# การตรวจหาเชื้อเอนเทอโรท็อกซิเจนิก เอสเชอริเชีย โคไล ในตัวอย่างอาหารด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นางสาวประชุมพร จันทร์วีระชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

# DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN FOOD SAMPLES BY POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE

Miss Prachumporn Chanweerachai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program
in Food Chemistry and Medical Nutrition
Department of Food and Pharmaceutical Chemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การตรวจหาเชื้อเอนเทอโรท็อกซิเจนิก เอสเชอริเชีย โคไล ในตัวอย่างอาหารด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส |
| โดย | นางสาวประชุมพร จันทร์วีระชัย |
| สาขาวิชา | อาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มณีวรรณ สุขสมทิพย์ |

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……..คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……..ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ลินนา ทองยงค์)

……..อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร)

……อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มณีวรรณ สุขสมทิพย์)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เพ็ญพรรณ แน่นหนา)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล)

ประชุมพร จันทร์วีระชัย : การตรวจหาเชื้อเอนเทอโรท็อกซิเจนิก เอสเชอริเชีย โคไล ในตัวอย่างอาหารด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส. (DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN FOOD SAMPLES BY POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ภญ. ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ภญ. ดร. มณีวรรณ สุขสมทิพย์, 77 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารให้เหมาะสมก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR รวมถึงพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อเอนเทอโรท็อกซิเจนิก เอสเชอริเชีย โคไล (enterotoxigenic *Escherichia coli*; ETEC) ในตัวอย่างอาหาร โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้เพื่อแยกแบคทีเรียออกจากเมทริกซ์ของอาหารหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR และเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย คือ วิธีการกักเซลล์แบคทีเรียไว้บนแผ่น membrane filter ผลการศึกษาพบว่า แม้ประสิทธิภาพในการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากเมทริกซ์ของอาหารของ membrane filter ซึ่งประเมินจากค่า % recovery จะมีค่าไม่สูงมาก คือ อยู่ในช่วง 69-79 แต่เมื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของ ETEC ได้แม้มีการปนเปื้อนเพียง $10^2$ CFU ต่ออาหารหนึ่งกรัม และสามารถดำเนินการแล้วเสร็จภายใน 8-10 ชั่วโมง หลังจากที่นำเอาวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารโดยใช้ membrane filter มาใช้ร่วมกับ multiplex PCR ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด ได้แก่ พริกแกงเขียวหวาน เนื้อหมูดิบ ลาบหมูสุก ลาบหมูกึ่งดิบกึ่งสุก และเครื่องดื่ม ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนในอาหารประเภท เนื้อหมูดิบ ลาบหมูสุก ลาบหมูกึ่งดิบกึ่งสุก น้ำมะพร้าว น้ำฝรั่ง และน้ำใบบัวบก และพบเชื้อ ETEC ในอาหารประเภท ลาบหมูกึ่งดิบกึ่งสุก แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในอาหารได้

ภาควิชา อาหารและเภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา อาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5276577033: MAJOR FOOD CHEMISTRY AND MEDICAL NUTRITION
KEYWORDS: MULTIPLEX PCR/ ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI*
PRACHUMPORN CHANWEERACHAI: DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN FOOD SAMPLES BY POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE. ADVISOR: ASST.PROF. SUYANEE PONGTHANANIKORN, Dr.P.H., CO-ADVISOR: ASSOC.PROF. MANEEWAN SUKSOMTIP, Ph.D. 77 pp.

The aim of this study was to develop sample preparation and optimize PCR conditions which allowed the rapid and sensitive detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) contamination in food. Trapping bacterial cells with membrane filter was selected for sample preparation in this study. The result showed that although efficiency of bacteria separation from food matrix by this method evaluated by %recovery was not high (69-79), developed multiplex PCR had a satisfied sensitivity as it could detect $10^2$ CFU of ETEC/gram of food. Moreover, it could be accomplished in 8-10 hours. When the developed method was used to detect ETEC contamination in food including green curry paste, raw pork, cooked ground pork with vegetable and chili (larb), medium ground pork with vegetable and chili, and beverages, there was *E. coli* contamination in raw pork, cooked ground pork with vegetable and chili, medium ground pork with vegetables and chili, coconut juice, guava juice, and *Centella asiatica* juice. There was ETEC contamination in medium ground pork with vegetable and chili. The present study indicated that developed PCR method could detect ETEC contamination in food.

Department: Food and Pharmaceutical Chemistry Student's Signature…….
Field of Study: Food Chemistry and Medical Nutrition Advisor's Signature…….....
Academic Year: 2012 Co-advisor's Signature……...

# กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ภญ. ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ .ภญ. ดร.มณีวรรณ สุขสมทิพย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ให้ความรู้ ข้อคิดเห็น ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ซึ่งเป็นประโยชน์ยิ่งต่อการวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ภญ. ดร.ลินนา ทองยงค์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล และ ผศ.เพ็ญพรรณ แน่นหนา คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในหลักสูตรอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ผู้วิจัยด้วยความเมตตาเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่อนุเคราะห์เชื้อเอนเทอโรท็อกซิเจนิก อี โคไล สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพรพรรณ โรหิตรัตน์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คุณกนกวรรณ หงส์ทอง และคุณมาริสา นวลกุล เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวก ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี และภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัย

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่เลี้ยงดูและให้การสนับสนุนการศึกษาตลอดมา และขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจผู้วิจัยมาโดยตลอด

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 4

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับ..... 5

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

2.1 เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)..... 6

2.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในอาหาร..... 8

2.3 การแยกแบคทีเรียปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาหาร..... 8

2.4 การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในอาหาร..... 12

2.5 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)..... 17

บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการวิจัย..... 24

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... 24

หน้า

3.2 เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน..... 26

3.3 วิธีการทดลอง..... 26

3.4 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหาร..... 34

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 38

4.1 การหาปริมาณแบคทีเรีย..... 38

4.2 การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค membrane filtration..... 38

4.3 การออกแบบไพรเมอร์..... 40

4.4 การพัฒนาหาสภาวะที่เหมะสมในการทำปฏิกิริยา multiple PCR..... 40

4.5 การใช้วิธีการเตรียม DNA template แบบต่างๆ ที่มีต่อปฏิกิริยา PCR..... 43

4.6 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์..... 45

4.7 การทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ ETEC จาก pure culture..... 49

4.8 การทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR เมื่อใช้ร่วมกับ membrane filter ในการเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของ ETEC ในตัวอย่างอาหาร..... 54

4.9 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี multiplex PCR ที่พัฒนา..... 56

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย..... 60

รายการอ้างอิง..... 62

ภาคผนวก..... 67

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 77

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | องค์ประกอบและความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR…….. | 18 |
| 2 | ปริมาณของแบคทีเรียในส่วนต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการเตรียมตัวอย่างอาหารโดยวิธีดักจับด้วย membrane filter…….. | 39 |
| 3 | รายละเอียดของไพร์เมอร์และลำดับเบสของไพร์เมอร์ …… | 40 |
| 4 | องค์ประกอบและปริมาณของสารต่างๆ สำหรับปฏิกิริยา simple PCR …… | 41 |
| 5 | องค์ประกอบและปริมาณของสารต่างๆ สำหรับปฏิกิริยา multiplex PCR……. | 42 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา multiplex PCR เมื่อวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ..... | 43 |
| 2 | PCR product ที่ได้จากการทำ multiplex PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ ETEC ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่างๆ..... | 44 |
| 3 | PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ USP ในปฏิกิริยา simple PCR | 45 |
| 4 | PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ LT ในปฏิกิริยา simple PCR... | 46 |
| 5 | PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ ST ในปฏิกิริยา simple PCR... | 47 |
| 6 | PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR..... | 48 |
| 7 | PCR product จากวิธี simple PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *uspA* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 50 |
| 8 | PCR product จากวิธี simple PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *lt* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้มต่างๆ..... | 51 |
| 9 | PCR product จากวิธี simple PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *st* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 52 |

ภาพที่ หน้า

10 PCR product จากวิธี multiplex PCR ในการการตรวจวิเคราะห์ยีน *uspA*, *lt* และ *st* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 53

11 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหาร.. 55

12 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างเนื้อหมูดิบ..... 57

13 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างลาบหมู 58

14 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างเครื่องดื่ม..... 59

.

# คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|---|---|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| bp | Base pair |
| C° | Degree Celcius |
| Cfu/CFU | Colony forming unit |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| dNTP | 2,3-dideoxynucleoside triphosphate |
| dATP | Deoxyadenosine 5’ triphosphate |
| dCTP | Deoxycytidine 5’ triphosphate |
| dGTP | Deoxyguanosine 5’ triphosphate |
| dTTP | Deoxythymidine 5’ triphosphate |
| et al. | Et alli (Latin) and other people |
| g | Gram |
| h | Hour |
| kb | Kilobase |
| LB | Luria Bertani broth |
| min | Minute |
| ml | Milliliter ($10^{-3}$ litre) |
| mM | Millimolar ($10^{-3}$ molar) |
| mm | Millimeter ($10^{-3}$ meter) |

| | |
|---|---|
| µg | Microgram ($10^{-6}$ gram) |
| µl | Microliter ($10^{-6}$ liter) |
| µm | Micrometer ($10^{-6}$ meter) |
| Tm | Melting temperature |
| Tris | Tris-borate-EDTA |
| TSA | Tryptic soy agar |
| TSB | Tryptic soy broth |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolet |
| µM | Micromolar ($10^{-6}$ molar) |
| M | Molar |
| MW | Molecular weight |
| ng | Nanogram |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| rpm | Revolution per minute |

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

โรคอุจจาระร่วง (diarrhea) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา[1,2] สำหรับประเทศไทยจากรายงานของกระทรวงสาธารณสุข พบว่าในปี พ.ศ. 2552 โรคอุจจาระร่วงก่อให้เกิดการเจ็บป่วยสูงเป็นอันดับหนึ่งและจากข้อมูลย้อนหลัง 10 ปี พบว่าอัตราป่วยเนื่องจากโรคอุจจาระร่วงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 1,544.46 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2543 เป็น 2,023.64 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2552[3] สาเหตุสำคัญและพบบ่อยที่สุดของโรคอุจจาระร่วง คือ การติดเชื้อในลำไส้ เนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรค ได้แก่ แบคทีเรีย ปรสิต และไวรัส[1] สำหรับเชื้อก่อโรคที่พบบ่อย คือ แบคทีเรีย ตัวอย่างแบคทีเรียก่อโรคที่พบปนเปื้อนในอาหาร (foodborne bacterial pathogen) ที่สำคัญได้แก่ *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni,* และ *Escherichia coli* เป็นต้น[4]

เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ส่วนใหญ่จัดเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic strain) และจัดเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีรายงานพบว่า *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคอุจจาระร่วงในมนุษย์และสัตว์ได้ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับ virulence factors และปริมาณของเชื้อที่ได้รับเข้าไป โดย *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง (diarrheagenic *E. coli*) สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC),

enteroinvasive *E. coli* (EIEC), และ enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ verotoxin-producing *E. coli* (VTEC)[5,6] เชื้อ ETEC เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็กเล็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี และเป็นสาเหตุหลักของโรคอุจจาระร่วงในหมู่นักท่องเที่ยว (traveler's diarrhea) ที่เดินทางไปยังประเทศที่กำลังพัฒนา นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อ ETEC เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคอุจจาระร่วงในสัตว์ เช่น โค สุกร เป็นต้น[6] โดยเชื้อ ETEC สามารถสร้างสารพิษที่มีผลต่อลำไส้ (enterotoxin) ได้ 2 ชนิด คือ ชนิดที่ไม่ทนความร้อน (heat-labile toxin; LT) และชนิดที่ทนความร้อน (heat-stable toxin; ST) ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 15 นาที กลไกก่อโรคของสารพิษทั้งชนิด LT และ ST คือทำให้เกิดการหลั่งสารน้ำและโซเดียมเข้าไปในลำไส้ (intestinal lumen) ในปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ เชื้อ ETEC บางสายพันธุ์อาจสร้างสารพิษชนิด LT หรือ ST เพียงชนิดเดียว ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษได้ทั้ง 2 ชนิด[6,7]

โรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ ETEC สามารถติดต่อกันโดยเชื้อจากลำไส้ผ่านเข้าทางปาก โดยสามารถถ่ายทอดจากบุคคลไปยังบุคคล หรือถ่ายทอดโดยเชื้อปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำ อาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ส่วนใหญ่ได้แก่ อาหารประเภทเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เนื้อหมู เนื้อวัว น้ำนมดิบ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในผักสด ผลไม้และน้ำผลไม้ ดังนั้นจึงนับได้ว่าอาหารเป็นตัวกลางนำโรคที่สำคัญ[6,7] การตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในอาหารจึงถือเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันและเฝ้าระวังโรค และเป็นแนวทางในการดูแลด้านความปลอดภัยของอาหาร (food safety) และการควบคุมคุณภาพอาหาร (food quality control)

วิธีการตรวจหาและจำแนกเชื้อ ETEC แบบดั้งเดิม (conventional method) นั้นเป็นการตรวจลักษณะทางกายภาพรวมถึงสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น (phenotypic assay) ประกอบไปด้วย

กระบวนการหลายขั้นตอน ได้แก่ การเพิ่มจำนวนและแยกเชื้อออกจากอาหาร (enrichment and isolation) แล้วนำไปทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity assay) เพื่อศึกษาความเป็นพิษหรือความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในสัตว์ทดลองหรือเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์เชื้อ ETEC แบบดั้งเดิมจึงมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองแรงงานมาก มีขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อน[8] ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาและจำแนกเชื้อ ETEC โดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล (molecular-based method) ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ (genotypic assay) โดยเทคนิคที่นิยมใช้กันมากคือ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งมีข้อดีคือ รวดเร็ว มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง[9,10] แต่อย่างไรก็ตาม การนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในอาหารนั้นยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ความซับซ้อนขององค์ประกอบในอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน สารเคมีต่างๆ ซึ่งสารบางชนิดอาจเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ทำให้ความไวของวิธีวิเคราะห์ลดลง[11] ดังนั้นในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) ให้เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR จะช่วยกำจัดหรือลดผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ และยังสามารถช่วยเพิ่มปริมาณและความบริสุทธิ์ของเชื้อก่อโรคหรือดีเอ็นเอเป้าหมายได้อีกด้วย[12-14]

สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การบ่มเพาะเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวน (enrichment) จากการศึกษาของ Myint และคณะ[15] โดยทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่ดิบ ด้วยเทคนิค PCR พบว่า การบ่มเพาะเชื้อในตัวอย่างอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR จะสามารถตรวจพบแบคทีเรียในระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ $10^2$ CFU/ml นอกจากนั้นอาจใช้การสกัดด้วยระบบ aqueous two-phase เช่นการศึกษาของ Lantz และคณะ[16] ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนยแข็ง ด้วยเทคนิค PCR พบว่า วิธีสกัดแยกเชื้อด้วย aqueous two-phase systems มีประสิทธิภาพดีใน

การกำจัดตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ออกจากตัวอย่าง อีกวิธีหนึ่งคือการตรึงแบคทีเรียด้วยสารออกไซด์ของโลหะหนัก (metal hydroxide immobilization) จากการศึกษาพบว่า วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ในการแยกเชื้อ *Enterobacter sakazakii* ออกจากตัวอย่างนมผงก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR[17] นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) เช่นการศึกษาของ Lindqvist[18] ทำการตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อวัว ด้วยเทคนิค PCR พบว่า วิธี buoyant density gradient centrifugation เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย รวดเร็ว และสามารถเพิ่มความไวของวิธี PCR ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมนั้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและคุณสมบัติของอาหารที่ต้องการวิเคราะห์[14] และบางครั้งการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมนั้นอาจจำเป็นต้องใช้วิธีการหลายวิธีร่วมกัน

ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างอาหารให้เหมาะสม เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ ETEC โดยใช้เทคนิค PCR รวมถึงทำการพัฒนาหาสภาวะและพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อให้ได้วิธีตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินความปลอดภัยของอาหารในเชิงระบาดวิทยาต่อไป

**1.2 วัตถุประสงค์**

1. พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารให้เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR
2. พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ ETEC ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร โดยอาศัยเทคนิค PCR

**1.3 ประโยชน์ที่ได้รับ**

1. ได้วิธีการตรวจหาเชื้อ ETEC ที่ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งรวดเร็ว มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน มีความจำเพาะสูง และอาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มอื่น
2. ได้วิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารรูปแบบต่างๆ ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ด้วยเทคนิค PCR

# บทที่ 2

# แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ขนาด 1-2 ไมโครเมตร ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative) ไม่มีการสร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria) และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส[19] *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารส่วนลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งจัดเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) โดยพบในปริมาณสูงประมาณล้านเซลล์ต่อกรัม เชื้อนี้จะถูกขับออกจากร่างกายพร้อมอุจจาระ จึงกำหนดให้ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ดัชนีบ่งชี้ (index microorganisms) การปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและน้ำ แต่การบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อนี้ไม่ได้ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic strain) แต่อย่างไรก็ตามมีบางสายพันธุ์ที่อาจทำให้เกิดโรค (pathogenic strain) ได้ ในประเทศที่กำลังพัฒนา (developing countries) พบว่า *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคเป็นปัจจัยหลักของอัตราการตายในมนุษย์ [8]

ปัจจุบันมีการแบ่งกลุ่ม *E. coli* ที่ก่อโรค (diarrheagenic strains) ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะและกลไกการก่อโรค คือ กลุ่ม enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) และ enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ทำให้เกิดอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ (watery diarrhea) กลุ่ม enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) ทำให้เกิดอาการที่รุนแรงกว่า คือ อาการถ่ายเหลวปนเลือด (bloody diarrhea) นอกจากนั้นยังสามารถก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ (haemolytic uremic syndrome; HUS)

และระบบประสาทได้ด้วย ปัจจุบันมีรายงานพบว่ามี *E. coli* อุบัติใหม่ (newly emerging) อีก 2 กลุ่ม ซึ่งพบว่าก่อโรคได้เช่นกัน แต่ยังไม่สามารถระบุสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคหรืออาการที่เกี่ยวข้องได้อย่างชัดเจน คือ กลุ่ม diffuse-adhering *E. coli* (DAEC) และกลุ่ม enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ไปสู่มนุษย์เกิดได้โดยการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระที่มีเชื้อนี้ (fecal oral route) ดังนั้นอาหารจึงถือเป็นพาหะที่สำคัญ การควบคุมดูแลด้านความปลอดภัยของอาหารโดยการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารถือเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อการคุ้มครองผู้บริโภค

เชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) มีอุบัติการณ์การติดเชื้อในเด็กที่มีช่วงอายุ 3–5 ปี ในประเทศกำลังพัฒนา โดยเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในเด็กสูงถึง 380,000 รายต่อปี นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่พบได้มากที่สุดจากการแยกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ[5] เชื้อ ETEC ทำให้เกิดอาการคล้ายอหิวาตกโรค คือถ่ายเป็นน้ำไม่มีมูกหรือเลือดปน ปวดเกร็งท้อง อาเจียน มีภาวะกรดเกิน มีอาการอ่อนเพลีย และมีภาวะขาดน้ำ อาจมีไข้ต่ำ โดยปกติมีอาการไม่เกินกว่า 5 วัน โรคนี้ติดต่อโดยการปนเปื้อนเชื้อในอาหารและน้ำ สำหรับทารกพบว่าเกิดจากการปนเปื้อนเชื้อในอาหารเป็นสำคัญ[7]

เชื้อ ETEC มีกลไกก่อโรคอุจจาระร่วงผ่านการสร้างสาร enterotoxin สารดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน (heat-labile enterotoxin; LT) และชนิดที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน (heat-stable enterotoxin; ST) โดยเชื้ออาจสร้างเฉพาะ LT หรือ ST หรือสร้างทั้ง LT และ ST เมื่อ enterotoxin เข้าสู่ร่างกายผ่านทางเดินอาหารสารพิษจะเดินทางไปยังผนังลำไส้และมีกลไกระดับเซลล์ ส่งผลทำให้การแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างทางเดินอาหารกับเซลล์เยื่อบุเปลี่ยนแปลงไป จนเกิดเป็นอาการของอุจจาระร่วงในที่สุด[7]

**2.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในอาหาร**

ตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในอาหารนั้นยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ความซับซ้อนขององค์ประกอบในอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน สารเคมีต่างๆ ซึ่งสารบางชนิดอาจเป็นตัวยับยั้ง ทำให้ความไวของวิธีวิเคราะห์ลดลง[11] การแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาหารนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความไวของการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งวิธีการทาง phenotyping assay และ genotyping assay โดยเฉพาะการตรวจทาง genotyping assay นั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นการตรวจความจำเพาะของเชื้อปนเปื้อนด้วยการตรวจถึงระดับโมเลกุลของสารพันธุกรรมของเชื้อนั้นๆ ซึ่งมีหลักการที่สำคัญสองประการคือ[20]

1) การเพิ่มปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้นมากขึ้น เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจพบ โดยปกติการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารมักมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งส่งผลให้การตรวจหาการปนเปื้อนให้ผลลบลวง (false negative) เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อยมากเกินความสามารถของวิธีที่ใช้จะสามารถตรวจหาได้

2) การกำจัดโมเลกุลที่อาจเป็นตัวรบกวนปฏิกิริยาการตรวจสอบที่มีอยู่ในตัวอย่างอาหาร ซึ่งทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ เช่น โมเลกุลของไขมันที่ไม่เข้ากับน้ำทำให้การแยกเชื้อเป็นไปได้ยาก โมเลกุลของสารโปรตีนที่อาจไปรบกวนกระบวนการที่จำเพาะบางอย่างได้ โมเลกุลของเซลลูโลส ที่มาจากตัวอย่างอาหารที่เป็นพืชซึ่งมีผลทำให้เกิดการอุดตันแผ่นกั้นสำหรับการกรองบางชนิดได้ เป็นต้น

**2.3 การแยกแบคทีเรียปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาหาร**

วิธีการแยกแบคทีเรียปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาหาร มีหลายวิธี ดังนี้

2.3.1 การเพิ่มปริมาณโดยการบ่มเพาะเชื้อ (enrichment)

วิธีการบ่มเพาะเชื้อปนเปื้อน (enrichment) ถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากที่สุด เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ทำให้มีปริมาณเชื้อมากพอที่จะตรวจสอบได้ มักจะดำเนินการก่อนเริ่มตรวจสอบ (pre-enrichment) โดยการนำตัวอย่างอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อไปบ่มเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 16–20 ชั่วโมง หรือบ่มเพาะเชื้อประมาณ 1 คืน เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติการ[21]

2.3.2 การปั่นเหวี่ยง (centrifugation)

การปั่นเหวี่ยงเป็นวิธีทางกายภาพ ซึ่งอาศัยหลักการของแรงเหวี่ยงทำให้โมเลกุลของอาหาร (food matrix) ตกลงไปตามแรงเหวี่ยงและอยู่บริเวณก้นของภาชนะ แต่ด้วยวิธีการนี้อาจทำให้เซลล์ของเชื้อปนเปื้อนนั้นตกลงไปตามแรงเหวี่ยงด้วยเช่นกัน ดังนั้นควรเริ่มต้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่ำก่อนแล้วเก็บส่วนใสที่มีแบคทีเรียอยู่นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบสูงเพื่อให้เชื้อตกลงมากันหลอดแล้วทิ้งส่วนน้ำใสด้านบนไป[11]

นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์นำเอาหลักการของความหนาแน่นมาใช้ร่วมกับการปั่นเหวี่ยง โดยวิธีนี้มีชื่อว่า buoyant density gradient centrifugation ซึ่งจะทำการปั่นเหวี่ยงเชื้อใน buoyant density gradient media ซึ่งมีคุณสมบัติในการแยกเชื้อออกจากการปั่นเหวี่ยง โดยเชื้อแต่ละชนิดจะมีค่าความหนาแน่นของเซลล์แตกต่างกัน เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงแล้วเชื้อแต่ละชนิดจะถูกแยกตามชั้นต่างๆ ของตัวกลาง (media) ซึ่งแยกได้เป็นเชื้อที่ตก (sediment) ลงด้านล่างของ media และเชื้อที่ลอย (float) อยู่ด้านบนของ media วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถแยก food matrix ออกได้ดี และยังแยกเชื้อที่ตายออกจากเชื้อที่มีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลการทดลองที่เป็นผลบวกลวง (false positive) และยังทำได้ง่ายและรวดเร็ว วิธีการนี้จึงเป็นวิธีที่นิยมในการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถตรวจสอบเชื้อปนเปื้อนที่มีปริมาณน้อยได้[11]

2.3.3 การกรอง (filtration)

การกรองเป็นการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันหรือสารที่มีการละลายแตกต่างกันออกจากกัน โดยในที่นี้มีผลทั้งการแยกโมเลกุลของ food matrix ออกจากเซลล์ของเชื้อ และการแยกเซลล์ของเชื้อออกจากของเหลวที่มีอนุภาคขนาดเล็ก ปัจจัยที่สำคัญคือ ขนาดของรูที่เป็นตัวกักเก็บแยกสารออกจากกันนั้นเอง วิธีนี้ให้ผลที่เหมาะสมสามารถทำให้เซลล์ของเชื้อมีความบริสุทธิ์ได้อย่างเพียงพอ[11]

2.3.4 Immunomagnetic separation

Immunomagnetic separation เป็นวิธีการแยกเชื้อปนเปื้อนออกจากอาหารที่มีความจำเพาะสูงมาก เนื่องจากเป็นการใช้ความจำเพาะของโมเลกุลแอนติบอดีกับแอนติเจนที่อยู่บนผิวเมมเบรนของแบคทีเรีย โดยโมเลกุลของแอนติบอดีที่ถูกออกแบบมาเพื่อให้มีความจำเพาะนั้นจะถูกนำมาเคลือบบนผิวของ magnetic beads ที่มีน้ำหนักมาก ทำให้แยกเชื้อที่ต้องการออกมาได้ร่วมกับการปั่นเหวี่ยง และนำไปชะล้างด้วยสารละลายที่จำเพาะเพื่อแยกเชื้อออกมา วิธีนี้มีข้อจำกัดคือมีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากต้องมีการออกแบบให้มีความจำเพาะ และสามารถใช้ตัวอย่างอาหารในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนั้นยังอาจถูกรบกวนจากโมเลกุลของอาหารที่นำมาตรวจวิเคราะห์ได้ [22]

2.3.5 Membrane surface adhesion-based extractor

การแยกเชื้อปนเปื้อนในอาหารโดยใช้สารละลายอาศัยหลักการ คือ เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเป็นสารชนิดที่ไม่ชอบน้ำและมักเข้ากันได้กับสารที่เป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว ดังนั้นจึงนำหลักการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ โดยใช้สารในกลุ่มพอลิคาร์บอเนต (polycarbonate) เช่น polyethylene glycols (PEG) เป็นตัวแยกเชื้อเพื่อกักเชื้อไว้ภายในวัฏภาคของสาร โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสม วิธีนี้ยังเป็นการแยกเอาสารที่อาจไปรบกวนกระบวนการตรวจสอบในระดับโมเลกุลให้

แยกออกไปได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัดคือแยกเชื้อออกมาได้ในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับวิธีอื่น[23]

2.3.6 Activated charcoal immobilization

การใช้ activated charcoal เป็นสารดูดซับตัวรบกวนในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อนั้นเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการทำให้น้ำและอาหารมีความบริสุทธิ์[24] มีหลักการคือ นำเอา amorphous carbon ที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุนและมีพื้นที่ผิวมาก และมีคุณสมบัติในการดูดซับสารต่างๆ เช่น โปรตีน เมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะทำให้บริเวณรูพรุนมีความเป็นประจุลบและทำให้ดูดซับสารต่างๆ ที่อาจรบกวนปฏิกิริยาการทดสอบได้ วิธีนี้ไม่นิยมใช้เป็นวิธีเดี่ยวๆ จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการแยกเชื้อด้วยวิธีอื่นๆ ร่วมด้วย โดยเฉพาะวิธีการทาง immunoassay จะได้ผลดีที่สุด[25]

2.3.7 Metal hydroxide immobilization

การแยกเชื้อปนเปื้อนในอาหารโดยใช้สารออกไซด์ของโลหะหนัก อาศัยคุณสมบัติในการดึงเชื้อแบคทีเรียให้ตกตะกอนรวมกันกับสารดังกล่าว โลหะหนักที่นิยมใช้เพื่อแยกเชื้อออกมาคือ zirconium โดยใช้ออกไซด์ของโลหะหนักคือ zirconium hydroxide มีกลไกในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียตรง amino side chain ทำให้ไม่เกิดความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและลบ สำหรับวิธีวิเคราะห์คือนำเอาโลหะหนักนั้นจับกับแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารที่ผ่านการบ่มเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแล้ว แล้วทำการปั่นเหวี่ยงโดยใช้รอบต่ำ จะทำให้โลหะหนักตกตะกอนอยู่ก้นหลอดโดยมีการกักเชื้ออยู่ภายใน วิธีการนี้มีข้อดีคือ เป็นการลดปริมาตรของตัวอย่างได้โดยการทิ้งส่วนของ supernatant ไป นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ได้[17]

**2.4 การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในอาหาร**

2.4.1 วิธีการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ[26]

วิธีการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจเป็นวิธีดั้งเดิม (conventional method) เป็นวิธีการบ่มเพาะเชื้อจากตัวอย่างอาหารโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ (selective media) กับ *E. coli* เพื่อแยกเซลล์ข *E. coli* ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และนับจำนวนเซลล์ *E. coli* ที่มีชีวิตในจานเพาะเลี้ยง วิธีนี้มีความไวสูง ราคาไม่แพง และสามารถให้ข้อมูลทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ต้องใช้แรงงานมาก และใช้เวลานานหลายวันกว่าจะทราบผลวิเคราะห์ เนื่องจากขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการแบ่งตัวเพื่อให้เห็นลักษณะของโคโลนีที่ดูได้ด้วยตาเปล่า ยิ่งกว่านั้นระยะเวลาที่ใช้ยังรวมไปถึงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพาะเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อ การนับโคโลนี และการดูลักษณะจำเพาะโดยใช้วิธีทางชีวเคมี

การเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ เช่น การเพาะเชื้อใน MacConkey agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบที่มีการหมักแลคโทส ซึ่ง *E. coli* นั้นจะให้ผลเป็นบวกคือมีการหมักแลคโทสได้เป็นกรด ดังนั้นจะทำให้ pH บริเวณนั้นต่ำลงแล้ว อินดิเคเตอร์ (indicator) ซึ่งเป็นสาร neutral red ในสูตรอาหาร จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดง พร้อมทั้งมีโซนของ bile ที่ตกตะกอนเป็นวงขุ่นรอบๆ บริเวณ หรือการเพาะใน eosin methylene blue agar (EMB agar) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบที่มีการหมักแลคโทส ใช้ทดสอบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นมีการหมักแลคโทสหรือไม่ ซึ่ง *E. coli* นั้นจะให้ผลเป็นบวก คือมีการหมักแลคโทส มีโคโลนีเป็นสีเขียวเมทัลลิค ตรงกลางของโคโลนีจะมีสีดำ (dark center and a greenish metallic sheen) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงใน MacConkey agar นั้นจะทดสอบได้เพียงร้อยละ 90 ของ *E .coli* เท่านั้น บางสายพันธุ์อาจจะให้ผลเป็นลบเนื่องจากไม่เกิดการหมักแลคโทสเกิดขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบทางชีวเคมีอีกขั้นตอนหนึ่งเพื่อยืนยันว่าเชื้อในตัวอย่างนั้นเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* [6]

2.4.2 การทดสอบลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี

การทดสอบ IMViC test[27,28] ประกอบด้วยการทดสอบ 4 อย่าง ได้แก่

2.4.2.1 Indole test เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole จาก tryptophan โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย tryptophan rich peptone เมื่อ tryptophan ใน peptone ถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรีย ให้ indole สามารถตรวจสอบ indole โดยใช้ alcoholic p-imethylaminobenzaldehyde โดย indole จะทำปฏิกิริยากับ aldehyde ให้ผลผลิตเป็นสีแดงในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งในการทดสอบนี้ *E. coli* ให้ผลบวก

2.4.2.2 Methyl red test เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อที่จะผลิตและรักษาความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการหมักกลูโคสไว้ให้มี pH ต่ำกว่า 4.4 โดยเมื่อเพาะเชื้อ *E. coli* ลงใน glucose phosphate broth ที่ 37 องศาเซลเซียส *E. coli* จะหมักกลูโคสเกิดสภาวะเป็นกรด เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจะทดสอบว่าเชื้อสามารถรักษาสภาวะความเป็นกรดได้หรือไม่ ซึ่งจะทดสอบโดยใช้ methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งถ้าสามารถรักษาภาวะกรดได้จะเกิดสีแดง ซึ่งในการทดสอบนี้ *E. coli* ให้ผลบวก

2.4.2.3 Voges-proskaver test เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการผลิต butylene glycol acetylemethylcarbinal ซึ่งจะทดสอบจาก acetyl-methyl carbinol (acetoin) ซึ่งเป็นตัวกลางของปฏิกิริยาเมื่อเติม alpha- naptol และ 40% KOH หลังจากบ่มเชื้อจากนั้นจะนำไปตั้งให้สัมผัสออกซิเจนจากอากาศ ถ้ามีสาร acetoin จะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนและ KOH ได้ diacetyl และ diacetyl จะทำปฏิกิริยากับ guanidine ที่อยู่ใน peptone ซึ่งเมื่อมี alpha- naptol จะทำให้เห็นเป็นสีแดง ซึ่งในการทดสอบนี้ *E. coli* จะให้ผลลบ

2.4.2.4 Citrate utilization test เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี sodium citrate และ bromothymol blue ซึ่งจะให้ผลผลิตที่

เป็นด่างซึ่งจะเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ (bromothymol blue) เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งในการทดสอบนี้ *E. coli* จะให้ผลลบ

หลังจากทำการทดสอบทั้งหมดที่กล่าวข้างต้นแล้วจะสามารถบอกได้เพียงว่าเชื้อที่นำมาทดสอบนั้นเป็น *E. coli* หรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคหรือไม่ก่อโรคจึงต้องมีการทดสอบทาง serotype ต่อไปเพื่อดูว่าเป็นสายพันธุ์ก่อโรคหรือไม่ นอกจากนั้นในการที่จะระบุว่าเป็นเชื้อ ETEC นั้นต้องมีการทดสอบสารพิษ (toxin) ของเชื้อด้วย

2.4.3 การทดสอบสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้น

การทดสอบสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้น แบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ

2.4.3.1 Phenotypic assay เป็นการทดสอบว่าสารที่เชื้อสร้างขึ้นเป็น toxin หรือไม่ โดยวิธีที่ใช้นั้นมีอยู่ 2 วิธีคือ

1) *Bioassays* ทำการทดลองกับสัตว์ทดลองหรือเซลล์เพาะเลี้ยงเช่น การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงส่วนลำไส้เล็กบริเวณไอเลียมของกระต่าย (rabbit ileal loop model test) ในการทดสอบสารพิษที่ไม่ทนความร้อน (heat labile toxin ; LT) และใช้หนูทดลองที่ยังเป็นทารกอยู่ (infant mouse assay) ในการทดสอบสารพิษที่ทนความร้อน (heat stable toxin; ST) และเนื่องมาจาก LT นั้นเป็นสารพิษที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายได้มากกว่า ST ซึ่งอาจก่ออันตรายได้มากกว่า จึงทำให้มีการพัฒนาแบบจำลองที่ใช้ในการศึกษาการทดสอบ LT ขึ้นมาอีกวิธีหนึ่งคือ การทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงแบบ 2-cell line ของเซลล์ต่อมหมวกไตส่วนอะดรีนัล (Y1 adrenal cell) และเซลล์มะเร็งรังไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (chinese hamster ovarian cell)[7] ซึ่งการทดสอบโดยวิธี Y1 adrenal cell test นั้นจะทำตามหลักของ sack and sack คือให้มีกลุ่มควบคุม ซึ่งสารพิษจะถูกสะเทินจนหมดฤทธิ์ด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibodies)

ที่จำเพาะคือ rabbit anti-LTp. และในการทดสอบจะถือว่าสายพันธุ์ที่สร้างารพิษแล้วมีการสะเทินสารพิษได้มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 จะถือว่ามีผลทดสอบเป็นบวก คือเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษได้ [8] วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ มีความซับซ้อนและยุ่งยากในการทดสอบ ผู้ทดสอบจึงควรเป็นผู้ที่มีความรู้ความชำนาญทางเทคนิคต่างๆ ที่ต้องใช้ในการปฏิบัติการ เช่น การปฏิบัติกับสัตว์ทดลอง การเพาะเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้อาจมีปัญหาเรื่องจริยธรรมในการทดลองในสัตว์อีกด้วย เช่น อาจมีการเหนี่ยวนำให้หนูแฮมสเตอร์เกิดมะเร็งเพื่อนำเซลล์มะเร็งมาเพาะเลี้ยงเพื่อทดลองต่อไป เป็นต้น

2) *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* เป็นวิธีทางชีวเคมีที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นโดยมีหลักการคือ ออกแบบแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อสารพิษที่ต้องการทดสอบ จากนั้นนำมาติดฉลากด้วยเอนไซม์นำไปทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการทดสอบ ถ้าสารที่นำมาทดสอบนั้นเป็นสารพิษที่ต้องการจะจับกับแอนติบอดี ถ้าไม่ใช่สารพิษที่ต้องการทดสอบจะไม่จับกันและจะถูกชะล้างออกไป ดังนั้นจึงมีแต่สารพิษและแอนติบอดีที่ต้องการเท่านั้นที่จับกันอยู่ หลังจากนั้นจะใส่สารตั้งต้น (substrate) ลงไป เอนไซม์ที่ติดฉลากอยู่กับแอนติบอดีจะเปลี่ยนสารตั้งต้น ให้เป็นผลผลิตที่มีสี แล้ววัดปริมาณสารพิษได้จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้น วิธี ELISA นี้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการใช้ทดสอบ LT ซึ่งจะใช้วิธี GM1 ganglioside method วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ มีราคาแพงเนื่องจากต้องมีการออกแบบแอนติบอดีให้จำเพาะต่อสารพิษที่ต้องการทดสอบ นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ อีกเช่น passive latex agglutination, immunoprecipitation in agar และ the Biken test ซึ่งพบว่ามีความจำเพาะสูงแต่ไม่เป็นที่นิยม

2.4.3.2 Genotypic assay การทดสอบยีนที่ใช้สร้างสารพิษ อาศัยหลักการที่ว่าการสร้างโปรตีนต่างๆ นั้นถูกกำหนดด้วยยีน จึงได้มีการประยุกต์เพื่อใช้ทดสอบหายีนที่เชื้อใช้ในการผลิตสารพิษขึ้น โดยใช้วิธีการดังนี้ [9]

1) *Nucleic acid hybridization* เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติเรื่องการจับกันของคู่เบสอย่างจำเพาะ ซึ่งจะมีโพรบ (probe) คือ DNA สายสั้นๆ ประมาณ 15-30 นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA หรือ RNA ของยีนที่ต้องการทดสอบ ความจำเพาะของวิธีนี้ขึ้นอยู่กับลำดับของนิวคลีโอไทด์ สำหรับ probe จะมีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescence) หรือสารกัมมันตรังสี (radioactive compound) เมื่อนำ probe และ DNA ที่ต้องการทดสอบมาทำปฏิกิริยากัน ส่วนของยีนและ probe ที่เป็นคู่สมกันจะมาจับกัน จากนั้นจะล้างเอาส่วนที่ไม่ได้จับกันออก แล้วตรวจสอบโดยการวัดการเรืองแสงหรือวัดปริมาณรังสี ซึ่งจะเป็นการตรวจสอบโดยตรง นอกจากนี้ยังมีวิธีตรวจสอบทางอ้อมคือ การติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีเป็นผลิตผลที่เป็นสารที่มีสีแล้วตรวจสอบจากการวัดความเข้มของสี

2) *Polymerase Chain Reaction (PCR)* เป็นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ DNA จาก DNA ต้นแบบ ให้ได้ปริมาณมากขึ้นโดยใช้เวลาน้อยและสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งในหลายๆ การวิเคราะห์นั้น DNA ต้นแบบจะต้องมีความบริสุทธิ์ในระดับหนึ่งปฏิกิริยาจึงจะเกิดขึ้นได้ ปัจจุบันเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหา บ่งชี้ และวิเคราะห์เกี่ยวกับยีนหรือ DNA หลักการ

ของปฏิกิริยา PCR อาศัยพื้นฐานความรู้เกี่ยวกับการสังเคราะห์ DNA ซึ่งอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และไพรเมอร์

## 2.5 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

2.5.1 สารสำคัญต่างๆ ในปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 1)[9,10]

2.5.1.1 *Template DNA* เป็น DNA ต้นแบบที่มียีนที่ต้องการเพิ่มจำนวนอยู่ในบริเวณดังกล่าว

2.5.1.2 *Primers* เป็น oligonucleotide 1 คู่ มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับเบสของ DNA ต้นแบบในการสังเคราะห์ แต่จะต้องไม่เป็นลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันระหว่าง primers ทั้งสองเส้น เพื่อจะได้ไม่จับกันเองเกิดเป็น primer-dimer ซึ่งจะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยา PCR primersมักมีความยาวประมาณ 20-30 เบส primers ทั้งสองเส้นจะต้องมีปริมาณเบส G และ C ใกล้เคียงกันและมี $T_m$ ใกล้เคียงกันเพื่อจะได้เลือกอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสายของ DNA ได้ง่ายและเหมาะสม

2.5.1.3 *DNA polymerase* ซึ่งจะใช้ชนิดที่สามารถทนความร้อนได้ดี เนื่องจากในขั้นแรกของปฏิกิริยาที่จะต้องมีการแยกสาย DNA จะใช้อุณหภูมิที่สูงถึงประมาณ 95 องศาเซลเซียส จึงต้องใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ดีคือ Taq polymerase ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquatious* ที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อน

2.5.1.4 *Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs)* คือนิวคลิโอไทด์ทั้งสี่ชนิด (A,T,GและC) ที่เป็นหน่วยย่อยที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่

2.5.1.5 *Magnesium ion ($Mg^{2+}$)* ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase

2.5.1.6 *PCR buffer* เป็นสารละลายที่ใช้ในการควบคุมสภาวะของปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสม เช่น ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของเกลือต่างๆ ในปฏิกิริยา

**ตารางที่** 1 องค์ประกอบและความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

| **Template DNA** | **Primers** | **DNA Polymerase** | **dNTPs** | **$Mg^{2+}$** | **PCR Buffer** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 pg – 1 µg | 1 µM | 1-5 units | 200 µM | 1.5 mM | 50 mM |

2.5.2 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.5.2.1 ***Denaturing*** เป็นการแยกสาย DNA จากสภาพที่เป็นเกลียวคู่ (double helix) ให้เป็นสายเดี่ยว (single stand) โดยทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาย DNA โดยใช้อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส ดังนั้นต้องใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถทนความร้อนได้สูงเพื่อไม่ให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ

2.5.2.2 ***Annealing*** เป็นขั้นตอนที่ primers จับกับ DNA แม่แบบ ในขั้นตอนนี้อุณหภูมิที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นกับไพรเมอร์ที่ใช้

2.5.2.3 ***Extension*** เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยจะสังเคราะห์จากด้าน 5' ของไพรเมอร์ ไปยังด้าน 3' ไปเรื่อยๆ ตามลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA แม่แบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Taq polymerase ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนที่สาม เครื่อง thermal cycler จะเริ่มขั้นตอนแรกใหม่หมุนเวียนต่อกันไปหลายๆ รอบ โดยปฏิกิริยา PCR 25-40 รอบจะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง หลังจากทำปฏิกิริยาจะได้สาย DNA สายใหม่จำนวนมากที่ถูกกำหนดตามขนาดของระยะห่างของไพรเมอร์ทั้งสองสายที่จับกับ DNA แม่แบบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis

2.5.3 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR

เทคนิค PCR เป็นทางเลือกใหม่สำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น ไวรัส หรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค การตรวจหาเชื้อก่อโรคโดยวิธี PCR นี้จะมีขั้นตอนสำคัญมากๆ ขั้นตอนหนึ่งคือ การเตรียม DNA template ให้มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณมากเพียงพอ การสกัด genomic DNA นั้นประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้

2.5.3.1 การทำให้เซลล์แตกแบบไม่รุนแรงเพื่อปลดปล่อย DNA ออกมา

ในขั้นตอนนี้จะขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการสกัดว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบ เนื่องจากลักษณะของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดจะแตกต่างกัน วิธีการที่จะนำมาใช้จึงแตกต่างกันด้วย เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกจะมีผนังหนากว่า จึงต้องใช้กระบวนการในการสกัดที่มากกว่า สำหรับเชื้อ *E. coli* นั้นเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ตัวอย่างของเทคนิคที่นำมาใช้ในการสกัด gDNA ในปัจจุบันได้แก่

1) *การสกัดด้วยการใช้ความร้อนในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (boiling lysis)* เป็นการใช้ความร้อนในการทำลายผนังเซลล์ โดยเติมน้ำปราศจากเชื้อลงในตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาสกัด และใช้ปริมาณตามความเหมาะสมกับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มี จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 95-100 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 10 นาที วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่สิ้นเปลืองเวลา

และค่าใช้จ่าย แต่อาจจะย่อยผนังเซลล์ได้ไม่สมบูรณ์ หรือถ้าใช้ความร้อนสูงหรือตั้งทิ้งไว้นานเกินไป อาจเกิดการทำลายสาย DNA ที่ออกมาจากเซลล์ได้

2) *การสกัดแยกโดยใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์มและตกตะกอน DNA โดยใช้เอทานอล (phenol-chloroform and isoamylic alcohol)* เป็นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดแยก DNA ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์ ซึ่งจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมชนิดต่างๆ ในสัดส่วนและปริมาณต่างๆ กันในแต่ละการวิจัย ยกตัวอย่างเช่น ผสมตัวอย่างแบคทีเรียเข้ากับสารผสมของ phenol/chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 % v/v ในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงรอบสูง แล้วดูดเอาส่วนบนที่เป็นส่วนน้ำออกแล้วถ่ายไปใส่หลอดใหม่ จากนั้นใส่ 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วเติม absolute ethanol ที่แช่เย็นลงไปประมาณ 2-2.5 เท่าของปริมาตรหลังจากเติม 3M sodium acetate แล้ว จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หรือ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงรอบสูง เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วใส่ 70 % เอทานอล ลงไปเพื่อตกตะกอน DNA จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วทิ้งส่วนใสเก็บตะกอนที่ได้แล้วทำให้ตะกอนแห้งโดยอาจจะตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน หรือใช้เครื่องดูดความชื้น (dessicator) ช่วย จะได้ตะกอน DNA แล้วนำตะกอนมาละลายด้วย TE buffer เพื่อเก็บไว้ใช้ในขั้นถัดไป ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้นั้นอาจมีพิษต่อผู้ปฏิบัติการและสิ่งแวดล้อม เช่น ฟีนอลนั้นเป็นสารที่มีพิษ และมีกลิ่นเหม็น

3) *การสกัดโดยใช้เอนไซม์ proteinase K และ lysis buffer* วิธีนี้เป็นวิธีการทำให้เซลล์แตกโดยใช้เอนไซม์ proteinase K ไปย่อยโปรตีนที่ผนังเซลล์และเยื่อหุ้ม

เซลล์ ช่วยให้เซลล์แตกและปลดปล่อยสารต่างๆภายในเซลล์รวมถึง DNA ออกมาด้วย เอนไซม์นี้จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 30 นาที

4) *การสกัดโดยใช้สารซักฟอก (detergent)* เป็นการใช้ lysis buffer ที่ประกอบด้วย detergent ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมัน เช่น sodium dodesyl sulfate; SDS ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมันและเป็นสารทำให้เกิดฟอง ในงานวิจัยนิยมใช้สาร SDS ในการทำให้เซลล์แตก สำหรับกลไกการทำงานของสาร SDS ในการทำให้เซลล์แตก คือ SDS จะเข้าไปละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมทั้งจับกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ที่เยื่อนี้ด้วย (hydrophobic protein) จึงทำให้เซลล์แตกออก ปล่อยองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์รวมทั้ง DNA ออกมาในสารละลาย ในงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์ Proteinase-K ร่วมกับการสกัดโดยใช้ detergent

2.5.3.2 การกำจัดสารปนเปื้อนออกจากโมเลกุลของ DNA ที่สกัดได้

เป็นการกำจัดเอาสารปนเปื้อนต่างๆ ที่หลุดออกมาจากเซลล์พร้อมกับ DNA ออกจากตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ เช่น สารพวกโปรตีน RNA สารมหโมเลกุลอื่นๆ ออกไปโดยใช้วิธีการต่างๆ ได้แก่

1) การปั่นเหวี่ยงรอบสูง (centrifugation) หลังจากสกัด DNA โดยใช้วิธีต่างๆ เรียบร้อยแล้ว นำมาปั่นเหวี่ยงรอบสูง เพื่อตกตะกอนสารต่างๆ แล้วเก็บส่วนใสที่มี DNA อยู่ไปใช้ ใช้เอนไซม์ RNase เพื่อกำจัดชิ้นส่วน RNA ที่ปนเปื้อนอยู่และทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ชนิด silica membrane spin columns โดยใส่สารละลาย DNA ที่สกัดได้ลงในคอลัมน์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงรอบสูง แล้ว

เก็บส่วนใสที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ไปใช้เป็น DNA ต้นแบบในกระบวนการต่างๆ ต่อไป

2) การใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (kit) ในปัจจุบันมีชุดสกัด DNA และทำให้ DNA บริสุทธิ์สำเร็จรูปขายอยู่ทั่วไป ซึ่งวิธีนี้จะใช้ lysis solution และเอนไซม์ต่างๆ เป็นสารที่ใช้ในการสกัด DNA และจะทำ DNA ที่ได้ให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น โดยนำไปผ่านคอลัมน์ที่มีอยู่ในชุดสกัด วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ผู้ที่ไม่มีความชำนาญและไม่มีทักษะมาก่อนก็สามารถสกัด DNA ได้โดยทำตามขั้นตอนที่ชุดสกัดกำหนดไว้อย่างละเอียดได้ วิธีนี้สามารถประหยัดเวลาและลดความยุ่งยากในการสกัดได้เป็นอย่างดี แต่มีข้อเสียคือ มีราคาแพง

จากการทดลองของ Blemrn และคณะ[8] เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบ LT และ ST ของ *E. coli* จำนวน 70 สายพันธุ์ที่แยกได้จากมนุษย์และหมู โดยใช้ 4 วิธี ดังกล่าวข้างต้นคือ bioassay, ELISA, DNA hybridization ซึ่งจะใช้ probe 2 ชนิดที่แตกต่างกันคือมีการติดฉลากด้วย $^{32}P$ ซึ่งเป็นกัมมันตรังสีจัดเป็น direct hybridization และอีกชนิดหนึ่งคือติดฉลากด้วย alkaline phosphatase จัดเป็น indirect hybridization และ PCR โดยใช้วิธี Y1 adrenal cell test เป็นวิธีอ้างอิงพบว่า ทั้งวิธี PCR และ $^{32}P$ DNA hybridization นั้นสามารถตรวจหาเชื้อที่สร้าง LT ได้ไวกว่าวิธี Y1 adrenal cell test เนื่องจากพบว่าเชื้อหนึ่งสายพันธุ์ที่ตรวจไม่พบโดยวิธี Y1 adrenal cell test แต่สามารถตรวจพบได้โดยสองวิธีดังกล่าวข้างต้น นอกจากนั้นยังพบว่าวิธี alkaline phosphatase DNA hybridization และวิธี ELISA นั้นไม่สามารถตรวจหาสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง LT ที่ได้จากมนุษย์ ถึง 8 และ 9 สายพันธุ์ตามลำดับ (% detection เท่ากับ 72% และ 69% ตามลำดับ) พบว่า 5 สายพันธุ์ที่ได้มาจากหมูนั้นไม่มีวิธีใดสามารถตรวจหา LT ได้เลย ดังนั้นควรมีการศึกษาพัฒนาวิธีตรวจหา LT ต่อไปเพื่อลด detection limit ในการตรวจ

การศึกษานี้ยังได้กล่าวไว้ว่า วิธี PCR เป็นทางเลือกที่ดีที่สุดที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องมาจากมีความไวสูงและมีความจำเพาะสูง ส่วนวิธี $^{32}P$ DNA hybridization นั้นยังมีความแตกต่างและความหลากหลายในการทดลองมากจึงไม่ดีนักเมื่อเทียบกับวิธี PCR

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ได้มีการคิดค้นพัฒนาและประยุกต์เอาวิธี PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อหรือสารพิษของเชื้อได้หลายรูปแบบมากขึ้น ตัวอย่างเช่น การทำ multiplex PCR เพื่อให้ตรวจหาสายพันธุ์ที่สร้าง ST และ LT ได้ในปฏิกิริยาเดียว ข้อดีของปฏิกิริยา PCR คือ มีความไวสูง และมีความจำเพาะสูง ใช้เวลาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิมซึ่งต้องมีการเพาะเชื้อใน selective medium การทดสอบทางชีวเคมี และการทำ bioassay ซึ่งโดยรวมแล้วกว่าจะทราบผลก็ใช้เวลาหลายวัน สิ้นเปลืองทั้งแรงงานและค่าใช้จ่าย อาจไม่เหมาะกับผู้ประกอบการที่ต้องการความรวดเร็ว ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบคุณภาพอาหารของตน ส่วนการทำปฏิกิริยา PCR นั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ DNA ต้นแบบที่จะนำมาเพิ่มจำนวนนี้จะต้องมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างมาก จึงต้องเตรียมตัวอย่าง DNA ต้นแบบให้มี matrix ต่างๆ จากอาหารปนเปื้อนให้น้อยที่สุด เพราะอาจมีสารต่างๆ ที่กำจัดออกไม่หมด และอาจจะไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ ดังนั้นขั้นตอนที่เป็นหัวใจสำคัญขั้นตอนหนึ่งของการทำปฏิกิริยา PCR คือการกำจัด food matrix ออกจากตัวอย่างอาหาร

# บทที่ 3

# อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

| อุปกรณ์และสารเคมี | รุ่น, บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Autoclave | HA-300MD, HIRAYAMA |
| Hot air oven | YCO-No1 |
| Centrifuge | SCR 20B Himac Centrifuge, HITACHI |
| Table-top microcentrifuge | EBA 12R, Hettich Zentrifugen |
| pH meter | SevenMulti, Mettler Toledo group |
| Analytical balance | Mettler Toledo PL602-s, Mettler Toledo group |
| Vortex mixer | Votex Genie-2, Scientific Industries, USA |
| Spin down | Mini Centrifuge C-1200,National Labnet |
| Incubator | POLAR 1000C Incubator, Contherm |
| Laminar air flow hood | Astec Microflow ATC 1800N, Science Tech |
| Water bath | Series 854, Memmert, Germany |
| Thermocycler | Mastercycler, Eppendorf, Germany |
| Gel Documentation | Gel Doc XR, Bio-Rad, USA |
| Stomacher | 400 circulator, Seward, UK |
| Micropipette | Gilson, France |
| Micropipette tip | Axygen Scientific Inc, USA |

| | |
|---|---|
| PCR tube, Microcentrifuge tube | Axygen Scientific Inc, USA |
| Paper filter (No.4), Membrane filter (0.45 µm) | Whatman, Germany |
| Tryptone | Difco Laboratories, USA |
| Yeast extract | Himedia Laboratories, India |
| Sodium chloride | Ajax Finechem, Australia |
| Agar Agar | Scharlau Chemie S.A., Spain |
| Glycerol | May&Baker, England |
| Polysorbate 80 | Ajax Finechem, Australia |
| Tris HCl | Fischer Scientific |
| EDTA | Ajax Finechem, Australia |
| Boric acid | Merck, Germany |
| Bromophenol blue | J.T. Baker Inc., USA |
| Ethidium bromide | Fluka Chemie, Switzerland |
| Agarose | AmRESCO, USA |
| Taq polymerase enzyme | Takara Bio Inc., Shiga, Japan |
| 10x Taq buffer | Takara Bio Inc., Shiga, Japan |
| dNTPs mixture | Takara Bio Inc., Shiga, Japan |
| DNA ladder 100 bp | Invitrogen, Brazil |
| PCR primer | Theera Trading Co. Ltd |
| GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit | Sigma-Aldrich, Inc., USA |

**3.2 เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน**

| **เชื้อแบคทีเรีย** | **แหล่งที่มา** |
|---|---|
| Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC; LT, STp) SW 103434/53 | สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ประเทศไทย |
| *Escherichia coli* ATCC 25922 | ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| *Salmonella choleraesuis* DMST 8014 | หน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประเทศไทย |
| *Bacillus cereus* DMST 2952 | หน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประเทศไทย |
| *Staphylococcus aureus* DMST 2928 | หน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประเทศไทย |
| *Listeria monocytogenes* DMST 1327 | หน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประเทศไทย |

*DMST: The Department of Medical Sciences Thailand

**3.3 วิธีการทดลอง**

3.3.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

นำเชื้อ ETEC มาตรฐานที่ได้จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB (LB agar) โดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate technique) แล้วนำไปบ่มเพาะ (incubate) ในสภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น เลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีครีมหรือขาวขุ่น และอยู่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB (LB broth) ที่สภาวะข้างต้น ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้าย 15 เปอร์เซ็นต์ (%) เพื่อเตรียมเป็นสารละลายเชื้อตั้งต้น (stock culture) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในการทดลองต้องกระตุ้นเชื้อโดยการบ่มเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง

3.3.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโดยวิธีนับเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด (viable plate count) บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับการวัดความขุ่น ซึ่งมีวิธีทดลอง คือ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มเพาะในสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จนได้ค่า optical density (OD) อยู่ในช่วง 0.08–0.13 จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่มีค่า OD อยู่ในช่วงดังกล่าว มาทำการเจือจางลงตามลำดับทีละสิบเท่า (10-fold serial dilution) ด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ จนได้ระดับความเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสม นำแต่ละระดับความเจือจางไป spread plate โดยการใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) กวาดสารละลายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแข็ง โดยแต่ละระดับความเจือจางจะทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มเพาะที่สภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น ซึ่งเท่ากับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยของ dilution ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี คูณกับค่า dilution factor ปริมาณของเชื้อจะแสดงในหน่วย colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) แล้วทำการเก็บเป็นค่ามาตรฐานสำหรับการทดลองต่อไป

3.3.3. การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างอาหารให้เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR

ในการพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างอาหารเพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้น จะทำการพัฒนาวิธีสกัดแยกเชื้อออกจากเมทริกซ์ (matrix) ของอาหาร รวมถึงการกำจัดตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ให้ได้มากที่สุด สำหรับอาหารที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษานี้ คือ พริกแกงเขียวหวานสำเร็จรูปที่ผ่านกระบวนการผลิตและบรรจุจากโรงงานที่ได้มาตรฐาน และเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียออกจากตัวอย่างอาหาร คือ membrane filtration

3.3.3.1 ขั้นตอนการทดลอง

1) นำตัวอย่างอาหาร 10 กรัม (g) ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อแล้วโดยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนแรงดันสูง (121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะเวลานึ่ง 30 นาที) มา inoculate ด้วย broth culture ของเชื้อที่ต้องการศึกษา เพื่อจำลองการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างอาหาร

2) เติมสารละลาย extraction buffer 90 มิลลิลิตร (ml) ลงในตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อผสม (homogenate) ให้เข้ากัน ด้วยเครื่องตีบดตัวอย่าง (Stomacher 400 Circulator) จากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ (sediment) ประมาณ 10 นาที เพื่อตกตะกอนกากอาหารขนาดใหญ่ ดูดของเหลวส่วนบน 50 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่ม (pre-enrichment) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3) ดูดตัวอย่างอาหารจากข้อ 2 มาปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.4) เพื่อกำจัดกากอาหารขนาดใหญ่ในตัวอย่างออกอีกครั้ง ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อที่สูญเสียไปกับกระดาษกรองและกากอาหาร (ส่วน A)

4) นำส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองแล้ว มาทำการดักจับแบคทีเรียโดยใช้แผ่นกระดาษกรองเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน (membrane filter)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อที่สูญเสียไปกับส่วนของเหลวที่ผ่านกระดาษกรองเมมเบรน (filtrate; ส่วน B)

5) จากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนที่กักเชื้อไว้มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water; DI) ที่ปลอดเชื้อ 200 ไมโครลิตร (µl) แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer Genie-2) ที่อัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที (rpm) เพื่อแยกเชื้อออกจากเมมเบรน นำสารละลายเชื้อ (ส่วน C) ไปวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อที่แยกได้จากเมมเบรน จากนั้นคำนวณหา % recovery ของวิธีดังกล่าวต่อไป

3.3.3.2 การหา % recovery

การหา % recovery ทำโดยวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อในส่วนต่างๆ ด้วยการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี (direct plate counting: drop plate method) แล้วนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{C}{A+B+C} \times 100$$

**A คือ ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่มีอยู่ในส่วนกากตะกอน**
**B คือ ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่มีอยู่ในส่วนของ filtrate**
**C คือ ปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในส่วน eluate**

3.3.4 การพัฒนาวิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) สำหรับปฏิกิริยา PCR

สำหรับการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA; gDNA) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR นั้นสามารถทำได้หลายวิธี ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อหาวิธีเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมโดยใช้วิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธีดังนี้

3.3.4.1 การต้ม (rapid boiling)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสม นำสารละลายเชื้อ (culture) มาตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (SCR 20B Himac Centrifuge) ที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบน (supernatant) ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ (cell pellet) ด้วยน้ำเกลือ (0.85 % normal saline) ที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เติมน้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อกระจายตะกอน (resuspension) จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำเอาส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ต่อไป

3.3.4.2 การต้มใน lysis buffer ร่วมกับการใช้เอนไซม์

นำตะกอนเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำเกลือแล้ว มาเติมสารละลาย lysis buffer (1% triton X-100) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โดยการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ต่ออีก 5 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำเอาส่วนของเหลวเหนือตะกอนมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ต่อไป

3.3.4.3 การใช้ GenElute$^{TM}$ Bacterial Genomic DNA Kit ทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสม ถ่ายสารละลายเชื้อ (culture) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นกระจายตะกอน (resuspended)

โดยเติมสารละลาย lysis solution T 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลาย lysis solution C 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตกและกำจัดไขมันส่วนเกินออกไป ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้เซลล์ที่แตกแล้ว (lyse cell) หลังจากนั้นเติมสารละลาย 95%เอทานอล 200 ไมโครลิตร นำสารละลายทั้งหมดเทลงในคอลัมน์ (column) ที่มีคุณสมบัติชอบจับดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างคอลัมน์โดยการเติมสารละลาย wash solution 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างครั้งที่ 2 โดยการเติมสารละลาย dilute wash solution concentrate 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมน้ำปราศจากเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 7.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากคอลัมน์ นำของเหลวส่วนที่ไหลผ่านคอลัมน์ (eluate) ไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ต่อไป

3.3.5 การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

ในการวิจัยนี้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในอาหาร จึงทำการคัดเลือกยีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ ETEC ได้แก่ ยีนที่สร้างท็อกซินชนิดที่ไม่ทนความร้อน (*lt)* และยีนที่สร้างท็อกซินชนิดที่ทนความร้อน (*st*) เพื่อใช้บ่งบอกว่าเป็นสายพันธุ์ enterotoxigenic *E. coli* นอกจากนั้นยังทำการตรวจสอบยีนที่สร้าง universal stress protein A (*uspA*) ซึ่งเป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์เพื่อแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

3.3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

การทำปฏิกิริยา PCR จะเริ่มต้นโดยทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนแต่ละชนิด (simple PCR) แล้วจึงพัฒนาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนยีนทั้งสามชนิดพร้อมๆ กัน (multiplex PCR) ซึ่งในการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้น กระทำโดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยา PCR เช่น ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ รวมทั้งปรับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอน annealing

3.3.7 การตรวจดูผลผลิต PCR (PCR product) โดยวิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

ละลายอะกาโรสเจล (agarose gel) ในสารละลาย 0.5X TBE buffer ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2% จากนั้นเทเจลลงบนแม่พิมพ์ ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวางบน chamber ที่มีสารละลาย 0.5X TBE buffer ท่วมแผ่นอะกาโรส จากนั้นนำผลผลิต PCR และดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) มาหยอดลงในหลุม โดยผสมกับสารละลายสี (loadind dye) ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 50 นาที นำแผ่นอะกาโรสไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV เปรียบเทียบขนาดกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3.8 การทดสอบความจำเพาะ

นำไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการวิจัยนี้มาทดสอบความจำเพาะ โดยนำมาทำปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเชื้อ ETEC และ *E. coli* มาตรฐาน (positive control) เปรียบเทียบผลที่ได้เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น (negative control) ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes*

3.3.9 การทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา PCR

การทดสอบหาความไวในการตรวจหาเชื้อ ETEC ศึกษาโดยทำการบ่มเพาะเชื้อ ETEC มาตรฐานในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง $10^2$-$10^6$ CFU/ml นำแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.3.10 การนำเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นไปตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ ETEC ในตัวอย่างอาหาร

เมื่อได้เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้น จึงนำไปตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ ETEC ในตัวอย่างอาหาร คือ ผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงเขียวหวานที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน (artificially contaminated food sample) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาความไวของวิธี multiplex PCR ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ ETEC ในตัวอย่างอาหาร เมื่อนำวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค membrane filtration มาใช้ร่วมด้วย ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ ETEC มาตรฐานในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น $10^8$ CFU/ml นำมาเจือจางเป็นอนุกรม 1:10 ด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ให้ได้ระดับความเข้มข้นของเชื้ออยู่ในช่วง $10^1$-$10^6$ CFU/ml จากนั้นถ่ายเชื้อแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ที่ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีบดตัวอย่าง จากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ (sediment) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที เพื่อตกตะกอนและกำจัดกากอาหารขนาดใหญ่ (ครั้งที่ 1) ดูดของเหลวส่วนบน 50 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่ม (pre-enrichment) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 10 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.4) เพื่อกำจัดกากอาหารที่มีขนาดใหญ่อีกครั้ง (ครั้งที่ 2) นำส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง

แล้ว มาใช้สำหรับทำการดักจับเชื้อ (trap) ด้วยแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน (membrane filter) จากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนที่ดักจับเชื้อไว้มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนที่ปลอดเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer Genie-2) ที่อัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เพื่อแยกเชื้อออกจากเมมเบรน นำสารละลายที่มีเชื้ออยู่มาสกัดดีเอ็นเอต้นแบบโดยวิธีการต้ม (rapid boiling) ร่วมกับการใช้คอลัมน์ (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit) เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา multiplex PCR

**3.4 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหาร**

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด (natural contaminated food sample) ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างและเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้น

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอาหาร 4 ชนิด คือ น้ำพริกแกงเขียวหวาน เนื้อหมูดิบบด ลาบหมู และเครื่องดื่ม จากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร ชนิดละ 10 ตัวอย่าง โดยลาบหมู จะแบ่งออกเป็นลาบหมูปรุงสุก จำนวน 5 ตัวอย่าง และลาบหมูปรุงกึ่งสุกกึ่งดิบ จำนวน 5 ตัวอย่าง ชนิดของเครื่องดื่ม ได้แก่ น้ำกระเจี๊ยบ น้ำมะนาว น้ำมะพร้าวน้ำเสาวรส ชาเย็น น้ำส้ม น้ำเก็กฮวย น้ำฝรั่ง น้ำใบบัวบก และน้ำมะตูม

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธี membrane filtration

3.4.2.1 ตัวอย่างน้ำพริกแกงเขียวหวาน

ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หลังจากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีบดตัวอย่าง จากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้

(sediment) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 20 นาที เพื่อตกตะกอนและกำจัดกากอาหารขนาดใหญ่ (ครั้งที่ 1) ดูดของเหลวส่วนบน 50 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่ม (pre-enrichment) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 10 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.4) เพื่อกำจัดกากอาหารที่มีขนาดใหญ่อีกครั้ง (ครั้งที่ 2) นำส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองแล้ว มาใช้สำหรับทำการดักจับเชื้อ (trap) ด้วยแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน (membrane filter) จากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนที่ดักจับเชื้อไว้มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนที่ปลอดเชื้อ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer Genie-2) ที่อัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เพื่อแยกเชื้อออกจากเมมเบรน นำสารละลายที่มีเชื้ออยู่มาสกัดดีเอ็นเอต้นแบบโดยวิธีการต้ม (rapid boiling) ร่วมกับการใช้คอลัมน์ (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit) เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ต่อไป

3.4.2.2 ตัวอย่างเนื้อหมูดิบบด

ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หลังจากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีบดตัวอย่าง จากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ (sediment) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที เพื่อตกตะกอนและกำจัดกากอาหารขนาดใหญ่ (ครั้งที่ 1) ดูดของเหลวส่วนบน 50 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่ม (pre-enrichment) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน (membrane filter) เพื่อดักจับเชื้อ (trap) ออกจากอาหาร จากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนที่ดักจับเชื้อไว้มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนที่ปลอดเชื้อ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer Genie-2) ที่อัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เพื่อแยกเชื้อออกจากเมมเบรน นำ

สารละลายที่มีเชื้ออยู่มาสกัดดีเอ็นเอต้นแบบโดยวิธีการต้ม (rapid boiling) ร่วมกับการใช้คอลัมน์ (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit) เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ต่อไป

3.4.2.3 ตัวอย่างลาบหมู

ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หลังจากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีบดตัวอย่าง จากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ (sediment) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที เพื่อตกตะกอนและกำจัดกากอาหารขนาดใหญ่ (ครั้งที่ 1) ดูดของเหลวส่วนบน 50 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่ม (pre-enrichment) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน (membrane filter) เพื่อดักจับเชื้อ (trap) ออกจากตัวอย่าง จากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนที่ดักจับเชื้อไว้มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนที่ปลอดเชื้อ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer Genie-2) ที่อัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เพื่อแยกเชื้อออกจากเมมเบรน นำสารละลายที่มีเชื้ออยู่มาสกัดดีเอ็นเอต้นแบบโดยวิธีการต้ม (rapid boiling) ร่วมกับการใช้คอลัมน์ (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit) เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ต่อไป

3.4.2.4 ตัวอย่างเครื่องดื่ม

ตวงตัวอย่างเครื่องดื่มปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้ไปเพาะบ่ม (pre-enrichment) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 2 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน (membrane filter) เพื่อดักจับเชื้อ (trap) ออกจากตัวอย่าง จากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเมมเบรนที่ดักจับเชื้อไว้มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5

มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนที่ปลอดเชื้อ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer Genie-2) ที่อัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เพื่อแยกเชื้อออกจากเมมเบรน นำสารละลายที่มีเชื้ออยู่มาสกัดดีเอ็นเอต้นแบบโดยวิธีการต้ม (rapid boiling) ร่วมกับการใช้คอลัมน์ (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit) เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ต่อไป

3.4.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ โดยวิธี multiplex PCR

นำดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมได้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมาใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา multiplex PCR โดยมีรายละเอียดและปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ รวมทั้งสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสม

# บทที่ 4

# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

## 4.1 การหาปริมาณแบคทีเรีย

การทดลองหาปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีการนับจำนวนเชื้อที่เพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (direct plate counting: spread plate method) โดยทำการเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วย LB แล้วนำไปวัดค่าความขุ่น (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จนได้ค่าอยู่ในช่วง 0.10 ± 0.02 เมื่อนำสารละลายเชื้อที่มีค่า OD อยู่ในช่วงดังกล่าวมาทำการหาความเข้มข้นของเชื้อ พบว่าสารละลายเชื้อ *E. coli* มีความเข้มข้นประมาณ 2-3 x $10^8$ CFU/ml

## 4.2 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารโดยใช้เทคนิค membrane filtration

สำหรับการพัฒนาเพื่อหาวิธีเตรียมตัวอย่างอาหารที่เหมาะสมนั้น มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทำให้ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียมากเพียงพอสำหรับการนำไปทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้หลายวิธี สำหรับการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ membrane filter เป็นตัวดักจับ (trap) แบคทีเรีย เพื่อแยกแบคทีเรียออกจากตัวอย่าง โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง นำเอาส่วนต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการเตรียมตัวอย่างมาหาปริมาณของแบคทีเรีย เมื่อนำปริมาณของแบคทีเรียที่ได้จากส่วนต่างๆ มาคำนวณหา % recovery (ภาคผนวก) พบว่าค่า % recovery อยู่ในช่วง 69 ถึง 79 (ตารางที่ 2)

**ตารางที่** 2 ปริมาณของแบคทีเรียในส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการเตรียมตัวอย่างอาหารโดยวิธีดักจับด้วย membrane filter

| **ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการเตรียมตัวอย่างอาหาร** | **จำนวนโคโลนีเฉลี่ย (โคโลนี)** | | |
|---|---|---|---|
| | การทดลองที่ 1 | การทดลองที่ 2 | การทดลองที่ 3 |
| ส่วนที่สูญเสียไปกับกระดาษกรองและกากอาหาร (ส่วน A) | 78 | 65 | 70 |
| ส่วนที่สูญเสียไปกับส่วนของเหลวที่ผ่านกระดาษกรองเมมเบรน (ส่วน B) | 18 | 2 | 6 |
| ส่วนที่สามารถแยกออกจากกระดาษกรองเมมเบรน (ส่วน C) | 256 | 91 | 88 |

**4.3 การออกแบบไพรเมอร์**

ในการวิจัยนี้ทำการเลือกไพรเมอร์จากงานวิจัยที่น่าเชื่อถือและได้รับการเผยแพร่แล้ว โดยไพรเมอร์ที่เลือกใช้จะมีความจำเพาะสูงต่อยีนเป้าหมายทั้ง 3 ยีน [31,32,34] มีรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้รวมถึงลำดับเบสของไพรเมอร์ ปรากฏดังตารางที่ 3

**ตารางที่** 3 รายละเอียดของไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์

| **Target gene** | **Primer code** | **Forward (5'-3')** | **Reverse (5'-3')** | **Amplicon size (bp)** |
|---|---|---|---|---|
| *uspA*[31] | USP | CCGATACGCTGCCAATCAGT | ACGCAGACCGTAGGCCAGAT | 884 |
| *lt*[32] | LT | ACGGCGTTACTATCCTCTC | TGGTCTCGGTCAGATATGTG | 273 |
| *st*[34] | ST | TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG | ACAGGCAGGATTACAACAAAG | 166 |

**4.4 การพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR**

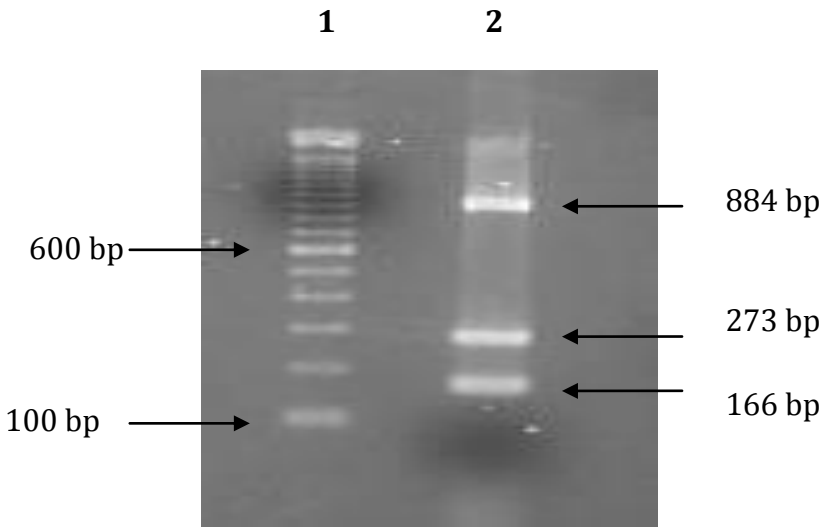
จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา simple PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนแต่ละชนิด พบสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 4 จากนั้นนำเอาสภาวะดังกล่าวมาปรับปรุงเพื่อพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนทั้งสามยีนไปพร้อมๆ กัน (triplex PCR) ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ปริมาณของ primer แต่ละคู่ที่ 1.0 ไมโครลิตร พบว่า จะพบเพียงแถบดีเอ็นเอของยีน *lt, st* เท่านั้น แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *uspA* แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ primer ของยีน *uspA* เป็น 1.5 ไมโครลิตร สามารถพบแถบดีเอ็นเอของยีนทั้ง 3 ชนิดนี้ได้พร้อมกัน ดังภาพที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex PCR ดังตารางที่ 5

**ตารางที่** 4 องค์ประกอบและปริมาณของสารต่างๆ สำหรับปฏิกิริยา simple PCR

| **องค์ประกอบ** | **ปริมาณ (ไมโครลิตร)** | | |
|---|---|---|---|
| | สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *uspA* | สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *lt* | สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *st* |
| 10x Taq buffer | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| dNTPs mixture | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| USP primer<br>Forward primer<br>Reverse primer | <br>1.0<br>1.0 | - | - |
| LT primer<br>Forward primer<br>Reverse primer | <br>-<br> | <br>1.0<br>1.0 | - |
| ST primer<br>Forward primer<br>Reverse primer | <br>-<br> | <br>-<br> | <br>1.0<br>1.0 |
| DNA template | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Taq DNA polymerase | 0.125 | 0.125 | 0.125 |
| Autoclaved DI water | 13.375 | 13.375 | 13.375 |
| Total volume | 25.0 | 25.0 | 25.0 |

**ตารางที่** 5 องค์ประกอบและปริมาณของสารต่างๆ สำหรับปฏิกิริยา multiplex PCR

| **องค์ประกอบ** | **ปริมาณ (ไมโครลิตร)** |
|---|---|
| 10x Taq buffer | 2.5 |
| dNTPs mixture | 2.0 |
| USP primer<br>Forward primer<br>Reverse primer | <br>1.5<br>1.5 |
| LT primer<br>Forward primer<br>Reverse primer | <br>1.0<br>1.0 |
| ST primer<br>Forward primer<br>Reverse primer | <br>1.0<br>1.0 |
| DNA template | 5.0 |
| Taq DNA polymerase | 0.125 |
| Autoclaved DI water | 13.375 |
| Total volume | 25.0 |



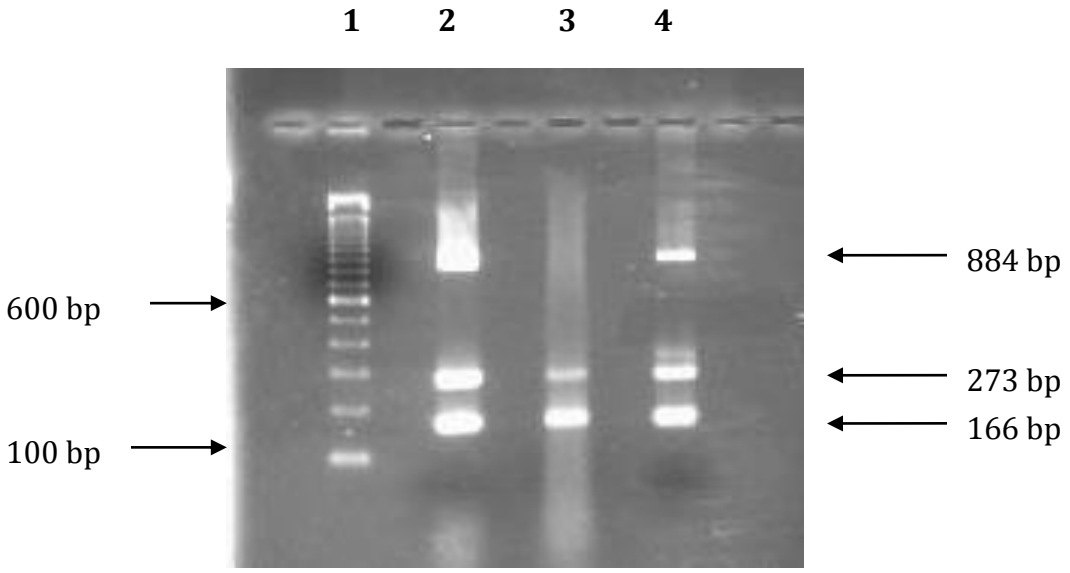

Lane 1: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 2: PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา multiplex PCR

**ภาพที่** 1 PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา multiplex PCR เมื่อวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

จากภาพจะเห็นว่าปริมาณขององค์ประกอบต่าง ๆ รวมถึงสภาวะและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR มีความเหมาะสมต่อการทำ multiplex PCR ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอของยีนที่มีขนาดต่างกันคือ 884, 273 และ 166 bp สำหรับยีน *uspA*, *lt* และ *st* ตามที่ต้องการ

**4.5. การใช้วิธีการเตรียม DNA template แบบต่าง ๆ ที่มีต่อปฏิกิริยา PCR**

เมื่อนำ DNA template ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีที่ต่างกันมาทำปฏิกิริยา multiplex PCR โดยมีองค์ประกอบรวมทั้งสภาวะของปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 5 หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์บน 2% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที ผลแสดงดังภาพที่ 2



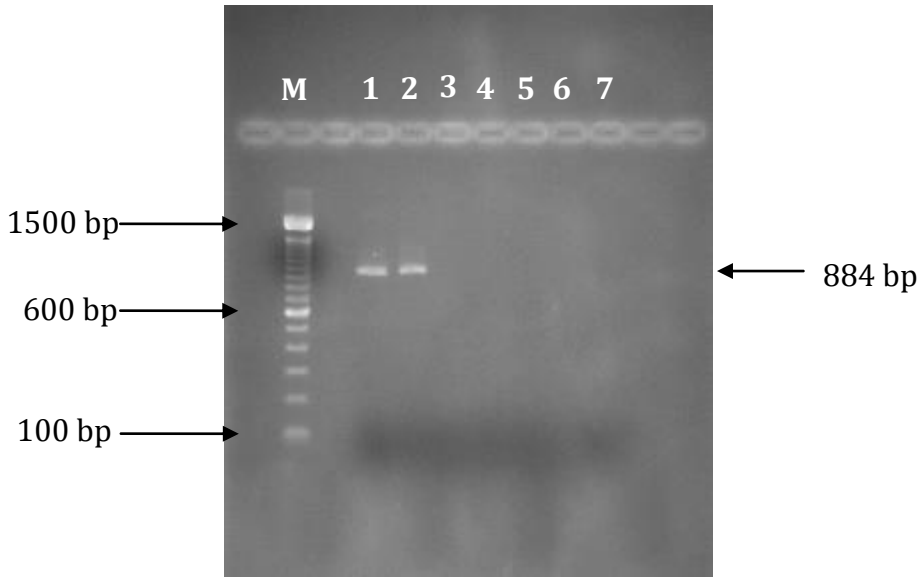

Lane 1: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 2: DNA template เตรียมด้วยวิธี rapid boiling lysis
Lane 3: DNA template เตรียมโดยการใช้ lysis buffer และ proteinase K
Lane 4: DNA template เตรียมโดยการใช้ commercial kit

**ภาพที่** 2 PCR product ที่ได้จากการทำ multiplex PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ ETEC ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่างๆ

จากภาพจะพบว่าการเตรียม DNA template โดยวิธี rapid boiling lysis ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน รวมถึงรวดเร็วและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเหมือนวิธีอื่นๆ สามารถทำให้ DNA template มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ได้ ดังนั้นในการศึกษาผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธี boiling lysis สำหรับเตรียม DNA template เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

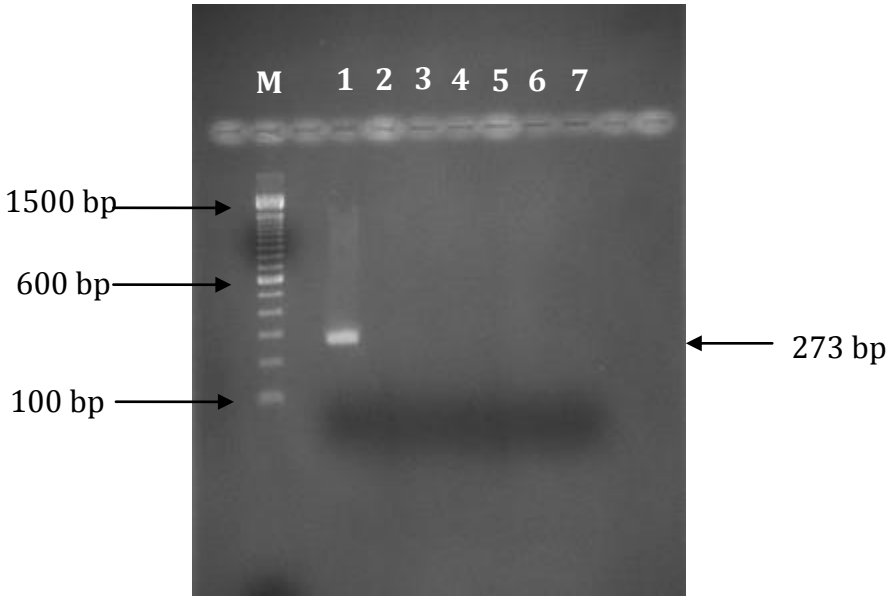
**4.6 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์**

ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์แต่ละคู่ในปฏิกิริยา simple PCR และ multiplex PCR โดยใช้ DNA template ที่ได้จากเชื้อ ETEC และแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารสายพันธุ์อื่นๆ ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ USP ให้ผลที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* ทั้งสายพันธุ์ nontoxigenic *E.coli* และสายพันธุ์ ETEC ส่วนไพรเมอร์ LT และ ST จะให้ผลที่จำเพาะต่อเชื้อ ETEC เท่านั้น นอกจากนั้นไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ยังให้ผลลบในปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ DNA template ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ดังปรากฏในภาพที่ 3-6



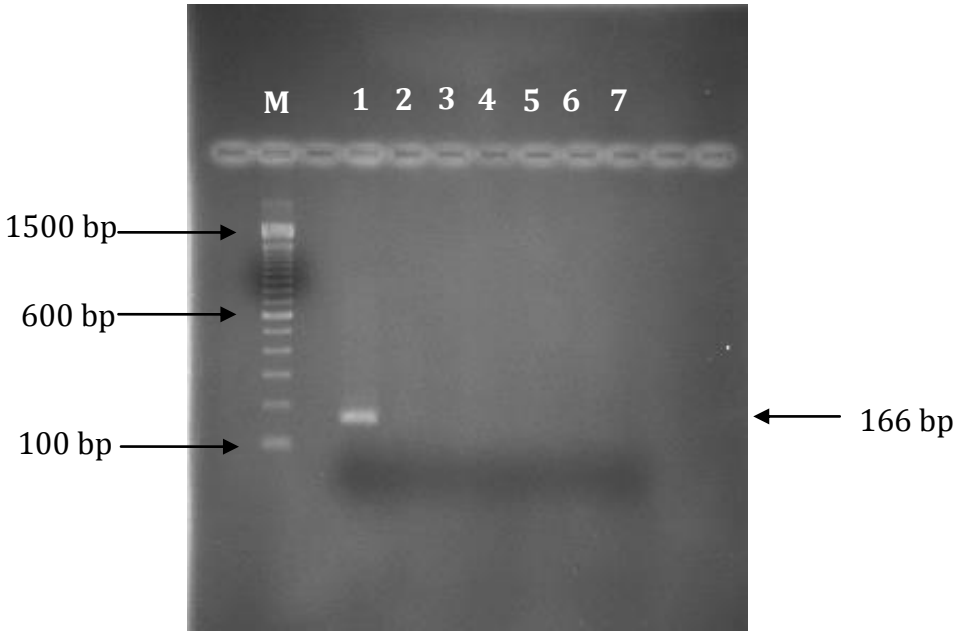

Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ ETEC
Lane 2: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)
Lane 3: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. choleraesuis* (DMST 8014)
Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *L. monocytogenes* (DMST 1327)
Lane 5: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. aureus* (DMST 2928)
Lane 6: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *B. cereus* (DMST 2952)
Lane 7: Negative control

**ภาพที่** 3 PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ USP ในปฏิกิริยา simple PCR



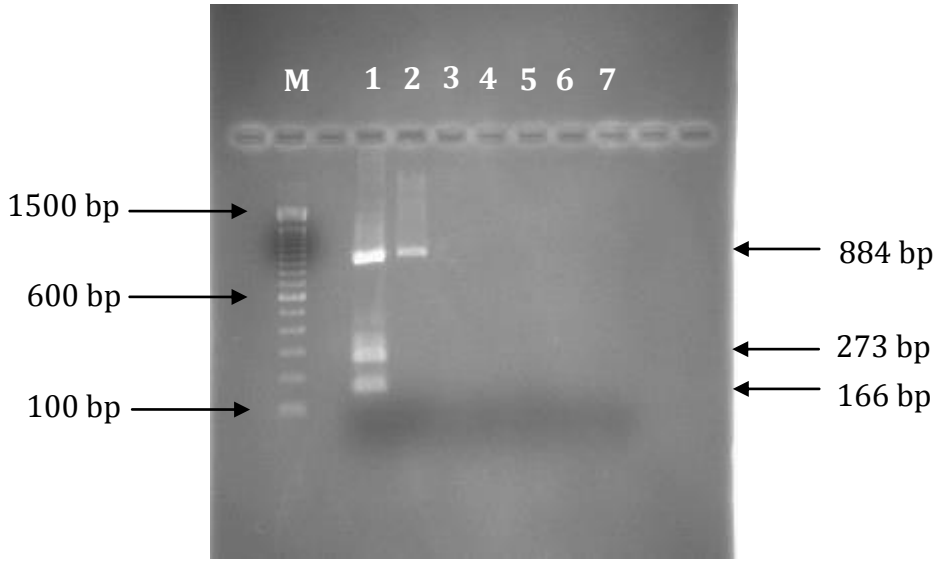

Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ ETEC
Lane 2: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)
Lane 3: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. choleraesuis* (DMST 8014)
Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *L. monocytogenes* (DMST 1327)
Lane 5: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. aureus* (DMST 2928)
Lane 6: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *B. cereus* (DMST 2952)
Lane 7: Negative control

**ภาพที่** 4 PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ LT ในปฏิกิริยา simple PCR




Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ ETEC
Lane 2: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)
Lane 3: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. choleraesuis* (DMST 8014)
Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *L. monocytogenes* (DMST 1327)
Lane 5: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. aureus* (DMST 2928)
Lane 6: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *B. cereus* (DMST 2952)
Lane 7: Negative control

**ภาพที่** 5 PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ ST ในปฏิกิริยา simple PCR




Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)

Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ ETEC

Lane 2: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)

Lane 3: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. choleraesuis* (DMST 8014)

Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *L. monocytogenes* (DMST 1327)

Lane 5: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *S. aureus* (DMST 2928)

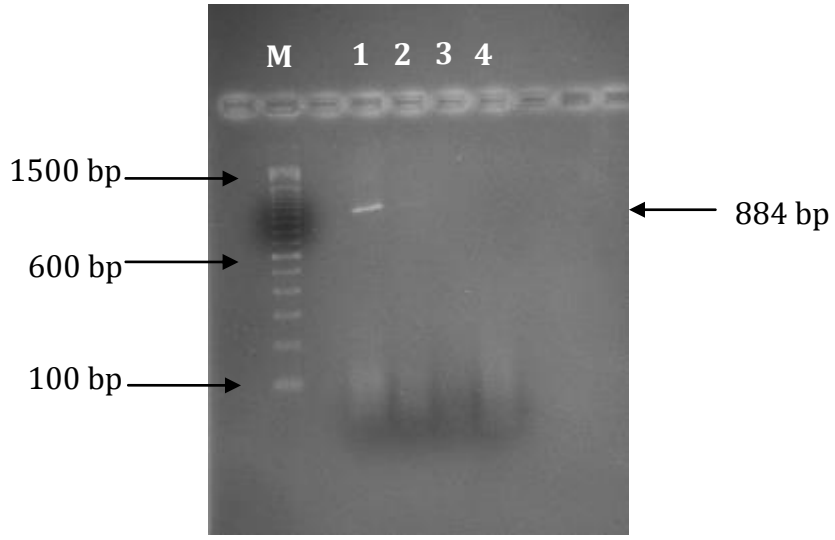
Lane 6: PCR product เมื่อใช้ template ของเชื้อ *B. cereus* (DMST 2952)

Lane 7: Negative control

**ภาพที่** 6 PCR product แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR

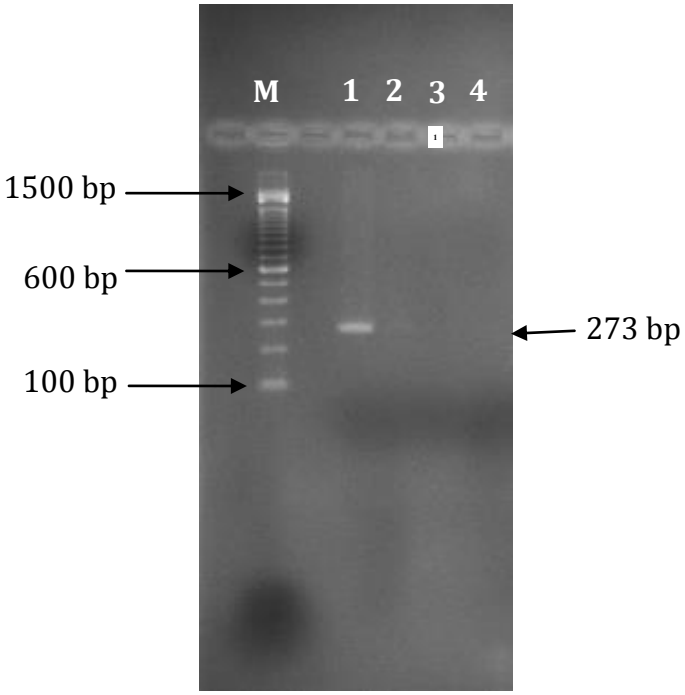
**4.7 การทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ ETEC จาก pure culture**

การทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา simple PCR และ multiplex PCR ทำโดยการเจือจาง culture ของเชื้อ ETEC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง $10^2$-$10^6$ CFU/ml แล้วแบ่ง culture แต่ละความเข้มข้นมา 10 ไมโครลิตร เพื่อนำมาสกัด gDNA ด้วยวิธี boiling lysis แล้วนำไปใช้เป็น DNA template สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis บน 2% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที ผลการศึกษาพบว่าสำหรับปฏิกิริยา simple PCR ความเข้มข้นของเชื้อ ETEC ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ PCR product ได้ คือ $10^5$ CFU/ml หรือ $10^3$ CFU/reaction ดังแสดงในภาพที่ 7-9 ส่วนปฏิกิริยา multiplex PCR นั้นพบว่าความเข้มข้นของเชื้อ ETEC ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ PCR product ทั้งสามยีนได้ คือ $10^5$ CFU/ml หรือ $10^3$ CFU/reaction ดังแสดงในภาพที่ 10



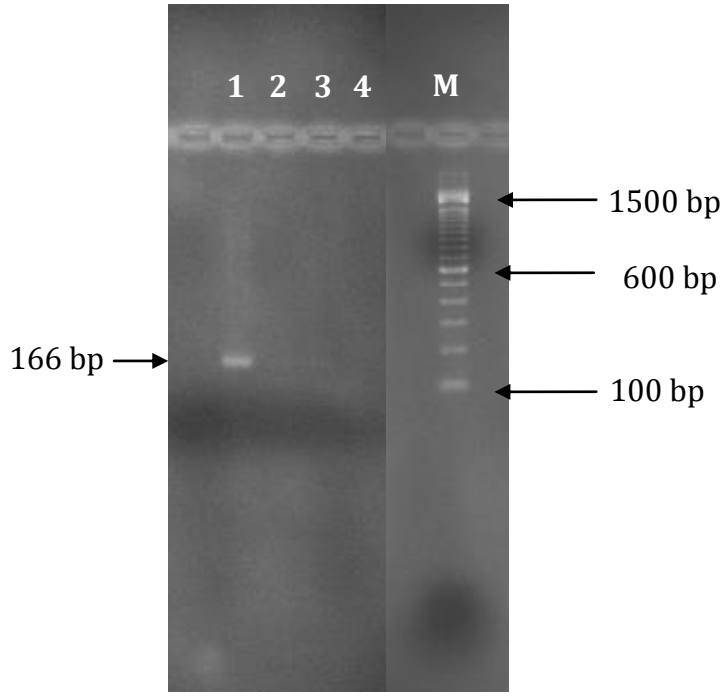

Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC $10^3$ CFU/reaction ($10^5$ CFU/ml)
Lane 2: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC $10^2$ CFU/reaction ($10^4$ CFU/ml)
Lane 3: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 10 CFU/reaction ($10^3$ CFU/ml)
Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 1 CFU/reaction ($10^2$ CFU/ml)

**ภาพที่** 7 PCR product จากวิธี simple PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *uspA* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ



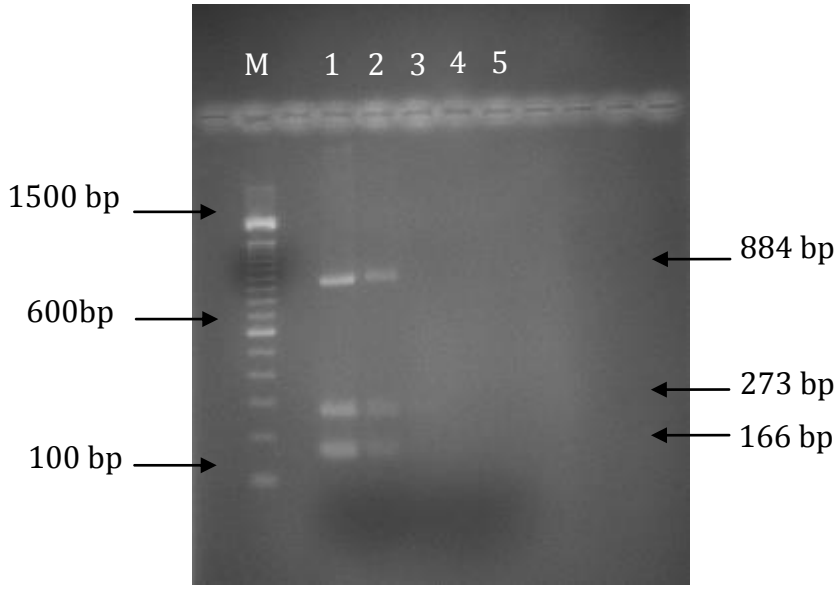

Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC $10^3$ CFU/reaction ($10^5$ CFU/ml)
Lane 2: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC $10^2$ CFU/reaction ($10^4$ CFU/ml)
Lane 3: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 10 CFU/reaction ($10^3$ CFU/ml)
Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 1 CFU/reaction ($10^2$ CFU/ml)

**ภาพที่** 8 PCR product จากวิธี simple PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *lt* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ




Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC $10^3$ CFU/reaction ($10^5$ CFU/ml)
Lane 2: PCR product เมื่อใช้template ที่เตรียมจาก ETEC $10^2$ CFU/reaction ($10^4$ CFU/ml)
Lane 3: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 10 CFU/reaction ($10^3$ CFU /ml)
Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 1 CFU/reaction ($10^2$ CFU /ml)

**ภาพที่** 9 PCR product จากวิธี simple PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *st* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ

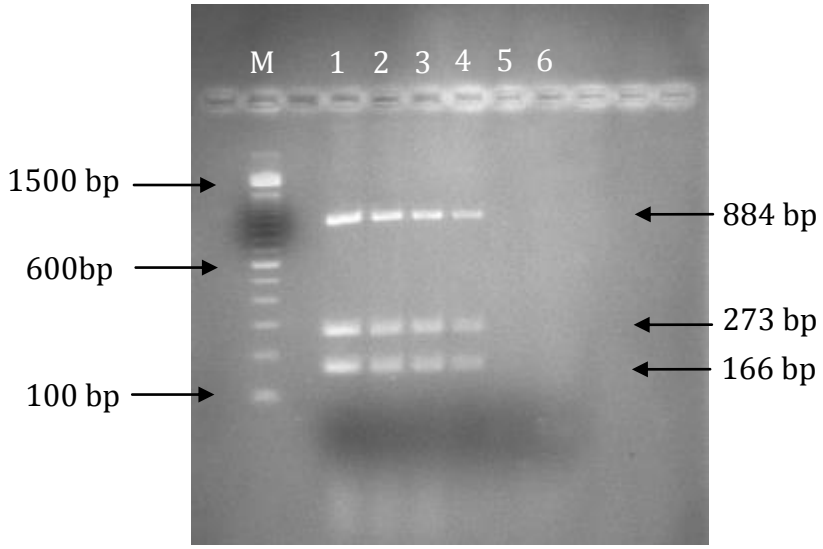



Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC $10^4$ CFU/reaction ($10^6$ CFU/ml)
Lane 2: PCR product เมื่อใช้template ที่เตรียมจาก ETEC $10^3$ CFU/reaction ($10^5$ CFU /ml)
Lane 3: PCR product เมื่อใช้template ที่เตรียมจาก ETEC $10^2$ CFU/reaction ($10^4$ CFU /ml)
Lane 4: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 10 CFU/reaction ($10^3$ CFU /ml)
Lane 5: PCR product เมื่อใช้ template ที่เตรียมจาก ETEC 1 CFU/reaction ($10^2$ CFU /ml)

**ภาพที่** 10 PCR product จากวิธี multiplex PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *uspA*, *lt* และ *st* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมจาก culture ของเชื้อ ETEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ

**4.8 การทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR เมื่อใช้ร่วมกับ membrane filter ในการเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของ ETEC ในตัวอย่างอาหาร**

ทำการทดสอบหาความไวของวิธี multiplex PCR เมื่อใช้ membrane filter สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหาร โดยทำการเจือจาง culture ของเชื้อให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $10^1$-$10^6$ CFU/ml แล้วนำ culture ความเข้มข้นต่างๆมาจำนวน 1 ml ถ่ายลงในตัวอย่างอาหารจำนวน 10 กรัมที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำมาแยก ETEC ออกจากตัวอย่างอาหารด้วยการใช้ membrane filter เป็นตัวดักจับเซลล์ของแบคทีเรียไว้ แล้วนำไปสกัด gDNA โดยวิธี boiling lysis จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column เพื่อใช้เป็น DNA template สำหรับปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นดังกล่าวสามารถตรวจพบเชื้อ ETEC ได้เมื่อมีการปนเปื้อนอย่างน้อย $10^2$ CFU/g ของอาหารตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 11



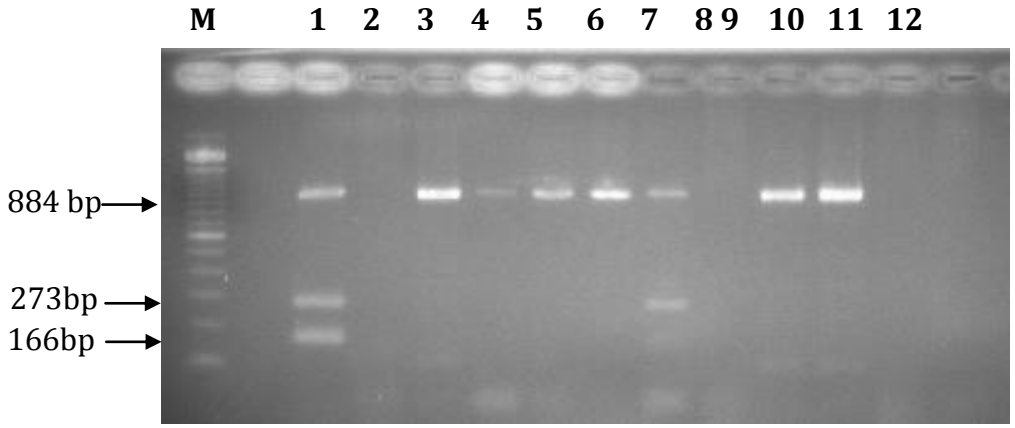

Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: PCR product เมื่อมีการปนเปื้อน ETEC $10^5$ CFU/g
Lane 2: PCR product เมื่อมีการปนเปื้อน ETEC $10^4$ CFU/g
Lane 3: PCR product เมื่อมีการปนเปื้อน ETEC $10^3$ CFU/g
Lane 4: PCR product เมื่อมีการปนเปื้อน ETEC $10^2$ CFU/g
Lane 5: PCR product เมื่อมีการปนเปื้อน ETEC 10 CFU/g
Lane 6: PCR product เมื่อมีการปนเปื้อน ETEC 1 CFU/g

**ภาพที่** 11 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหาร

**4.9 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี multiplex PCR ที่พัฒนา**

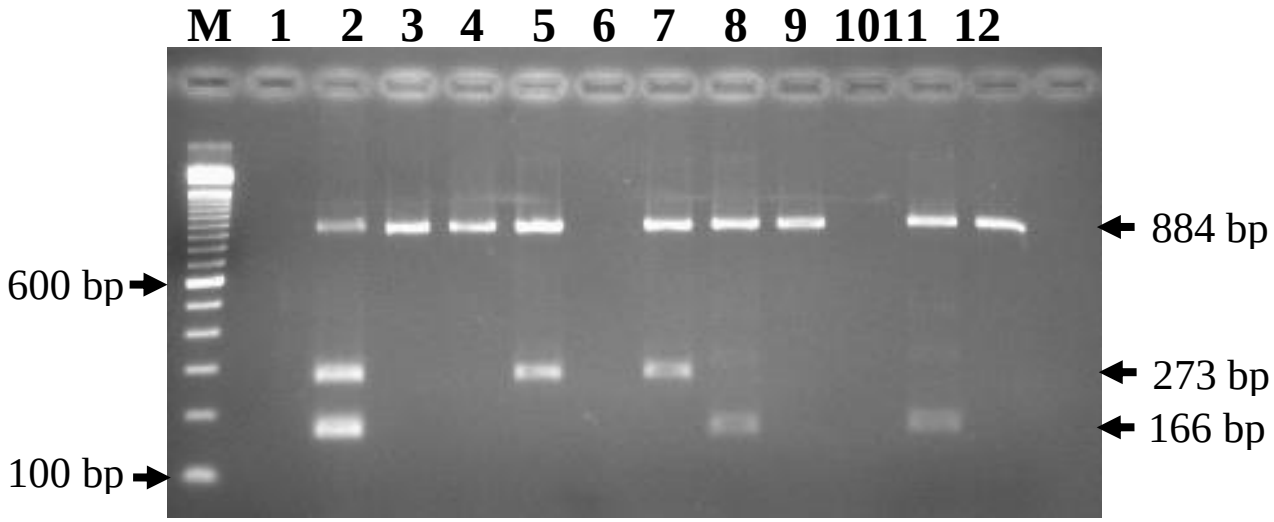
การศึกษานี้ได้นำวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นไปทดลองใช้จริง โดยตรวจวิเคราะห์เชื้อ ETEC ในอาหารตัวอย่าง 4 ชนิดคือ พริกแกงเขียวหวาน เนื้อหมูดิบ ลาบหมู (แบบสุกและกึ่งดิบกึ่งสุก) และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม จากตลาดสด ผลการศึกษาไม่พบ PCR product ของยีนทั้งสามยีนในตัวอย่างพริกแกงเขียวหวานทั้ง 10 ตัวอย่าง สำหรับเนื้อหมูดิบตรวจพบ PCR product จำนวน 7 ตัวอย่างจากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง ตรวจพบ PCR product ชนิดเดียวที่มีขนาด 884 bp ของยีน *uspA* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะกับเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ แสดงว่าทั้ง 6 ตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* นอกจากนั้นยังพบ PCR product ที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ 884 และ 273 bp ในตัวอย่างเนื้อหมูดิบจำนวน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 5) ดังรายละเอียดที่แสดงในภาพที่ 12 แสดงว่าตัวอย่างเนื้อหมูดิบดังกล่าวมีการปนเปื้อนเชื้อ ETEC ชนิดที่สร้างท็อกซิน LT

สำหรับตัวอย่างประเภทลาบ ตรวจพบ PCR product จำนวน 8 ตัวอย่างจากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างจำนวน 4 ตัวอย่างตรวจพบ PCR product ชนิดเดียวที่มีขนาด 884 bp ของยีน *uspA* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะกับเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์แสดงว่าทั้ง 4 ตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* นอกจากนั้นยังพบ PCR product ที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาดคือ 884 และ 273 bp ในตัวอย่างลาบหมูกึ่งดิบกึ่งสุกจำนวน 2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 3 และ 5) และพบ PCR product ที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาดคือ 884 และ 166bp ในตัวอย่างลาบหมูกึ่งดิบกึ่งสุกจำนวน 2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 6 และ 9) ดังรายละเอียดที่แสดงในภาพที่ 13




Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: Positive control
Lane 2: Negative control
Lane 3: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 1
Lane 4: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 2
Lane 5: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 3
Lane 6: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 4
Lane 7: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 5
Lane 8: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 6
Lane 9: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 7
Lane 10: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 8
Lane 11: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 9
Lane 12: เนื้อหมูดิบตัวอย่างที่ 10

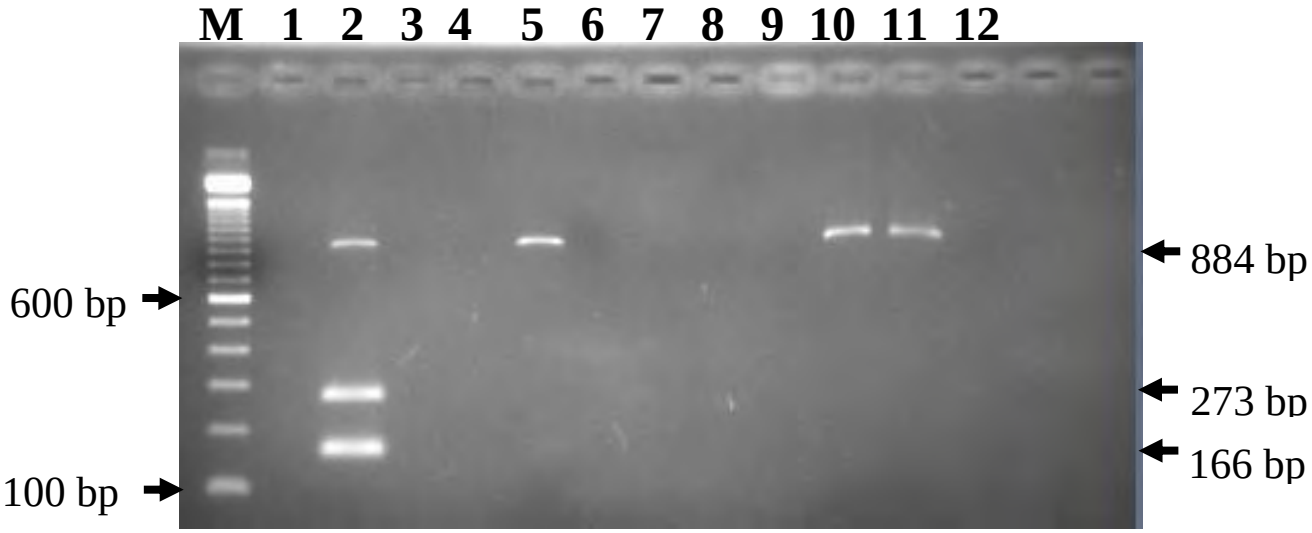
**ภาพที่** 12 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างอาหารด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างเนื้อหมูดิบ




Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: Negative control
Lane 2: Positive control
Lane 3: ลาบกึ่งดิบกึ่งสุกตัวอย่างที่ 1
Lane 4: ลาบสุกตัวอย่างที่ 2
Lane 5: ลาบกึ่งดิบกึ่งสุกตัวอย่างที่ 3
Lane 6: ลาบสุกตัวอย่างที่ 4
Lane 7: ลาบกึ่งดิบกึ่งสุกตัวอย่างที่ 5
Lane 8: ลาบกึ่งดิบกึ่งสุกตัวอย่างที่ 6
Lane 9: ลาบสุกตัวอย่างที่ 7
Lane 10: ลาบสุกตัวอย่างที่ 8
Lane 11: ลาบกึ่งดิบกึ่งสุกตัวอย่างที่ 9
Lane 12: ลาบสุกตัวอย่างที่ 10

**ภาพที่** 13 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างอาหารด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างลาบหมู

ส่วนของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ตรวจพบ PCR product จำนวน 3 ตัวอย่างจากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยทุกตัวอย่างตรวจพบ PCR product ชนิดเดียวที่มีขนาด 884 bp ของยีน *uspA* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะกับเชื้อ *E. Coli* ทุกสายพันธุ์ แสดงว่าทั้ง 3 ตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ดังแสดงในภาพที่ 14




Lane M: Marker (DNA ladder 100 bp)
Lane 1: Negative control
Lane 2: Positive control
Lane 3: น้ำกระเจี๊ยบ
Lane 4: น้ำมะนาว
Lane 5: น้ำมะพร้าว
Lane 6: น้ำเสาวรส
Lane 7: ชาเย็น
Lane 8: น้ำส้ม
Lane 9: น้ำเก็กฮวย
Lane 10: น้ำฝรั่ง
Lane 11: น้ำใบบัวบก
Lane 12: น้ำมะตูม

**ภาพที่** 14 PCR product จากวิธี multiplex PCR เมื่อเตรียมตัวอย่างอาหารด้วยวิธี membrane filtration เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างเครื่องดื่ม

# บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัย

วิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสามารถนำมาตรวจหาและแยกความแตกต่างของเชื้อเอนเทอโรท็อกซิเจนิก อี โคไล (ETEC) ได้ โดยไพรเมอร์ที่เลือกใช้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย คือ universal stress protein A (*uspA*), heat-labile toxin (*lt*) และ heat-stable toxin (*st*) และไม่เกิด cross-reaction เมื่อใช้ในปฏิกิริยาเดียวกัน แต่เมื่อนำวิธีดังกล่าวมาทดสอบในตัวอย่างอาหาร ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนมาก รวมถึงมีสารที่อาจมีผลยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ ดังนั้นวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารให้เหมาะสมก่อนทำปฏิกิริยา PCR เพื่อกำจัดตัวยับยั้งปฏิกิริยารวมทั้งเพื่อแยกและเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายให้มากที่สุด เพื่อเพิ่มความไวของวิธี PCR จึงเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็น จากการวิจัยนี้ได้พัฒนาหาวิธีสำหรับเตรียมตัวอย่างอาหารโดยใช้เทคนิค membrane filtration ผลการศึกษาพบว่า แม้ประสิทธิภาพในการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากเมทริกซ์ของอาหารของ membrane filter ซึ่งประเมินจากค่า % recovery จะมีค่าไม่สูงมาก คือ อยู่ในช่วง 69-79 แต่เมื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของ ETEC ได้แม้มีการปนเปื้อนเพียง $10^2$ CFU ต่ออาหารหนึ่งกรัม หลังจากที่นำเอาวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารโดยใช้ membrane-filter มาใช้ร่วมกับ multiplex PCR ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ ETEC ในตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถนำไปใช้ตรวจการปนเปื้อนของ ETEC ในตัวอย่างอาหารได้

**ข้อจำกัดของงานวิจัยและข้อเสนอแนะ**

1. ถึงแม้ว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการบ่มเพาะเชื้อ (pre-enrichment) ร่วมกับวิธี membrane filtration เพื่อแยกและเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย จะทำให้วิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวที่ดี คือ $10^2$ CFU ต่ออาหารหนึ่งกรัม แต่วิธีการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวก็ยังมีข้อกำจัดอยู่ คือ มีหลายขั้นตอน จึงอาจไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นในอนาคตจำเป็นต้องมีการศึกษาและวิจัยเพิ่มเติม
2. ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อ ETEC มาตรฐานในการทดลองเพียงสายพันธุ์เดียว ในการทดสอบความจำเพาะ ซึ่งความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของเชื้อ ETEC อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นได้ ดั้งนั้นการวิจัยในอนาคตจึงควรใช้เชื้อ ETEC มาตรฐานจำนวนมากขึ้น
3. วิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายที่ได้ทั้งเชื้อเป็นและเชื้อตาย ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างอาหารแล้วให้ผลบวก จึงไม่สามารถระบุได้ว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนเชื้อ ETEC ชนิดเป็นหรือตาย

# รายการอ้างอิง


[1] สุพร ตรีพงษ์กรุณา. Infective diarrhea in children. ใน สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล, เกศรา อัศดามงคล, มาเรียว ริกันตี, สมชาย สันติวัฒนกุล, บรรณาธิการ. ภาวะติดเชื้อ: Molecular/Cellular and Clinical Basis. หน้า 1420-1431. กรุงเทพฯ: เม็ดทรายพริ้นติ้ง, 2547.

[2] ศรีลักขณ์ สิมะเสถียร และวีระชัย วัฒนวีรเดช. โรคอุจจาระร่วงจากการติดเชื้อในเด็ก. ใน พรรณทิพย์ ฉายากุล, ชิษณุ พันธุ์เจริญ, ชุษณา สวนกระต่าย และคณะ, บรรณาธิการ. ตำราโรคติดเชื้อ 1: A Textbook of Infectious Diseases1. หน้า 283-298. กรุงเทพ: โฮลิสติกพับลิชชิ่ง, 2548.

[3] สาธารณสุข, กระทรวง. กรมควบคุมโรค สำนักระบาดวิทยา. โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี 2552. หน้า 125-126. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์, 2553.

[4] Prasad, D., and Vidyarthi, A.S. DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. African Journal of Biotechnology 8 (2009): 1768-1775.

[5] ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ. โรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียเอสเชอริเชีย โคไล. ใน ความปลอดภัยของอาหาร. หน้า 84-118. กรุงเทพฯ: ซิสเตอร์พริ้นท์แอนด์มีเดียกรุ๊ป, 2549.

[6] Nataro, J.P., and Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 11 (1998): 142-201.

[7] Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S.G., and Sack, R.B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical

features, treatment, and prevention. Clinical Microbiology Reviews. 18 (2005): 465-483.

[8] Blemrn, I., Lrfdahl, S., Stenstrrm, T.A., and Norberg, R. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates: a comparison of PCR, DNA hybridization, ELISAs and bioassays. Journal of Microbiological Methods 17 (1993): 181-191.

[9] Olsen, J.E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens Food Research International 33 (2000): 257-266.

[10] Candrian, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. Journal of Microbiological Methods 23 (1995): 89-103.

[11] Lantz, Pär-G., Hahn-Hägerdal, B., and Rådström, P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens**.** Trends in Food Science and Technology 5 (1994): 384-389.

[12] Ge, B., and Meng, J. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: current applications and future directions. Technology Review 8 (2009): 235-241.

[13] Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., and Löfström, C. Pre-PCR: processing strategies to generate PCR-compatible samples. Molecular Biotechnology 26 (2004): 133-146.

[14] Rijpens, N.P., and Herman, L.M.F. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. Journal of AOAC international 85,4 (2002): 984-995.

[15] Myint, M.S., Johnson, Y.L., Tablante, N.L., and Heckert, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. Food Microbiology 23 (2005): 599-604.

[16] Lantz, P.C., Tjerneld, F., Borch, E., Hahn-Hagerdal, B., and Radstrom, P. Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. Applied and Environmental Microbiology 60 (1994): 3416-3418.

[17] Zhou, Y., Wu, Q., Xu, X., Yang, X., Ye, Y., and Zhang, J. Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula. Food Microbiology 25 (2008): 648–652.

[18] Lindqvist, R. Preparation of PCR samples from food by a rapid and simple centrifugation technique evaluated by detection of *Escherichia coli* O157:H7. International Journal of Food Microbiology 37 (1997): 73-82.

[19] Jay, J.M. Foodborne gastroenteritis caused by *Escherichia coli*. Modern Food Microbiology. 6th ed. pp 637-655. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 2000.

[20] Paton, A., Morona, N., and Paton, J.C. Designer probiotics for prevention of enteric infections. Nature Reviews Microbiology 4 (2006): 193-200.

[21] Sharma, V. K.; and Carlson, S. A. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture Applied and Environmental Microbiolog 66,12 (2000): 5472-5476.

[22] Fu, Z., Rogelj, S., and Kieft, T.L. Rapid detection of *Escherichia coli O157:H7* by immune magnetic separation and real-time PCR. International Journal of Food Microbiology 99 (2005): 47–57.

[23] Fitzmaurice, J., Duffy, G., Kilbride, B., Sheridan, J.J., Carroll, C., and Maher, M. Comparison of a membrane surface adhesion recovery method with an IMS method for use in a polymerase chain reaction method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef. Journal of Microbiology Method 59,2 (2004): 243-252.

[24] Bansal, R.C., and Goyal, M. Activated carbon adsorption. pp 351-353. London: Taylor and Francis Group, 2005.

[25] Luan, C., and Levin, R.E. Use of activated carbon coated with bentonite for increasing the sensitivity of PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Canadian oyster (*Crassostrea gigas*) tissue. Journal of Microbiology Method 72 (2008): 67-72.

[26] Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., and Pal, U.K. Methods for rapid detection of food-borne pathogens: an overview. American Journal of Food Technology 6,2 (2011): 87-102.

[27] บุษกร อุตรภิชาติ. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. หน้า 394-395. สงขลา: นำศิลป์โฆษณา, 2552.

[28] Doyle, M.P., and Padhye, V.V. *Escherichia coli* in M.P. Doyle (ed.) Foodborne Bacterial Pathogens. pp 235-281. New York: Marcel Dekker, 1989.

[29] Dutka-Malen, S., Evers, S., and Courvalin, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology 33 (1995): 24-27.

[30] Murray, M. G., and Thompson, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8 (1980): 4321-4325.

[31] Chen, J., Griffiths, N.W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. Letters in Applied Microbiology 27 (1998): 369-371.

[32] Sjoling, A., Wiklund, G., Savarino, S.J., Cohen, D.I., and Svennerhol, A.M. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factor. Journal of Clinical Microbiology 45 (2007): 3295-3301.

[33] Moseley, S.L., Hardy, J.W., Huq, M.I., Echeverria, P., and Falkow, S. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Infection and Immunity 39 (1983): 1167-1174.

[34] Bolin, I., Wiklund, G., Qadri, F., Torres, O., Bourgeois, A.L., Savarino, S., and Svennerholm, A.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas endemicity and in travelers. Journal of Clinical Microbiology 44 (2006): 3872-3877.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. **2 % Agarose gel** ซึ่งมีสูตรดังนี้

| | |
|---|---|
| Agarose powder | 1.0 g |
| 0.5x TBE buffer solution q.s. to | 50 ml |

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Agarose powder 1.0 กรัมใส่ลงใน beaker
2. เติม 0.5x TBE buffer solution 50 มิลลิลิตร ลงในbeakerใช้แท่งแก้วคนสารคนให้เข้ากันจะมีบางส่วนที่ยังละลายไม่หมด
3. นำbeaker ที่ได้จากข้อ3ไปให้ความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟ ระดับไฟปานกลาง นานประมาณ 2 นาที
4. เมื่อเจลละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงก่อน
5. นำเจลที่ได้มาเทลงบนถาดทำเจล แล้วเสียบหวีเพื่อให้เกิดรูที่ใช้ในการโหลดสาร
6. รอให้เจลแข็ง ใช้เวลาประมาณ 20 นาที เมื่อเจลแข็งแล้วจึงดึงหวีออก
7. จะได้ agarose gel ที่จะนำไปทำ gel electrophoresis ต่อไป

**2. Extraction Buffer**

โดยในการวิจัยนี้ใช้ Buffered Sodium Chloride-peptone Solution pH 7.0 ซึ่งมีสูตรดังนี้

| | |
|---|---|
| Potassium dihydrogen phosphate | 3.6 g |
| Disodium hydrogen phosphate dehydrate | |
| equivalent to 0.067 M | 7.2 g |
| NaCl | 4.3 g |
| Peptone (meat or casein) | 1.0 g |
| Polysorbate 80 | 10 g |
| Purified water q.s. to | 1000 ml |

วิธีการเตรียม

1. คำนวณworking formula เพื่อหาปริมาณสารแต่ละตัวที่จะต้องใช้ตามปริมาตร extraction buffer ที่ต้องการ
2. ชั่งสารตาม working formula ที่คำนวณได้ใส่ลงใน flask
3. นำสารในflask มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ
4. คนจนเป็นสายละลายสีเหลืองใส
5. นำฟอยล์อลูมิเนียมมาปิดฝา flask
6. นำไป อบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15psi เป็นเวลา 20 นาที (autoclave)
7. นำ extraction buffer ที่ได้มาเทลงใน หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อแล้ว เพื่อเตรียมเป็น extraction buffer สำหรับ สกัดเชื้อออกจากพริกแกงต่อไป

**3. LB Agar ซึ่งมีสูตรดังนี้**

| | |
|---|---|
| PEG 6000 | 4 g |
| Distilled water q.s. to | 100 ml |

วิธีการเตรียม

1. คำนวณworking formula เพื่อหาปริมาณ PEG 6000 ที่จะต้องใช้ตามปริมาตรของ PEG 6000 solution ที่ต้องการ
2. ชั่ง PEG 6000 ตาม working formula ที่คำนวณได้ใส่ลงใน beaker
3. เติม น้ำกลั่น ให้มีปริมาตร ตาม working formula ใช้แท่งแก้วคนสารคนให้เข้ากัน
4. จะได้ 4% PEG 6000 solution เก็บไว้เป็น stock solution โดยเก็บไว้ในขวดReagent เพื่อใช้ในการสกัดแยกเชื้อจากพริกแกงโดยต้องนำไป autoclave ก่อนที่จะนำมาใช้

**4. LB broth ซึ่งมีสูตรดังนี้**

| | |
|---|---|
| Tryptone | 10 g |
| Yeast extract | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Distilled water q.s. to | 1000 ml |

วิธีการเตรียม

1. คำนวณworking formula เพื่อหาปริมาณสารแต่ละตัวที่จะต้องใช้ตามปริมาตร broth ที่ต้องการ

2. ชั่งสารตาม working formula ที่คำนวณได้ใส่ลงใน flask
3. นำสารในflask มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ
4. คนจนเป็นสายละลายสีเหลืองใส
5. นำฟอยล์อลูมิเนียมมาปิดฝา flask
6. นำไป อบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15psi เป็นเวลา 20 นาที (autoclave)
7. นำ LB agar ที่ได้มาเทลงใน หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อแล้ว เพื่อเตรียมป็น อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่อไป

**5. Tris-borate-EDTA buffer solution (TBE buffer)**

โดยเตรียมเป็น Stock solution (5x) ซึ่งมีสูตรดังนี้

| | |
|---|---|
| Tris base | 54 g |
| Boric acid | 27.5 g |
| Add EDTA solution (pH8.0) | 20 ml |
| Purified water q.s. to | 1,000 ml |

EDTA solution ที่ใช้ใน TBE Buffer มีสูตรดังนี้

| | |
|---|---|
| EDTA | 93.05 g |
| DI water | 400 ml |
| DI water q.s.to | 500 ml |
| NaOH q.s.to pH 8.0 | |

วิธีการเตรียม

1. คำนวณ working formula เพื่อหาปริมาณสารแต่ละตัวที่จะต้องใช้ตามปริมาตรของ EDTA solution ที่ต้องการ
2. ชั่ง EDTA ตาม working formula ที่คำนวณได้ใส่ลงใน flask
3. เติม DI water ให้มีปริมาตร ตาม working formula
4. ปรับpHของสารละลาย EDTA ด้วยสารละลาย NaOH จนมีpH=8.0
5. ปรับปริมาตรด้วย DI water ให้มีปริมาตรสุดท้ายตามที่ต้องการ
6. จะได้ EDTA solution ที่จะนำไปใช้เตรียม TBE buffer
7. คำนวณworking formula เพื่อหาปริมาณสารแต่ละตัวที่จะต้องใช้ตามปริมาตรของ 5x TBE buffer solution ที่ต้องการ
8. ชั่ง Tris base และ boric acid ตาม working formula ที่คำนวณได้ใส่ลงใน flask
9. เติมEDTA solution ที่เตรียมไว้ใน ข้อ 1-6 ตาม working formulaที่คำนวณได้ใส่ลงใน flask
10. เติม DI waterให้มีปริมาตร ตาม working formula

จะได้5x TBE buffer solution ตามที่ต้องการ เก็บไว้เป็น stock solution โดยใส่ในขวด Reagent สำหรับการทำ gel electrophoresis ซึ่งต้องใช้ 0.5x TBE buffer solution ซึ่งจะเตรียมได้จากการนำ 5x TBE buffer solutionมาเจือจางด้วย DI water ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า แล้วนำไป autoclave ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทำ gel electrophoresis

# ภาคผนวก ข

## การคำนวณ %recovery

**คำนวณหา % recovery**

การใช้ membrane filter เป็นตัวดักจับแบคทีเรีย

**การทดลองที่ 1**

- **ส่วน A** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 78 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{78 \text{ colony}}{50\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 1560 \text{ CFU/ml}$$

- **ส่วน B** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 18 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{18 \text{ colony}}{10\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 1800 \text{ CFU/ml}$$

- **ส่วน C** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 256 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{256 \text{ colony}}{20\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 12800 \text{ CFU/ml}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{12800}{1560+1800+12800} \times 100 = 79.21\ \%$$

**การทดลองที่ 2**

- **ส่วน A** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 65 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{65 \text{ colony}}{50\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 1300 \text{ CFU/ml}$$

- **ส่วน B** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 2 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{2 \text{ colony}}{10\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 200 \text{ CFU/ml}$$

- **ส่วน C** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 91 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{91 \text{ colony}}{20\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 4550 \text{ CFU/ml}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{4550}{1300+200+4550} \times 100 = 75.21\ \%$$

**การทดลองที่ 3**

- **ส่วน A** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 70 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{70 \text{ colony}}{50\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 1400 \text{ CFU/ml}$$

- **ส่วน B** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 6 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{6 \text{ colony}}{10\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 600 \text{ CFU/ml}$$

- **ส่วน C** มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 88 โคโลนี

$$\text{Total population} = \frac{88 \text{ colony}}{20\ \mu l} \times 1000\ \mu l = 4400 \text{ CFU/ml}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{4400}{1400+600+4400} \times 100 = 68.75\ \%$$

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวประชุมพร จันทร์วีระชัย เกิดเมื่อวันที่ 22 ธันวาคม 2526 ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาเภสัชศาสตรบัณฑิตจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร