการตอบสนองต่อทั้ง 3 target genes ดังที่แสดงในรูป

3. ผลการทดสอบในตัวอย่างอาหารที่เวลา 0 และ 18 ชั่วโมง



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

รูปที่ 8 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างอาหารด้วยวิธี multiplex PCR

Lane 1 : DNA Ladder 100 bp
Lane 2 : ตัวอย่างกระเพรา ที่ 0 ชั่วโมง
Lane 3 : ตัวอย่างหอมหัวใหญ่ ที่ 0 ชั่วโมง
Lane 4 : ตัวอย่างถั่วฝักยาว ที่ 0 ชั่วโมง
Lane 5 : ตัวอย่างกะหล่ำปลี ที่ 0 ชั่วโมง
Lane 6 : ตัวอย่างสะระแหน่ ที่ 0 ชั่วโมง
Lane 7 : ตัวอย่างกระเพรา ที่ 18 ชั่วโมง
Lane 8 : ตัวอย่างหอมหัวใหญ่ ที่ 18 ชั่วโมง
Lane 9 : ตัวอย่างถั่วฝักยาว ที่ 18 ชั่วโมง
Lane 10: ตัวอย่างกะหล่ำปลี ที่ 18 ชั่วโมง
Lane 11: ตัวอย่างสะระแหน่ ที่ 18 ชั่วโมง
Lane 12: Positive Control ที่ 18 ชั่วโมง
Lane 13 : Pure Culture ที่ 18 ชั่วโมง

จากรูปแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างอาหารที่ 0 ชั่วโมง (lane 1-6) จะไม่เกิดการจับกับ target geneใด ๆ เนื่องจากที่เวลา 0 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นยังไม่มีการเติบโตของเชื้อเพียงพอที่จะ detect ได้ หรืออาจจะไม่มีเชื้ออยู่เลย

แต่เมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมงจะเห็นว่าใน lane ที่ 7 นั่นคือ ตัวอย่างกระเพรา พบแถบการจับกับ target gene sea1-sea2 ที่ 263 base pairs แสดงให้เห็นถึงการมีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ และใน lane 13 ที่พบแถบของ target genes ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดเนื่องจาก lane 13 นั้นเป็น Pure culture ส่วนใน lane 12 นั้นควรพบทั้ง 3 แถบเช่นเดียวกับ lane 13 เนื่องจากเป็น Positive control แต่จากรูปที่แสดงจะยังเห็นว่ามีแถบขึ้นไม่ชัดเจนนัก

3.1 **ผลแสดงปริมาณเชื้อ** (CFU/mL) **ที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารที่ 0 ชั่วโมง**

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารที่ 0 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	*Salmonells spp.*	*S. aureus*	*B. cereus*
กระเพรา	TMTC	-	4.0×10^{2}
หอมหัวใหญ่	2.6×10^{3}	-	-
ถั่วฝักยาว	2.1×10^{4}	-	-
กะหล่ำปลี	6.0×10^{2}	-	-
สะระแหน่	8.4×10^{3}	-	-

3.2 **ผลแสดงปริมาณเชื้อ** (CFU/mL) **ที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารที่ 18 ชั่วโมง**

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารที่ 18 ชั่วโมง, Positive Control และ Pure Culture

ตัวอย่าง	*Salmonells spp.*	*S. aureus*	*B. cereus*
กระเพรา	2.9×10^{9}	-	1.0×10^{8}
หอมหัวใหญ่	8.0×10^{9}	-	-
ถั่วฝักยาว	5.5×10^{9}	-	-
กะหล่ำปลี	6.0×10^{9}	-	-
สะระแหน่	2.5×10^{9}	-	-
Positive Control	3.3×10^{9}	6.3×10^{9}	1.0×10^{8}
Pure Culture	5.6×10^{9}	4.0×10^{8}	-

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของการศึกษานี้เป็นการทดลองควบคู่ไประหว่างการทดสอบแบบ Conventional method และการทดสอบโดยวิธี Multiplex-PCR เพื่อพิจารณาความสอดคล้องและความน่าเชื่อถือของแต่ละวิธี ซึ่งผลจากการตรวจสอบเชื้อ จุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด เป็นดังนี้

1. การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่เป็น Positive Control นั้นให้ผลตรงกันทั้ง 2 วิธี ทั้งในแง่ของความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ และปริมาณของเชื้อแต่ละชนิด

2. การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างผักสด 5 ชนิด ที่ 0 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าไม่พบเชื้อใด ๆ จากการตรวจด้วยวิธี Multiplex-PCR ส่วน Conventional method นั้นสามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้ในตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด พบเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างเพียง 1 ชนิด และไม่พบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างใด ๆ เลย

3. สำหรับการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างผักสด 5 ชนิด ที่ 18 ชั่วโมง จากการตรวจด้วยด้วยวิธี Multiplex-PCR พบว่า มีการตรวจพบเชื้อที่ไม่เฉพาะเจาะจงในทุก ตัวอย่างอาหาร แต่พบเชื้อ *B. cereus* เพียงชนิดเดียว ในตัวอย่างเดียวเท่านั้น ในขณะที่ Conventional method สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้ในตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด พบเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างเพียง 1 ชนิด (ตัวอย่างเดียวกันกับที่พบที่ 0 ชั่วโมง) และไม่พบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างใด ๆ เลย เช่นเดียวกับที่ 0 ชั่วโมง

4. ผลของ Positive control (ในตัวอย่างอาหาร) และ Pure culture (ในอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในการตรวจที่ 18 ชั่วโมงที่ได้จากวิธี Multiplex-PCR ยังไม่ชัดเจนนักทั้ง ๆ ที่ใช้สภาวะในการทดสอบเดียวกัน แต่สำหรับ Conventional method สามารถพบเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

สรุปผลการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารทั้ง 5 ชนิดของการศึกษานี้โดยวิธี Multiplex-PCR และ Conventional method ไม่มีความสอดคล้องซึ่งกันและกัน และผลที่ได้จากวิธี Multiplex-PCR ยังไม่มีความน่าเชื่อถือเท่าที่ควร

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่เป็น Positive Control

การทำ Positive Control มีความสำคัญเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการทดลอง และทำให้การทดลองมีความน่าเชื่อถือ ผลจากการทำ Positive Control พบว่า primer ที่เลือกมา ใช้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อจุลินทรีย์เป็นอย่างมากแม้ว่าจะทดสอบในหลอดทดลองเดียวกัน

ซึ่งก่อนหน้าที่จะมีการทำ Positive Control นั้น ได้มีการทดสอบหาความจำเพาะ เจาะจงของ primer เหล่านี้ต่อเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะสายพันธุ์ที่ก่อโรคเท่านั้น เชื้อที่เลือกมาทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (มี 263 bp), *Bacillus cereus* (มี 757 bp) และ *Salmonella spp.* (มี 463 bp) โดย primer sea1 และ sea2 มีความจำเพาะเจาะจงต่อ *S. aureus* ATCC13565 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง enterotoxin ได้มาก และมียีนที่สร้าง enterotoxin อยู่มากกว่าครึ่งหนึ่งของทั้งหมด จึงสามารถตรวจเจอได้ง่าย primer invA1 และ invA2 มีความจำเพาะเจาะจงต่อ *S. typhimurium, S. paratyphi A, S. typhi, S. Enteritidis* และ *S. choleraesuis* ส่วน primer nheA1 และ nheA2 มีความจำเพาะ เจาะจงต่อ *B. cereus, B. thuringiensisATCC10792* และ *B. thuringiensis* ซึ่งล้วนแต่ก่อให้เกิดโรคทางระบบทางเดินอาหารได้ทั้งสิ้น

2. การทำ PCR สำหรับตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

อาหารมีหลากหลายชนิดทั้งที่ผ่านการปรุงสำเร็จ และที่รับประทานโดยตรง องค์ประกอบหลักของอาหารส่วนใหญ่มักจะเป็นเนื้อสัตว์ ผัก และเครื่องปรุง หากพิจารณาถึงโครงสร้างภายในแล้ว เนื้อสัตว์จะมีรายละเอียดและความซับซ้อนมากกว่าผัก ซึ่งอาจทำให้เกิดความยุ่งยากในการทดลองมากกว่า

ในการทดลองนี้ผู้ทดลองจึงได้เลือกผักสดมาทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ กระเพรา หอมหัวใหญ่ ถั่วฝักยาว กะหล่ำปลี และสะระแหน่ ซึ่งเป็นผักที่หาได้ง่าย และส่วนใหญ่มักกินสด ไม่ได้ผ่านการปรุงหรือได้รับความร้อน จึงทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ โดยในการทดลองไม่ได้มีการล้างผักแต่อย่างใดเพื่อเป็น การเลียนแบบร้านอาหารทั่วไปที่มักไม่มีการล้างผักก่อนนำมาให้ผู้บริโภค

การทดลองนี้มีการบันทึกผลที่ 2 ช่วงเวลา คือที่ 0 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง ซึ่งจากงานวิจัยที่มีการทำมาก่อนหน้านี้มักจะบันทึกผลที่ 16 ถึง 18 ชั่วโมง แต่ที่ผู้ทดลองบันทึกผลที่ 0 ชั่วโมง ด้วยเนื่องจากต้องการตรวจดูว่าหากนำตัวอย่างอาหารมาตรวจทันทีนั้นจะได้ผลเป็นอย่างไร

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ผลที่ได้จากการทำ pure culture นั้นเป็นที่น่าพอใจ และเชื่อถือได้เพราะผลที่ได้จากภาพถ่ายและผลจากการนับเชื้อ (Conventional method) มีความสอดคล้องกัน ในขณะที่ผลจากการทดลองกับตัวอย่างอาหารจริงนั้นไม่เป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากผลที่ได้จากภาพถ่ายและผลจากการนับเชื้อไม่มีความสอดคล้องกัน ประกอบกับผลจากการทำ Positive Control ยังไม่เป็นอย่างที่ควรจะเป็น อาจเนื่องมาจาก Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความละเอียดสูง ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญในการทำเป็นอย่างมาก หากคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อยก็อาจทำให้ผลการทดลองผิดไปจากค่าที่ควรจะเป็นได้ หรืออาจเกิดจากสภาวะของการทดลองในอาหารยังไม่เหมาะสม และมีความเป็นไปได้ว่าในตัวอย่างผักนั้นอาจมีสารหรือเอนไซม์ซึ่งสามารถรบกวนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสไม่ให้ดำเนินไปอย่างที่ควรจะเป็น

ข้อเสนอแนะ

สภาวะในการทดสอบครั้งนี้จำเพาะเจาะจงกับการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เท่านั้น แต่เมื่อนำมาใช้กับตัวอย่างอาหารจริง (*in vivo*) จำเป็นต้องปรับสภาวะใหม่ให้เหมาะสมมากขึ้น โดยการสกัดสารที่รบกวนปฏิกิริยาดังกล่าวออกไป ซึ่งต้องใช้เวลามากกว่านี้ นอกจากนี้ตัวอย่างแต่ละชนิดอาจต้องการสภาวะในการทดลองต่างกัน จึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละตัวอย่าง เพื่อที่จะพัฒนาต่อไปเป็น standard protocol ซึ่งจะส่งผลประโยชน์ให้แก่ระบบสาธารณสุขได้เป็นอย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

1. Cano RJ, Colomé JS. Microbiology. St. Paul: West Publishing Company, 1986: 797-820.
2. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 2002: 525-533.
3. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, et al. Medical Microbiology 20th ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1995.
4. Li Y, Mustapha A. Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in Apple Cider and Produce by a Multiplex PCR. Journal of Food Protection 2004; 67: 27-33.
5. Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat Samples. Journal of Food Protection 2005; 68: 551-556.
6. Bhunia AK, Lathrop A. Pathogen detection, food-borne. The McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology 2003. New York: McGraw-Hill, 2003.
7. ชลดา เอี่ยมสะอาด, วัฒนา กลิ่นศรีสุข. Foodborne illness: cause and prevention [Online]. Department of Food Technology and Nutrition: Faculty of Technology, Mahasarakham University; 2001. Available from: http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/pathogens/staphylococcus_aureus.htm [Accessed 2001 Oct 14].
8. ชลดา เอี่ยมสะอาด, วัฒนา กลิ่นศรีสุข. Foodborne illness: cause and prevention[Online]. Department of Food Technology and Nutrition: Faculty of Technology, Mahasarakham University; 2001. Available from: http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/pathogens/bacillus_cereus_and_other_bacill.htm [Accessed 2001 Oct 14].

9. ชลดา เอี่ยมสะอาด, วัฒนา กลิ่นศรีสุข. Foodborne illness: cause and prevention[Online]. Department of Food Technology and Nutrition: Faculty of Technology, Mahasarakham University; 2001. Available from: http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/pathogens/salmonella__spp.htm [Accessed 2001 Oct 14].

9. กลุ่มภารกิจด้านสนับสนุนงานบริการสุขภาพ. บทคัดย่อการประชุมวิชาการกลุ่มภารกิจด้านสนับสนุนงานบริการสุขภาพ ครั้งที่ 3 ประจำปี 2548 เรื่อง “คุ้มครองผู้บริโภคก้าวไกลเมืองไทยแข็งแรง”. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ, 2548.

11. ศิริพร สิทธิประณีต. พันธุวิศวกรรมปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: ส.วิชาญการพิมพ์, 2531.

12. สำนักงานคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/cheme/confict21.htm