บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเป็นสิ่งสำคัญในการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ การควบคุมและการป้องกันโรคติดเชื้อ รวมถึงความปลอดภัยของประชาชนที่บริโภคอาหาร *Campylobacter* spp. เป็นเชื้อก่อโรคตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยที่เรียกว่า Campylobacteriosis ในมนุษย์ (Friedman, 1996) มีการรายงานการระบาดของเชื้อ *C. jejuni* ในหลายๆพื้นที่ และหลายๆแหล่ง เช่น มีรายงานการพบการติดเชื้อ *C. jejuni* ในประเทศ เดนมาร์ค และสเปน ส่วนใหญ่จะพบการติดเชื้อจากสัตว์ปีกเป็นส่วนใหญ่ (Kadrin, 2009) ยังมีการรายงานการติดเชื้อ *C. jejuni* ใน 24 ประเทศของกลุ่มEU ในปี 2005 พบว่าใน 100,000 รายของผู้ติดเชื้อ มี 51.6 ราย ที่มีอาการเกิดความเจ็บป่วยที่เรียกว่า Campylobacteriosis และพบการปนเปื้อนจากพวกสัตว์ปีก ในกระบวนการ การฆ่าและชำแหละ และยังมีการรายงานอย่างต่อเนื่องในปี 2006 ในประเทศของกลุ่ม EU ยังพบการติดเชื้อ *C. jejuni* พบว่าใน 100,000 รายของผู้ติดเชื้อ มี 63.4 รายที่เกิดโรค Campylobacteriosis ซึ่งใน เบลเยี่ยมพบการติดเชื้อของ *C. jejuni* ในประชากรถึง 91% และมีการรายงานการปนเปื้อนจากโรงฆ่าสัตว์ 72% ,พบการปนเปื้อนหลังจากการฆ่าถึง 79% (Winy, 2009) และในเขตกรุงเทพมหานครมีรายงานการแพร่กระจายของ *C. coli* ร้อยละ 66.6 และ *C. jejuni* ร้อยละ 26.6 ในไก่สดและไก่แช่แข็ง (จริยาและสุวนี, 2543)

ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความต้องการวิธีที่รวดเร็ว มีความเป็นอัตโนมัติ และมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *C. jejuni* เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลานานและมีการปฏิบัติหลายขั้นตอนตั้งแต่การ เพิ่มจำนวนเชื้อ การคัดแยกเชื้อ การทดสอบทางชีวเคมี และการยืนยันผลด้วยวิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา ซึ่งขบวนการเหล่านี้ทำให้ต้องใช้เวลานานมากในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะ *C. jejuni* ที่ต้องใช้เวลานานในการเจริญและต้องการสภาวะแวดล้อมต่างๆที่เหมาะสม มีการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่รวดเร็ว เช่น PCR, ELISA, Piezoelectric biosensors, Amperometric biosensor, Potentiometric biosensor, Surface plasmon resonance (Ow, 2005), Fluorescent Labelling (Pyle, 1999), Flow cytometry และ Fluorescent Nanoparticle Bioconjugate (Hun, 2007) แต่ละวิธีมีทั้งความได้เปรียบและข้อจำกัดในการตรวจวัดที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสิ่งตรวจวัดและการประยุกต์ใช้งาน

Fluorescent doped silica nanoparticles bioconjugate (FDS-NPs) เป็นวิธีการที่เป็นที่คาดหวังในความสำเร็จต่อการวิเคราะห์ในงานด้านชีวภาพขณะนี้ เนื่องจากอนุภาคซิลิกานาโนที่มีการบรรจุสีฟลูออเรสเซนท์ไว้ภายใน มีคุณสมบัติที่ดีต่อการนำมาใช้งาน เนื่องจากข้อจำกัดในการตรวจวัดต่ำ ใช้สารในการทำปฏิกิริยาน้อยสามารถสังเคราะห์ได้ง่ายด้วยวิธีพื้นฐานทั่วไป (Harman, 2004) (Valanne, 2005) มีโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนท์ที่บรรจุอยู่ภายในอนุภาคจำนวนมากช่วยเพิ่มสัญญาณการเรืองแสงในการตรวจวัด มีความเข้มของการเรืองแสงมาก มีโครงสร้างซิลิกาป้องกันการเกิดการซีดจางของสีเมื่อสัมผัสกับแสง และให้แสงที่เสถียรเหมาะกับใช้งานที่ต้องการวิเคราะห์ทั้งในการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ และการวิเคราะห์โรคที่ได้จากภาพทางการแพทย์ (Santra, 2001; Lian, 2004; Yang, 2004) นอกจากนี้อนุภาคซิลิกานาโนสามารถดัดแปลงพื้นผิวได้หลากหลายทำให้มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลชีวภาพได้หลายชนิด และมีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายที่ต้องการศึกษา

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน ขนาดของอนุภาค โครงสร้างลักษณะ และการกระจายตัวของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ด้วยวิธีของ (ธัญภัค สุวรรณชาติ, 2551) ทำการศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนโดยการตรวจด้วยเครื่อง Transmission electron microscope (TEM) ,X-ray diffraction และหาความเข้มแสงโดยใช้ เครื่องวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนท์ (Spectrofluorometer) และศึกษาการเกาะกลุ่มของอนุภาคนาโน เพื่อลดความผิดพลาดในการมองเห็นของกลุ่มอนุภาคนาโน รวมถึงการศึกษาจำนวนเซลล์ภายใต้กล้อง epifluorescence microscope และตรวจสอบการจับกันด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) และผลการวิจัยนี้ยังสามารถนำไปตรวจสอบกับเชื้อจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนจากสถานที่จริง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 การพัฒนาชุดทดสอบเพื่อตรวจหา *Campylobacter jejuni* ภายใต้กล้อง epifluorescence microscope โดยเปรียบเทียบกับวิธีนับเชื้อ (Conventional method)

1.2.2 พัฒนาอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน ทางด้านกายภาพให้มีประสิทธิภาพในการจับเชื้อ *Campylobacter jejuni* สูงที่สุด

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 สังเคราะห์ FDS-NPs โดยวิธี microemulsion ร่วมกับ sol-gel โดยประยุกต์ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์

1.3.2 การตรวจวิเคราะห์ FDS-NPs ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธี

- วิเคราะห์อนุภาคนาโนโดยศึกษาจาก ขนาด, รูปร่าง และความสม่ำเสมอโดยทำการตรวจด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscopy (TEM)
- ทำการวิเคราะห์ความยาวช่วงคลื่น Excitation-Emission Wavelength เพื่อหาความเข้มแสงของอนุภาค โดยทำการศึกษาด้วยเครื่อง Spectrofluorometer
- วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวอนุภาคซิลิกานาโนที่มีการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวโดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด (Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrometer)

1.3.3 ศึกษาการการกระจายตัว และวิธีแก้ไขของ FDS-NPs ซึ่งมีผลกระทบต่อการเรืองแสงของอนุภาค (False positive)

1.3.4 ศึกษาจำนวน *C. jejuni* ภายใต้กล้อง Epifluorescence microscope และตรวจสอบการจับกันด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopy (SEM)

1.3.5 ศึกษาการตรวจปริมาณ *C. jejuni* ในไก่ก่อนการผลิต โดยการ swab test โดยใช้อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนเปรียบเทียบกับทางห้องปฏิบัติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับ

- สามารถพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ *Campylobacter jejuni* ในอาหารด้วยวิธีรวดเร็ว ลดขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องใช้เวลานาน ใช้สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือน้อยลง และลดปริมาณของเสียที่เกิดจากการทดสอบ
- พัฒนาการตรวจวิเคราะห์ให้ใช้ขั้นตอนน้อย ใช้งานง่าย สะดวก ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เทียบเท่าวิธีมาตรฐาน
- สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเพื่อพัฒนาชุดทดสอบตรวจเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ในงานทางด้านความปลอดภัยอาหาร ทางคลินิก และเพื่อผลิตทางการค้าต่อไปในอนาคต