ISSN 3027-6357 (Print)
ISSN 3027-6365 (Online)

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 32 ฉบับที่ 4 (กรกฎาคม-สิงหาคม 2567) หน้า [43-53]

พัฒนาการตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างน้ำอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค Real-time PCR

Development of Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* in Water by Real-time PCR Technique

พจชนาถ พัทบุรี*, ธัญทิพย ชูเพชร
สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 9000
Pojchanad Pathaburee*, Tanyatip Chupet
Office Of Scientific Instrument and Testing, Prince of Songkla University, Songkhla 90110
Received 28 May 2023; Received in revised 21 January 2024; Accepted 7 March 2024

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำที่สำคัญได้แก่ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. ซึ่งแบคทีเรียเชื้อ *S. aureus* ที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษ พบได้ทั่วไปอยู่ตามผิวหนัง ทางเดินหายใจ บาดแผลของมนุษย์ การตรวจวินิจฉัยโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบตามวิธีทางชีวเคมีประมาณ 3 วัน และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทางด้านจุลินทรีย์ในการแยกและจำแนกชนิดเชื้อ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค Real time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในน้ำเป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดและเป็นปฏิกิริยาที่มีความไวสูงสามารถตรวจสอบเชื้อที่ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย โดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อได้ที่ปนเปื้อน 4,200 CFU/mLโดยไม่ต้องนำไปบ่มเพิ่มปริมาณเชื้อ และใช้เวลาในการตรวจสอบที่สั้นประมาณ 45 นาที ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค Real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวและจำเพาะสูงซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำได้

คำสำคัญ: เชื้อ *S. aureus*; Real-time PCR; *Nuc* gene

Abstract

The important microorganisms that contaminate water include *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* sp., with a particular emphasis on the extensively studied *S. aureus*, commonly found on the skin, in the respiratory tract, and in human wounds. This research focuses on the development of real-time PCR technology for the detection of *S. aureus* in water. Real-time

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** pojchanad.j@psu.ac.th

Science32-N4.indd 43 8/8/2567 BE 15:02

PCR, known for its specificity to individual pathogen DNA and high sensitivity, enables quantitative detection of targeted pathogens with minimal sample quantities. The method allows testing at contamination levels as low as 4200 CFU/mL without additional processing. Remarkably, the detection process takes only about 2 hours. This study underscores the heightened sensitivity and specificity of the developed real-time PCR technology, making it a viable and efficient method for detecting *S. aureus* in water samples.

Keywords: *S. aureus*; Real-time PCR; *Nuc* gene

1. บทนำ

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำที่สำคัญ ได้แก่ *Staphylococcus aureus (*S. aureus*)* , *Escherichia coli, Salmonella* sp. ซึ่งแบคทีเรีย *S. aureus* พบอยู่ตามผิวหนัง ทางเดินหายใจ บาดแผลของมนุษย์ [7] เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง บาดแผล ระบบปัสสาวะ ปอด กระแสเลือด การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ (Respiratory tract infection) [6, 12] ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อในน้ำดื่มโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างที่ต้องสงสัยในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Baird Parker agar และนำโคโลนีมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว เมื่อให้ผลบวกนำทดสอบการสร้างเอนไซม์ Coagulase การตรวจสอบใช้เวลาประมาณ 3 วัน [2] และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทางแบคทีเรียในการแยกเชื้อและตรวจสอบเพื่อจำแนกชนิดเชื้อ ต่อมาได้มีการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค dot ELISA แต่อาจเกิดปฏิกริยาข้ามได้ [9] และมีการนำเทคนิคการตรวจสอบรวดเร็ว (rapid test) สำหรับสแตปฟิโลคอคคัสออเรียสหลายวิธี แต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีปริมาณแบคทีเรีย 10^4-10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก [20] ปัจจุบันการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอเป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากให้ผลรวดเร็วและมีความจำเพาะสูง เช่น การนำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR polymerase chain reaction) [3] ตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ทั้งในอาหารและในนม [4, 15, 16] โดยสามารถตรวจสอบสแตปฟิโลคอคคัสออเรียสได้ ภายใน 4-6 ชั่วโมงหลังจากสกัดดีเอ็นเอ [7] ซึ่งเป็นวิธีรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นเช่น ELISA [18] นอกจากนี้การตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค Real time PCR ได้รับความสนใจศึกษาโดยการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดเชื้อ *S. aureus* ตรวจสอบในส่วน *nuc* gene เป็นยีนเกี่ยวกับ Extracellular thermostable nuclease ของเชื้อ [8] และ *femA* [17] รวมทั้งยีนเกี่ยวกับการดื้อยา *mecA* และ *pvl* [11] ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อหา primer ที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ในน้ำซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวสูง สามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณเพียงเล็กน้อย และศึกษาความไวของวิธีเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจสอบที่มีคุณภาพและประหยัดทั้งเวลารวมทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจหาเชื้อต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

การดำเนินการวิจัย เริ่มจากการหา primer ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ primer ส่วน *nuc* gene และ *FemA* gene ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษา

1) ตัวอย่าง Positive Control เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เชื้อนำมาขีดบนอาหาร baird parker agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง

Science32-N4.indd 44 8/8/2567 BE 15:02

2) ตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ *Staphylococcus argenteus* (*S. argenteus*), *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*) เชื้อนำมาขีดบนอาหาร baird parker agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง, เชื้อ *Salmonella* sp. นำเชื้อขีดบนอาหาร XLD agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) นำเชื้อขีดบนอาหาร Endo's medium บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง

นำโคโลนีของเชื้อประมาณ 5-10 โคโลนีผสมในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร นำมาสกัดดีเอ็นเอ

2.1 ตรวจสอบความจำเพาะของ primer ในส่วน *Nuc* gene และ *femA* gene

เชื้อ *S. aureus*, *S. argenteus, S. intermedius, Salmonella* sp. และ เชื้อ *E. coli* ที่ผ่านการยืนยันชนิดเชื้อด้วยเทคนิค MALDI Biotyper เลี้ยงในอาหาร Selective media นำโคโลนีสกัดดีเอ็นเอ

1. สกัดดีเอ็นเอ นำ Culture media เชื้อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีชุดสกัด GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) แล้ว Elute ดีเอ็นเอ ด้วย Elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตรได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่อง Nano drop lite (Thermo Scientific, USA) แล้วปรับให้มีความเข้มข้น 20-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

2. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *nuc* gene, *femA* gene เตรียมสารละลายในหลอดทดลอง ประกอบด้วย High fidelity PCR (Thermo Scientific, USA) 10 ไมโครลิตร, DMSO 0.6 ไมโครลิตร, DNA 2 ไมโครลิตร, Primer 2.5 ไมโครโมลาร์ forward primer และ reverse primer [14] ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเข้าเครื่อง PCR (PE Applied Biosystems, USA) ซึ่งรอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เวลา 0.50 นาที, 54 องศาเซลเซียส เวลา 0.50 นาที, 72 องศาเซลเซียส เวลา 0.50 นาที จำนวน 30 รอบและ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที นำ PCR product ตรวจสอบโดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Gel Electrophoresis จะเห็นแถบดีเอ็นเอ แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย SYBR Safe ถ่ายภาพ ด้วยเครื่อง Gel Documentation (GEL DOC 1000, Hongkong) นำ PCR product หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN

Sequences of nucleotide primers

GENES	Primers	Primer Sequences	Tm (°C)
nuc	forward primer	5' GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT 3'	54
	reverse primer	5'AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA 3'	54
femA	forward primer	5'AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG 3'	54
	reverse primer	5'GAT AAA GAA GAA ACC AG AG 3'	54

Science32-N4.indd 45 8/8/2567 BE 15:02

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและความไวของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Real-time PCR

ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษา

1) ตัวอย่างน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เติมเชื้อ *S. aureus* จำนวนโคโลนี 1 ทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่ระดับต่าง ๆ คือ 1: 10 1:100 1:1000 และ 1:10000 ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2) ตัวอย่างน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เติมเชื้อ *S. aureus* จำนวนโคโลนี 1 โดยกรองน้ำทั้งหมดบนกระดาษกรอง Filter membrane แล้วนำ Filter membrane ใส่ลงใน Brain Heat Broth 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3) ตัวอย่าง Positive Control เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* นำมาขีดบนอาหาร Baid parker agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *S. aureus* จำนวน 10 โคโลนีนำมาละลายในน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็น template สำหรับปฏิกิริยา Real time PCR

4) ตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ *S. argenteus*, *S. intermedius*, *Salmonella* sp. และ *E. coli* นำเชื้อแต่ละชนิดที่เลี้ยงในอาหาร selective media จำนวน 10 โคโลนีนำมาละลายในน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรเป็นดีเอ็นเอควบคุมที่เป็นลบสำหรับปฏิกิริยา Real time PCR

2.1 ออกแบบ probe เพื่อใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real time PCR โดยนำลำดับนิวคลีไอไทด์จากเทคนิค PCR ออกแบบ probe โดยใช้โปรแกรม primer 3 ที่ออกแบบในงานวิจัยครั้งนี้ โดยหาความไวของปฏิกิริยาในตัวอย่างที่เตรียมดังนี้

2.2 ตัวอย่างน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เติมเชื้อ *S. aureus* จำนวนโคโลนี 1 ทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่ระดับต่าง ๆ คือ 1: 10 1:100 1:1000 และ 1:1000 โดยนำตัวอย่างน้ำที่เติมเชื้อ *S. aureus* ที่ทำการเจือจางเติมลงในปฏิกิริยา Real time PCR โดยตรงซึ่งไม่ได้สกัดดีเอ็นเอปริมาณ 3 ไมโครลิตรต่อการทำปฏิกิริยาเพื่อลดเวลาการทดสอบโดยเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

2.3 หาปริมาณความเข้มเข้นเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี AOAC รายงานผลเป็น CFU/mL และนำตัวอย่าง

2.4 นำตัวอย่างตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ประกอบด้วยสารละลาย Primer 2.5 ไมโครโมลาร์ forward primer (5’ GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT 3’), Primer 2.5 ไมโครโมลาร์ reverse primer (5’AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA 3’) และ probe 2.5 ไมโครโมลาร์ (5’GGTCCTGAA GCAAGTGCATT), qPCRBIO Probe Blue Mix 10 ไมโครลิตร, template 3 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง Real-time PCR (Applied Biosystems 7300) รอบปฏิกิริยาอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 95 องศาเซลเซียส เวลา 0.50 นาที, 54 องศาเซลเซียส เวลา 0.50 นาที จำนวน 35 รอบและ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ตรวจสอบผลจากกราฟ Amplification plot รวมทั้งประเมินความคุ้มค่าการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

2.3 นำผลการตรวจสอบที่ได้พิจารณา Predictive values และความถูกต้อง (Accuracy)

		การวินิจฉัยจากการตรวจ Microbial quantity	
		ผลบวก	ผลลบ
ผลของการตรวจที่ต้องการทดสอบ Real time PCR	ผลบวก	a	b
	ผลลบ	c	d

Positive predictive value = a / a + b

Negative predictive value = d / c + d

Accuracy = [a + d] / [a + b + c + d] [20]

Science32-N4.indd 46 8/8/2567 BE 15:02

3. ผลการทดลอง และวิจารณ์

3.1 ตรวจสอบความจำเพาะของ primer

หลังจากสกัดดีเอ็นเอและนำเชื้อ *S. aureus* ขยายสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ในส่วน *nuc* gene และ *femA* gene ตรวจสอบ PCR product โดยนำมาแยกบน 2%Agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย SYBR Safe ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV พบว่าสามารถเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส เมื่อใช้ primer ส่วน *nuc* gene โดยให้ผลบวกเฉพาะดีเอ็นเอจากเชื้อ *S. aureus* เท่านั้นแต่เชื้อ *S. argenteus, S. intermedius, Salmonella* sp. และ *E.coli* ให้ผลลบโดยไม่มีแถบ PCR product ปรากฏดัง Figure 1A แต่สำหรับ primer ในส่วน *femA* gene จะให้แถบ PCR product ขนาด 200 คู่เบสดัง Figure 1B จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *S. aureus*, *S. argenteus*, *S. intermedius* และให้ผลลบเชื้อ *Salmonella* sp. และเชื้อ *E.coli* โดยเชื้อ *S. aureus*, *S. argenteus, S. intermedius* เป็นเชื้อใน genus เดียวกัน ซึ่ง primer ในส่วน *femA* gene ไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. aureus* จึงนำ PCR product เฉพาะที่ได้จากส่วนยีน *nuc* gene ทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปเทียบกับฐานข้อมูลสากลพบว่า รายงานเป็นเชื้อ *S. aureus* และนำมาออกแบบ probe สำหรับการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค Real-time PCR ต่อไป ดังแสดง Figure 1

เมื่อนำ PCR product หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) แล้วนำลำดับนิวคลีไอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลใน Gene Bank โดยใช้โปรแกรม BLASTN ให้ผลเปรียบเทียบเป็นเชื้อ *S. aureus* ความเหมือน 99% แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ออกแบบ probe สำหรับตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค real-time PCR

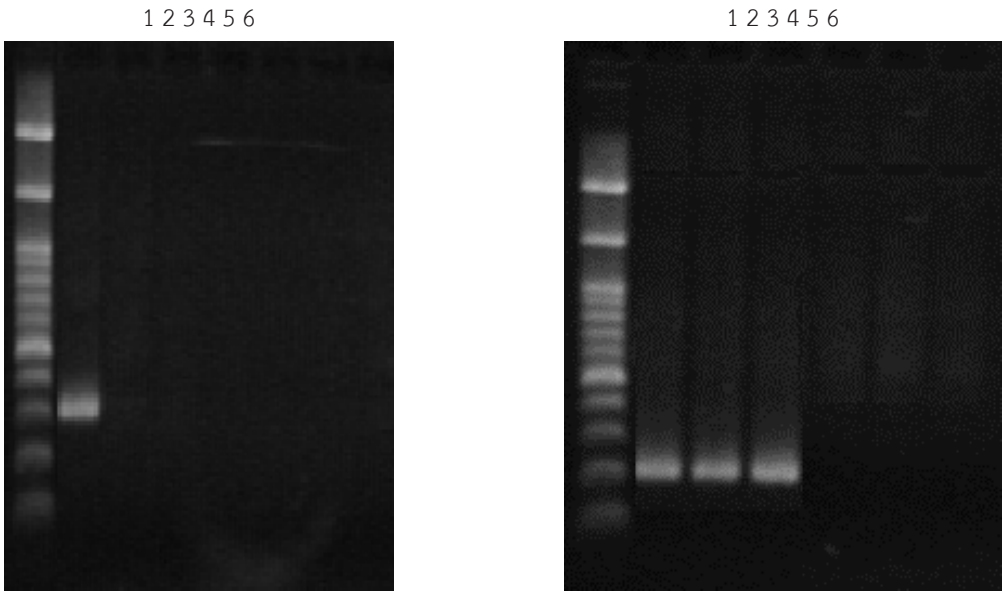

Figure 1 Gel electrophoresis of PCR product form *nuc* gene (A) Lane 1= 100 bp DNA Ladder, Lane 2=positive *S. aureus*, Lane 3= *S. argenteus*, Lane4= *S. intermedius*, Lane 5=*Salmonella* sp, Lane 6=*E. coli* and *femA* gene (B) Lane 1= 100 bp DNA Ladder, Lane 2=positive *S. aureus*, Lane 3= *S. argenteus*, Lane4= *S. intermedius*, Lane 5=*Salmonella* sp, Lane 6=*E.coli*

Science32-N4.indd 47 8/8/2567 BE 15:02

Sequence of probes for real-time PCR

GENE	probe	Sequence	Tm (°C)
Nuc	FAM	5'GGT CCT GAA GCA AGT GCA TT	54

3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและความไวของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ตัวอย่างน้ำปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตรเติมเชื้อ *S. aureus* จำนวน 1 โคโลนีและเจือจางด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่ระดับต่าง ๆ คือ 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 ตัวอย่างละ 3 ซ้ำเมื่อนำตัวอย่างน้ำที่เติมเชื้อเติมลงในปฏิกิริยา Real time PCR โดยตรงโดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ และตัวอย่างจากเชื้อ *S. aureus* จำนวน 1 โคโลนีบ่มที่ 35 องศาเซลเซียวเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี positive control คือเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* จำนวน 10 โคโลนีนับได้ 17,000,000 CFU/mL และ Negative control คือเชื้อจุลินทรีย์ *S. argenteus* พบว่าเมื่อตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค real-time PCR ให้ผลเป็นบวกเฉพาะเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะปรากฏสัญญาณฟลูโอเรสเซน สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ *S. argenteus* ให้ผลเป็นลบไม่ปรากฏการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดัง Figure 2 และสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อระดับต่ำสุดเจือจางที่ 1:100 โดยตัวอย่างทดสอบไม่ต้องผ่านการสกัดดีเอ็นเอและไม่ต้องบ่มตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดัง Figure 2 และ Figure 3 โดยตรวจวัดสัญญาณฟลูโอเรสเซนได้ในรอบการทำปฏิกิริยาที่ 30 (CT value=30 sdv

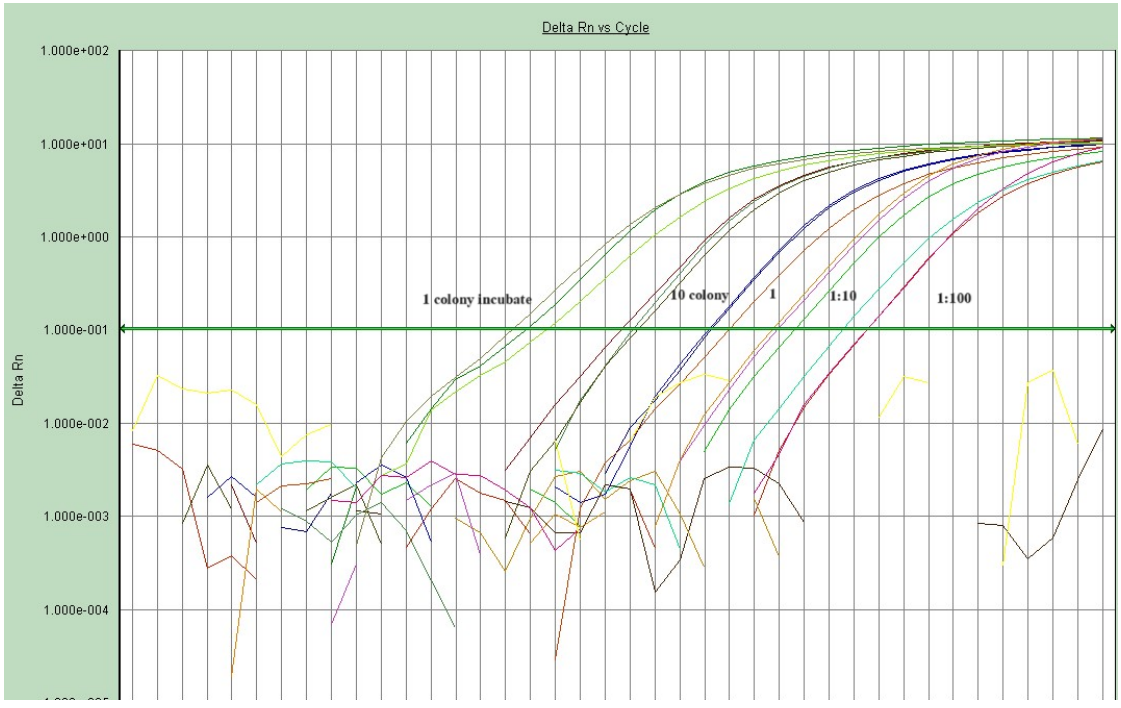

Figure 2 Amplification plot of sensitivity at series contaminated of *S. aureus* in water. 1 colony incubated, 10 colonies, 1 colony, 1:10, 1:100, and other species, *S. argenteus*, provided only the background

Science32-N4.indd 48 8/8/2567 BE 15:02

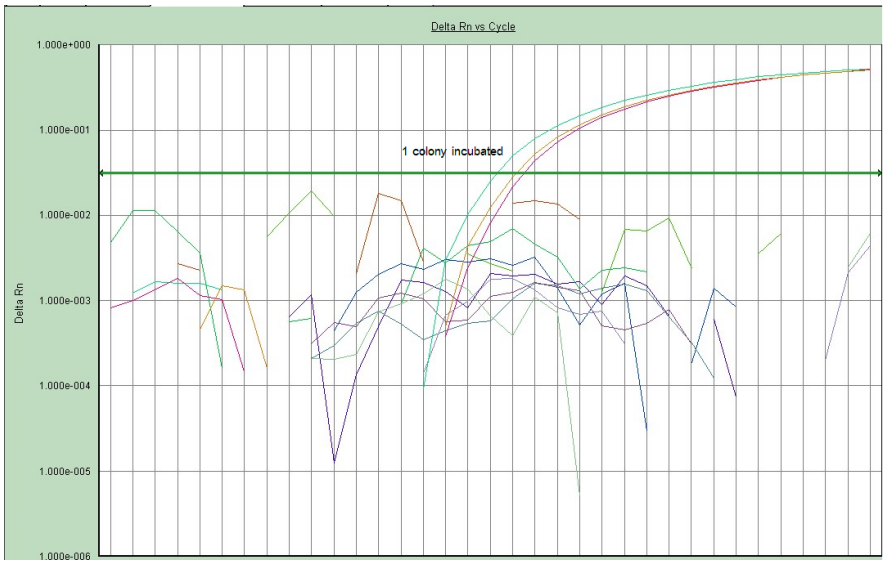

Figure 3 Amplification plot of sensitivity at series contaminated of *S. aureus* in water. 1 colony incubated, 1:1000, 1:10000, and other species, S. argenteus, provided only the background

Table 1 The dilution levels and concentration levels of the microorganisms tested by the real-time PCR technique.

Samples	Microbial quantity (AOAC)	Result in Real-time PCR	Cycle numbers (Ct)
1 colony incubate	(+) no concentration result	positive	16
10 colony	(+) 17,000,000 CFU/mL	positive	21
1 colony	(+) 4,900,000 CFU/mL	positive	24
1 colony diluted (1:10)	(+) no concentration result	positive	27
1 colony diluted (1:100)	(+) 4200 CFU/mL	positive	30
1 colony diluted (1:1000)	(+) no concentration result	negative	-
colony diluted (1:10000)	(-) no concentration result	negative	-
S. argenteus	(-) no concentration result	negative	-
S. intermedius	(-) no concentration result	negative	-
Salmonella sp.	(-) no concentration result	Negative	-
E. coli	(-) no concentration result	negative	-

นำผลพิจารณา ค่า Positive predictive value = a / a + b
ค่า Negative predictive value = d / c + d
ค่า Accuracy = [a + d] / [a + b + c + d] [20]

Science32-N4.indd 49 8/8/2567 BE 15:02

0.5) ระดับความเข้มข้นเชื้อระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้เมื่อเจือจาง 1:100 นับได้ 4200 CFU/mL สำหรับเชื้อ *S. aureus* ที่ผ่านการกรองบนเมมเบรนและนำไปบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมงสามารถตรวจวัดสัญญานฟลูโอเรสเซน รอบการทำปฏิกิริยาที่ 16 (CT value=16.8 sdv 0.4) โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอ แสดงผลใน Table 1

พบว่า Positive Predictive value (PPV) หรือค่าความน่าจะเป็นที่จะเป็นพบเชื้อนั้นจริงเมื่อการตรวจให้ผลบวก การตรวจที่มีความจำเพาะสูงมักจะมีค่า PPV สูง โดยผลที่ได้มีค่า 100% และ Negative Predictive value ค่าความน่าจะเป็นไม่พบเชื้อนั้นเมื่อการตรวจเป็นลบ มีค่า 83% สำหรับค่า Accuracy ของวิธีมีค่า 91% โดยเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ *S .aureus* ในน้ำ ด้วยเทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจเชื้อ *S. aureus* ในระดับต่ำสุดมีความเข้มข้นเชื้อ 4200 CFU/mL และไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอสามารถนำเชื้อในน้ำเติมลงในปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อลดระยะเวลาการตรวจสอบให้รวดเร็วขึ้นได้

4. อภิปรายผลการวิจัย

เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปทั้งในน้ำ ดิน หรือในอาหาร เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารเป็นพิษ มีสาเหตุจากสารพิษของเชื้อทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เป็นเชื้อรูปร่างกลมมักเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น [4] เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* สามารถทนคลอรีนได้ดีกว่าโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จึงสามารถพบเชื้อดังกล่าวในน้ำสระว่ายน้ำ น้ำทะเล ซึ่งทำให้ปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ง่าย [1] การตรวจสอบเชื้อดังกล่าวมีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและยืนยันชนิดด้วยเทคนิคชีวเคมี [2] ซึ่งใช้ระยะเวลาตรวจสอบประมาณ 3-4 วัน นอกจากนี้การตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ 3 M petri film ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูปแบบแผ่นฟิล์ม และการตรวจเชื้อในระดับดีเอ็นเอปัจจุบันเป็นที่นิยม โดย นฤมล และคณะ ได้วิเคราะห์เชื้อ *S. aureus* ในส่วนของยีน *FemA* ด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจสอบเชื้อที่ปนเปื้อนอย่างน้อย 10 เซลล์ในตัวอย่าง [13] เนื่องจากเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* มีหลายชนิดที่มีความสำคัญที่เป็นสาเหตุการเกิดโรค Kim และคณะได้จำแนกชนิดเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* ในอาหาร โดยใช้เทคนิค real time PCR จำแนก S. aureus ระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจพบที่ 1.5×10^2 CFU/mL เชื้อ *S. capitis*, *S. caprae* and *S. epidermidis* สามารถตรวจพบระดับต่ำสุดที่ 2.6×10^2 CFU/mL [5] ในการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* โดยเทคนิค real time PCR โดยใช้ primer ในส่วนของ *nuc และ FemA* gene พบว่า primer ในส่วน *FemA* gene ไม่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ได้เนื่องจากไม่สามารถแยก species เชื้อในระดับ genus เดียวกันได้ โดยให้ผลบวกจากเชื้อ *S. argenteus* และ *S. intermedius* ซึ่งเป็นเชื้อในระดับ genus เดียวกันกับ *S. aureus* อาจทำให้รายงานผลผิดพลาดได้ ในกรณีที่มีเชื้อ genus เดียวกันปนเปื้อนในน้ำอาจรายงานผลผิดพลาดได้ แต่สำหรับ primer ในส่วน *nuc* gene มีความจำเพาะให้ผลบวกเฉพาะดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* แต่เชื้อ *S. argenteus* และ *S. intermedius* ให้ผลเป็นลบเมื่อทำการยืนยันผล PCR product ที่ได้โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ารายงานผลเป็นเชื้อ *S. aureus* ความเหมือน 99% จากการศึกษาของ Odd และคณะได้ตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ส่วน Nuc gene ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อดังกล่าว [14] ในงานวิจัยได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เพื่อใช้ออกแบบ probe โดยติดสาร fluorescence FAM ที่บริเวณ 5’ ของ probe เพื่อเพิ่มความจำเพาะให้กับปฏิกิริยาการตรวจสอบด้วยเทคนิค real time PCR ในงานวิจัยครั้งนี้ศึกษาความไวของการทดสอบเมื่อทำการเติมเชื้อจำนวน 1 โคโลนีลงไปในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเจือจาง 1:10 1:100 1:1000 1:10000 ที่ไม่ผ่านการสกัด DNA และเชื้อ *S. aureus* ที่ผ่านการบ่ม 24 ชั่วโมง โดยมี positive control คือเชื้อ *S. aureus* จำนวน 10 โคโลนี โดยเติมตัวอย่างน้ำที่เติม

Science32-N4.indd 50 8/8/2567 BE 15:02

เชื้อลงไปจำนวน 3 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อในระดับเจือจาง 1:100 (CT value= 30 sdv 0.5) โดยไม่ต้องนำตัวอย่างน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* เพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจสอบเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ 24 ชั่วโมง และพบว่าสามารถเติมน้ำปนเปื้อนเชื้อลงไปโดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอเพื่อลดระยะวเวลาการสกัดดีเอ็นเออย่างน้อย 2 ชั่วโมงและค่าใช้จ่ายลดลง โดยได้นำตัวอย่างน้ำที่เจือจางระดับต่าง ๆ หาปริมาณความเข้มข้นเชื้อพบว่าระดับ 1:100 มีระดับความเข้นข้นเชื้อ *S. aureus* ที่ 4200 CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ primer ด้วยเทคนิค PCR ในส่วนยีนอื่นเช่น *Coa* gene สามารถตรวจสอบเชื้อต่ำสุดที่ $2.56x10^5$ CFU/mL นอกจากนี้ primer ที่ใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real time PCR ส่วน nuc gene มีความจำเพาะกว่า primer ในส่วน *FemA* gene จึงสามารถใช้โดยใช้เวลาในการตรวจสอบ 4 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลที่เร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการเพิ่มความมั่นใจและลดระยะเวลาในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ในน้ำให้ผู้บริโภคได้

5. สรุปผล

การพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ในน้ำดื่มโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อดังกล่าว ได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของ Primer ที่ใช้ ผลที่ได้นำเข้าสู่ฐานข้อมูลสากลเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *S. aureus* ในฐานข้อมูลสากล NCBI โดยมี % Identity มากกว่า 99% เมื่อศึกษาความไวของปฏิกริยาการตรวจสอบหาเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยนำดีเอ็นเอจำนวน 1 โคโลนีและ10โคโลนีที่ผ่านการบ่มและไม่บ่ม พบว่าสามารถตรวจสอบ *S. aureus* ได้ โดยเทคนิค Real-time PCR ไม่จำเป็นต้องบ่มเชื้อ สามารถตรวจหาเชื้อเพียง 1 โคโลนีที่อยู่ในน้ำ 100 มิลลิลิตรได้ โดยลดระยะเวลาในการทดสอบ ใช้เวลาในการตรวจสอบนับตั้งแต่การตรวจสอบเชื้อ โดยใช้เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลที่เร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการเพิ่มความมั่นใจและลดระยะเวลาในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ในน้ำให้ผู้บริโภคได้

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบการวิจัยเงินรายได้สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบคุณสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

7. References

[1] Amala, E. and Aleru, P. 2016. Bacteriological quality of swimming pools water in port harcourt metropolis. Nat. Sci., 08,79-84.

[2] American Public Health Association – APHA. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 21st Edition, APHA, AWWA, WEF, Washington DC, USA.

[3] Argudín, M.Á.; Mendoza, M.C.; Rodicio, M.R. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. Toxins 2010, 2, 1751-1773.

[4] Borelli, B.M., Lacerda, I.C. and Brando, L.R., 2011, Identification of Staphylococcus spp. Isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. Arq. Brs. Med. Vet. Zootec. 63: 481-487.

[5] Eiseul, K., Seung-Min, Y., Ji-Eun, W., Da-Young, K., Da-Som, K. and Hae-Yeong, K., 2021. Real-Time PCR Method for the Rapid Detection and Quantification of Pathogenic Staphylococcus Species

Science32-N4.indd 51 8/8/2567 BE 15:02

Based on Novel Molecular Target Genes. Foods. 10(11):1-15.

[6] Evidence-based medicine on Diagnostic study, Available Source: https://www.rama. Mahidol. ac.th, December 5, 2023. (in Thai)

[7] Gavin, K. P., Ewan, M.H. and Mark, A.H., 2014, The emergence of mec methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends in Microbiology. 22(1): 42-47.

[8] Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. 2007, Real-Time PCR Method for Quantification of Staphylococcus aureus in Milk. J Food Prot. 70 (1): 90-96.

[9] Haniyeh, G.,Hamed, A., Amirali, A.,Delavar, S., 2020. Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxin A (SEA) Using Dot-ELISA in Milk Samples. J Med Microbiol Infect Dis, 2020; 8 (4): 132-136.

[10] Katsutoshi, S., Teiichi, M., Midori, K. 1997, Rapid identification and typing of Staphylococcus aureus by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. FEMS Microbiology Letters.146(2): 271-278.

[11] Liliana, G., Marco, L., Anna, B. and Annarita, M., 2019. Real-time PCR assay for detection of Staphylococcus aureus, Panton-Valentine Leucocidin and Methicillin Resistance directly from clinical samples. AIMS Microbiol. 5(2): 138-146.

[12] Muhammad, A.Q., Shahid, S., Abdul, W. et al. 2019, Molecular analysis of Staphylococcus aureus isolated from infected dairy goats, Journal of Veterinary Medicine.49(4): 361-367. (in Thai)

[13] Narumol, T. and Theerachai, T. 2012. Detection of Staphylococcus aureus Using Polymerase Chain Reaction, Journal of Science and Technology. 121-126. (in Thai)

[14] Odd, G., Brakstad, l., Kjetill, A. and Johan, A., 1992. Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 30(7):1654-60.

[15] Rajeh, A.K., Ayman, A.M., Mazen, S. 2014, Role of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus Egyptian, Journal of Medical Human Genetics.15(3): 293-298.

[16] Sasaki T, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. J Clin Microbiol 2010;48:765-769.

[17] Shashank, S., Saleha, A., Hemant, K., Upendra, C. and Sunil, V., 2014. FemA gene in Indian isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolation and amplification through real time PCR. European Journal of Experimental Biology. 4(6):90-94.

Science32-N4.indd 52 8/8/2567 BE 15:02

[18] Tasci, F., Sahindokuyucu, F. and Ozturk, D., 2011. Detection of Staphylococcus species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province, Afr. J. Agr;6: 937-942.

[19] Yousun, C., Taek, S., Young, M., Yun, H., Jeong, P., Sang, H., Kyoung, S., Suk, K., Kyoung, P., Hong, K., Junghan, S. and EuiChong, K., 2016. Use fulness of Multiplex Real-Time PCR for Simultaneous Pathogen Detection and Resistance Profiling of Staphylococcal Bacteremia, BioMed Research International. 3860, 1-7.

[20] Yu, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, H., Yang, H., and Wei, H. (2016). Sensitive and rapid detection of staphylococcus aureus in milk via cell binding domain of lysin. Biosens. Bioelectron. 77, 366-371.

Science32-N4.indd 53 8/8/2567 BE 15:02