การใช้เทคนิค Real-time PCR ในการตรวจปริมาณยาปฏิชีวนะ

นางสาวดลจิต จินใจ
นางสาวอภิษฐา ทรัพย์ประเสริฐ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2552

QUATITATIVE OF ANTIBIOTICS BY REAL-TIME PCR

MISS DONJIT CHINJAI
MISS APISTHA SUPPRASERT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE BACHELER DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การใช้เทคนิค Real-time PCR ในการตรวจปริมาณยาปฏิชีวนะ

.....

(นางสาวดลจิต จินใจ)

.....

(นางสาวอภิษฐา ทรัพย์ประเสริฐ)

.....

(ผศ.ดร.วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ดร.สุรชัย งามรัตนไพบูลย์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ

การใช้เทคนิค Real-time PCR ในการตรวจปริมาณยาปฏิชีวนะ

ดลจิต จินใจ, อภิษฐา ทรัพย์ประเสริฐ
อาจารย์ที่ปรึกษา : วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์*, สุรชัย งามรัตนไพบูลย์*
*ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ : Real-time PCR, ยาปฏิชีวนะ, *Staphylococcus aureus*

ปัจจุบันปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์เกิดเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการป้องกันและรักษาโรค หรือใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ ทำให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภค อาจทำให้เกิดการสะสมในร่างกายและก่อให้เกิดเชื้อดื้อยา วิธีการตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในปัจจุบันมีการวิเคราะห์หลายวิธีและหลายระดับได้แก่ microbiological assay, immunological assay และ chemical assay เช่น HPLC และ LC-MS/MS ซึ่งมีเพียง 2 วิธีนี้เท่านั้น ที่สามารถบอกได้ทั้งชนิดและปริมาณของยาปฏิชีวนะ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Penicillin G และ Erythromycin โดยใช้เทคนิค Real-time PCR เพื่อให้ได้วิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงและให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วมากกว่าวิธีที่เคยมีมาในอดีต และสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะอื่น ๆ ต่อไปได้

การศึกษานี้เริ่มจากการนำเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml มาผสมกับ Penicillin G หรือ Erythromycin ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นนำมาสกัด DNA เพื่อนำมาตรวจหาปริมาณยาปฏิชีวนะดังกล่าว โดยใช้เทคนิค Real-time PCR จากผลการศึกษาจะได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบการเพิ่มขึ้นของ DNA กับความเข้มข้นของยา จากผลการศึกษาพบว่า Penicillin G มีความสัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรงระหว่างจำนวน DNA กับความเข้มข้นของ Penicillin G ในช่วง 0.00001 – 0.008 ppm (r^2 = 0.089) จึงน่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจปริมาณยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ แต่ Erythromycin ได้ผลการทดลองที่ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ได้ ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Erythromycin ต่อไป

Abstract

QUATITATIVE OF ANTIBIOTICS BY REAL-TIME PCR

Donjit Chinjai, Apistha supprasert

Project advisor : Wichet Leelamanit*, Surachai Kamrattanapriboon*

*Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword : Real-time PCR, antibiotics, *Staphylococcus aureus*

Nowaday, the use of a several drug of antibiotics for the treat and protection of diseases or feed as growth promoters in animal farming frequently causes several problems. Drugs contaminants in raw meat contributes to increase in the emergence of resistant bacteria in humans. In routine work, antibiotic contamination was determined by microbiological assay, immunological assay and chemical assays. So far, only HPLC and LC-MS/MS, which are chemical assay, can be used to identify and quantify the remaining antibiotics in meat. Therefore, this study was develop the Real-time PCR method for quantitative Penicillin G and Erythromycin. The developed method was applied for quantitative other antibiotics.

In present study, 10^7 cfu/ml of *Staphylococcus aureus* was individually mixed with Penicillin G or Erythromycin in various concentrations. DNAs extracted from individual Real-time PCR methods was applied to determine the DNA concentration from each samples. The data from the experiment method indicated the relationship between the DNA and antibiotic concentrations. The result of Penicilin G was illustrated linearities (r^2 = 0.089) in range 0.00001 – 0.008 ppm. In consequence, the technique can be applied to quantitative Penicillin G contamination in meat. The result of Erythromycin was poor to measurement. Therefore, further study should be developed method for quantitative Erythromycin.