การตรวจสอบการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ในเภสัชภัณฑ์อย่างรวดเร็วโดยเทคนิคแลมป์

นางสาวนันทกานต์ หลีกอาญา
นางสาวน้ำฝน ปุพพะธีราวณิชย์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2553

RAPID DETECTION OF *Salmonella* spp. CONTAMINATED IN PHARMACEUTICAL PRODUCTS BY LAMP TECHNIQUE

MISS NANTAKARN LEAKAYA
MISS NAMFON PUPPATEERAVANICH

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

โครงการพิเศษ

เรื่อง การตรวจสอบการปนเปื้อน *Salmonella* spp.

ในเภสัชภัณฑ์อย่างรวดเร็วโดยเทคนิค LAMP

.....

(นางสาวนันทกานต์ หลีกอาญา)

.....

(นางสาวน้ำฝน ปุพพะธีราวณิชย์)

.....

(รศ.ดร.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ
การตรวจสอบการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ในเภสัชภัณฑ์อย่างรวดเร็วโดยเทคนิคแลมป์

นันทกานต์ หลีกอาญา, น้ำฝน ปุพพะธีราวณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษา : จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ : *Salmonella* spp., Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, เภสัชภัณฑ์

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ทำให้เกิดโรคทางทางเดินอาหารที่สำคัญ เช่น โรคลำไส้อักเสบ ไทฟอยด์ หรือการติดเชื้อในกระแสเลือด มักพบปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไก่ นม ไข่ ผัก ตลอดจนการปนเปื้อนในเภสัชภัณฑ์ต่างๆ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ในเภสัชภัณฑ์โดยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *invA* ของ *Salmonella enterica* จำนวน 4 เส้น ทั้งนี้ได้มีการทดลองเบื้องต้นโดยการเติมเชื้อ *Salmonella* ที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่างยาแล้วตรวจสอบโดยเทคนิค LAMP พบว่าให้ผลบวก จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่จำหน่ายตามท้องตลาดทั้งยาแผนปัจจุบันและยาแผนโบราณ 20 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วยเภสัชภัณฑ์รูปแบบของแข็ง 10 ตัวอย่าง และรูปแบบของเหลว 10 ตัวอย่าง โดยทำการเพิ่มจำนวนเชื้อใน tryptic soy broth ตามด้วยการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 50 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis บน 2% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องเพื่อดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP โดยดูการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเขียวเมื่อหยด SYBR green I ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. จากเภสัชภัณฑ์ 20 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ 2 ตัวอย่างคือ เภสัชภัณฑ์รูปแบบของแข็ง 1 ตัวอย่าง และเภสัชภัณฑ์รูปแบบของเหลว 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างดังกล่าวด้วยวิธีมาตรฐาน แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเภสัชภัณฑ์ใดๆ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไวสูง มีความจำเพาะเจาะจงสูง ทำได้ง่ายภายใต้อุณหภูมิคงที่ และใช้เวลาน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่จำเป็นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน ดังนั้นสามารถประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเภสัชภัณฑ์จริงได้

Abstract

Rapid detection of *Salmonella* spp. contaminated in pharmaceutical products by LAMP technique

Nantakarn Leakaya, Namfon puppateeravanich

Project advisor : Chanpen Wiwat

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword : *Salmonella* spp., Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, pharmaceutical products

Salmonella spp., Gram negative bacilli, are common caused of gastrointestinal tract infections such as gastroenteritis, typhoid fever and septicemia. They usually contaminate in meats, chickens, milk, eggs, vegetables including pharmaceutical products. The purpose of this study was to develop a rapid detection of *Salmonella* spp. contaminated in pharmaceutical products by LAMP technique. This study used 4 designed primers that are specific to the *invA* gene of *Salmonella enterica*. Preliminary experiment was performed by adding known amount of *Salmonella* spp. into pharmaceutical samples. Subsequently, the samples were detected by LAMP technique. The results showed this method is detectable. The 20 samples of modern and traditional pharmaceutical products were collected; 10 samples were oral solid dosage forms and the other were oral liquid dosage forms. Prior to the LAMP assay, all samples were pre-enriched in tryptic soy broth. DNAs were extracted and amplified at 65 $^{\circ}$C for 50 min. Amplified products were separated by means of electrophoresis in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized by UV transilluminator. Moreover, the amplified products were mixed with SYBR green I and observed the green color. The results, 2 of 20 samples gave the positive results. One obtained from oral solid dosage forms and another liquid dosage forms. Furthermore, the same pharmaceutical products were detected by conventional culture method. All samples gave negative results. This study showed that LAMP technique provides more DNA amplification efficiency, sensitivity, specificity, and rapidity under isothermal conditions than conventional culture method, using at least 3 days. Consequently, LAMP technique has the potential to apply for detection *Salmonella* spp. contaminated in the pharmaceutical products.