



## โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การตรวจหา *Staphylococcus aureus* enterotoxin A ด้วยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อ enterotoxin A จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรไทย

**ชื่อนิสิต** นางสาวธัญกร นิลสาขา รหัสประจำตัว 5932321023

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การตรวจหา *Staphylococcus aureus* enterotoxin A ด้วยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อ enterotoxin A จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรไทย

Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A by PCR method specific to enterotoxin A from Thai coins and banknotes

**ชื่อนิสิต** นางสาวธัญกร นิลสาขา

**เลขประจำตัว** 5932321023

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ การตรวจหา *Staphylococcus aureus* enterotoxin A ด้วยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อ  
enterotoxin A จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรไทย

โดย นางสาวธัญกร นิลสาขา 5932321023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

ปีการศึกษา 2562

---

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

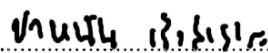


..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ



..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)



..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ)



..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การตรวจหา *Staphylococcus aureus* enterotoxin A ด้วยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อ  
enterotoxin A จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรไทย

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

นิสิตในโครงการ

นางสาวฉัญกร นิลสาขา รหัสประจำตัวนิสิต 5932321023

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ

การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

## โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การตรวจหา *Staphylococcus aureus* enterotoxin A ด้วยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อ enterotoxin A จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรไทย

นิสิตในโครงการ นางสาวธัญกร นิลสาขา  
เลขประจำตัวนิสิต 5932321023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์

### บทคัดย่อ

*Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของมนุษย์ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* (SFP) ทั่วโลก *Escherichia coli* เป็นดัชนีสุหลักขณะที่ยังชีพการปนเปื้อนอุจจาระโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารและน้ำ การปนเปื้อน *S. aureus* และ *E. coli* บนเหรียญกษาปณ์และธนบัตรอาจก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารในหมู่ประชากรไทย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษา คือ ตรวจหาการปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* บนเหรียญกษาปณ์และธนบัตรของไทย เก็บเหรียญกษาปณ์และธนบัตรโดยสุ่มจากตลาดและโซนิเคตเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียจากพื้นผิว สารแขวนลอยแบคทีเรียได้ถูกทำให้เข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงและนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ตามด้วยการเพิ่มจำนวนยีน SEA (*Staphylococcal Enterotoxin A*) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะ นำส่วนแบ่งของสารแขวนลอยแบคทีเรียมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเพื่อหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด และเพาะเลี้ยงบนแมนนิทอลซอร์บิทอซาร์ (MSA) เช่นเดียวกับอีโอซินเมธิลีนบูลอะการ์ (EMB) เพื่อหาจำนวนของ *S. aureus* และ *E. coli* ตามลำดับ ผลได้แสดงว่า PCR ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับ SEA ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน SEA ใน *S. aureus* ATCC 13565 ที่เป็นเชื้อควบคุมผลบวก การเพาะเลี้ยง *S. aureus* ATCC 13565 และ *E. coli* MSCU 0620 บน MSA และ EMB ตามลำดับ ได้แสดงลักษณะโคโลนีที่ควรเป็น พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุดในเหรียญ 1 บาท คิดเป็น 98.4 CFU/พื้นที่ผิว (ตร.ซม.) ไม่พบ *S. aureus* และ *E. coli* บน MSA และ EMB ตามลำดับ ผลเบื้องต้นแสดงว่าบนเหรียญกษาปณ์และธนบัตรมีเซลล์แบคทีเรียน้อยมากและไม่พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *E. coli* ควรทำการทดลองต่อไปโดยใช้ตัวอย่างที่มากขึ้นเพื่อผลการทดลองที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

**Project title** Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A by PCR method specific to enterotoxin A from Thai coins and banknotes

**Investigator** Ms. Thanyakorn Nilsakha  
Student ID 5932321023

**Advisor** Kobchai Pattaragulwanit, Assistant Professor, Dr.rer.nat.

**Abstract**

*Staphylococcus aureus* is an important human pathogen which can cause staphylococcal food poisoning (SFP) worldwide. *Escherichia coli* is an important hygienic index indicating for fecal contamination especially in food and water. Contamination of *S. aureus* and *E. coli* on coins and banknotes may cause gastroenteropathy among Thai population. Therefore, the objective of this study is to find the contamination of *S. aureus* and *E. coli* on Thai coins and banknotes. Coins and banknotes were collected randomly from market and sonicated to isolate bacterial cells from the surface. Bacterial suspensions were concentrated by centrifugation and subjected to genomic DNA isolation followed by PCR amplification using primer pair specific for SEA (Staphylococcal Enterotoxin A) gene. Aliquots of bacterial suspension were spreaded on NB agar to estimate the total bacterial cells number and cultivated on Mannitol Salt Agar (MSA) as well as Eosin Methylene Blue agar (EMB) in order to estimate the number of *S. aureus* and *E. coli*, respectively. The results revealed that PCR with specific primers for SEA failed to amplify SEA gene in a positive control strain *S. aureus* ATCC 13565. Cultivations of *S. aureus* ATCC 13565 and *E. coli* MSCU 0620 on MSA and EMB, respectively, showed the typical colony characteristics. The highest total bacterial cell count was on 1-baht coin 98.4 CFU/cm<sup>2</sup> surface areas. No *S. aureus* and *E. coli* could be found on MSA and EMB, respectively. Our preliminary results indicated that there are very low bacterial cells on coins and banknotes and no contamination of *S. aureus* and *E. coli* was found. Further experiments with more samples would be suggested for the statistically significance of the experiments.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาและข้อคิดเห็นในเรื่องต่าง ๆ อีกทั้งยังคอยดูแล เอาใจใส่ และเป็นกำลังใจ ตลอดจนอนุเคราะห์ในการปรับปรุงแก้ไขตรวจทานโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ และอาจารย์ ดร.สิริสา ณ ป้อมเพ็ชร สำหรับการอนุเคราะห์แบบคที่เรียสายพันธุ์ต่าง ๆ อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ สำหรับการอนุเคราะห์เครื่องมือที่สำคัญต่องานวิจัยฉบับนี้ และคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและให้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงานในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในงานวิจัย

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 1704/13 และสมาชิกชั้น 17 ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำโครงการนี้เสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ กลุ่ม we bare bear and Nom Nom และเพื่อน ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งนายภูมินทร์ สินธรา ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือรวมทั้งให้กำลังใจในการทำงานวิจัยและโครงการนี้เสมอมา

ขอขอบคุณคุณหวงอ้อป้อและคุณเขี้ยวจ้าน ที่เป็นแรงบัลดาลใจ แรงผลักดัน ทำให้เห็นถึงความเข้มแข็งอดทน ความตั้งใจ และเป็นแบบอย่างที่ดีในชีวิต

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุน ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

ธัญกร นิลสาข

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์การทดลองและเคมีภัณฑ์	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก ก	41
ภาคผนวก ข	43



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1.1	บทบาทของ Staphylococcal enterotoxins แต่ละชนิด	5
1.2	อัตราการตายประจำปีของผู้ป่วยจากโรคติดเชื้อในสหรัฐอเมริกา	7
1.3	สมบัติทางชีวเคมีและสัณฐานวิทยาของ <i>S.aureus</i> และ <i>Staphylococcus</i> สปีชีส์อื่น	8
1.4	ข้อกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 356 พ.ศ. 2556	10
1.5	ข้อกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 3470 พ.ศ. 2549	11
2.1	ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ SEA gene	16
2.2	ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ 16s rRNA gene	16
3.1	สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	17
4.1	พื้นที่ผิวของเหรียญและธนบัตรตัวอย่าง	28
4.2	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร NA จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตร	29
4.3	จำนวนโคโลนีของ <i>Staphylococcus aureus</i> บนอาหาร MSA จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตร	30
4.4	จำนวนโคโลนีของ <i>Escherichia coli</i> บนอาหาร EMB จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตร	31

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 อาการของโรค SSSS ในผู้ป่วยเด็กอายุ 4 ปี	3
4.1.1 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จาก PCR จากการหาความจำเพาะของไพรเมอร์	20
4.1.2 อะกาโรสเจลแสดงผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยโคลนินและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของเชื้อ	21
4.1.3 อะกาโรสเจลแสดงผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยโคลนินและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	22
4.1.4 อะกาโรสเจลแสดงผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยโคลนินของเชื้อ <i>S. aureus</i> ATCC 13565 และ <i>E. coli</i> MSCU 0260 เมื่อป่มในน้ำยาสกัดดีเอ็นเอที่เวลาต่างกัน	23
4.1.5 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จาก gradient PCR	24
4.1.6 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จาก PCR จากไพรเมอร์ 16s rRNA gene	25
4.2.1 ลักษณะของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA	26
4.2.2 ลักษณะของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร EMB agar	27

## บทที่ 1

### บทนำ

#### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นทรงกลมอยู่รวมกันคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ catalase สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 7 – 48 องศาเซลเซียส และตั้งแต่ช่วงความเป็นกรดต่าง 4 - 10 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 – 7 นอกจากนี้ยังทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 20 % (Wirtanen และ Salo, 2016) สามารถพบได้บนบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกของคนโดยเป็นเชื้อประจำถิ่นมากกว่าครึ่งในคนสุขภาพดี โดยเฉพาะในจมูกและคอ และในประชาชนบางกลุ่มอาจพบเชื้อชนิดนี้มากกว่า 80 % เช่น กลุ่มคนที่ประกอบอาชีพในสถานพยาบาล ผู้ที่ใช้เข็มฉีดยาเป็นประจำ ไม่ว่าจะเป็นผู้ป่วยที่ต้องอาศัยการรักษาหรือผู้ใช้สารเสพติดแบบฉีดเข้าเส้นเลือด รวมไปถึงผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งเชื้อสามารถแพร่จากคนสู่คนได้ผ่านการสัมผัสโดยตรงหรือการสัมผัสวัตถุสิ่งของต่าง ๆ (Taylor และ Unakul, 2020) อย่างไรก็ตาม *S. aureus* ยังเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในคนก่อให้เกิดการติดเชื้อได้อย่างหลากหลายรูปแบบ จากการติดเชื้อที่ได้มาจากทั้งชุมชน (community-acquired) และโรงพยาบาล (hospital-acquired) (Ricke และคณะ, 2012) ตั้งแต่การติดเชื้อไม่รุนแรง เช่น หนองฝีหัวเดียว (folliculitis) หรือฝีหลายหัว (furunculosis) ตามบริเวณผิวหนังบนร่างกาย ไปจนถึงก่อโรครุนแรง เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด ปอดอักเสบ กระดูกอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ รวมไปถึงเยื่อหูหัวใจอักเสบ (Gnanamani และคณะ, 2017; Taylor และ Unakul, 2020)

#### ปัจจัยในการก่อโรค

กลไกสำคัญของ *S. aureus* ในการก่อโรคที่หลากหลาย เกิดจากการผลิตโปรตีนบนผิวเซลล์ และการสร้าง virulence factor ที่เป็นเอนไซม์และโปรตีนซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์เจ้าบ้านหลายชนิด ได้แก่

## 1. โปรตีนบนผิวเซลล์ (surface protein)

โปรตีนบนผิวเซลล์ของ *S. aureus* เป็น microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) ประกอบไปด้วยโปรตีนบนผิวเซลล์ในกลุ่มใหญ่ที่สุด เช่น clumping factor, fibronectin binding protein, protein A และ collagen adhesin มีบทบาทในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อของเซลล์เจ้าบ้าน และหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน (Kong และคณะ, 2016)

## 2. เอนไซม์

*S. aureus* สามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น coagulase, proteases และ staphylokinase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ช่วยให้ *S. aureus* หลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันจากเซลล์เจ้าบ้าน ทั้งยังช่วยให้แทรกผ่านเนื้อเยื่อ รุนรานและทำลายเซลล์เจ้าบ้าน หรือรบกวนการส่งสัญญาณและวิถีเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เจ้าบ้าน (Kong และคณะ, 2016)

## 3. สารพิษ (toxin)

*S. aureus* สามารถสร้าง exotoxin ได้หลายชนิด สารพิษเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน ในการเจริญช่วงหลังของระยะ exponential โปรตีนเหล่านี้มีบทบาทในการแทรกผ่านเนื้อเยื่อ รุนรานและทำลายเซลล์เจ้าบ้าน แบ่งออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่

**3.1 Hemolysin และ Leukotoxin** เป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาว ตามลำดับ ประกอบด้วย

3.1.1  $\alpha$ -hemolysin สารพิษชนิดนี้เมื่อจับเข้ากับ proteinaceous receptor ADAM10 บนเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (ยกเว้น neutrophil) เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีการแลกเปลี่ยน  $Ca^{2+}$  และ  $K^+$  รบกวนการรักษาสมดุลภายในเซลล์ เกิดเซลล์เสียหายและแตกในที่สุด (Kong และคณะ, 2016)

3.1.2  $\beta$ -hemolysin หรือ sphingomyelinase ออกฤทธิ์ทำลาย sphingomyelin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ต่าง ทำให้เซลล์เกิดความไม่เสถียรทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว พบใน *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ (Kong และคณะ, 2016)

3.1.3  $\gamma$ -hemolysin ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์เม็ดเลือดของกระต่าย และเมื่อออกฤทธิ์ร่วมกับ leucocidin สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดขาว ทั้ง neutrophils, monocytes, granulocytes และ macrophages ทำให้เสียสมดุลของแรงดันออสโมติก เซลล์จึงเสียหาย บวม และแตกในที่สุด (Kong และคณะ, 2016)

3.1.4  $\delta$ -hemolysin หรือ phenol-soluble modulins (PSM) เป็นสายเปปไทด์ที่มีหน้าที่หลายอย่างในการก่อโรคของเชื้อสกุล *Staphylococcus* และ *S. aureus* หลายสายพันธุ์ ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์เม็ดเลือด และเนื้อเยื่ออื่น ๆ โดยไม่จำเป็นต้องอาศัย receptor ทั้งยังมีความสามารถในการจับกับส่วนของไขมันได้ดี (Kong และคณะ, 2016)

### 3.2 Staphylococcal exfoliative toxins (ETs)

exfoliative toxin มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ serine protease เป็นสาเหตุของโรค staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) มักเกิดกับเด็กแรกเกิด ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง และผู้มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เกิดการบวมที่ผิวหนัง เนื่องจากในเด็กยังไม่มีภูมิคุ้มกันต้านต่อสารพิษชนิดนี้ และไตไม่สามารถขับสารพิษได้อย่างสมบูรณ์ การออกฤทธิ์นั้นแตกต่างจากสารพิษอื่น ๆ ที่ *S. aureus* สร้างออกมา คือ มีเป้าหมายที่โปรตีน desmoglein 1 และเมื่อเข้าทำลายจะทำให้สูญเสียการยึดติดกันของเซลล์ผิวหนัง (Kong และคณะ, 2016; รัตนาวัลย์ นิตยารมย์, 2562) ภายใน 1- 2 วันหลังได้รับสารพิษ จะเกิดผื่นแดง พองเป็นตุ่มน้ำ (รูปที่ 1.1 ก) สูญเสียผิวหนังส่วนหน้ามีลักษณะคล้ายผิวถูกน้ำร้อนลวก จากนั้นจะแห้ง ตกสะเก็ด (รูปที่ 1.1 ข) (Haasnoot และ Vries, 2018)



[ก]



[ข]

รูปที่ 1.1 อาการของโรค SSSS ในผู้ป่วยเด็กอายุ 4 ปี [ก] ตุ่มน้ำบริเวณหน้าหลังแสดงอาการ 3 วัน, [ข] ผิวหนังตกสะเก็ดหลังรับการรักษา 7 วัน (Haasnoot และ Vries, 2018)

### 3.3 Staphylococcal enterotoxins (SEs) และ toxic-shock syndrome toxin-1 (TSST-1)

Staphylococcal enterotoxins (SEs) เป็นสาเหตุสำคัญที่พบบ่อยที่สุดในโรคที่เกิดจากอาหาร (food-borne disease) หรืออาหารเป็นพิษ เรียกว่า Staphylococcal food poisoning (SFP) มีสาเหตุจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน SEs โดยอาหารที่พบการปนเปื้อนบ่อย ได้แก่ เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก ไข่ไก่ นม ผลิตภัณฑ์จากนม อาหารที่มีส่วนผสมของนมหรือครีม รวมไปถึงอาหารที่มีเกลือสูง เช่น แยม เนื่องจากเชื้อมีความทนต่อความเข้มข้นเกลือสูง หรือมีค่า water activity ต่ำ ( $a_w = 0.86$ ) การปนเปื้อนเกิดจากการประกอบอาหารของผู้ประกอบอาหารเป็นพาหะของ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้าง enterotoxin จากทั้งใน จมูก สารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ มือ หรือ ผิวน้ำ รวมทั้งการเก็บรักษาวัตถุดิบหรืออาหารที่ไม่ได้มาตรฐาน ทำให้เชื้อสามารถเจริญและสร้างสารพิษชนิดนี้ออกมา (Argudin และคณะ, 2010) หากผู้บริโภครับประทานเข้าไปจะแสดงอาการภายใน 2-8 ชั่วโมง มีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องอย่างรุนแรง หรืออาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย (Langley และคณะ, 2015) เนื่องจากมีสมบัติเป็น enterotoxin ทนความร้อนสูงแม้ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาทีที่ยังคงรักษาสมบัติทางชีวภาพได้ (Yehia และคณะ, 2019) นอกจากนี้ยังทนกรดและเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น เปปซิน ทริปซิน เรนิน และปาเปอซิน (Pinchuk และคณะ, 2010) ดังนั้นการประกอบอาหารผ่านความร้อนสามารถทำลายเชื้อได้ แต่ไม่สามารถทำลายสารพิษที่เชื้อสร้างไว้ได้ เรียกสารพิษที่เชื้อสร้างไว้ว่า preformed toxin โดยกลไกในการก่อโรคของสารพิษชนิดนี้ยังไม่ทราบชัดเจน (Kong และคณะ, 2016)

ปัจจุบันพบ SEs มากกว่า 20 ชนิด จากลักษณะการเป็นแอนติเจนที่หลากหลาย มีสมบัติเป็น superantigen แม้ได้รับในเพียงนาโนกรัม-มิลลิกรัม จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองอย่างไม่จำเพาะ หลัง cytokine ในปริมาณมากกว่าปกติ สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการไข้ ความดันโลหิตต่ำ อวัยวะล้มเหลว และเสียชีวิตจากการช็อคได้ (Krakauer และ Stiles, 2013) สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ Staphylococcal enterotoxins (SEs) และ Staphylococcal enterotoxin-like toxins (SELTs) ที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ (Yehia และคณะ, 2019) ชนิดที่สำคัญและมีการศึกษาเชิงลึก คือ SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEF, SEG, SEH และ SEI ซึ่งมีบทบาทแตกต่างกัน คือ ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการอาหารเป็นพิษ ได้แก่ SEA, SEB, SED, SEE, SEG และ SEH โดย SEA เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการอาหารเป็นพิษจาก Staphylococcal มากที่สุด ส่วน SEB นอกจากจะเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการอาหารเป็นพิษ ยังมีการศึกษาถึงศักยภาพในการใช้เป็นอาวุธชีวภาพผ่านการสูดดม (Pinchuk และคณะ, 2010) นอกจากนี้ SEF ได้รับการเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น TSST-1 (toxic-shock syndrome toxin-1) มีบทบาท

ต่อการเกิดกลุ่มอาการ toxic shock ทำให้มีไข้สูงเฉียบพลัน ความดันโลหิตต่ำ ปวดหัวหรือกล้ามเนื้อ ชัก หรืออาจร้ายแรงถึงชีวิต (Kong และคณะ, 2016; Mayo clinic, 2020) (ตารางที่ 1.1)

**ตารางที่ 1.1** บทบาทของ Staphylococcal enterotoxins แต่ละชนิด (Pinchuk และคณะ, 2010)

Staphylococcal enterotoxin	บทบาทสำคัญ
SEA	เกี่ยวข้องกับ staphylococcal food poisoning มากที่สุด
SEB	ศึกษาในลักษณะของการเป็นอาวุธชีวภาพ
SEC	ส่วนมากแยกได้จากสัตว์
SED	อาหารเป็นพิษ
SEE	อาหารเป็นพิษ
SEF	เกี่ยวข้องกับ toxic shock syndrome
SEG	อาหารเป็นพิษ (บทบาทน้อย)
SEH	อาหารเป็นพิษ
SEI	อาหารเป็นพิษ (บทบาทน้อย)

ในเดือนมิถุนายน ค.ศ. 2000 ณ เมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษครั้งใหญ่จากการบริโภคนมคืนรูป (reconstituted milk) ที่ปนเปื้อน SEA ในปริมาณเพียง 80 นาโนกรัม โดยมีรายงานผู้ป่วยมากกว่า 10,000 คน นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบวัตถุดิบในการผลิต พบ SEH ในนมขาดมันเนยความเข้มข้น 10% w/v (skim milk solution) ดังนั้นจึงเป็นการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการได้รับ staphylococcal enterotoxins หลายชนิดพร้อมกัน (Ikeda และคณะ, 2005)

ในวันที่ 30 เดือน กรกฎาคม ค.ศ. 2012 ณ แผนกฉุกเฉิน ประจำหน่วยโรงพยาบาลทหาร ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รับผู้ป่วยฉุกเฉิน 13 คนที่มีอาการทางระบบทางเดินอาหารหลังจากรับประทานอาหารในงานเลี้ยงอาหารกลางวัน 2-3 ชั่วโมง คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสีย หน่วยงานป้องกันโรคติดต่อในประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and prevention: CDC) ได้วิเคราะห์สาเหตุ เริ่มจากตรวจสอบอาหาร “perlo” ซึ่งทำมาจากไก่ ไส้กรอก และข้าว ที่เป็นอาหารจานหลักในการเลี้ยงครั้งนั้น จากการตรวจสอบทาง

ห้องปฏิบัติการ ตรวจพบ staphylococcal enterotoxin A จึงยืนยันได้ว่าผู้ป่วยเกิดอาการอาหารเป็นพิษจากการได้รับ SEA ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อตรวจสอบขั้นตอนการเตรียมอาหาร พบว่า อาหารบางชนิดได้เตรียมไว้ล่วงหน้าก่อนวันจัดงาน 1-2 วัน โดยวัตถุดิบส่วนมากเป็นอาหารแช่แข็ง ละลายน้ำแข็งโดยการอุ่นร้อนด้วยไมโครเวฟเท่านั้น จากการปรุงอาหารไว้ล่วงหน้า มักใช้ความร้อนต่ำในการประกอบอาหาร ไม่ได้อุ่นร้อนอีกครั้งก่อนรับประทาน อีกทั้งผู้ประกอบการไม่ได้สวมถุงมือขณะประกอบอาหาร จึงเป็นสาเหตุของเหตุการณ์ครั้งนี้ (Centers for Disease Control and prevention , 2013)

ในวันที่ 1 เดือนตุลาคม ค.ศ. 2014 ณ ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เด็กนักเรียนและเจ้าหน้าที่จากโรงเรียนประจำสวิส (Swiss boarding school) ได้รับความทุกข์ทรมาน “Tomme” เป็นชีสอ่อนชนิดหนึ่ง ทำจากนํ้านมวัวดิบ หลังจากนั้น 7 ชั่วโมง มี 14 คนเกิดอาการอาหารเป็นพิษ เป็นเด็กนักเรียน 10 คนและเจ้าหน้าที่ 4 คน เวลาในการแสดงอาการขึ้นกับอายุผู้ป่วย คือ เด็กอายุต่ำกว่า 10 ปี ใช้เวลาแสดงอาการใน 2 ชั่วโมง 30 นาที เด็กโตถึงช่วงวัยรุ่นแสดงอาการใน 3 ชั่วโมง 30 นาที และผู้ใหญ่แสดงอาการใน 7 ชั่วโมงหลังการรับประทาน จากการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารพบ staphylococcal enterotoxin A ในปริมาณต่ำ คือ มากกว่า 6 นาโนกรัมต่อชีส 1 กรัม และ staphylococcal enterotoxin D ในปริมาณสูง คือ มากกว่า 200 นาโนกรัมต่อชีส 1 กรัม ดังนั้นชีส Tomme จึงเป็นแหล่งของการระบาดครั้งนี้ (Johler และคณะ, 2015)

ในช่วงฤดูร้อน ค.ศ. 2017 เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ ณ ประเทศอิตาลี ในกลุ่มคนทำงานก่อสร้างหลังเกิดแผ่นดินไหว 26 คน หลังรับประทานอาหารกลางวันที่ยูนิยอาหาร โดย 23 คนเกิดอาการทางระบบทางเดินอาหารและเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล คาดว่าเกิดจากการรับประทานสลัดพาสต้า จากการตรวจสอบและวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารและผู้ประกอบอาหาร พบ staphylococcal enterotoxin A ในปริมาณ 0.033 ng ต่อสลัดพาสต้า 1 กรัม และพบ staphylococcal enterotoxin D ในปริมาณ 0.052 ng ต่อสลัดพาสต้า 1 กรัม นอกจากนี้ยังแยกเชื้อ *S. aureus* ได้ 23 สายพันธุ์ที่มียีนสร้าง staphylococcal enterotoxin ชนิดเดียวหรือหลายชนิดพร้อมกัน ทั้ง SEA, SED, SEJ และ SER ดังนั้นสลัดพาสต้าจึงเป็นแหล่งของการระบาดครั้งนี้ และการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการได้รับ staphylococcal enterotoxins หลายชนิดพร้อมกัน (Guidi และคณะ, 2018)



## การรักษาและการต้านยาของ *Staphylococcus aureus*

การรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* ในปี ค.ศ. 1941 ใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบต้า แลคแตม ( $\beta$ -lactam) คือ penicillin G ต่อมาพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ penicillinase จึงเกิดการต้านต่อยาชนิดนี้ขึ้น จึงได้พัฒนายาปฏิชีวนะในการรักษาต่อเชื้อต้านยานี้ คือ methicillin หลังจากใช้ยาชนิดนี้ไม่นาน พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านต่อยาชนิดนี้ นั่นคือ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และมีแนวโน้มที่จะต้านต่อยาชนิดอื่นมากขึ้น เช่น สายพันธุ์ที่ต้านต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant *S. aureus*: VRSA) เป็นต้น ทั้งยังมีข้อจำกัดในการพัฒนายาปฏิชีวนะ จึงเป็นความท้าทายต่อการรักษาโรคติดเชื้อสายพันธุ์นี้ (Gnanamani และคณะ, 2017; Kane และคณะ, 2018) มีรายงานว่าอัตราการติดเชื้อ MRSA และอัตราการตายของผู้ป่วยชาวอเมริกันสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคเอดส์ วัณโรค ไวรัสตับอักเสบบี ซาร์ส และไข้หวัดนก (Boucher และ Corey, 2008) (ตารางที่ 1.2)

**ตารางที่ 1.2** อัตราการตายประจำปีของผู้ป่วยจากโรคติดเชื้อในสหรัฐอเมริกา (Boucher และ Corey, 2008)

โรคติดเชื้อ	จำนวนผู้เสียชีวิต (โดยประมาณ)	ปี (ค.ศ.)
การติดเชื้อ MRSA	19,000*	2005
เอดส์	15,798	2004
วัณโรค	662	2004
ไวรัสตับอักเสบบี	5793	2002
ซาร์ส	0	ทุกปี
ไข้หวัดนก	0	ทุกปี

\* คือ จำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตในโรงพยาบาล

ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาในระดับประชากร มีเพียงการศึกษาภายในโรงพยาบาลเท่านั้น พบว่าสาเหตุการติดเชื้อในกระแสเลือดอันดับที่ 3 คือ *S. aureus* พบมากในผู้ป่วยเด็กเล็ก และผู้สูงอายุ มีอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 26 จากการติดเชื้อแบบลุกลาม โดยปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเสียชีวิต ได้แก่ ผู้ป่วยสูงอายุ ทารกคลอดก่อนกำหนด ผู้ป่วยเรื้อรัง การติดเชื้อ MRSA และการได้รับการรักษาที่ช้าเกินไป (ปิยรัชต์ สัตตะรัตติวงศ์, 2554)

## วิธีตรวจหาและระบุชนิดของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

### 1. การเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงและทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test)

วิธีที่นิยมใช้ระบุชนิดเชื้อทางคลินิก ในปัจจุบันวิธีนี้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการในการระบุชนิดของเชื้อเบื้องต้น อาศัยความสามารถในการใช้แหล่งอาหาร การผลิตเอนไซม์ ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่มีลักษณะเฉพาะตัวในเชื้อแต่ละชนิด การระบุเชื้อ *Staphylococcus aureus* เบื้องต้นเริ่มจากนำตัวอย่างมาเลี้ยงบนอาหาร mannitol salt agar (MSA) เพื่อทดสอบการหมักน้ำตาลแมนนิทอลในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง จะเกิดโซนสีเหลืองล้อมรอบโคโลนีสีเหลือง ภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบ DNase โดยเลี้ยงบนอาหาร DNase agar จะเกิด clear zone รอบโคโลนีเมื่อหยด 1N HCl และยืนยันผลด้วยการทดสอบ bound และ free coagulase ด้วยพลาสมาโดยจะเกิดก้อน clump บนแผ่นสไลด์และ clot ในหลอดทดลองตามลำดับ (Kateete และคณะ, 2010)

### ตารางที่ 1.3 สมบัติทางชีวเคมีและสัณฐานวิทยาของ *S. aureus* และ *Staphylococcus* สปีชีส์อื่น

(Al-Khafaji และ คณะ, 2013)

biochemical test	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. chromogenes</i>
Gram stain	+	+	+
Coagulase & clumping factor	+	-	-
catalase	+	+	+
oxidase	-	-	-
DNase	+	-	-
Growth on high salt media	+	+	+
Mannitol fermentation	+	-	-
Staphyloxanthin production	+	+	-
Nitrate reduction	+	+	+
motility	-	-	-

## 2. molecular method

การใช้วิธีทาง molecular biology เช่น polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA replication เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์ ที่จำเพาะต่อยีนที่สนใจได้ในเวลาอันสั้นและดีเอ็นเอสายใหม่จำนวนมาก จึงนำมาใช้ตรวจหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับ SEs พบรายงานการใช้วิธี PCR ครั้งแรก โดย Wilson และคณะในปี 1991 โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 ชุดที่จำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนยีน SEB และ SEC ได้สำเร็จ หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาวิธี PCR ในการตรวจหา SEs เช่น multiplex PCR real-time PCR reverse transcription PCR รวมไปถึง loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนามาเพื่อลดข้อจำกัดของวิธี PCR ในเรื่องของอุปกรณ์ เครื่องมือ เวลา และสถานที่ที่มีข้อจำกัด จึงเหมาะกับการใช้การภาคสนาม (Suwanampai และคณะ, 2011; Wu และคณะ, 2016)

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วยเพอริทริคัสแฟลเจลลลา (peritrichous flagella) ส่วนสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นไม่ก่อโรค นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคในคน เช่น enterohemorrhagic (EHEC), enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC) และ enteroinvasive (EIEC) จะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) จากการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังมีบางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการท้องเสีย ถ่ายเป็นเลือด ลำไส้อักเสบเฉียบพลัน (acute enteritis) เป็นต้น มักเกิดในกลุ่มนักท่องเที่ยวหรือเด็กในพื้นที่ด้อยพัฒนา จากการปนเปื้อนของอาหารหรือน้ำดื่ม (Percival และคณะ, 2014; กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557)

การใช้โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria) ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ไม่ก่อโรค พบมากได้ในลำไส้ และอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่น เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะจากการปนเปื้อนของอุจจาระในอาหาร น้ำ และสิ่งแวดล้อม มาตรฐานบ่งชี้ในปัจจุบันให้ความสำคัญกับ *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียหนึ่งในกลุ่มโคลิฟอร์ม สามารถอยู่รอดในน้ำได้นาน และมีหลักฐานที่ตรวจพบ *E. coli* ในแหล่งน้ำดื่มอย่างแน่ชัดว่ามาจากการปนเปื้อนอุจจาระ หากการปนเปื้อนตรวจพบเชื้ออื่นในกลุ่มโคลิฟอร์ม แต่ไม่พบ *E. coli* นั้นอาจเกิดจากพืช ดิน หรืออาจใช้เป็นสัญญาณเตือนในระวาง

การปนเปื้อนจากสิ่งอันตรายอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังฝนตกหลัง (Brandt และคณะ, 2017) ดังนั้นการตรวจพบ *E. coli* จึงอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระได้ ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าอาหารและน้ำดื่มผลิตได้อย่างถูกสุขลักษณะหรือไม่

### คุณภาพทางจุลชีววิทยาของมาตรฐานน้ำบริโภค

ข้อกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของมาตรฐานน้ำบริโภคประเทศไทยมีมาตรฐานหลัก เรื่องน้ำบริโภคอยู่ 2 มาตรฐาน คือ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุข และสำนักงานมาตรฐาน ผลิตภัณฑ้อุตสาหกรรม (สมอ.) กระทรวงอุตสาหกรรม (สุพรรณิ เทพอรุณรัตน์, 2547) ซึ่งมีรายละเอียดแตกต่างกันดังนี้

1. มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 356 พ.ศ. 2556 เรื่องเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (สำนักสุขภาพอาหารและน้ำ, 2560) ได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยา ดังตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 ข้อกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 356 พ.ศ. 2556

ด้านชีวภาพ		
พารามิเตอร์	หน่วยวัด	ค่าที่กำหนด
โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	MPN/100 ml	< 1.1
<i>E. coli</i>	MPN/100 ml	< 1.1
จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค		
<i>Salmonella</i> spp.	100 ml	ไม่พบ
<i>Clostridium perfringens</i>	100 ml	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 ml	ไม่พบ

ที่มา : ดัดแปลงจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 356 พ.ศ. 2556

2. มาตรฐานตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 3470 พ.ศ. 2549 ได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยา (ศูนย์ห้องปฏิบัติการกรมอนามัย, 2558) ดังตารางที่ 1.5

**ตารางที่ 1.5** ข้อกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 3470 พ.ศ. 2549

ด้านชีวภาพ		
พารามิเตอร์	หน่วยวัด	ค่าที่กำหนด
โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	MPN/100 ml	< 1.1
<i>E. coli</i>	-	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp.	-	ไม่พบ
<i>Clostridium perfringens</i>	-	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	ไม่พบ

ที่มา : ดัดแปลงจากประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 3470 พ.ศ. 2549

### เหรียญและธนบัตรในประเทศไทย

ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ธนบัตรและเหรียญกษาปณ์หลายราคาในระบบเศรษฐกิจ เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการใช้ในปัจจุบัน และส่งเสริมการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศ (กรมธนารักษ์, 2561)

จากบทความปริทัศน์ของ Angelakis และคณะ (2014) เรื่องปัจจัยสำคัญในการแพร่กระจายของโรคจากธนบัตรและเหรียญจากงานวิจัยต่าง ๆ รายงานว่าพบการปนเปื้อนแบคทีเรียที่หลายหลายในเงินแต่ละประเทศ โดยแบคทีเรียที่พบมาก คือ *E. coli* และ *S. aureus* จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรที่เก็บจากร้านอาหารและบริเวณโรงพยาบาล ทั้งนี้ยังพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอื่น ๆ ในสัดส่วนแตกต่างกัน ดังนั้นบทวิจารณ์งานวิจัยสรุปว่าเหรียญและธนบัตรเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ในเดือนกุมภาพันธ์ และเดือนมิถุนายน ค.ศ. 2013 Maritz และคณะได้เก็บตัวอย่างธนบัตรมูลค่า 1 ดอลลาร์สหรัฐที่หมุนเวียนในรัฐนิวยอร์ก สหรัฐอเมริกา เพื่อศึกษาเมตาจีโนมิกของจุลินทรีย์บนธนบัตร รายงานว่าพบทั้งดีเอ็นเอของมนุษย์ เซลล์ยูคาริโอต แบคทีเรีย และไวรัส ตามลำดับ ซึ่งสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบคิดเป็น 29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมากเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนังและช่องปากของมนุษย์ โดยตัวอย่างที่เก็บในฤดูร้อน เดือนมิถุนายนพบสัดส่วนแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์มากกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว เดือนกุมภาพันธ์ แสดงให้เห็นถึง

ความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบนธนบัตรในแต่ละฤดูกาล ใช้เป็นตัวประเมินและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคผ่านเงินที่หมุนเวียนในระบบเศรษฐกิจ ยิ่งไปกว่านั้นมนุษย์มีส่วนช่วยให้เกิดความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมากยิ่งขึ้น จากความถี่ที่ใช้เงินนั้นในการแลกเปลี่ยน ซื้อขาย ร้านอาหาร หรือการเดินทาง (Maritz และคณะ, 2017)

จากการศึกษาเมตาจีโนมิกและรีซิสโตม (resistome) ของประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างธนบัตรฮ่องกงที่เก็บจากโรงพยาบาลและสถานีรถไฟของ Heshiki และคณะ (2017) พบความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียสูงบนตัวอย่างธนบัตร ทั้งยังพบแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ที่มียีนต้านต่อยาปฏิชีวนะสูงเป็น 5 เท่าเมื่อเทียบกับประชากรแบคทีเรียที่วิเคราะห์จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินตะกอนทะเล น้ำทะเล เป็นต้น แสดงให้เห็นถึงมนุษย์มีส่วนช่วยให้เกิดความหลากหลายและแพร่กระจายกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะจากอัตราการใช้เงินหมุนเวียนในระบบเศรษฐกิจ (Heshiki และคณะ, 2017)

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคในมนุษย์จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรจากเงินบริจาคในโบสถ์ ประเทศแอฟริกาใต้ของ Abia และ Ubonba-Jaswa (2019) พบ *E. coli* บนตัวอย่างเหรียญและธนบัตร 76 ตัวอย่าง คิดเป็น 39.6 เปอร์เซ็นต์ โดยพบมากที่สุดที่ธนบัตรมูลค่า 10 แรนด์ ทั้งนี้จาก Sanger sequencing พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 3 สกุล คือ *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Corynebacterium* และเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ 2 สกุล คือ *Clavispora* และ *Rhodotorula* แสดงให้เห็นว่าเหรียญและธนบัตรเป็นสื่อกลางในการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคที่สามารถแพร่กระจายประชากรได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งธนบัตรที่มีรอยพับ (Abia และ Ubonba-Jaswa, 2019)

ด้วยเหตุนี้ในงานวิจัยนี้จึงสนใจตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ผลิต enterotoxins A และ *E. coli* จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective media และการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ SEA gene เนื่องจากเหรียญและธนบัตรเป็นสิ่งที่ทุกคนสัมผัสบ่อยครั้งในแต่ละวัน ไม่ทราบถึงที่มาที่ไปของเหรียญและธนบัตรที่ได้รับมา ทั้งยังเป็นสิ่งที่ไม่ได้รับการทำความสะอาดหรือผ่านความร้อนและมีการหมุนเวียนใช้หลายปีก่อนนำไปทำลาย

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรด้วยการเลี้ยงบนอาหาร selective media

2. ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* Enterotoxin A จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรด้วยวิธี PCR ที่มีไพรเมอร์จำเพาะต่อ SEA gene

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงการปนเปื้อนของ *S. aureus* enterotoxin A และ *E. coli* บนเหรียญและธนบัตรไทย

## บทที่ 2

### อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

#### อุปกรณ์ในการทดลอง

1. กระจกบอกตวง (graduated cylinder) ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร บริษัท Witeg, Germany
2. ขวดดูแรน ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท SCHOTT, Germany
3. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น Sonorex super RK 100 บริษัท Banderlin Electronic, Germany
4. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo block) รุ่น Mylab™ Thermo-Block SLTDB-120 บริษัท SeoulBioScience, South Korea.
5. เครื่องชั่ง รุ่น ME 3002 ของบริษัท METTLER-TOLEDO, Switzerland
6. เครื่องทำน้ำปลอดประจุ (ultra-pure water) รุ่น Maxima บริษัท Alga, UK
7. เครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) รุ่น Mupid-2plus system บริษัท Takara Bio, USA
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-315 บริษัท TOMY Digital Biology, Japan และ รุ่น HV-25 ของบริษัท HIRAYAMA Manufacturing, Japan
9. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
10. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) รุ่น T100 บริษัท Bio-Rad, USA
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S20 SevenEasy ของบริษัท METTLER-TOLEDO, Switzerland
12. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Force 1418 บริษัท Micro force, USA
13. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) บริษัท Greiner Bio-One (Thailand)
14. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow) รุ่น LV1250 ของบริษัท Official Equipment Manufacturing, Thailand
15. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SF-PC697 ของบริษัท Panasonic, Thailand
16. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น ULE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
17. ทิป (tip) ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร บริษัท Bio Science, Inc., USA



18. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 10, 100 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
19. หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, USA
20. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, USA
21. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
  - Gel Doc™ XR+ Gel Documentation บริษัท Bio-Rad, USA
  - โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 บริษัท Bio-Rad, USA

### เคมีภัณฑ์

1. กรดอะซิติกเข้มข้น (acetic acid); ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) บริษัท Merck, Germany
2. กรดเอทิลีนไดเอมีนทetraอะซิติก (EDTA disodium salt); ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$ ) บริษัท Merck, Germany
3. กลีเซอรอล (glycerol); ( $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$ ) บริษัท Merck, Germany
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
5. ผงวุ้น (agar)
6. ผงอาหารไวรัส (agarose powder) บริษัท Lonza Rockland, USA
7. สารสกัดดีเอ็นเอ (DNAzol® Direct) บริษัท Molecular Research Center, USA
8. DNA loading dye บริษัท New England Biolabs, USA
9. เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide); ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ ) บริษัท Bio-Rad, USA
10. 100 bp DNA ladder บริษัท New England Biolabs, USA
11. dNTPs บริษัท biotechrabbit, Germany
12. Trizma base (Tris [hydroxymethyl] aminomethane), ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) บริษัท Sigma, USA
13. Taq DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA

## โอลิโกนิวคลีโอไทด์

1. ไพรเมอร์ (primer) สำหรับ SEA gene สั่งเคราะห์โดยบริษัท Integrated DNA Technologies, USA

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ SEA gene (Suwanampai และคณะ, 2011)

Primer	Sequence (5' – 3')
SEA-1F	TTGGAAACGGTTAAAACGAA
SEA-2R	GAACCTTCCCATCAAAAACA

2. ไพรเมอร์ (primer) สำหรับ 16s rRNA gene สั่งเคราะห์โดยบริษัท Biodesign, Thailand

ตารางที่ 2.2 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ 16s rRNA gene (Freddriksson และคณะ, 2013)

Primer	Sequence (5' – 3')
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	TACGGHTACCTTGTTACGACTT

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการทดลอง

#### 3.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้

แบคทีเรียที่ใช้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งที่มา
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565	รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6535	คลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Staphylococcus aureus</i> MSCU 0270	คลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Bacillus subtilis</i> MSCU 0271	คลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSCU 0359	
<i>Escherichia coli</i> MSCU 0260	
<i>Enterobacter aerogenes</i> MSCU 0260	

#### 3.2 การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างเหรียญและธนบัตร

เก็บตัวอย่างจากเหรียญจากท้องตลาดทั่วไปทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่เหรียญ 25 สตางค์ 50 สตางค์ 1 บาท 2 บาท 5 บาท และ 10 บาท และธนบัตรทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ธนบัตร 20 บาท, 50 บาท, 100 บาท, 500 บาท และ 1,000 บาท โดยนำเหรียญชนิดละ 50 เหรียญ และธนบัตรชนิดละ 10 ฉบับ นำมา sonicate ภายในเครื่อง Bandelin SONOREX™ SUPER without heating Ultrasonic baths (Bandelin, Germany) ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 10 ml เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แวนล่อยตะกอนเซลล์ในสารละลาย 0.85% NaCl จำนวน 0.5 ml แบ่ง 0.2 ml เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อและอีก 0.3 ml นำไปสกัด DNA เพื่อในการทำ PCR ในลำดับต่อไป

### 3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงแบคทีเรียและตัวอย่างจากเหริยญและธนบ้ตรในอาหาร nutrient agar บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ และตัวอย่าง DNA ที่ได้จากตัวอย่างเหริยญและธนบ้ตร ใช้ DNAzol® Direct ตามขั้นตอนของบริษัท (Molecular Research Center, USA) นำเซลล์แบคทีเรียปริมาณ 1-10 mg หรือ 1-10 µl ผสมลงในสารละลาย DNAzol® Direct ปริมาตร 100 µL แบคทีเรียแกรมลบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที และแบคทีเรียแกรมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex และนำสารละลายนี้ปริมาตร 2-5 µL ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR ต่อไป

### 3.4 การตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.4.1 การตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

นำเซลล์จากข้อ 3.2 ของตัวอย่างเหริยญและธนบ้ตรแต่ละชนิดมา 50 µL กระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีรายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Unit (CFU) ต่อ 1 เหริยญหรือธนบ้ตร และ CFU ต่อพื้นที่ผิวของเหริยญและธนบ้ตร (ตารางเซนติเมตร)

#### 3.4.2 การแยกแบคทีเรียที่ต้องการบน selective medium

##### 3.4.2.1 *Staphylococcus aureus*

นำเซลล์จากข้อ 3.2 ของตัวอย่างเหริยญและธนบ้ตรแต่ละชนิดมา 50 µL กระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol salt agar (MSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เกิดโซนสีเหลืองล้อมรอบโคโลนีสีเหลือง รายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Unit (CFU) ต่อ 1 เหริยญหรือธนบ้ตร และ CFU ต่อพื้นที่ผิวของเหริยญและธนบ้ตร (ตารางเซนติเมตร)

##### *Escherichia coli*

นำเซลล์จากข้อ 3.2 ของตัวอย่างเหริยญและธนบ้ตรแต่ละชนิดมา 50 µL กระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue (EMB) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เกิด metallic sheen สีเขียว รายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Unit (CFU) ต่อ 1 เหริยญหรือธนบ้ตร และ CFU ต่อพื้นที่ผิวของเหริยญและธนบ้ตร (ตารางเซนติเมตร)

### 3.5 การตรวจหา *S. aureus* enterotoxin A ด้วยวิธี PCR

PCR reaction mix ปริมาตร 25  $\mu$ l มีองค์ประกอบ ดังนี้ Tris-HCl (pH 7.4) 10 mM, KCl 10 mM, dNTP 0.2 mM, *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, England) 0.625 U, primer ชนิดละ 0.2  $\mu$ M และ DNA template 1 ng – 1  $\mu$ g จากนั้นปรับปริมาตรด้วย ultrapure H<sub>2</sub>O จนเป็น 25  $\mu$ l ใช้อุณหภูมิและเวลาในช่วงต่าง ๆ ดังนี้

- Initial denaturation: 94 องศาเซลเซียส, 2 นาที
- Denaturation: 94 องศาเซลเซียส, 30 วินาที
- Primer annealing: 50 องศาเซลเซียส, 30 วินาที
- Extension: 68 องศาเซลเซียส, 30 วินาที
- Final extension: 68 องศาเซลเซียส, 5 นาที

ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ ภายในเครื่อง T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)

โดยมี *S. aureus* ATCC25923 เป็น positive control เนื่องจากมี SEA gene และ negative control คือ ไม่เติม DNA จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอขนาด 120 bp ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ด้วยเครื่อง Mupid-2plus system (Takara Bio Inc, USA) โดยใช้ 2% agarose gel เป็นเวลา 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide (Bio-Rad, USA) และถ่ายภาพเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Doc™ XR+ Gel Documentation (Bio-Rad, USA)

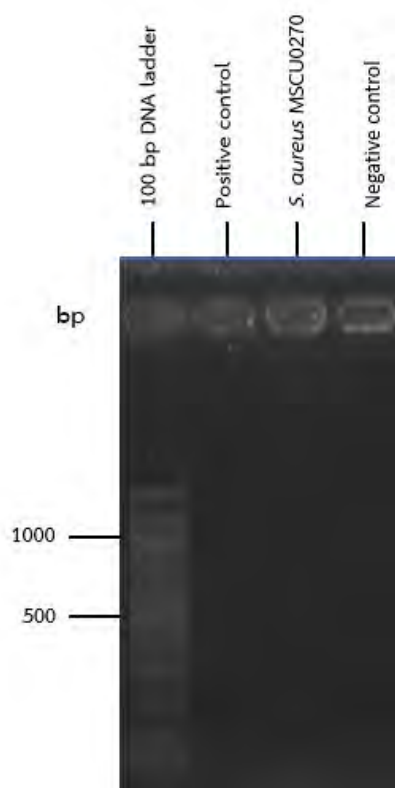
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

#### 4.1. การตรวจหา *Staphylococcal enterotoxin A* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

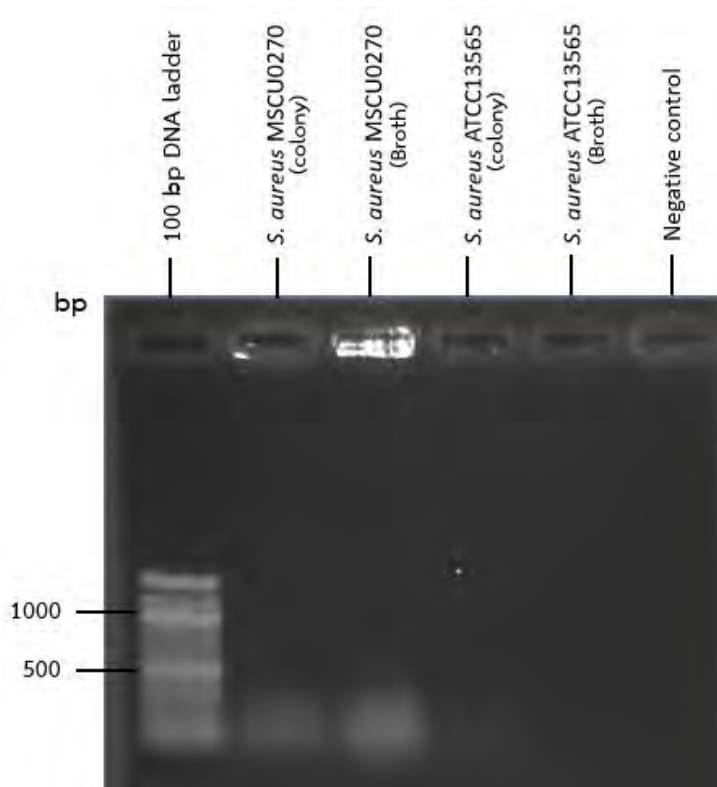
##### การหาความจำเพาะของไพรเมอร์

การหาความจำเพาะของ forward primer คือ SEA-1F และ reverse primer คือ SEA-2R (Suwanampai และคณะ, 2011) ต่อ SEA gene ใน *Staphylococcus aureus* โดยใช้ *S. aureus* ATCC 13565 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) โดยทดสอบความจำเพาะเทียบกับ *S. aureus* MSCU 0270 และน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) จากการตรวจสอบผล PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ คือแถบขนาด 120 bp แสดงดังรูปที่ 4.1.1



รูปที่ 4.1 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จาก PCR จากการหาความจำเพาะของไพรเมอร์

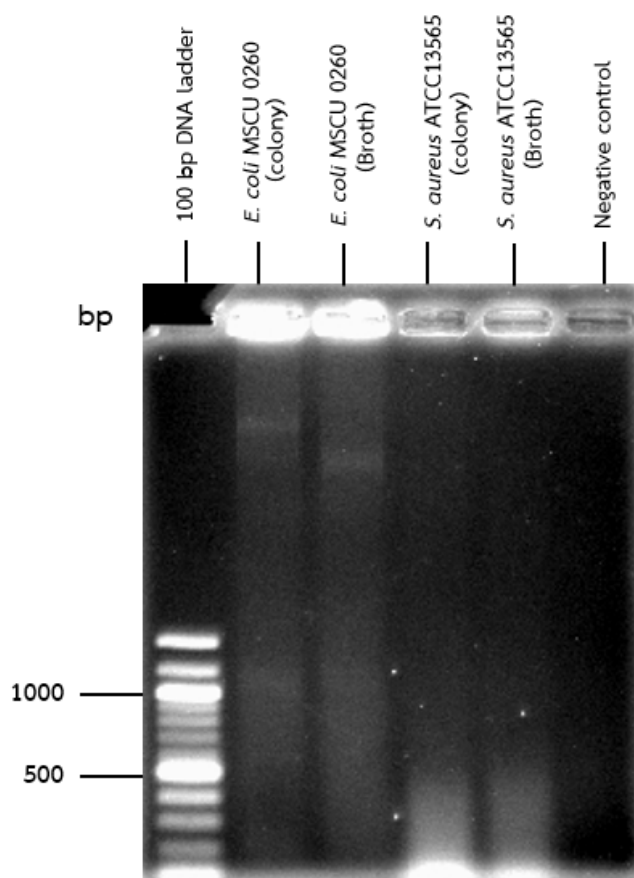
จากผลข้างต้นจึงเกิดข้อสงสัยถึงสาเหตุของการไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ โดยตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแบบที่เร็ว เนื่องจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNAzol® Direct ตามวิธีของบริษัท Molecular Research Center, USA ระบุไว้ว่าสามารถใช้ตัวอย่างแบคทีเรียได้ทั้งตัวอย่างของแข็งหรือของเหลว ดังนั้นจึงทดลองสกัดดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 13565 และ *S. aureus* MSCU 0270 แบบใช้โคลนินของเชื้อและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ และคาดว่าจะแสดงแถบดีเอ็นเออยู่เหนือ DNA ladder ภาพจากอะกาโรสเจล ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจากทั้งการสกัดดีเอ็นเอด้วยโคลนินและเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว DNA แสดงดังรูปที่ 4.1.2 ดังนั้นการใช้เซลล์จากโคลนินหรือจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไม่มีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอ



รูปที่ 4.1.2 อะกาโรสเจลแสดงผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยโคลนินและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของเชื้อ

จากผลข้างต้น จึงได้ตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของน้ำยา ดังนั้นจึงทดลองสกัดดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 13565 เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวก และ *E. coli* MSCU 0260 เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ โดยสกัดดีเอ็นเอด้วยโคลนินและเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามวิธีของบริษัท Molecular Research

Center, USA โดยผสม DNAzol® Direct กับแบคทีเรียแกรมลบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที และแบคทีเรียแกรมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อยืนยันสมมติฐาน และนำปอดประจุปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ภาพจากอะกาโรสเจล พบแถบที่คาดว่าอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอของ *E. coli* MSCU 0260 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากทั้งการสกัดดีเอ็นเอด้วยโคลีนีและเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของ *S. aureus* ATCC 13565 แสดงดังรูปที่ 4.1.3

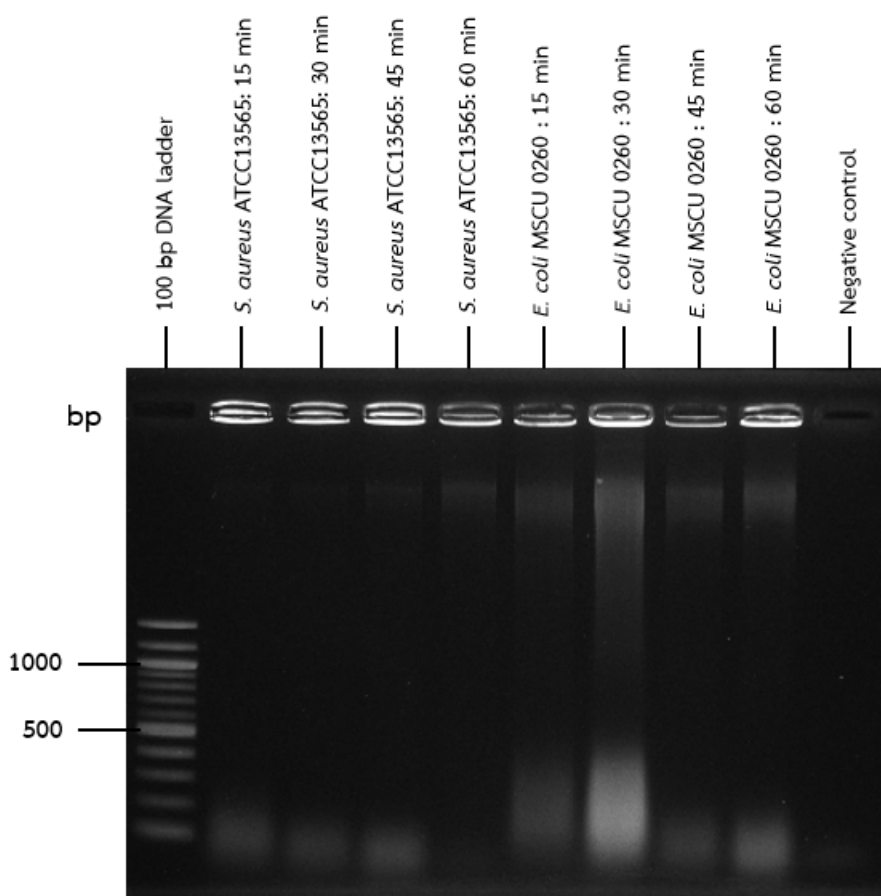


**รูปที่ 4.1.3** อะกาโรสเจลแสดงผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยโคลีนีและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของเชื้อ *E. coli* MSCU 0260 และ *S. aureus* ATCC 13565

จากการพบแถบที่คาดว่าอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอของ *E. coli* MSCU 0260 ข้างต้น จึงทดลองปรับเวลาในการบ่มเชื้อกับสารสกัดดีเอ็นเอ ให้ *S. aureus* ATCC 13565 เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวก และ *E. coli* MSCU 0260 เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ สกัดดีเอ็นเอด้วยโคลีนีจากเชื้อ โดยผสม DNAzol® Direct กับแบคทีเรีย



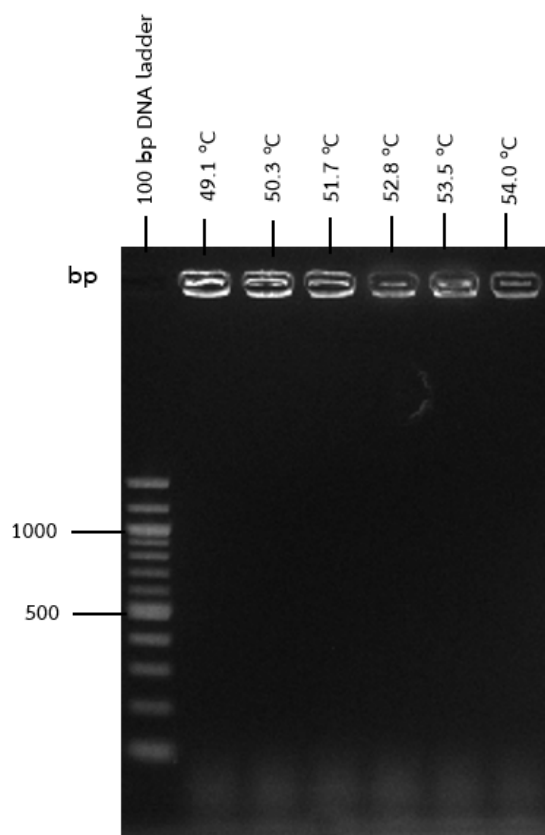
แกรมลบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที และแบคทีเรียแกรมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ และใช้น้ำปลอดประจุ ปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ภาพจากอะกาโรส พบแถบที่คาดว่าอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 13565 เมื่อ บ่มเป็นเวลา 60 นาทีกับสารสกัดดีเอ็นเอ และแถบที่คาดว่าอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอของ *E. coli* MSCU 0260 ใน ทุกเวลาการบ่ม แสดงดังรูปที่ 4.1.4



รูปที่ 4.1.4 อะกาโรสเจลแสดงผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยโคลนิจของเชื้อ *S. aureus* ATCC 13565 และ *E. coli* MSCU 0260 เมื่อบ่มในน้ำยาสกัดดีเอ็นเอที่เวลาต่างกัน คือ 15, 30, 45 และ 60 นาที

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ของ *S. aureus* ATCC 13565 ที่เวลา 60 นาที นำมาทำ gradient PCR เพื่อหาความจำเพาะและอุณหภูมิในขั้น annealing ที่เหมาะสมของ forward primer คือ SEA-1F และ reverse primer คือ SEA-2R ต่อยีน staphylococcal enterotoxin A (SEA gene) โดยมีช่วงอุณหภูมิในขั้น annealing ดังนี้ 49.1,

50.3, 51.7, 52.8, 53.5 และ 54 องศาเซลเซียส จากการตรวจสอบผล gradient PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 120 bp จาก *S. aureus* ATCC 13565 แสดงดังรูปที่ 4.1.5

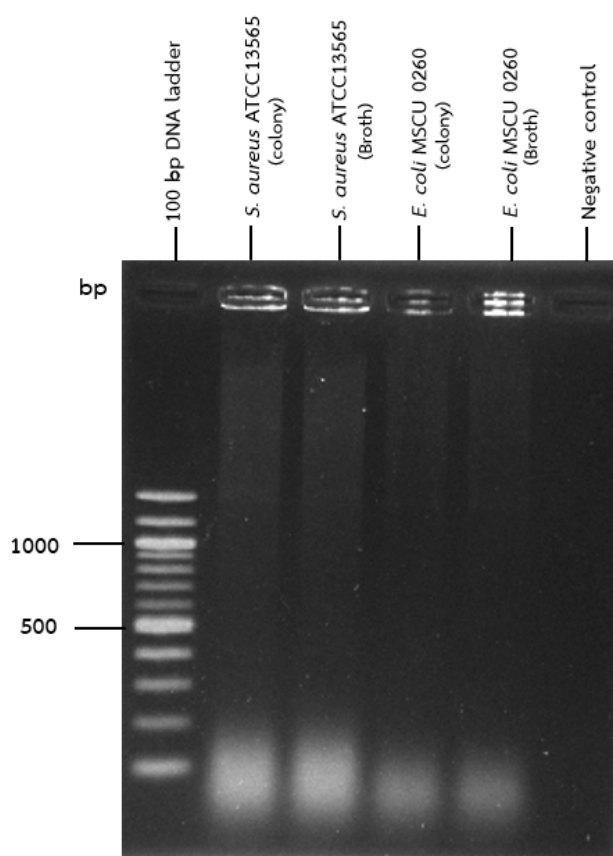


**รูปที่ 4.1.5** อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จาก gradient PCR จากการหาความจำเพาะและอุณหภูมิในขั้น annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ต่อ SEA gene ของ *S. aureus* ATCC 13565

จากผลข้างต้นจึงตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ที่เสื่อมประสิทธิภาพ จึงทดสอบการทำงานของ *Taq* DNA polymerase โดยทำ PCR กับ forward primer คือ 27F และ reverse primer คือ 1492R ของ 16s rRNA gene ดังตาราง 4.1 โดยใช้สภาวะในปฏิกิริยา PCR ตามวิธีของ Fredriksson และคณะ (2013) กับดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 13565 และ *E. coli* MSCU 0260 ด้วยโคลนีและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่สกัดได้จาก DNAzol® Direct ขวดใหม่ โดยคาดว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้งสองเชื้อจะแสดงแถบดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล เนื่องจากเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด มีความแปรผันทางวิวัฒนาการต่ำ มี

ความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง ทั้งยังมีขนาดที่เหมาะสมคือประมาณ 1500 bp จึงใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกแบคทีเรียได้ (Srinivasan และคณะ, 2015)

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ จากทั้ง *S. aureus* ATCC 13565 และ *E. coli* MSCU 0260 ดังรูปที่ 4.1.6 แสดงว่า *Taq* DNA polymerase ที่ใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้ทั้งหมดอาจไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงไม่สามารถหาความจำเพาะของ forward primer คือ SEA-1F และ reverse primer คือ SEA-2R ต่อ SEA gene ใน *S. aureus* ได้ และสืบเนื่องจากเหตุการณ์การระบาดของ COVID-19 จึงไม่ได้ทำการทดลองในส่วนนี้ต่อ

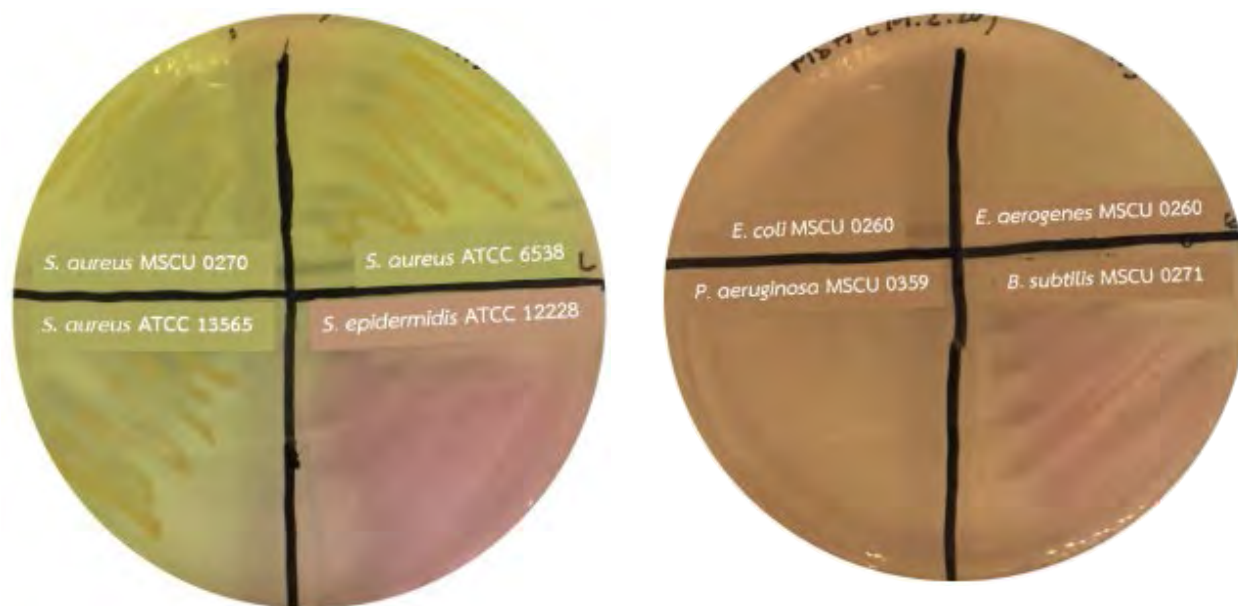


รูปที่ 4.1.6 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จาก PCR จากไพรเมอร์ 16s rRNA gene

## 4.2 การคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 4.2.1 ลักษณะโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียชนิดอื่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol salt agar

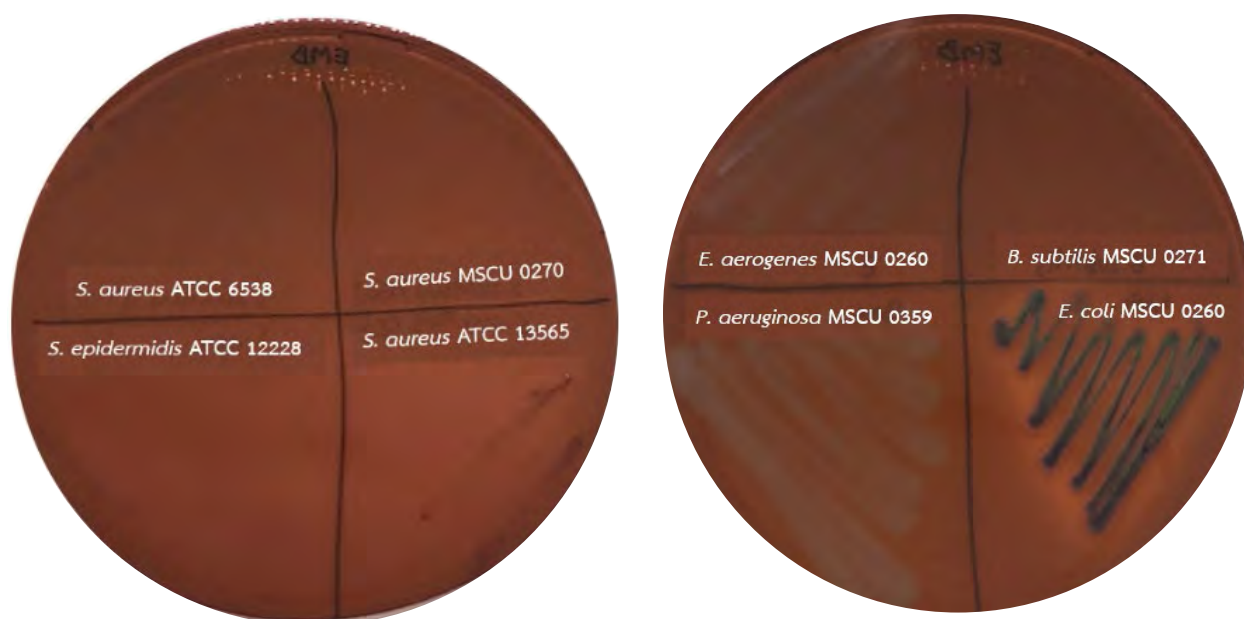
mannitol salt agar (MSA) ที่ใช้แยก *Staphylococcus aureus* มีความเข้มข้นเกลือสูง 7.5% ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ และการใช้น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol) ที่ *S. aureus* สามารถหมักได้ เกิดโซนสีเหลืองล้อมรอบโคโลนีสีเหลืองทอง จากค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นเปลี่ยนสีของฟีนอลเรดในอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง (Shields และ Tsang, 2006) เช่น *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* ATCC 6535 และ *S. aureus* MSCU 0270 ซึ่งเชื้ออื่นในกลุ่ม *Staphylococci* ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลจะเจริญได้ โดยไม่เปลี่ยนสีอาหาร มีโซนสีแดงล้อมรอบโคโลนีและให้โคโลนีสีขาว เช่น *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *B. subtilis* MSCU 0271 และไม่พบการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *P. aeruginosa* MSCU 0359, *E. coli* MSCU 0260 และ *E. aerogenes* MSCU 0260 ดังรูปที่ 4.2.1



รูปที่ 4.2.1 ลักษณะของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA

#### 4.2.2 ลักษณะโคโลนีของ *Escherichia coli* และแบคทีเรียชนิดอื่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar

Eosin methylene blue agar (EMB) ที่ใช้แยก *Escherichia coli* มีสี methylene blue และสี eosin เป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก มีน้ำตาลแลคโตสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ในแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลแลคโตสได้ (lactose fermenting bacteria) ทั้ง *E. coli* และกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียจะสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลแลคโตสและเกิดการรวมตัวของสี ทำให้โคโลนีมีหลายสีตามความเป็นกรดที่สร้างขึ้น ในกลุ่มที่ใช้น้ำตาลแลคโตสได้เร็ว สร้างกรดมาก จะเห็นโคโลนีเป็นสีม่วงเข้มและสีเขียวของโลหะ (green metallic sheen) (Lal และ Cheeptham, 2007) เช่น *E. coli* ส่วนกลุ่มที่สร้างกรดที่ใช้น้ำตาลแลคโตสได้ช้า สร้างกรดน้อย จะเห็นโคโลนีสีน้ำตาลชมพู และกลุ่มที่ไม่ใช้น้ำตาลแลคโตสจะปรากฏโคโลนีใส จากการนำเชื้ออ้างอิงในการทดลองมาเลี้ยงบนอาหาร EMB ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* ATCC 6535, *S. aureus* MSCU 0270, *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *B. subtilis* MSCU 0271 พบโคโลนีเป็นสีม่วงเข้มและสีเขียวของโลหะของ *E. coli* MSCU 0260 โคโลนีใสของ *P. aeruginosa* MSCU 0359 และโคโลนีน้ำตาลชมพูของ *E. aerogenes* MSCU 0260 ดังรูปที่ 4.2.2



ภาพที่ 4.2.2 ลักษณะของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร EMB agar

### 4.3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างเหริยญและธนบัตร

#### 4.3.1 พื้นที่ผิวของเหริยญและธนบัตร

พื้นที่ผิวทั้งหมดของเหริยญที่เตรียมใช้ในการทดลองทั้ง 6 ชนิด คือ มูลค่า 25 สตางค์ 50 สตางค์ 1 บาท 2 บาท 5 บาท และ 10 บาท ชนิดละ 5 เหริยญ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางและความหนาของเหริยญในหน่วยเซนติเมตร และธนบัตร 1 ชนิด คือ มูลค่า 20 บาท 50 บาท 100 บาท 500 บาท และ 1000 บาท ชนิดละ 2 ฉบับ โดยวัดความกว้างและความยาวของธนบัตรทั้งสองด้านในหน่วยเซนติเมตร เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณเชื้อปนเปื้อนต่อพื้นที่ผิวในตัวอย่างเหริยญและธนบัตร ดังตาราง 4.1

ตารางที่ 4.1 พื้นที่ผิวของเหริยญและธนบัตรตัวอย่าง

ตัวอย่าง	มูลค่า (บาท)	พื้นที่ผิวทั้งหมด (ตร.ซม.)
เหริยญ	0.25	4.5
	0.5	5.7
	1	6.9
	2	8.6
	5	10.6
	10	12.2
ธนบัตร	20	198.7
	50	207.4
	100	216.0
	500	224.6
	1000	233.3

#### 4.3.2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างเหริยญและธนบัตร

จากการนำตัวอย่างเหริยญ 6 ชนิด คือ มูลค่า 25 สตางค์ 50 สตางค์ 1 บาท 2 บาท 5 บาท และ 10 บาท ชนิดละ 5 เหริยญ และธนบัตร 3 ชนิด คือ มูลค่า 20 บาท 50 บาท และ 100 บาท ชนิดละ 1 ฉบับ มาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี total plate count บนอาหาร nutrient agar (NA) พบว่า เหริยญมูลค่า 1 บาท มีการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุด คือ 17 โคลโลนี และคิดเป็น 98.4 CFU/พื้นที่ผิว (ตร.ซม.) และไม่พบการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างธนบัตร ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จำนวนโคลโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร nutrient agar จากตัวอย่างเหริยญและธนบัตร

ตัวอย่าง	มูลค่า (บาท)	ความเงือจาง (เท่า)	จำนวนโคลโลนี	CFU/1 เหริยญ หรือธนบัตร	CFU/พื้นที่ผิว (ตร.ซม.)
เหริยญ	0.25	10	5	200	44.2
	0.5	10	8	320	55.6
	1	10	17	680	98.4
	2	10	9	360	41.9
	5	10	11	440	41.7
	10	10	16	640	52.3
ธนบัตร	20	10	0	0	0
	50	10	0	0	0
	100	10	0	0	0

#### 4.3.3 จำนวน *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างเหริยญและธนบ้ตร

จากการนำตัวอย่างเหริยญ 6 ชนิด คือ มูลค้ำ 25 สตงค้ 50 สตงค้ 1 บาท 2 บาท 5 บาท และ 10 บาท ชนิดละ 5 เหริยญ และธนบ้ตร 3 ชนิด คือ มูลค้ำ 20 บาท 50 บาท และ 100 บาท ชนิดละ 1 ฦบ้ มาหาจำนวน *S. aureus* ด้วยการเลี้ยงบนอาหารค้ดเลือก mannitol salt agar (MSA) ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารจากทั้งตัวอย่างเหริยญและธนบ้ตร ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 จำนวนโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร MSA จากตัวอย่างเหริยญและธนบ้ตร

ตัวอย่าง	มูลค้ำ (บาท)	ความเจือจาง (เท่า)	จำนวนโคโลนี	CFU/1 เหริยญ หรือธนบ้ตร	CFU/พื้นที่ผิว
เหริยญ	0.25	10	0	0	0
	0.5	10	0	0	0
	1	10	0	0	0
	2	10	0	0	0
	5	10	0	0	0
	10	10	0	0	0
ธนบ้ตร	20	10	0	0	0
	50	10	0	0	0
	100	10	0	0	0



### 4.3.3 จำนวน *Escherichia coli* จากตัวอย่างเหริยญและธนบัตร์

จากการนำตัวอย่างเหริยญ 6 ชนิด คือ มูลค่า 25 สตางค์ 50 สตางค์ 1 บาท 2 บาท 5 บาท และ 10 บาท ชนิดละ 5 เหริยญ และธนบัตร์ 3 ชนิด คือ มูลค่า 20 บาท 50 บาท และ 100 บาท ชนิดละ 1 ฦบับ มาหาปริมาณ *E. coli* ด้วยการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก Eosin Methylene Blue (EMB) agar ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารจากทั้งตัวอย่างเหริยญและธนบัตร์ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 จำนวนโคโลนีของ *Escherichia coli* บนอาหาร EMB จากตัวอย่างเหริยญและธนบัตร์

ตัวอย่าง	มูลค่า (บาท)	ความเจือจาง (เท่า)	จำนวนโคโลนี	CFU/1 เหริยญ หรือธนบัตร์	CFU/พื้นที่ผิว
เหริยญ	0.25	10	0	0	0
	0.5	10	0	0	0
	1	10	0	0	0
	2	10	0	0	0
	5	10	0	0	0
	10	10	0	0	0
ธนบัตร์	20	10	0	0	0
	50	10	0	0	0
	100	10	0	0	0

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ในการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการตรวจหาปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* enterotoxins A โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ SEA gene และการปนเปื้อน *Escherichia coli* จากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรในประเทศไทย เนื่องจากเป็นสิ่งที่ทุกคนสัมผัสบ่อยครั้งในแต่ละวัน ไม่ทราบถึงที่มาที่ไปของเหรียญและธนบัตรที่ได้รับ ทั้งยังเป็นสิ่งที่ไม่ได้รับการทำความสะอาดหรือผ่านความร้อน และมีการหมุนเวียนใช้หลายปี เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพ ความสะอาด และสุขลักษณะ จากการสัมผัสเหรียญและธนบัตรในอนาคตได้

ผลการศึกษาการตรวจหา *Staphylococcal enterotoxin A* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าเกิดข้อผิดพลาดในการหาความจำเพาะของ forward primer คือ SEA-1F และ reverse primer คือ SEA-2R ต่อยีน *Staphylococcal Enterotoxin A* (SEA gene) ใน *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก จากการใช้ *Taq* DNA polymerase เสื่อมประสิทธิภาพ และไม่ได้ทำการทดลองแก้ไขในส่วนนี้ต่อเนื่องจากเหตุการณ์การระบาดของ COVID-19 คาดว่าหากได้แก้ไขข้อผิดพลาดในขั้นตอนนี้ โดยการใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีประสิทธิภาพ จะสามารถหาความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อ SEA gene ใน *S. aureus* ATCC 13565 ได้สำเร็จ โดยให้แถบดีเอ็นเอขนาด 120 bp (Suwanampai และคณะ, 2011) บนเจลอะการโรส และไม่ให้แถบดีเอ็นเอบนเจลอะการโรสเมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อแบคทีเรียอื่น ดังนี้ *S. aureus* ATCC 6535, *S. aureus* MSCU 0270, *S. epidermidis* ATCC 12228, *B. subtilis* MSCU 0271, *E. coli* MSCU 0260, *P. aeruginosa* MSCU 0359 และ *E. aerogenes* MSCU 0260 จากนั้นจึงนำไปใช้ตรวจหา ยีน SEA จากตัวอย่างที่เก็บได้จากเหรียญและธนบัตรด้วยวิธี PCR และคาดว่าจะตรวจพบ SEA gene ในตัวอย่างเหรียญและธนบัตรเนื่องจากมีรายงานผลการศึกษามาตาจินิกของจุลินทรีย์ที่พบบนเงินที่หมุนเวียนในรัฐนิวยอร์ก สหรัฐอเมริกา โดยใช้ธนบัตรมูลค่า 1 ดอลลาร์สหรัฐในการศึกษา เนื่องจากมีอัตราการใช้สูงที่สุดและมีอายุการใช้งานในระบบเศรษฐกิจสั้นที่สุด คือ 5.8 ปี เมื่อเทียบกับธนบัตรมูลค่า 20 และ 100 ดอลลาร์สหรัฐ คือ 7.9 ปีและ 15 ปีตามลำดับ พบทั้งดีเอ็นเอของมนุษย์ เซลล์ยูคาริโอต แบคทีเรีย และไวรัส ตามลำดับ ซึ่งสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบ คิดเป็น 29 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าส่วนมากเป็นแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังและช่องปากของมนุษย์ ทั้งนี้ ยังพบ *S. aureus* จากตัวอย่างธนบัตรที่เก็บในฤดูร้อนในสัดส่วนที่มากกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว แสดงให้เห็น

ถึงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบนธนบัตรในแต่ละฤดูกาล ทั้งยังใช้เป็นตัวประเมินและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคผ่านเงินที่หมุนเวียนในระบบเศรษฐกิจ (Maritz และคณะ, 2017)

นอกจากนี้มีรายงานผลการศึกษาการตรวจหา *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcal enterotoxin genes* ด้วยวิธี quantitative PCR จากตัวอย่างฝุ่นในบริเวณต่าง ๆ ของบ้าน โดยใช้ *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 เป็นตัวควบคุมผลบวก พบ *Staphylococcus aureus* ที่มี SEA gene ถึง 25 เปอร์เซ็นต์จากฝุ่นในห้องนอน (Ludwiga และคณะ, 2017) แสดงให้เห็นว่าแม้แต่ฝุ่นภายในห้องนอนยังสามารถพบ *Staphylococcus aureus enterotoxin A* ได้ ดังนั้นเหรียญและธนบัตรที่เป็นสิ่งหมุนเวียนในระบบเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานนั้นอาจตรวจพบได้เช่นกัน

ผลจากการหาจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนในตัวอย่างเหรียญและธนบัตร ในการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร nutrient agar พบการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างเหรียญเท่านั้น โดยเหรียญมูลค่า 1 บาท พบจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด เนื่องจากเป็นเหรียญที่มีอัตราการแลกเปลี่ยน หมุนเวียนมากที่สุด จากสถิติการรับแลก-จ่ายแลกเหรียญกษาปณ์หมุนเวียนกรมธนารักษ์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ประจำเดือนเมษายน 2563 โดยมีอัตราการแลกเปลี่ยน หมุนเวียนประมาณ 886 ล้านเหรียญ คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับเหรียญมูลค่าอื่น ได้แก่ ราคา 25 สตางค์ 50 สตางค์ 2 บาท 5 บาท และ 10 บาท และเช่นเดียวกันกับในปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และ 2562 (กรมธนารักษ์, 2563) ทั้งนี้ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างธนบัตร เนื่องจากธนบัตรในประเทศไทยทำจากกระดาษที่มีใยฝ้ายเป็นส่วนประกอบหลัก (ธนาคารแห่งประเทศไทย, ม.ป.ป) ซึ่งช่วยให้เซลล์แบคทีเรียยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดี จากการศึกษาการรอดชีวิต การยึดเกาะและความเป็นพิษต่อแบคทีเรียจากวัสดุที่ใช้ทำเหรียญและธนบัตรของ Vriesekoop และคณะ (2016) รายงานว่า ธนบัตรที่ทำจากใยฝ้ายมีโครงสร้างที่ช่วยให้แบคทีเรียยึดเกาะได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับวัสดุอื่น ๆ เช่น กระดาษวาชิ ใยฝ้ายผสมลิกนิน และพลาสติกสังเคราะห์

นอกจากนี้ยังไม่พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *E. coli* บนอาหารคัดเลือก Mannitol Salt Agar (MSA) และ Eosin Methylene Blue (EMB) agar ตามลำดับ จากวิธีโซนิเคตมาแยกเชื้อออกจากเหรียญและธนบัตรนั้น อาจทำให้เซลล์ของแบคทีเรียที่ต้องการเกิดความเสียหายหรือแตก เนื่องจากความถี่ที่ใช้ อาจทำให้เกิดการสั่นสะเทือนภายในเซลล์ และทำให้เซลล์แตกได้ (Islam และคณะ, 2017) หรือเวลาที่ใช้ในการโซนิเคตไม่เพียงพอต่อการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากพื้นผิวของตัวอย่างเหรียญและธนบัตร ดังนั้นจะต้องหาเวลาที่เหมาะสมในการโซนิเคต หรืออาจเปลี่ยนวิธี ใช้การ vortex แทน โซนิเคต อาจช่วยให้เซลล์ได้รับความเสียหายน้อยลงทั้งยังอาจช่วยแยกเซลล์ได้ดีขึ้น

จากการศึกษาของ Kumar และคณะ (2009) ได้รายงานการศึกษาการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคใน *S. aureus* ที่แยกได้จากธนบัตรในประเทศอินเดีย เก็บตัวอย่างธนบัตร 96 ตัวอย่างจากสถานที่ต่าง ๆ แยกเซลล์แบคทีเรียจากตัวอย่างธนบัตรแต่ละชนิดมาปั่นผสม (vortex) กับสารละลายน้ำเกลือ 0.85% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางถึงความเข้มข้น  $10^{-10}$  และนำมากระจายเชื้อลงบน mannitol salt agar เลือกโคโลนีสีเหลืองที่มีโซนสีเหลืองล้อมรอบมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก Baird-Parker Agar และ brain heart infusion agar นอกจากนี้ยังทดสอบทางชีวเคมีอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อยืนยันการระบุว่าเป็น *S. aureus* เช่น coagulase test,  $\beta$ -hemolysis, DNase test และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก HiCrome Staph Selective Agar ของบริษัท HiMedia, USA จากผลการศึกษาพบแบคทีเรียทั้งหมดในช่วง 38 – 270 โคโลนี/1 ธนบัตร และได้โคโลนีของ *S. aureus* ในช่วง 1 – 16 โคโลนีจากอาหารคัดเลือกและการระบุชนิดด้วยการทดสอบทางชีวเคมี จะเห็นได้ว่าความถี่ในการพบ *S. aureus* มีความหลากหลายสูง ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรใช้ตัวอย่างมากขึ้น เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนและมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาของ Hiko และคณะ (2016) ได้รายงานการศึกษาการปนเปื้อน *E. coli* บนธนบัตรจากผู้ประกอบอาหารหลากหลายชนิดในประเทศเอธิโอเปียทั้งหมด 384 ตัวอย่าง แยก *E. coli* บนธนบัตรโดยใช้การใช้ก้านสำลีปลอดเชื้อชุบ Buffered Peptone Water (BPW) ป้ายบนธนบัตรทั้ง 2 ด้าน จากนั้นนำมา streak บน Eosin Methylene Blue (EMB) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เกิด metallic sheen มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar สำหรับเตรียมทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติม เพื่อยืนยันการระบุเชื้อเป็น *E. coli* เช่น Indole production, Methylene red reduction, Voges Proskauer reaction และ Citrate utilization (IMViC)

ดังนั้นหากสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้คาดว่าจะสามารถตรวจหาปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* enterotoxins A โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ SEA gene ทั้งนี้เพิ่มตัวอย่างเหรียญและธนบัตรและใช้วิธีที่เหมาะสมในการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากตัวอย่างเหรียญและธนบัตรจะให้ผลการทดลองที่ชัดเจนมากขึ้น และคาดว่าผลการทดลองที่ได้จะใช้เป็นข้อมูลในการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพ ความสะอาด และสุขลักษณะ จากการสัมผัสเหรียญและธนบัตรในอนาคตได้

## เอกสารอ้างอิง

### ภาษาไทย

กรมธนารักษ์. 2561. โรงกษาปณ์ ประวัติความเป็นมา. [ออนไลน์]

<https://www.treasury.go.th/th/mint-history/>

เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 2 พ.ค. 2563

กรมธนารักษ์. 2563. สถิติการรับแลก-จ่ายแลกเหรียญกษาปณ์หมุนเวียน. [ออนไลน์]

<https://www.treasury.go.th/th/service-statistics/>

เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 2 พ.ค. 2563

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2557. *Escherichia coli*. [ออนไลน์]

[http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact\\_sheet/12\\_57.pdf](http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/12_57.pdf)

เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 24 เม.ย. 2563

ธนาคารแห่งประเทศไทย. ม.ป.ป. ลักษณะต่อต้านการปลอมแปลงในธนบัตร. [ออนไลน์]

[https://www.bot.or.th/Thai/Banknotes/production\\_and\\_security/Pages/counterfeit\\_deterrence.aspx](https://www.bot.or.th/Thai/Banknotes/production_and_security/Pages/counterfeit_deterrence.aspx). เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 2 พ.ค. 2563

ปิยรัชต์ สัตตะรัตติวงศ์. 2554. วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส. [ออนไลน์].

[https://pidst.or.th/userfiles/47\\_วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส.pdf](https://pidst.or.th/userfiles/47_วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส.pdf)

เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 22 เม.ย. 2563

รัตนาวลัย นิตियารมย์. 2562. โรค 4S หรือ Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS). [ออนไลน์].

<https://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=1359>

เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 22 เม.ย. 2563

สุพรรณณี เทพอรุณรัตน์ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2547. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำบริโภค. [ออนไลน์].

[http://www.dss.go.th/images/st-article/bsp\\_8\\_2547\\_water\\_gmp.pdf](http://www.dss.go.th/images/st-article/bsp_8_2547_water_gmp.pdf)

เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 24 เม.ย. 2563

สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ. 2560. มาตรฐานน้ำบริโภคประเทศไทย. [ออนไลน์].

[http://foodsafety.anamai.moph.go.th/more\\_news.php?cid=59&filename=water\\_index18](http://foodsafety.anamai.moph.go.th/more_news.php?cid=59&filename=water_index18)

เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 24 เม.ย. 2563

ศูนย์ห้องปฏิบัติการกรมอนามัย, 2558. ข้อกำหนดเกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภค มอก.257-2549. [ออนไลน์].

[http://rldc.anamai.moph.go.th/index.php?option=com\\_content&view=article&id=191:stan](http://rldc.anamai.moph.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=191:stan)

-drink-2&catid=2&Itemid=512. เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 24 เม.ย. 2563

### ภาษาอังกฤษ

Abia ALK, Ubomba-Jaswa E. 2019. Dirty money on holy ground: isolation of potentially pathogenic bacteria and fungi on money collected from church offerings. *Iranian Journal of Public Health* 48(5):849-857.

Al-Khafaji MH, Flayyih MT, Arsheed M. 2013. Isolation, Identification and detection of some virulence factors of Staphylococci in milk and cheese in Baghdad. *Iraqi Journal of Science* 54(4):1057-1067.

Angelakis E, Azhar E, Bibi F, Yasir M, Al-Ghamdi AK, Ashshi AM, Elshemi AG, Raoult D. 2014. Paper money and coins as potential vectors of transmissible disease. *Future Microbiology* 9:249-261.

Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2:1751-1773.

Boucher HW, Corey GR. 2008. Epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 46:S344-349.

Brandt MJ, Johnson KM, Elphinston AJ, Ratnayaka DD. 2017. Chemistry, Microbiology and Biology of water, p.235-321. In Brandt MJ, Johnson KM, Elphinston AJ, Ratnayaka DD (ed), *Twort's Water Supply*. Butterworth-Heinemann. Massachusetts, USA.

Centers for Disease Control and prevention. 2013. Outbreak of staphylococcal food poisoning from a military unit lunch party — United States, July 2012. [online].

<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6250a2.htm>. Accessed 5 May 2020.

- Freddriksson NJ, Hermansson M, Wilén BM. 2013. The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8(10): e76431.
- Gnanamani A, Hariharan P, Satyaseela MP. 2017. *Staphylococcus aureus*: overview of Bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. In Enany S, Alexander LC (ed), *Frontiers in Staphylococcus aureus*, London, UK.
- Guidi F, Duranti A, Gallina S, Nia Y, Petruzzelli A, Romano A, Travaglini V, Olivastri A, Calvaresi V, Decastelli L, Blasi G. 2018. Characterization of a staphylococcal food poisoning outbreak in a workplace canteen during the post-Earthquake reconstruction of central Italy. *Toxins (Basel)* 10(12):523.
- Haasnoot PJ, Vries DA. 2018. Staphylococcal scalded skin syndrome in a 4-year-old child: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 12(20).
- Heshiki Y, Dissanayake T, Zheng T, Kang K, Yueqiong N, Xu Z, Sarkar C, Woo PCY, Chow BKC, Baker D, Yan A, Webster CJ, Panagiotou G, Li J. 2017. Toward a metagenomic understanding on the bacterial composition and resistome in Hong Kong banknotes. *Frontiers in microbiology* 8:632.
- Hiko A, Abdata K, Muktar Y, Woyesa M, Mohammed A. 2016. Contamination of Ethiopian paper currency notes from various food handlers with *E. coli*. *SpringerPlus* 5(1):1065.
- Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino S. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology* 71(5): 2793–2795.
- Islam MS, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. 2017. A Review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines (Basel)* 8(3):83.

- Johler S, Weder D, Bridy C, Huguenin MC, Robert L, Hummerjohann J, Stephan R. 2015. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science* 98(5):2944-2948.
- Kane TL, Carothers KE, Lee SW. 2018. Virulence factor targeting of the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* for vaccine and therapeutics. *Current Drug Targets* 19(2):111-127.
- Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka F. 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 9:23.
- Kong C, Neoh HM, Nathan S. 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins* (Basel) 8(3):72.
- Krakauer T, Stiles BG. 2013. The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings. *Virulence* 4(8):759-773.
- Kumar JD, Neki Yk, Gaur A, Khanna D. 2009. Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency. *International Journal of Infectious Diseases* 13(6):e450-455.
- Lal A, Cheeptham N. 2007. Eosin-methylene blue agar plates protocol. [online]. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2869>. accessed 8 May 2020.
- Langley RJ, Fraser JD, Proft T. 2015. Bacterial superantigens and superantigen-like toxins, p.911–974. In Alouf J, Ladant D, Popoff MR (ed.), *The comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Academic Press, London, UK.
- Ludwiga S, Jimenez-Busha I, Brighamb E, Boseb S, Dietteb G, McCormackb MC, Matsuib EC, Davisa MF. 2017. Analysis of home dust for *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin genes using quantitative PCR. *The Science of the Total Environment* 581-582:750–755.



- Maritz JM, Sullivan SA, Prill RJ, Aksoy E, Scheid P, Carlton JM. 2017. Filthy lucre: a metagenomic pilot study of microbes found on circulating currency in New York City. *PLoS One* 12(4):e0175527.
- Mayo clinic. 2020. Toxic shock syndrome. [online].  
<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/toxic-shock-syndrome/symptoms-causes/syc-20355384>. Accessed 24 April 2020.
- Percival SL, Williams DW. 2014. *Escherichia coli*. In: Percival SL, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF, editors. Microbiology of waterborne diseases. 2nd edition. *Microbiological Aspects and Risks*; 89–117.
- Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. 2010. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2(8):2177–2197.
- Ricke SC, Jarquin R, Hanning I. 2012. Antimicrobials in animal feed: benefits and limitations, p.411-431. In Gremmel (ed.), *Effects on Livestock and Food Safety*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
- Shields P, Tsang AY. 2006. Mannitol salt agar plates protocols. [online].  
<https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3034>  
accessed 8 May 2020.
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie FL, Lynch SV. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE* 10(2): e0117617.
- Suwanampai T, Pattarakulvanit K, Pattanamahakul P, Sutheinkul O, Okada K, Honda T, Thaniyavarn J. 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for detecting enterotoxin A gene of *Staphylococcus aureus* in pork. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 42(6):1489-1497.

- Taylor TA, Unakal CG. 2020. *Staphylococcus aureus*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Vriesekoop F, Chen J, Oldaker J, Besnard F, Smith R, Leversha W, Smith-Arnold C, Worrall J, Ruffray E, Yuan Q, Liang H, Scannell A, Russell C. 2016. Dirty money: a matter of bacterial survival, adherence, and toxicity. *Microorganisms* 4(4):42.
- Wirtanen G, Salo S. 2016. Biofilm risks, p.55-79. In Lelieveld H, Holah J, Gabrić D (ed.), *Handbook of hygiene control in the food industry*. Woodhead Publishing, San Diego, USA.
- Wu S, Duan N, Gu H, Hao L, Ye H, Gong W, Wang Z. 2016. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)* 8(7):176.
- Yehia HM, Ismail EA, Hassan ZK, Al-Masoud AH, Al-Dagal MM. 2019. Heat resistance and presence of genes encoding staphylococcal enterotoxins evaluated by multiplex-PCR of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized camel milk. *Bioscience Reports* 39(11): BSR20191225.

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth (NB)

เพปโตน (peptone)	3	กรัม
------------------	---	------

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
--------------------------------	---	------

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient (NA)

เพปโตน (peptone)	3	กรัม
------------------	---	------

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
--------------------------------	---	------

ผงวุ้น (agar)	15	กรัม
---------------	----	------

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mannitol Salt (MSA)

Pancreatic Digest of Casein	5	กรัม
-----------------------------	---	------

Peptic Digest of Animal Tissue	5	กรัม
--------------------------------	---	------

ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	1	กรัม
-------------------------------	---	------

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	75	กรัม
-----------------------	----	------

น้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)	10	กรัม
--------------------------------	----	------

ฟีนอลเรด (phenol red)	25	มิลลิกรัม
-----------------------	----	-----------

ผงวุ้น (agar)	15	กรัม
---------------	----	------

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB)

Pancreatic Digest of gelatin	10	กรัม
น้ำตาลแลคโตส (lactose)	10	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2	กรัม
อีโอซินวาย (eosin Y)	0.4	กรัม
เมทิลีนบลู (methylene blue)	65	มิลลิกรัม
ผงวุ้น (agar)	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ

1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**  
**สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง**

**1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์**

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**2. สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (0.5M EDTA)**

ละลายเกลือไดโซเดียมของอีดีทีเอ ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ ) 186.1 กรัม ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยผลึก โซเดียมไฮดรอกไซด์ นมีค่าเท่ากับ 8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**3. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสอะซิเตดอีดีทีเอ 50 เท่า (50X TAE)**

ทริส-เบส ( $C_4H_{11}NO_3$ )	242	กรัม
กรดอะซิติก ( $CH_3COOH$ )	57.1	มิลลิลิตร
สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8)	100	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร		