

## บทที่ 3

### การดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ระเบียบวิธีวิจัย ประกอบด้วย

##### 1. แบบแผนการวิจัย (Research Design)

- ค้นคว้าวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- การคำนวณขนาดตัวอย่าง
- เก็บตัวอย่างอาหารแต่ละประเภทตามแหล่งต่างๆ ในจังหวัดขอนแก่นและเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษและอุจจาระร่วง จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น
- ออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ 5 ชนิด และ enterotoxin พร้อมทั้ง toxic shock syndrome toxin-1 ของเชื้อ *S. aureus*
- สกัดดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป
- ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR
- ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของวิธี multiplex PCR
- ตรวจสอบยีนดังกล่าวกับตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจอุจจาระโดยตรงโดยใช้วิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบวิธีมาตรฐาน
- ตรวจสอบสารพิษ enterotoxin และ toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) โดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วไปทดสอบการสร้างสารพิษโดยวิธี reverse passive latex agglutination (RPLA)
- ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ
- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล

#### 3.2 ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

##### 3.2.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

- **ส่วนที่ 1** ตัวอย่างอาหาร แบ่งออกเป็น 3 ประเภท รวมจำนวน 150 ตัวอย่าง ได้แก่
  - อาหารพื้นเมือง เช่น ส้มตำ แหนม จำนวน 50 ตัวอย่าง
  - อาหารผ่านความร้อนไม่สมบูรณ์ เช่น ยำต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง
  - เครื่องดื่ม เช่น โอเลี้ยง กาแฟ น้ำผลไม้ จำนวน 50 ตัวอย่าง

## ส่วนที่ 2 สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง

- Rectal swab samples หรือ Stool specimens จำนวน 150 ตัวอย่าง

### 3.2.2. การเก็บตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่นำมาศึกษานี้ แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามชนิดของอาหาร ได้แก่ อาหารพื้นเมือง อาหารผ่านความร้อนไม่สมบูรณ์และเครื่องดื่มน้ำ โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างตามแหล่งต่างๆ ในเขตเทศบาลเมือง จังหวัดขอนแก่น ได้แก่ ร้านอาหารในเทศบาลเมืองขอนแก่น (Food shops in Khon Kaen municipality) และผู้ขายเร่ (Food vendors) หรือหรือหาบเร่แผงลอย

วิธีการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างอาหารใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ (sterile container) จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 3.1)

### 3.2.3. การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง

ได้แก่ Rectal swab sample โดยนำสิ่งส่งตรวจ rectal swab ซึ่งถูกนำส่งงานประจำของหน่วยวิเคราะห์การติดเชื้อโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น จุ่มลงในอาหารกระตุ้นการเจริญของเชื้อ (enrichment media) แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 3.2)

### 3.2.4. ขั้นตอนในห้องปฏิบัติการ

#### 3.2.4.1. การหาลำดับเบสและออกแบบ primer

##### A. หาลำดับเบสที่มีความจำเพาะ

หาลำดับเบสที่มีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำมาออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกหรือดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

##### B. การออกแบบ primer

ในการศึกษานี้มีทั้งที่ได้จากการตีพิมพ์แล้วและถูกออกแบบใหม่โดยใช้โปรแกรม Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) โดย primer sequence ที่ถูกเลือกนำมาใช้เหล่านี้ได้ผ่านการตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) โดยใช้โปรแกรม Blast ของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และวิเคราะห์ค่า Temperature melting (Tm) อีกทั้งยังตรวจสอบโอกาสการเกิด hairpin, self-dimer, hetero-dimer โดยใช้โปรแกรม Integrated DNA technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>)

##### C. การทดสอบความจำเพาะของ primer (specificity test)

ทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายของเชื้อแต่ละชนิด โดยการใส่ดีเอ็นเอของเชื้อในจีแนส (Genus) เดียวกันแต่หลายสายพันธุ์ (strains) โดยสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบนี้จะครอบคลุมทั้ง environment strains และ clinical strains

นอกจากนี้ยังทดสอบความจำเพาะกับเชื้อต่างชนิดในเชื้อกลุ่ม *Vibrionaceae* และ *Enterobacteriaceae* เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ที่อาจเกิดขึ้นได้

### 3.2.4.2 การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR

ตารางที่ 3.1 การหาสถานะที่เหมาะสมของ PCR mixture และ PCR condition สำหรับการเพิ่มจำนวน ยีนเป้าหมายโดยวิธี Multiplex PCR (checkerboard test)

PCR mixture/condition	Multiplex PCR
1. 10X PCR buffer	1X
2. 10 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5, 2.0, 2.5 mM
3. 1.25 mM dNTPs	0.2 to 0.8 mM
4. 10 μM Primer	
- Forward primer	0.1-1.0 μM
- Reverse primer	0.1-1.0 μM
5. Taq DNA polymerase (5 U/μl)	1.5- 2.5 U
6. Sterile water	-
7. Template DNA	
• Pure culture	1 fg -100 ng
• Food or rectal swab samples	1 fg -700 ng
8. Annealing temperature	56 - 60 °C
9. Extension time	45 sec, 1.0, 1.5, 2.0 min
<b>Total volume 25 μl</b>	

3.2.4.3 การตรวจหายีนจำเพาะของเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ ยีนสร้างสารพิษของเชื้อ *S. aureus*, ยีนสร้างสารพิษคลอริลาและยีนทดสอบ serogroup ของเชื้อ *V. cholerae* โดยวิธี multiplex PCR

#### A. การสกัดดีเอ็นเอ

##### i. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวเชื้อโดยตรง

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ของเชื้อทั้ง 5 ชนิด ได้ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (Puregene DNA Purification System, Genta System, USA) โดยการเตรียมตัวอย่างเชื้ออย่างละ 1 โคโลนี ที่นำมาตรวจสอบต้องทำการเพาะเลี้ยงใน Brain heart infusion (BHI) broth 3 มิลลิลิตร และนำไปปั่นใน ตู้ปั่นแบบเขย่า (shaking incubator) ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C, 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึง

นำมาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งมีขั้นตอนการทำโดยย่อคือ ใช้ suspension ปริมาตร 1 มล. แล้วนำไปปั่น 14,000×g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ตัวเซลล์ตกตะกอน (สำหรับ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เติม Cell Suspension Solution ปริมาตร 300 µl และเติม lysozyme (20 mg/ml) ปริมาตร 50 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000×g เป็นเวลา 2 นาที) จากนั้นจึงเติม Cell lysis solution ปริมาตร 300 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม RNase A Solution (25 mg/ µl) ปริมาตร 1.5 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม Protein precipitation solution ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000×g เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน แล้วดูดเอาส่วนน้ำใสส่วนบนซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ ใส่ในหลอด centrifuge หลอดใหม่ที่บรรจุ 100% Isopropanol (2-propanol) ปริมาตร 300 µl จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 14,000×g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทน้ำใสส่วนบนทิ้งไป แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 300 µl จึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000×g เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วคว่ำหลอดและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งประมาณ 5-10 นาที จากนั้นจึงเติม DNA Hydration Solution ปริมาตร 50 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทำ PCR amplification

## ii. การสกัดดีเอ็นเอโดยการเติมเชื้อในอาหาร

เพื่อเป็นการทดลองว่า การประยุกต์ใช้วิธี multiplex PCR ตรวจเชื้อในอาหาร สามารถทำได้จริง จึงได้ทดสอบดังต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่างอาหารมา 25 กรัม จำนวน 4 ชุด (ต่อหนึ่งชนิดอาหาร) ดังนี้

- ชุดที่ 1 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทริปติเคซิน ซอย บรอก (Trypticase Soy Broth +10% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 1% โซเดียมไพรูเวท (Sodium pyruvate) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)

- ชุดที่ 2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออัลคาไลน์ เปปโตน วอเตอร์ (Alkaline Peptone Water; APW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้นการเจริญของเชื้ออิวรีโอ คลอเลรี (*Vibrio cholerae*) และเชื้ออิวรีโอ พาราฮีโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*)

- ชุดที่ 3 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อบัฟเฟอร์ เปปโตน วอเตอร์ (Buffer Peptone Water; BPW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อแซลมอนเนลลา (*Salmonella* spp.) ผสมให้เข้ากัน

- ชุดที่ 4 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชิเจลลา บรอก (Shigella broth; SGB) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อชิเจลลา (*Shigella* spp.) ผสมให้เข้ากัน

2. จากนั้นเติมเชื้อทั้ง 5 ชนิดที่มีความเข้มข้น  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  CFU/25 g ใส่ลงในตัวอย่างอาหารแต่ละชุด

3. จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่บรรจุในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 1-3 ไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  และชุดที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ  $44^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อในแต่ละช่วงเวลาทำการคัดตัวอย่างอาหารที่ผ่านการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ (enrichment) แล้วมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมเชื้อแบคทีเรีย (Pure Gene DNA Purification Kit, Qiagen) ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวเชื้อโดยตรงดังกล่าวข้างต้น เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

### iii. การสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากตัวอย่างอาหาร

ชั่งตัวอย่างอาหารมา 25 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด จำนวน 4 ชุด ดังกล่าวข้างต้น จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 0, 6 และ 24 ชั่วโมง ยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Shigella* broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $44^{\circ}\text{C}$  จากนั้นจึงคัดตัวอย่างอาหารที่ผ่านการ enrichment แล้วมา 1 มล. ใส่ในหลอด centrifuge แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอเหมือนวิธีการที่กล่าวข้างต้น

### iv. การสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจอุจจาระ

นำ rectal swab ที่บรรจุใน transport media ที่ส่งไปยังห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงของโรงพยาบาลศรีนครินทร์มาลงใน 10 มล. ของ enrichment media ดังต่อไปนี้ สำหรับ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ใส่ใน Gram negative (GN) broth และ BPW ส่วน *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ใส่ใน APW จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 0 และ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาทำการสกัด DNA ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

## B. การทำ DNA amplification

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR เพื่อตรวจหาชนิดเป้าหมายต่างๆ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงจำนวน 5 ชนิด คือ *S. aureus* (*nuc*), *Salmonella* spp. (*invA*), *Shigella* spp. (*ipaH*), *V. cholerae* (*ompW*) และ *V. parahaemolyticus* (*tl*), ชุดที่ 2 สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษชนิดซุเปอร์แอนติเจนของเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียสยีน (*sea-sed* และ *tst-1*) และชุดที่ 3 สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษคลอเรลาและยีนทดสอบ serogroup ของเชื้อ *V. cholerae* โดยองค์ประกอบของ Reaction mixture และ primer sequence / PCR conditions แสดงดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ



ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของ Reaction mixture สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายต่างๆ โดยวิธี multiplex PCR จำนวน 3 ชุด

PCR mixture	Bacterial detection in food and rectal swab	Pure culture detection	
	Multiplex set 1	Multiplex set 2	Multiplex set 3
1. PCR buffer	1X	1X	1X
2. MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	2.5 mM	2.0 mM
3. dNTPs	0.3 mM	0.3 mM	0.2 mM
4. Primer-F	0.1 – 1.1 μM	0.1 – 0.5 μM	0.2-0.7 μM
Primer-R	0.1 – 1.1 μM	0.1 – 0.5 μM	0.2-0.7 μM
5. Taq DNA polymerase	2.0 U	2.0 U	1.5 U
6. dH <sub>2</sub> O	← ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 25 μl →		
7. DNA template	700 ng	100 ng	100 ng

### C. การตรวจหา PCR product

ทำโดยนำ amplified product ที่ได้ไปแยกด้วย 2% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นจึงนำไปดูภายใต้กล้องซึ่งใช้แสง ultraviolet (UV) (Imagemaster VDS, Pharmacia Biotech, USA) จะปรากฏแถบ (band) ดีเอ็นเอให้เห็น ซึ่งตรงกับขนาดของ PCR product ที่ต้องการเมื่อเทียบกับ Standard marker

### D. การทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR

การทดสอบความไว (sensitivity test) ของวิธี PCR คือ การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนเป้าหมายน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี multiplex PCR ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบและวิเคราะห์โดยใช้ 2 วิธี คือ

1. การคำนวณความเข้มข้นของ DNA เทียบกับจำนวนเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการข้างต้น จากนั้นนำดีเอ็นเอแม่แบบมาเจือจางแบบ 10-fold serial dilution แล้วใช้ดีเอ็นเอเหล่านั้นเป็นแม่แบบในการทำ PCR ต่อไป

2. การคำนวณความเข้มข้นของ DNA เทียบกับน้ำหนักของ circular DNA ซึ่ง เป็น complete genome ของแบคทีเรีย ตามขั้นตอนดังนี้

- คำนวณหา molecular weight of double stranded DNA ซึ่งเป็นการเปลี่ยน หน่วยของจีโนมจาก base pair (bp) เป็นหน่วยกรัม (g) ก่อน
- คำนวณหาความเข้มข้นของ DNA (หน่วย fg) ต่อหนึ่งจีโนมหรือหนึ่ง cell จากสูตร concentration of DNA (fg) = Total dalton (gram) / avogadro number เมื่อ avogadro number =  $6.02 \times 10^{23}$
- เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของ DNA ต่อหนึ่งเซลล์แล้ว นำค่าความเข้มข้นของ DNA (หน่วย fg) ที่ได้ มาคำนวณหา sensitivity โดยเทียบกับค่าความเข้มข้นของ DNA ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้จากการทำ PCR ข้างต้น

จากวิธีการดังกล่าวจะทำให้ทราบจำนวนเชื้อน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ primer ตามระบุในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 Primer sequence และ PCR conditions สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 5 ชนิด (set 1), ยีนสร้างสารพิษชนิดซูปเปอร์แอนติเจน (set 2), ยีนสร้างสารพิษและ virulent gene ของเชื้อ *V. cholerae* (set 3)

Organisms	Target genes	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Multiplex PCR set/ PCR condition	Reference
<i>S. aureus</i>	<i>nuc</i> (thermonuclease)	GCTTGCTATGATTGTGGTAGCC (22) <sup>1)</sup> TCTCTAGCAAGTCCCTTTTCCA (22) <sup>1)</sup>	423	<b>Multiplex PCR (1)</b> 94°C; 10 min 35 cycles of 94°C; 30 s 60°C; 30 s 72°C; 2 min 72°C; 10 min	In this study
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> (invasion protein A)	GGCACTAATCGCAATCAACAATT(23) CCTGATCGCACTGAATATCGTAC(23)	640		In this study
<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i> (invasion plasmid antigen H)	AGTGCCTCTGCGGAGCTTCG (20) GGAGAGTTCTGACTTTATCCCG (22)	232		[43] With modified
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tl</i> (thermolebile hemolysin)	CCACATTAGATTTGGCGAACGA (22) CAGACAAGCTGTCACCGAGT (20)	150		In this study
<i>V. cholerae</i>	<i>ompW</i> (outer membrane protein W)	GTAAGTCTGAGCCCTAAGCTC (20) <sup>2)</sup> GGACCATAAAGGTAGGTGGC (20) <sup>2)</sup>	307		In this study
<i>S. aureus</i>	<i>sea</i> (staphylococcal enterotoxin A)	ACCGTTTCCAAAGGTACTGTA TGGTACACCAAACAAAACAGC	135	<b>Multiplex PCR(2)</b> 94°C ; 7 min 35 cycles of 94°C ; 30 s 58°C ; 30 s 72°C ; 45 s 72°C ; 7 min	In this study
	<i>seb</i> (staphylococcal enterotoxin B)	CCTAAACCAGATGAGTTGCAC CAGGCATCATGTCATACCAAAA	592		In this study
	<i>sec</i> (staphylococcal enterotoxin C)	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG CTTCACACTTTTAGAATCAACCG	454		[12, 52] with modified
	<i>sed</i> (staphylococcal enterotoxin D)	GCTTGACATATGGAGGTGTCA GACCCATCAGAAGAATCAAACCT	263		In this study
	<i>tst-1</i> (Toxic shock syndrome toxin-1)	GGCAGCATCAGCCTTATAATTT GTGGATCCGTCATTCATTGTT	371		In this study
<i>V. cholerae</i>	<i>ctxA</i> (cholera toxin A subunit)	TGGTCTTATGCCAAGAGGACA (21) ATCTTGAGCATTCCCACAAC (21)	517	<b>Multiplex PCR(3)</b> 94°C;10 min 35 cycles of 94°C; 1 min 59°C; 1 min 72°C; 1 min 72°C;10 min	In this study
<i>V. cholerae</i> O1	<i>rfbO1</i> (O-Antigen O1)	TCTATGTGCTGCGATTGGTG (20) ACCCCGAAAACCTAATGTGAG (21)	639	[34] With modified	
<i>V. cholerae</i> O139	<i>rfbO139</i> (O-Antigen O139)	AGCCTCTTTATTACGGGTGG (20) GTCAAACCCGATCGTAAAGG (20)	449	[4]	

<sup>1)</sup>: Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน โดยวิธี multiplex PCR set 1 และ 2

<sup>2)</sup>: Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน โดยวิธี multiplex PCR set 1 และ 3

### 3.2.4.4 การยีนย่นผล PCR โดยวิธี Southern blotting

Southern blot เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายในตัวอย่าง โดยการถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก gel electrophoresis ไปสู่ filter membrane เช่น nitrocellulose membrane เป็นต้น จากนั้นจึงเติม probe ที่มีความจำเพาะต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นๆ ลงไป ถ้าในตัวอย่างมีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ probe จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายและปรากฏแถบสีขึ้นในตำแหน่งนั้นๆ มีวิธีการโดยย่อคือ

#### A. การ label PCR product ด้วย DIG-High prime

ทำการเจือจาง PCR product ให้ได้ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ใน DW 16  $\mu\text{l}$  จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดย heat DNA ที่ 100°C 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติม DIG-High prime ปริมาณ 4  $\mu\text{l}$  จากนั้น mix ให้เข้ากัน ก่อนนำไปบ่มที่ 37°C overnight หลังจากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 200 mM EDTA (pH 8.0) ปริมาณ 2  $\mu\text{l}$  แล้วนำ probe ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C โดยก่อนนำ probe มาใช้ต้อง heat ที่ 100°C 10 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันทีทุกครั้ง

#### B. Southern blotting by vacuum technique

run gel และ depurination gel ด้วย 0.25 M HCl 10 นาที (shake ที่อุณหภูมิห้อง) แล้วตัดกระดาษ nitrocellulose ให้พอดีกับขนาด gel โดยแช่กระดาษใน DW และ 20X SSC 10-20 นาที จากนั้นวางกระดาษกรอง, nitrocellulose membrane, และ gel บนเครื่อง vacuum แล้วเติมสารละลายต่างๆ ดังนี้ 1. depurination solution (ทิ้งไว้ 30 นาที) 2. neutralization solution (30 นาที) และ 3. transfer solution (90 นาที) ตามลำดับ จากนั้นจึงล้าง membrane ด้วย 2X SSC เป็นเวลา 5 นาที ชับ membrane ให้แห้ง และ fix membrane ด้วย UV ด้านละ 3 นาที เก็บ membrane ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หรือทำ pre-hybridization ได้เลย

#### C. Pre-hybridization and hybridization technique

ทำการเติม pre-hybridization solution (น้ำยาสำเร็จรูป) 20 ml ต่อ 100  $\text{cm}^2$  ของ membrane pre-hybridization ที่ 42°C เป็นเวลา 3-6 ชม. หรือ overnight จากนั้นเติม probe แล้ว hybridize ที่ 42°C overnight (probe 10  $\mu\text{l}$  + hybridization solution 10 ml) และล้าง membrane ด้วย high stringency โดย shake ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที (2 รอบ) ล้าง membrane ด้วย low stringency โดย shake ใน water bath ที่อุณหภูมิ 45-50°C เป็นเวลา 20 นาที (2 รอบ) หลังจากนั้นเติม 1X blocking reagent 10 ml โดย dilute ใน Maleic acid buffer (pH 7.5) เป็นเวลา 60 นาที และเติม anti-DIG โดย dilute anti-DIG ใน 1X blocking reagent เป็นเวลา 1 ชม. แล้วล้าง membrane ด้วย 1X washing buffer โดย shake ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที (2 รอบ) และล้างด้วย 1X detection solution โดย shake ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย color-substrate solution (NBT/BCIP) โดย dilute ใน 10 ml

detection buffer หลังจากนั้นจะปรากฏแถบสีขึ้นบน membrane (ทำในที่มืด) แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม double DW หรือ TE buffer (50 ml) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นถ่ายภาพเก็บไว้

ในขั้นตอนยืนยันผลโดยวิธี Southern blot นี้ ยังไม่ได้ทำการศึกษาวิจัย เนื่องจากอยู่ระหว่างการเก็บตัวอย่างและตรวจสอบผลเบื้องต้น โดยวิธี PCR

### 3.2.4.5 การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหาร โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบวิธีมาตรฐาน

#### A. การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อบันทึกจำนวนจุลินทรีย์ (Bacterial colony count) [23]

ชั่งตัวอย่างอาหารมา 50 กรัม ใส่ใน phosphate-buffer saline (PBS) ปริมาตร 450 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการเจือจาง 10 เท่า จนถึงระดับความเจือจาง  $1:10^5$  จากนั้นจึงจุดตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มล. มาเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี spread plate ลงบนอาหาร Plate count agar (PCA) (Oxoid) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จึงนำมาบันทึกจำนวนโคโลนีของเชื้อและรายงานผลเป็น colony forming unit (CFU)/กรัมตัวอย่างอาหาร

#### B. การตรวจหาและระบุเชื้อ *S. aureus* [23]

ชั่งตัวอย่างอาหารมา 50 กรัม ใส่ใน phosphate-buffer saline (PBS) ปริมาตร 450 มล. ผสมให้เข้ากันประมาณ 2 นาที แล้วทำการเจือจาง 10 เท่า จนถึงระดับความเจือจาง  $1:10^4$  จึงทำการตรวจนับจำนวนเชื้อโดยวิธี Most probable number (MPN method) ตามวิธีมาตรฐานของ BAM โดยจุดตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มล. มาเพาะเลี้ยงเชื้อใน TSB (+10% NaCl และ 1% sodium pyruvate) แล้วนำไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดที่มีความขุ่นมา streak ลงบนอาหาร Baird-Parker with egg yolk tellurite emulsion agar (Biomark, India) แล้วนำไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี (typical colony) ของ *S. aureus* ซึ่งมีลักษณะดังนี้ โคโลนีสีดำ, มันวาว, ผิวหนานูน และมีลักษณะคล้าย clear zone รอบๆ โคโลนี จากนั้นจึงนำ typical colony นั้นมาทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ได้แก่ Gram's stain [38], Catalase test [38], Coagulase test [23], PR-mannitol และ PR-Glucose fermentation

#### C. การตรวจหาและระบุเชื้อ *Salmonella* spp. [23]

ชั่งตัวอย่างอาหารมา 25 กรัม ใส่ใน buffered peptone water (BPW) 225 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งสารแขวนลอยเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 จุดสารแขวนลอยปริมาตร 0.1 มล. และ 1 มล. ใส่ลงใน secondary enrichment media จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ Rappaport-Vassiliadis (RV) medium และ Tetrathionate (TT) broth ปริมาตร 10 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $42^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ RV broth และ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับ TT broth จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Salmonella-Shigella (SS) agar และ Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar แล้วนำไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

สังเกตลักษณะโคโลนี (typical colony) ของ *Salmonella* spp. บน SS agar และ XLD agar ซึ่งมีลักษณะดังนี้คือ โคโลนีสีดำและมีลักษณะคล้าย clear zone รอบๆ โคโลนี และโคโลนีสีแดง ขนาด 3-5 มม. อาจมีหรือไม่มีสีดำตรงกลางโคโลนี ตามลำดับ

ส่วนที่ 2 ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility) ในอาหาร Modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) โดยใช้ pasture pipette คูดสารแขวนลอยขึ้นมาและหยดลงบนผิวหน้าอาหาร MSRV เป็น 4 มุม ในแนวตั้งจาก จุดละ 1 หยด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการเคลื่อนที่ของ *Salmonella* spp. บนอาหาร MSRV ซึ่งมีลักษณะคล้าย precipitin band จากนั้นจึงนำโคโลนีที่ให้ผลบวกไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร SS agar และ XLD agar แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น ซึ่งถือว่าเป็น Positive colony นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยใช้อาหารทดสอบได้แก่ Triple Sugar Iron (TSI), Motile-Indole (MI), Lysine (L), Urea-Phenylalanine agar และ Citrate (C)

#### D. การตรวจหาและระบุเชื้อ *Shigella* spp. [81]

ชั่งตัวอย่างอาหารมา 25 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Shigella* broth (SB) ที่มียาปฏิชีวนะ novobiocin ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ปริมาตร 225 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยงลงใน SS agar และ XLD agar แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี (typical colony) ของ *Shigella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar (โคโลนีขนาดเล็ก สีใส ขอบเรียบ ผิวหนานูน) และ XLD agar (โคโลนีสีแดง 2-4 มม. ขนาด ขอบเรียบ ผิวหนานูน) จากนั้นจึงนำโคโลนีดังกล่าว มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่นเดียวกับเชื้อ *Salmonella* spp

#### E. การตรวจหาและระบุเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* [23]

ชั่งตัวอย่างอาหารมา 25 กรัม ใส่ใน Alkaline peptone water (APW), pH 8.4 ปริมาตร 225 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง สำหรับ *V. cholerae* และ overnight สำหรับ *V. parahaemolyticus*) จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS, Oxoid) แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี (typical colony) ของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีลักษณะดังนี้คือ *V. cholerae* (โคโลนีสีเหลือง, ขนาด 2-3 mm, เรียบแบน) และ *V. parahaemolyticus* (โคโลนีสีเขียวแกมน้ำเงิน ขนาดใหญ่) จากนั้นจึงนำ typical colony มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ Oxidase test, ความสามารถในการเจริญในความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ (0, 3, 8, 10 % NaCl) และใช้อาหารทดสอบได้แก่ Triple Sugar Iron (TSI), Motile-Indole (MI), และ Lysine (L)

### 3.2.4.6 การตรวจหา enterotoxin และ toxic shock syndrome toxin ของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี reverse passive latex agglutination (RPLA)

**การเตรียมเชื้อ *S. aureus*** : ทำโดยนำโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* ที่ให้ผลการทดสอบ coagulase เป็นบวก จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงใน brain heart infusion (BHI) broth ปริมาตร 3 มล. แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000×g เป็นเวลา 2-3 นาที

**การทดสอบ** : ดูดเอาส่วนน้ำใสส่วนบน มาทดสอบ enterotoxin และ toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) โดยใช้ชุดทดสอบ Reversed passive latex agglutination kit (SET-RPLA and TST-RPLA, Oxoid) จากนั้นรายงานผลการทดสอบโดยดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มระหว่างแอนติเจน คือ Staphylococcal enterotoxin ชนิด A, B, C, D และ toxic shock syndrome toxin ที่ผลิตโดยเชื้อ *S. aureus* กับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ enterotoxin และ toxic shock syndrome toxin

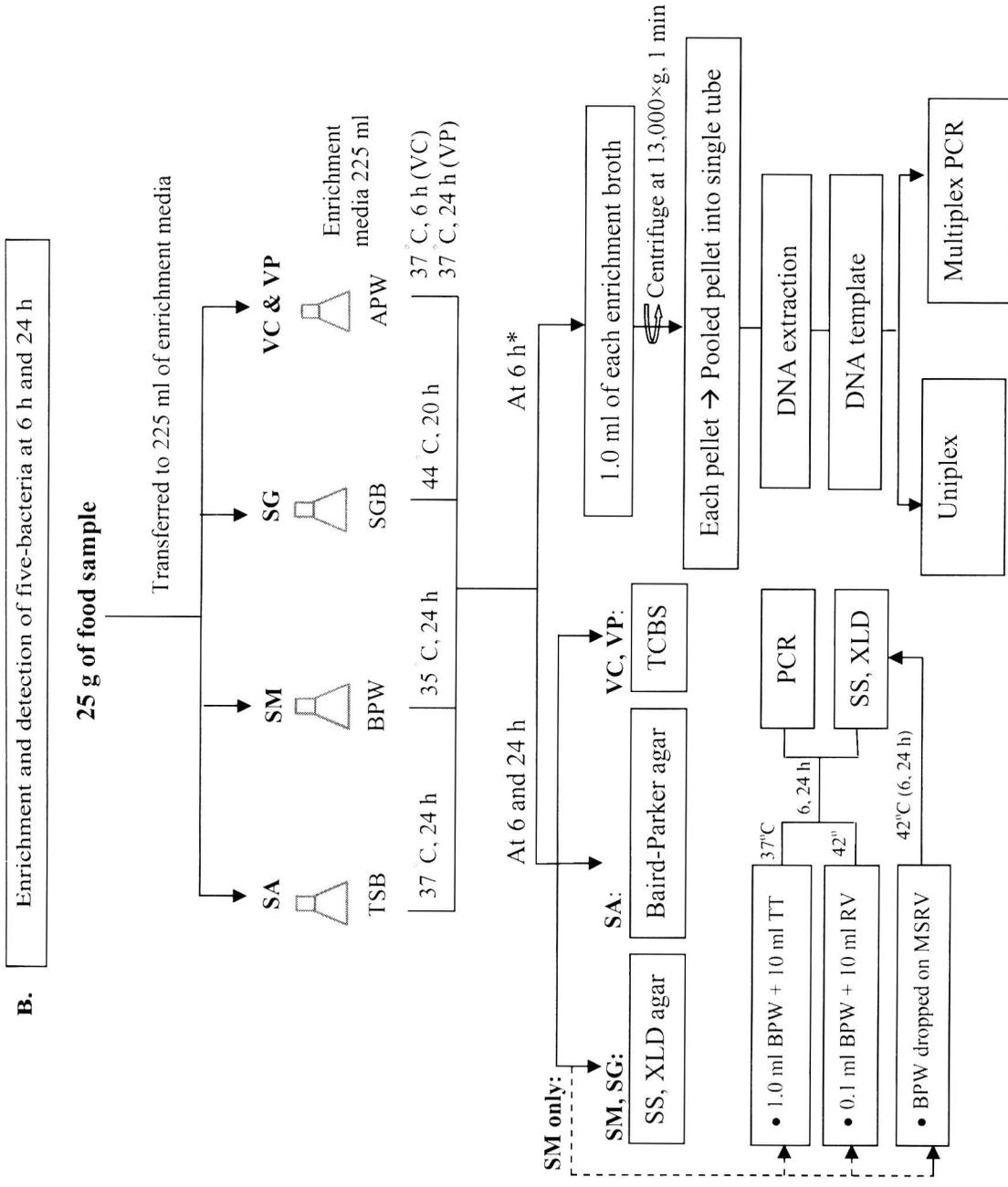
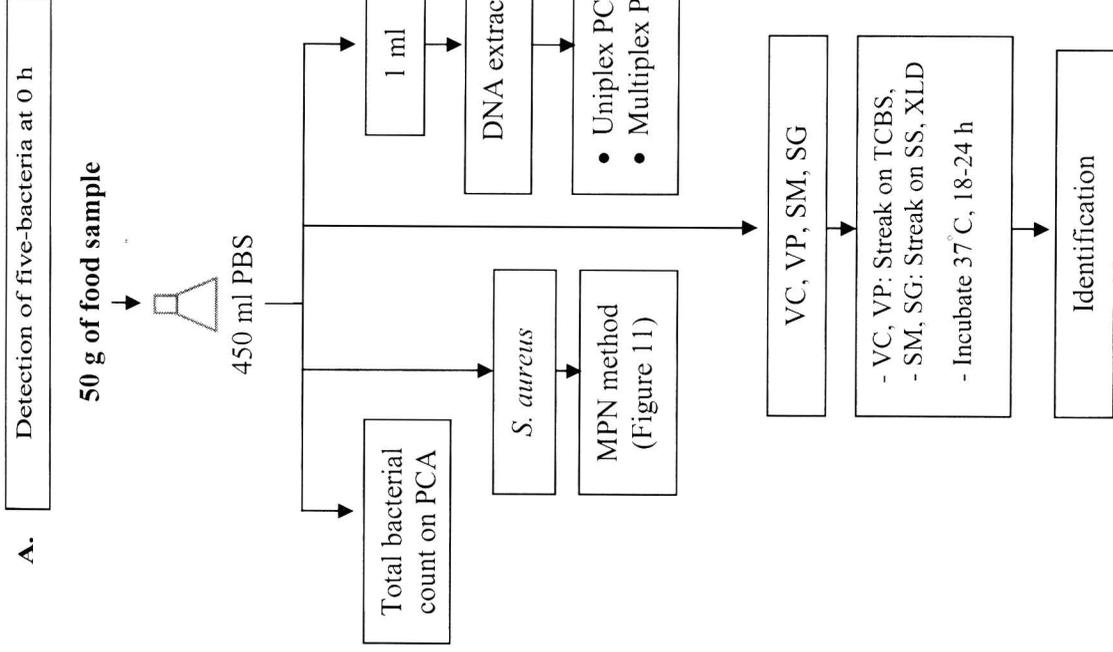
### 3.2.4.7 การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Disk agar diffusion

**การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์** : นำโคโลนีของเชื้อซึ่งเจริญในอาหาร Blood agar plate จำนวน 2-3 โคโลนี มาทำ direct suspension ใน 2 มล. ของ 0.85% normal saline solution ให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับความเข้มข้นของ Mc Farland No. 0.5

**การทดสอบ** : ใช้ swab จุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อที่เจือจางแล้วและนำมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (หนาประมาณ 5-6 ซม.) เป็น 3 ระนาบ ทิ้งให้ plate แห้งประมาณ 3-5 นาที จึงวาง Disk ที่มีตัวยานชนิดต่างๆ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง

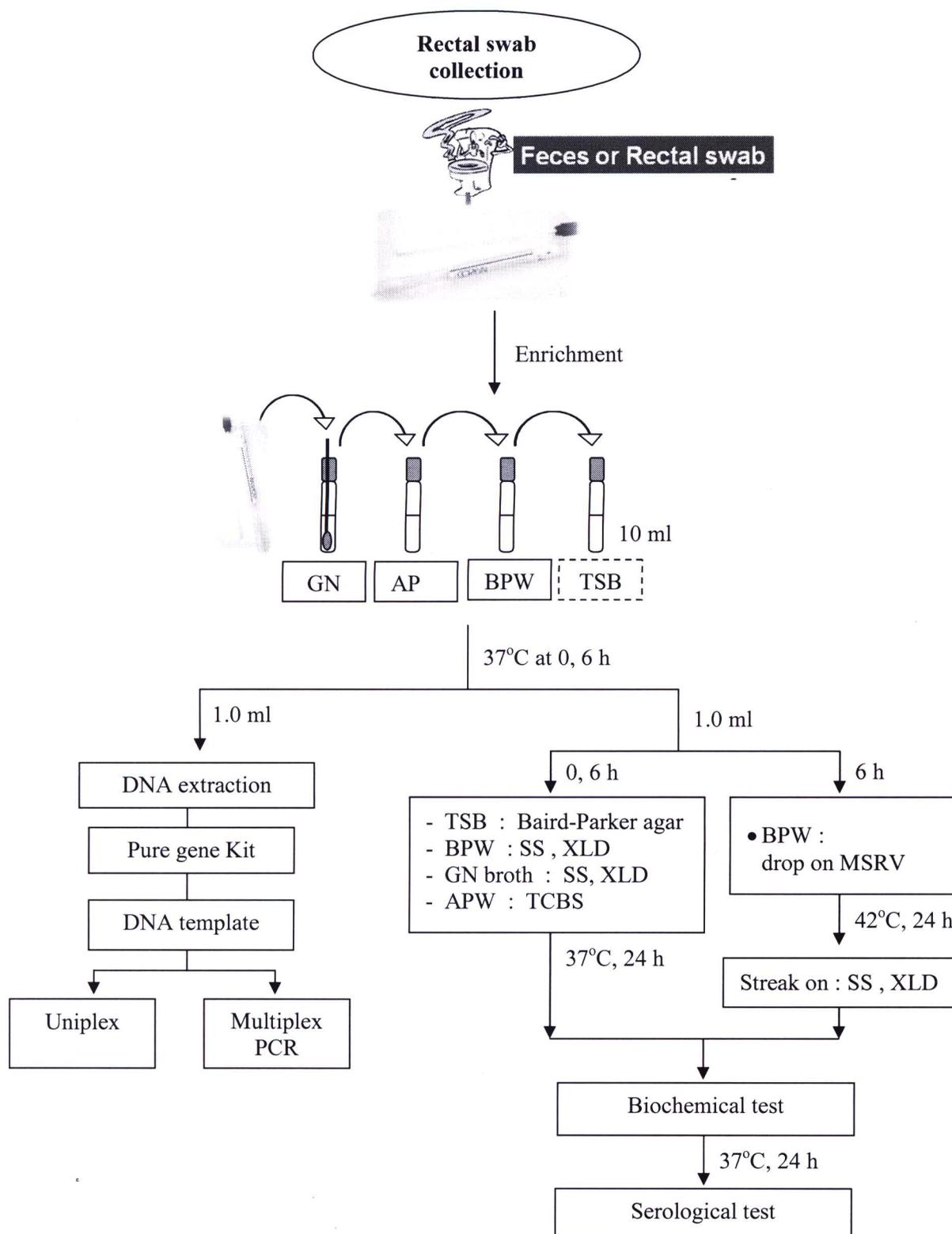
**การอ่านผลการทดสอบ** : วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone แล้วนำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับค่าในตารางมาตรฐานของ CLSI โดยรายงานเป็น Sensitivity (S), Intermediate sensitive (I) และ Resistant (R) ดังตารางที่ 3.4 และ 3.5





**รูปที่ 3.1** กระบวนการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงจำนวน 5 ชนิดในตัวอย่างอาหาร. (A) การตรวจหาเชื้อทั้ง 5 ชนิดที่เวลา 0 ชั่วโมง, และ (B) การ enrichment เชื้อ. (TSB= Tryptic soy broth containing 10% NaCl and 1% sodium pyruvate, BPW= buffer peptone water, SGB= sodium pyruvate, SGB= buffer peptone water, SGB= *Shigella* broth with novobiocin (0.5µg/ml), APW=alkaline peptone water, MPN= Most probable number.

\* ถ้า multiplex PCR ให้ผลลบ, จะทำการตรวจตัวอย่างอาหารที่เวลา 12 หรือ 24 ชั่วโมงหลัง enrichment โดยวิธี multiplex PCR หรือ uniplex PCR



รูปที่ 3.2 กระบวนการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงจำนวน 5 ชนิดในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (rectal swab sample)

ตารางที่ 3.4 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *S. aureus* และการแปลผลจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

Antimicrobial agent	Disk content ( $\mu\text{g}$ )	Zone diameter, Nearest whole mm		
		Resistant (R)	Intermediate (I)	Susceptible (S)
1. Cefoxitin (FOX)	30	$\leq 21$	-	$\geq 22$
2. Gentamicin (GN)	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
3. Cephalotin (CP)	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
4. Erythromycin (E)	15	$\leq 13$	14-22	$\geq 23$
5. Clindamycin (DA)	2	$\leq 14$	15-20	$\geq 21$
6. Fosfomycin	50	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$
7. Vancomycin	30	-	-	$\geq 15$
8. Teicoplanin	30	$\leq 10$	11-13	$\geq 14$
9. Cotrimoxazole (SXT)	1.25/23.75	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$
10. Ciprofloxacin (CIP)	5	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$
11. Ampicillin (AM)	10	$\leq 28$	-	$\geq 29$

ที่มา : CLSI ,2007 [25]

ตารางที่ 3.5 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และการแปลผลจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

Antimicrobial agent	Disk content ( $\mu\text{g}$ )	Zone diameter, Nearest whole mm		
		Resistant (R)	Intermediate (I)	Susceptible (S)
1. Cotrimoxazole (SXT)	1.25/23.75	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$
2. Ampicillin (AM)	10	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$
3. Choramphenicol (C)	30	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$
4. Norfloxacin (NOR)	10	$\leq 12$	13-16	$\geq 17$
5. Ofloxacin (OFX)	5	$\leq 12$	13-15	$\geq 16$
6. Tetracycline (TE)	30	$\leq 11$	12-14	$\geq 15$
7. Cefotaxime (CTX)	30	$\leq 14$	15-22	$\geq 23$
8. Gentamicin (CN)	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
9. Nalidixic acid (NA)	30	$\leq 13$	14-18	$\geq 19$
10. Ciprofloxacin (CIP)	5	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$

ที่มา : CLSI ,2007 [25]

### 3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล

- 3.3.1 หาปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุดที่จะตรวจพบขึ้น โดยวิธี multiplex PCR (cells/25g of food or cells per PCR reaction)
- 3.3.2 หาเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 5 ชนิด ในอาหารแต่ละชนิด โดยวิธี multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อ
- 3.3.3 หาเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 5 ชนิด ในสิ่งส่งตรวจอุจจาระผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง โดยวิธี multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อ
- 3.3.4 หาเปอร์เซ็นต์การตรวจพบยีนสร้างสารพิษชนิดซูเปอร์แอนติเจนของเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร โดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับวิธี RPLA assay
- 3.3.5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคือยาของเชื้อแต่ละชนิดที่แยกได้จากอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง