สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานสรุปผลการวิจัย

เรื่อง

การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในอาหารพร้อมรับประทาน

หัวหน้าโครงการ
ดร. กุลวรา พูลผล

ผู้ร่วมโครงการ
ผศ. ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส
ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช

QR 181346
- 1 ต.ค. 2558
เริ่มบริการ
357934 AQ 0111050 19 ต.ค. 2559

ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทงบประมาณเงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๖
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อภินันทนาการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)

การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในอาหารพร้อมรับประทาน

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ)

The simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food by multiplex PCR

ชื่อหัวหน้าโครงการ นางสาวกุลวรา พูลผล

ชื่อผู้ร่วมโครงการ นางสาวอุไรวรรณ อินทมาโส

นางสาวกนกพร ศรีสุจริตพานิช

บทคัดย่อ

Staphylococcus aureus และ *Listeria monocytogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สามารถพบได้ในอาหารทั่วไป โดยเฉพาะในอาหารพร้อมรับประทาน เนื่องจากอาหารที่พร้อมรับประทานจะไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนมากนัก และส่วนใหญ่จะเก็บไว้โดยการแช่เย็น ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อ *L. monocytogenes* สามารถเจริญเติบโตได้ อีกทั้งอาหารประเภทนี้มักจะมีวิธีการเตรียมด้วยการใช้มือสัมผัส ดังนั้นอาจมีการปนเปื้อนของ *S. aureus* จากผิวหนังของผู้ประกอบอาหารได้ง่าย การวิจัยนี้ได้ออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อ Coagulase (coa) gene ของเชื้อ *S. aureus* และ PrfA gene ซึ่งเป็น virulence gene ของเชื้อ *L. monocytogenes* และนำมาใช้ใน multiplex PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวในอาหารพร้อมรับประทาน การทดสอบความไวของ multiplex PCR ในการทดลองนี้ พบว่า สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้อย่างต่ำสุดคือ 1 ng และ 0.15 ng ตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยจำลองการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองในอาหาร พบว่าจำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่ multiplex PCR สามารถตรวจหาได้คือ 10^5 เซลล์ ต่ออาหาร 5 กรัม หรือ ประมาณ 10^4 เซลล์ ต่ออาหาร 1 กรัม และจำนวนเซลล์ของ *L. monocytogenes* ที่น้อยที่สุดที่ multiplex PCR สามารถตรวจหาได้คือ 1 เซลล์ ต่ออาหาร 5 กรัม จากผลการทดลองยังพบว่า multiplex PCR นี้มีความจำเพาะมาก เนื่องจากไม่พบการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้ออื่นๆ ที่ไม่จำเพาะ กับ primers ที่ใช้ ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับประทานที่ขายในแถบจังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าอาหารที่นำมาทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 58 ตัวอย่าง ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เลย อย่างไรก็ตามเพื่อเฝ้าระวังการเกิดการปนเปื้อนดังกล่าวอาจจะต้องมีการตรวจหาแบคทีเรียในอาหารเป็นระยะๆ ต่อไป จากการวิจัยครั้งนี้ วิธี multiplex PCR สามารถใช้เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ในอาหารพร้อมรับประทานได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อดังกล่าวเพื่อให้เป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังการปนเปื้อนหรือการระบาดของเชื้อต่อไป

คำสำคัญ Multiplex PCR; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; ready-to-eat foods

Abstract

Listeria monocytogenes and *Staphylococcus aureus* are food-borne pathogens widely distributed in dairy products, especially in ready-to-eat foods. Due to undercooked and storage of ready-to-eat foods in cold temperature is optimal for growth of *L. monocytogenes*. Moreover, *S. aureus* is commonly found on the skin of healthy people therefore it can contaminate in food products during preparation and processing. In this study, specific primers for Coagulase (coa) gene from *S. aureus* and PrfA gene from *L. monocytogenes* were designed and used for detection of those bacteria by a multiplex PCR. The multiplex PCR can detect at least 1 ng and 0.15 ng of *S. aureus* and *L. monocytogenes* DNA, respectively. Investigation of the artificially contaminated foods, the multiplex PCR was possible to detect *S. aureus* 10^5 celsl per 5 g (2×10^4 cells/g) of food and detect *L. monocytogenes* less than 1 cell per 5 g (<1 cell/g) of food. No amplification DNA of related food pathogens in PCR reaction, indicate specificity of the primers. The multiplex PCR was then used as a tool to detect contaminated foods in local markets in Chonburi province. Fifty-eight samples of several types of ready-to-eat foods were analyzed and the results showed that none of them were contaminated with *L. monocytogenes* and *S. aureus*. However, it needs further investigation for the surveillance in the future. This multiplex PCR can be used for *L. monocytogenes* and *S. aureus* detection in contaminated ready-to-eat foods as a rapid, high sensitive and specific assay. This multiplex PCR assay can be further developed, and could be benefit for public health and surveillance of disease outbreaks.

Key words Multiplex PCR; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; ready-to-eat foods

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
อักษรย่อและสัญญลักษณ์	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 การออกแบบ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR	7
3.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย	7
3.3 การสกัด bacterial genomic DNA จากแบคทีเรีย	8
3.4 การวิเคราะห์ DNA โดยวิธี electrophoresis	8
3.5 การทำ monoplex PCR สำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด เพื่อทดสอบ primer	9
3.6 การทดสอบหาความไวของคู่ primer PCR ต่อ DNA เป้าหมายที่สกัดบริสุทธิ์ ด้วย monoplexPCR	10
3.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR	10
3.8 การทดสอบหาความไวของ Multiplex PCR ต่อ DNA เป้าหมายที่สกัดบริสุทธิ์	11
3.9 การศึกษาความจำเพาะของคู่ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR	11
3.10 การทดสอบหาความไวในการตรวจหาจำนวนเซลล์ ของ S. *aureus* และ *L. monocytogenes* ด้วย Multiplex PCR โดยการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร	11
3.11 การเก็บตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบ	11
3.12 การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารพร้อมรับประทาน	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)	13
4.2 การทำ monoplex PCR สำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด เพื่อทดสอบ primers	14
4.3 การทดสอบหาความไวของmonoplex PCRจาก DNA สกัดบริสุทธิ์	15
4.4 การทำ multiplex PCR สำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การทดสอบหาความไวของ Multiplex PCR ในการตรวจหา DNA ของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes*	18
4.6 การศึกษาความจำเพาะของ Multiplex PCR	20
4.7 การทดสอบความไวของ Multiplex PCR ในการตรวจหาเชื้อในอาหาร โดยการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร	21
4.8 การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ในอาหารพร้อมรับประทานจากท้องตลาด	23
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลและวิจารณ์	24
5.2 ข้อเสนอแนะ	25
5.3 การนำไปใช้ประโยชน์	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวกโครงการ	30
ประวัตินักวิจัย	34

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	แสดงลำดับเบสของ primers	7
ตารางที่ 4-1	คู่ Primers ที่ออกแบบได้	13

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4-1	การวิเคราะห์ PCR Product ที่เกิดขึ้นใน Monoplex PCR	14
ภาพที่ 4-2	Sensitivity ของ monoplex PCR กับ DNA ของเชื้อ S. *aureus*	15
ภาพที่ 4-3	Sensitivity ของ monoplex PCR กับ DNA ของเชื้อ *L. monocytogenes*	16
ภาพที่ 4-4	ผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ด้วย Multiplex PCR	17
ภาพที่ 4-5	Sensitivity ของ multiplex PCR กับ DNA ของเชื้อ *S. aureus*	18
ภาพที่ 4-6	Sensitivity ของ multiplex PCR กับ DNA ของเชื้อ *L. monocytogenes*	19
ภาพที่ 4-7	ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีการ Multiplex PCR ในการตรวจหาแบคทีเรียชนิดอื่น	20
ภาพที่ 4-8	ผลการทดสอบหาความไวในการตรวจหาจำนวนเซลล์ ของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ที่ใส่ลงไปในอาหาร ด้วย Multiplex PCR	22
ภาพที่ 4-9	ตัวอย่างผลการทดสอบการตรวจหาการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับปทระทาน ด้วย Multiplex PCR	23

อักษรย่อและสัญญลักษณ์

bp	base pair
cfu	colony forming unit
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleoside triphosphates
g	gram
kb	kilo base
KCl	Potassium Chloride
Mg	milligram
Ml	milliliter
Ng	nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pg	picogram
rpm	revolutions per minute
TAE	tris-acetate EDTA
TBE	tris-borate EDTA
V	volt
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
°C	degree celsius

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและสรุปความเป็นมาของโครงการ

อาหารประเภทเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ มักมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อก่อโรคที่ติดต่อผ่านทางอาหาร (Asoa et al, 2003; Jorgensen et al., 2005) ในปัจจุบันด้วยวิถีชีวิตที่รีบเร่ง คนวัยทำงานส่วนใหญ่มักรับประทานอาหารที่หาซื้อได้ง่ายและพร้อมรับประทาน (ready-to-eat food) ได้เลยที่ร้านสะดวกซื้อ โดยอาหารบางส่วนถูกเก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อต้องการรับประทานก็เพียงแค่นำมาผ่านความร้อนจากตู้ไมโครเวฟเพียงแค่ไม่กี่นาที หรือบางชนิดสามารถรับประทานได้ทันทีเลย เช่น ฮ๊อทดอก และสลัด เป็นต้น แม้อาหารเหล่านี้จะผ่านการรับประกันความสะอาดและมาตรฐานการผลิตในระดับหนึ่งก็ไม่สามารถรับประกันถึงการปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อโรคได้ ดังจะเห็นได้จากการเรียกเก็บผลิตภัณฑ์อาหารที่ปนเปื้อนเชื้อก่อโรคเป็นระยะๆในประเทศแคนนาดา(CFIA, 2009, 2010) จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้พบเชื้อก่อโรคที่แยกได้มาจากอาหารดิบ และอาหารพร้อมรับประทานหลายชนิด รวมทั้งจากสิ่งแวดล้อมอาทิ เช่น น้ำ อุปกรณ์ต่างๆและ ดิน เป็นต้น (Gombas et al., 2003; Miettinen and Wirtanen, 2006; Wiedmann, 2003)

*Staphylococcus aureus*จัดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญมาก สามารถก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและท้องเสีย (Balaban and Rasooly, 2000; McLauchlin et al., 2000; Le Loir et al., 2003)สาเหตุเนื่องมาจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถปล่อยสารพิษ staphylococcal enterotoxins (SEs) ได้หลายชนิด และสามารถทนต่อการถูก inactivation ได้โดยเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal proteases) เช่น เอนไซม์ pepsin รวมทั้งทนต่อความร้อนจากการปรุงอาหารด้วย หากอาหารมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S. aureus*จำนวนโคโลนีประมาณ 10^6 cfu/g (Pelisser et al., 2009) หรือเจือปนด้วย enterotoxin ปริมาณตั้งแต่ 20 ng ถึง 1 µg ก็จะทำให้เกิดโรคดังกล่าวได้ (Bergoll, 1989)

*Listeria monocytogenes*เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารเช่นกันแบคทีเรียชนิดนี้พบปนเปื้อนอยู่ในอาหารหลายชนิดรวมทั้งอาหารพร้อมรับประทานที่เก็บไว้ในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ Listeria เหล่านี้ก่อให้เกิดโรค Listeriosis ที่มีอาการได้แก่ meningitis, encephalitis, septicemia และ abortion เป็นต้น (Jeffers et al., 2001; Nightingale et al., 2005) อาการดังกล่าวอาจรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้โดยเฉพาะหากเกิดในคนกลุ่มเสี่ยง ได้แก่ ผู้สูงอายุ สตรีมีครรภ์และทารกแรกเกิด

การตรวจสอบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมากและต้องการวิธีที่มีความไว รวดเร็ว มาใช้ในการตรวจสอบโครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาการใช้ multiplex PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและ

ความจำเพาะสูง อีกทั้งยังสามารถทราบผลการทดสอบได้รวดเร็วเพราะสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งชนิดได้พร้อมกันภายในการทดสอบครั้งเดียว โดยโครงการวิจัยนี้มีการตรวจหาสารพันธุกรรมของ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* พร้อมกัน ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่พร้อมรับประทานที่วางขายอยู่ สำหรับประโยชน์ที่จากงานวิจัยนี้ นอกจากจะเป็นการพัฒนาวิธี multiplex PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารแล้ว ข้อมูลที่ได้ยังทำให้ทราบถึงการแพร่ระบาดของแบคทีเรียในอาหาร ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ในการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคด้วยการตัดวงจรการแพร่ระบาดของเชื้อผ่านทางอาหารได้ด้วย นอกจากนี้ ยังสามารถนำไปใช้ พัฒนาต่อยอดผลิตเป็นชุดตรวจสอบตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเชิงพาณิชย์สำหรับผู้บริโภคและผู้ประกอบการที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความไว และ ความจำเพาะ ในโอกาสต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อประเมินความไวและความจำเพาะของ multiplex PCR ในการตรวจสอบหา*S. aureus* และ *L. monocytogenes* จากสารสกัดทางพันธุกรรมและจากที่ปนเปื้อนจำลองในอาหารพร้อมรับประทาน

2. เพื่อทดสอบวิธี multiplex PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ในอาหารพร้อมกินที่วางขายในท้องถิ่นด้วยวิธี multiplex PCR

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การสำรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง (literatures review)

Staphylococcus จัดอยู่ในตระกูล Micrococcaceae เชื้อมีลักษณะเป็นรูปทรงกลม แกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 0.5 ถึง 1.5 µm เมื่อแบ่งเซลล์จะติดกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจเซลล์อยู่เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม หรือเป็นสายสั้นได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเชื้อ มีเพียงสายพันธุ์ *S. aureus* เท่านั้นที่เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในคน ทำให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรง และให้ผลบวกกับปฏิกิริยาโคแอกกูเลส (coagulase positive) สามารถสร้างแคบซูลหรือเมือก (Slime) ที่ช่วยเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคได้

S. aureus เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปบนผิวหนัง โพรงจมูก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝี หนอง รวมถึงในดินฝุ่นละออง และ จัดเป็นแบคทีเรียหนึ่งชนิดที่ เป็นสาเหตุหลักของโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) เนื่องมาจากผลิต enterotoxin ได้ พบได้มากโดยเฉพาะอาหาร ประเภทเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน จากการศึกษาพบว่า 3 ใน 10 ของปลาสดพบปริมาณ *S. aureus* มากกว่า ในฝั่งตะวันตกของประเทศบราซิลกว่าร้อยละ 20 จากจำนวน 175 เนื้อปลาตัวอย่างถูกพบว่ามี *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ นอกจากนั้นแล้ว *S. aureus* ยังคงถูกพบภายในขั้นตอนการผลิตปลาไหลรมควันในมลรัฐอลาสกา สหรัฐอเมริกา โดยระหว่างการผลิตอาหารนั้น *S. aureus* สามารถเจริญในอาหารนั้นได้มากกว่า 10^5 CFU/g เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* สามารถพบได้ในอาหารทั่วไป จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ในปี 1994 ได้มีการกำหนดคุณลักษณะที่ดีของอาหารว่า จะต้องไม่ตรวจพบ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์ที่ปรุงเสร็จแล้วซึ่งอยู่ระหว่างการวางจำหน่าย (Novotny et al., 2004) ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2556 (มกราคม - สิงหาคม) พบการระบาดของ Staphylococcus คิดเป็นร้อยละ 0.1 ที่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเกิดจากเชื้อในกลุ่ม Staphylococcus (พบผู้ป่วย 90 ราย จากข้อมูลทั้งหมด 96,813 ราย) ส่วนร้อยละ 99.4% ไม่สามารถระบุสาเหตุของอาหารเป็นพิษได้

การบริโภคทอกซินของเชื้อ *S. aureus* ที่ อยู่ในอาหารเข้าไปในร่างกาย เป็นสาเหตุให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ โดยที่อาหารนั้นมักถูกปนเปื้อนโดยผู้ประกอบการอาหารที่มีเชื้ออยู่ในมือ และอาหารนั้นไม่ได้ถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่เย็นพอ จึงทำให้เชื้อเกิดการเจริญเติบโตและสร้างทอกซินขึ้น อาหารที่มักมีเชื้อปะปน โดยทั่วไปแล้วผู้บริโภคอาจไม่ทราบว่าอาหารนั้นมี Enterotoxin อยู่ เนื่องจากอาหารที่มี Enterotoxin ปะปนมักมีกลิ่น รส และสภาพของอาหารเป็นปกติ ปริมาณทอกซินที่มากพอจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจะถูกสร้างขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง ที่ 30°C อาการของโรคจะเกิดภายใน 2 ถึง 6 ชั่วโมงหลังจากบริโภคอาหารเข้าไป โดยผู้ได้รับสารพิษนี้จะเกิดอาการเป็นตะคริวรุนแรง ปวดท้อง

อาเจียน ท้องร่วง เหงื่อแตก และปวดศีรษะ ไม่มีไข้ แต่อย่างไรก็ตามอาการของโรคจะหายไปอย่างรวดเร็วภายใน 6 ถึง 8 ชั่วโมง

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนสั้น กว้างประมาณ 0.4 ถึง 0.5 µm ยาวประมาณ 0.5 ถึง 2.0 µm ไม่สร้างสปอร์ แอโรบิกจนถึงไมโครแอโรฟิลิกเป็นแบคทีเรียที่อยู่ภายในเซลล์ โคโลนีมีลักษณะกลมขนาดเล็ก นอกจากนี้การใช้อาหารคัดเลือกและการเก็บไว้ในที่เย็น (Cold environment) สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อListeria จากตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วยเชื้ออื่นที่เจริญได้เร็วกว่าในจำนวน 13 serotype ทั้งหมด *L. monocytogenes*serotype 1/2a, 1/2b และ 4b เป็นสาเหตุของการเกิดโรค listeriosis ในคนได้มากที่สุด และแม้แต่สายพันธุ์ต่างกันแต่มี serotype ชนิดเดียวกันสามารถก่อให้เกิดความรุนแรงของได้แตกต่างกันด้วย (Evans et al., 2004; Farber and Peterkin., 1991; Hofer et al., 2000) เชื่อว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการเกิดโรค ปัจจัยอย่างหนึ่งคือฮีโมไลซินที่เรียกว่า ลิสเทอโรไลซิน (listerolysin O) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่อยู่ในเซลล์โฮสต์

L. monocytogenes มีการแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางในสภาวะแวดล้อมทั่วไป มีการปนเปื้อนในปลาจากการเพาะเลี้ยงในบริเวณแหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำบริเวณชายฝั่ง หรือเกิดขึ้นระหว่างการประกอบอาหาร นอกจากนี้ยังพบมีการปนเปื้อนใน อาหารที่พร้อมรับบประทาน (Ready to Eat) และด้วยคุณสมบัติของ *L. monocytogenes* ที่เป็น Psychrotrophic pathogen ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิตู้แช่เย็นทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อชนิดนี้มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับ ปลาที่ถูกรมควันหรือปลาบรรจุสุญญากาศ ปลาเทราต์ (Oncorhynchus mykiss) และปลาแซลมอน (Salmo salar) รมควันหรือที่ตั้งให้เย็นพร้อมรับประทาน รวมทั้งอาหารพร้อมบริโภคอื่นๆ เช่น สลัดผักโคลสลอว์ เนยแข็งและนม เป็นต้น มีรายงานว่าพบเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวนมากในนมดิบจากวัวที่ติดเชื้อ และถ้ามีเชื้อจำนวนมากในน้ำนมดิบแล้ว การพาสเจอร์ไรซ์ธรรมดาจะไม่สามารถกำจัดเชื้อได้หมด ซึ่งมีรายงานว่ามีคนตายถึง 29% จากโรคนี้ หลังจากกินนมพาสเจอร์ไรซ์ นอกจากนี้ยังมีคนตายถึง 90% จากการบริโภคเนยแข็ง (Mexican style cheese) ที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ ในประเทศไทยยังไม่มีการเก็บข้อมูลการระบาด จากข้อมูลในต่างประเทศพบการระบาดที่รุนแรงหลายครั้ง เช่น การระบาดที่เกิดจากการติดเชื้อ *L. monocytogenes* จากนมพาสเจอร์ไรท์ ที่รัฐ Massachusette ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 2007 (2008) การระบาดที่เกิดจากเชื้อปนเปื้อนในไส้กรอก ที่รัฐ Louisiana ประเทศสหรัฐอเมริกา พบผู้ป่วยได้รับการยืนยันจากห้องปฏิบัติการว่ามีการติดเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน 14 ราย ในช่วงเดือนมกราคมถึงมิถุนายน ปี ค.ศ. 2010 (2011) จากข้อมูลของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระบุว่าการระบาดที่เกิดจากเชื้อ *L. monocytogenes* ปนเปื้อนในอาหารพร้อมรับประทาน (Ready-to eat) ระหว่างปี ค.ศ. 1998-2008 พบว่าในหนึ่งปีจะมีจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อประมาณ 1,662 ราย และพบผู้ป่วยเสียชีวิตจำนวน 266 ราย (Cartwright et al., 2013) ผลจากการติดเชื้อ มากกว่า 75% ทำให้เกิดสมองอักเสบโดยเฉพาะในคนไข้ที่เปลี่ยนไตเพราะคนไข้จะอยู่ในระยะภูมิคุ้มกันถูกกดนอกจากนี้ยังทำให้

เกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ หลอดปัสสาวะอักเสบ เยื่อตาขาวอักเสบ และเกิดการแท้ง ส่วนใหญ่พบในทารกแรกเกิดอายุต่ำกว่า 4 สัปดาห์และในผู้สูงอายุ การติดเชื้อในผู้ใหญ่ส่วนใหญ่แล้วจะเกิดที่ระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เกิดโลหิตเป็นพิษจะทำให้มีไข้ หนาวสั่น คนไข้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำมากอาจถึงตายได้ และเยื่อบุหัวใจอักเสบ (endocarditis) ซึ่งเป็นอาการแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นจากการเกิดโลหิตเป็นพิษ กรณีที่เกิดมากที่สุดจะพบในคนไข้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน หรือได้รับการบำบัดด้วยรังสี จากรายงานที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเกือบร้อยละ 10 ของผลิตภัณฑ์สุญญากาศขายปลีกนั้น มีเชื้อ *L. monocytogenes* อยู่ (Novotny et al., 2004; Azevedo et al., 2005) ปกติแล้วการตรวจสอบชนิดอาหารที่เป็นต้นเหตุของโรค listeriosis เพื่อใช้ในการวินิจฉัยสาเหตุของโรคกระทำได้ยาก เนื่องจาก *L. monocytogenes* มีระยะฟักตัวยาวนานถึง 70 วันจึงมักไม่มีการเก็บอาหารเหล่านั้นไว้ตรวจสอบ

แต่เดิมการตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนิยมใช้การแยกเชื้อก่อโรคจากอาหารนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและนำมานับจำนวนโคโลนี และทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลานานโดยเฉพาะการวินิจฉัยเชื้อ *Listeria* ที่ต้องใช้เวลานานถึง 1-2 สัปดาห์ มีการแปลผลยากจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อเพราะแบคทีเรียมีความหลากหลายสูงทางปฏิกิริยาทางชีวเคมี หรือมี phenotypic profile ที่ผิดแผกไปจากปกติ (Thompson et al., 2004) บางครั้งอาจทำให้มีการแปลผลผิดพลาดเกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีความไวในการทดสอบอาจไม่เพียงพอในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปรากฏในสารตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำ (Tang et al., 1998)

ได้มีการนำวิธี immunological method มาใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคโดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างของ antibody ที่ยึด (immobilized) กับ column กับแอนติเจนของเชื้อเป้าหมายใน food extract วิธีนี้จึงมีข้อดีคือสามารถตรวจหาจำนวนที่แท้จริงของ infectious microorganism ใน food extract ได้เพราะ antibody จะสามารถจับได้กับแอนติเจนที่สมบูรณ์เท่านั้นแต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อด้อยเช่นกันเพราะตามการยึด antibody ไว้กับ column ทำให้ antibody ไม่อยู่ในสภาพเป็นอิสระทำให้จับกับ antigen ได้ไม่ดี และวิธีนี้อาจจะต้องใช้เวลานานถึง 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้เกิด ปฏิกิริยาจับกันแน่นระหว่าง immobilized antibody และ antigen ดังนั้นได้มีการพัฒนาให้ antibody จับกับ antigen ได้ดีขึ้นโดย immobilize antibody ไว้กับ bead หรือบน magnetic particle โดยตรง (Safarik et al., 1995) หรือใช้ปฏิกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin มาช่วยในการ immobilize antibody บน magnetic particle อีกขั้นหนึ่ง แม้วิธีนี้สามารถได้รวดเร็ว อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังคงมี ข้อจำกัดเนื่องจาก มีความไวต่ำและอาจเกิดความไม่จำเพาะจากการเกิด cross reactivityระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีได้

วิธีทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีที่นิยมมาก เพราะมีความจำเพาะ ตัวอย่าง เช่น วิธี nucleic acid-based hybridization ที่มีความจำเพาะสูงมากเพราะอาศัยหลักการจับแบบคู่สมระหว่าง DNA เป้าหมายที่ถูก denature ให้เป็นสายเดี่ยวกับ DNA probe อย่างไรก็ตามวิธีนี้ความไวไม่เพียงพอที่จะใช้การตรวจหา DNA เป้าหมายในอาหารได้ เพราะต้องมี DNA อย่างน้อย 10^3 ถึง 10^4 ถึงจะให้สัญญาณ hybridization ได้ส่วนวิธี PCR-based methods เป็นวิธีที่ความจำเพาะสูงเช่นกันและมีความไวสูงมากกว่า วิธี nucleic acid-based hybridizationจึงสามารถใช้ในการตรวจหา

สารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคที่มีจำนวนน้อยในอาหารรวมทั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Anono et al., 1997)ในทางทฤษฎีสามารถเพิ่มจำนวนจาก 1 nucleic sequence ตั้งต้นได้ผลผลิต เป็นล้านเท่าโดยอาศัยปฏิกิริยาการจับอย่างจำเพาะระหว่าง bacterial genome กับ PCR primer แม้วิธีนี้มี ความไวสูงเพราะสามารถเพิ่มจำนวนของ DNA มากในเวลาสั้น ๆ แต่วิธีนี้เพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถ ใช้การตรวจหาได้โดยตรงใน food extract ได้ จำเป็นต้องนำอาหารไปผ่านขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย (enrichment) ก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR เพราะหากปราศจากขั้นตอนนี้จะไม่สามารถตรวจพบในเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนระหว่าง 100-1000 cells ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของอาหารตัวอย่างได้ (Malorny et al., 2008)การทำขั้นตอน enrichment ที่เพียงพอก่อนทำ PCR จะสามารถช่วยแก้ไขข้อจำกัดของวิธี PCR ได้ (Nam et al., 2005; Bai et al., 2010) นอกจากนี้หากมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective enrichment สารพวก selective inhibitors ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายที่จะมารบกวนการตรวจสอบ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประประสิทธิภาพในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของแบคทีเรียเป้าหมายและช่วยลดการเกิดผลปลอมได้ด้วย (Li et al., 2005; Kim and Bhunia, 2008)

วิธี multiplex PCR เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี PCR แบบดั้งเดิม ด้วยการใช้ primer สองคู่หรือหลายคู่โดยที่แต่ละคู่จำเพาะต่อ template เป้าหมายต่างชนิดกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ตรวจหา template เป้าหมายสองหรือมากกว่าสองชนิดได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน วิธีนี้นับว่าเป็นเทคนิคที่ใช้อย่างมากมายในการตรวจหาเชื้อก่อโรค และ การวินิจฉัยโรคติดเชื้อการจำแนก species ของเชื้อหลายชนิดใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella enteric* serotype ต่างๆ ใน สิ่งส่งตรวจจากสิ่งแวดล้อมและอาหาร (Beaubrun et al., 2012)ตรวจหา *Vibrio cholera* ชนิดที่ผลิต toxin ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา (Jeyasekaran et al., 2011) เพราะจัดว่าเป็นเทคนิคที่มีความน่าเชื่อถือ มีความไว รวดเร็ว มีความยืดหยุ่นและราคาไม่แพง ในการทดสอบ

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การออกแบบ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR

Primer 2 คู่ผ่านการออกแบบด้วยโปรแกรม BioEdit (version 5.2.2) โดยเลือก *PrfA* gene ซึ่งเป็น virulence gene ของ *L. monocytogenes*และCoagulase *(coa)* gene ซึ่งเป็น virulence gene ของ*S. aureus*โดยใช้ฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ตัวอย่างละ 40 Sequencesบริเวณ conserved region ของยีนนำ Primer ที่ออกแบบขึ้นมาตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไปโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Oligos (version 9.1) มีการกำหนดให้primer ต้องมี %GC content มากกว่าร้อยละ 50 ขึ้นไป ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นสายสั้น (oligonucleotide) ที่มีความยาวไม่เกิน 18-24 นิวคลีโอไทด์ และมีค่า Tm เท่ากันหรือใกล้เคียงกันระหว่าง primer ทั้ง 2 คู่และใช้โปรแกรม Standard Nucleotide BLAST เพื่อทดสอบความจำเพาะ คู่ของ primersที่ผ่านการออกแบบแล้วนั้นแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 3-1 แสดงลำดับเบสของ primers

Target	Primer				
	Name	Sequence		Position	Product Size
coa gene	Stap_F_59	5'-GGGATAACAAAGCAGATGCG-3'		59-78	1353 bp
		Tm = 60°C	%GC content = 50		
	Stap_R_1411	5'-ACGTTGATTCAGTACCTTGTG-3'		1391-1411	
		Tm = 60°C	%GC content = 42.86		
*prf*A gene	Lis_F_147	5'-GAGTATTAGCGAGAACGGGA-3'		147-166	420 bp
		Tm = 60°C	%GC content = 50		
	Lis_R_566	5'-TAACAGCTGAGCTATGTGCG-3'		547-566	
		Tm = 60°C	%GC content = 50		

3.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียแต่ละชนิดเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth เป็นเวลา 18-24ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นนำมาปั่นและล้างด้วย 0.85% NaCl เพื่อเก็บตะกอนของเซลล์และเพื่อใช้ในการสกัด genomic DNA ต่อไป

3.3 **การสกัด** bacterial genomic DNA **จากแบคทีเรีย**

Bacterial genomic DNA ถูกสกัดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียโดยใช้ Nucleic Acid Extraction Kit (GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit) ตามวิธีที่แนะนำมากับชุดสกัด โดยเริ่มจากนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ข้ามคืนมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g เป็นเวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทิ้ง supernatant และเติม Buffer R1 (GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit) ปริมาตร 100 µl ลงใน pellet ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเติม 50 mg/mlLysozyme ปริมาตร 10 µl สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ หรือปริมาตร 20 µl สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 3 นาที ทิ้ง supernatant ทั้งหมด เติม Buffer R2 (GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit)ปริมาตร 180 µl และ Proteinase K ปริมาตร 20 µl ลงใน pellet ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเขย่าในอ่างน้ำอุ่น 65°C อย่างต่อเนื่อง หรือ pipetting ทุก 5 นาทีจนครบเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 20 mg/ml RNase A (DNase-free) ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากัน เพื่อสุดท้ายจะได้เป็น RNA-free DNA จากนั้นนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาทีเติม Buffer BG เป็นปริมาตรสองเท่าของสารละลายทั้งหมด (ประมาณ 440 µl ในกรณีที่มีการเติม RNase A) เติม Absolute Ethanol ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันทันที เพื่อป้องกันการตกตะกอน จากนั้นนำสารที่ได้ ถ่ายใส่ column ที่มี collection tube ประกอบอยู่ ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งflow through ทั้งหมด ล้าง column ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 µl โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง flow through ทั้งหมด ปั่นเหวี่ยง column ที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเป็นการกำจัด Ethanol ที่อาจเหลือค้างอยู่ วาง column บน microcentrifuge tube ใหม่ที่สะอาด จากนั้นเติม 50 µl Elution Buffer ที่อุ่นลงใน column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เก็บ DNA ไว้ที่ -20°Cสำหรับ genomic DNA ที่ได้จะผ่านการวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบ แถบ DNA ที่ได้กับ 1 kb marker

3.4 **การวิเคราะห์** DNA **โดยวิธี** electrophoresis

เตรียมแผ่น 1% agarose gelโดยใช้ผง agarose ผสมในสารละลาย TBE ให้ได้ปริมาตร 50ml (agarose 0.5 g ในสารละลาย TBE 50 ml) ให้ความร้อนโดยใช้ microwave ให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงบนถาดเจลที่มีหวี (comb) วางอยู่ และรอให้เจลแข็งตัว นำเจลที่แข็งแล้ววางลงในเครื่อง gel electrophoresis จากนั้นหยด loading dye ที่มี SYBR Gold ผสมอยู่ปริมาตร 0.5 µl ลงบน parafilm ดูด DNA ที่สกัดได้ ปริมาตร 1 µl ลงผสมลงผสมกับ loading dye ที่เตรียมไว้ จากนั้นดูด 1 kb marker ปริมาตร 1 µl ลงผสมกับ loading dye ที่เตรียมไว้เช่นกัน ดูดสารละลายตัวอย่างหยอดลงในหลุม (well) บนแผ่น 1 % agarose gel ปรับความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าให้เป็น 110 V ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 25 นาที และวิเคราะห์ DNA band ที่ได้เปรียบเทียบกับ DNA marker

3.5 การทำ monoplex PCR สำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด เพื่อทดสอบ primer

นำ DNA ของ bacteria แต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยา PCR (monoplex PCR)โดยใส่คู่ของ primerที่เหมาะสมของแบคทีเรียแต่ละชนิด และด้วยสภาวะที่แนะนำมากับชุดทดสอบทั้งนี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ primer ในการจับกับ DNA เป้าหมายหาก primer คู่ที่ได้รับการออกแบบมาสามารถจับ DNA เป้าหมายได้อย่างจำเพาะแล้วจะได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเป็นแถบ DNA เพียงแถบเดียวที่มีขนาดความยาวของนิวคลิโอไทด์ตามที่คาดประมาณไว้เมื่อตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis สำหรับ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water)

โดยมีปฏิกิริยาในการทำ monoplex ดังนี้

PCR reaction (total 25 µl):

2.5 µl 10X *Taq* Buffer with KCl

2 µl 25 mM $MgCl_2$

2.5 µl 2mM dNTPs mix

2.5 µl 10 µM forward primer

2.5 µl 10 µM reverse primer

1 µl DNA template / Sterile water(สำหรับ negative control)

0.5 µl 5 u/µl *Taq* DNA Polymerase

จากนั้นนำ Reaction ที่เตรียมแล้ว ใส่ลงในเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดให้มีขั้นตอนดังนี้

1. Initial Denaturation อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที
2. Denaturation อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที
3. Annealing อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 20 วินาที
5. Final Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 2 – 4 มีจำนวน 40 รอบ

เก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อเสร็จขั้นตอนทั้งหมดแล้ว นำ 5 µl ของ PCR Product ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ 1% agarose Electrophoresis ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 V นาน 25 นาทีเปรียบเทียบ band ที่ได้กับ DNA marker โดย *S. aureus* จะให้ PCR product ขนาด 1353 bp และ *L. monocytogenes*จะให้ PCR product ขนาด 420 bp

3.6 การทดสอบหาความไวของคู่ primer PCR ต่อ DNA เป้าหมายที่สกัดบริสุทธิ์ด้วย monoplexPCR

นำ DNA ของ bacteria แต่ละชนิดมาทำการเจือจางแบบ 10 เท่า (10 ng ถึง 0.1 pg)จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา PCR ในปฏิกิริยาแยกกัน (monoplex PCR)โดยใส่คู่ของ primerของเชื้อแต่ละชนิด สำหรับ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อในปฏิกิริยาแทน DNAใช้สภาวะการทำ monoplex PCR ตามวิธีการทดลองที่ 4 ข้างต้น

3.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR

นำ DNA ของ bacteria ทั้งสองชนิดมาผสมกันในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน และใส่ primer ที่จำเพาะลงไปพร้อมกันทั้ง 2 คู่ (multiplex PCR) สำหรับ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water)ทำการปรับ ปริมาณต่างๆ ของส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เช่น Mg^{2+}, DNA เป้าหมาย, dNTPs รวมทั้งอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนของการทำ PCR ให้เหมาะสมจนได้แถบ DNA ตามที่ต้องการ

โดยมีปฏิกิริยาในการทำ multiplex ดังนี้

PCR reaction (total 25 µl):

2.5 µl	10X *Taq* Buffer with KCl
2 µl	25 mM $MgCl_2$
2.5 µl	2mM dNTPs mix
3µl	10 µM Stap_F_59 primer
3µl	10 µM Stap_R_1411 primer
2.5µl	10 µM Lis_F_147 primer
2.5µl	10 µM Lis_R_566 primer
1 µl	แต่ละ DNA template / Sterile water (สำหรับ negative control)
0.5 µl	5 u/µl *Taq* DNA Polymerase

จากนั้นนำ Reaction ที่เตรียมแล้ว ใส่ลงในเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดให้มีขั้นตอนดังนี้

1. Initial Denaturation	อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที
2. Denaturation	อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30วินาที
3. Annealing	อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension	อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที
5. Final Extension	อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 4 นาที

ขั้นตอนที่ 2 – 4 มีจำนวน 35รอบ

เก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อเสร็จขั้นตอนทั้งหมดแล้ว นำ 5 µl ของ PCR Product ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ 1.5 % agarose Electrophoresis ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 V นาน 25 นาทีเปรียบเทียบ band ที่ได้

กับ DNA marker โดย *S. aureus* จะให้ PCR product ขนาด 1353 bp และ *L. monocytogenes*จะให้ PCR product ขนาด 420 bp

3.8 การทดสอบหาความไวของ Multiplex PCR ต่อ DNA เป้าหมายที่สกัดบริสุทธิ์

นำ DNA ของ bacteria แต่ละชนิดมาทำการเจือจางแบบ 10 เท่า แล้วนำมาทำปฏิกิริยา multiplex PCR โดยใช้สภาวะที่ได้ใช้ในทดสอบของ multiplex PCR ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

3.9 การศึกษาความจำเพาะของคู่ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR

ทดสอบด้วย DNA ของแบคทีเรียอื่นที่มักติดต่อผ่านทางอาหาร ได้แก่ *Vibrio cholera* และ *Escherichia coli* ในการทดลองใช้สภาวะที่ได้ใช้ในทดสอบของ multiplex PCR ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

3.10 การทดสอบหาความไวในการตรวจหาจำนวนเซลล์ของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ด้วย Multiplex PCR โดยการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร

นำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บเซลล์และล้างเซลล์ด้วย PBS ปั่นล้าง 2 รอบ resuspend ด้วย LB 1 ml จากนั้นหาปริมาณเซลล์แบคทีเรียด้วย Hemacytometer และปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 10^6cells/ml และเจือจางจนถึง 1 cell/ml จากนั้นใส่เชื้อชนิดละ 1 ml ผสมลงกับเนื้อปลา(ที่ปราศจากเชื้อ)5 กรัม และอาหารเลี้ยงเชื้อLB 13 ml ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมที่ได้ไป enrichment โดยการincubate ที่ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวจำนวน 1 ml ไปปั่นด้วย centrifuge 500 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อแยกเศษปลาออกไป และนำ supernatant ไปปั่นอีกครั้งหนึ่งที่ 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ก้นหลอด นำมาปั่นล้างด้วย 0.85% NaClเพื่อชะล้างสิ่งเจือปนอื่นออกไป ก่อนนำมาสกัด DNA ด้วย Nucleic Acid Extraction Kit จากนั้นนำ DNA ที่ได้จากแต่ละหลอดมาทำปฏิกิริยา multiplex PCR โดยมี positive control เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ purified DNA ส่วน negative control ใช้น้ำในปฏิกิริยาแทน DNA สำหรับความไวของปฏิกิริยาจะทราบได้จากค่าการเจือจางของแบคทีเรียสูงที่สุดที่ยังคงให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่สามารถมองเห็นแถบ DNA ที่มีขนาดความยาวของนิวคลิโอไทด์ตามที่คาดประมาณไว้เมื่อตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ได้

3.11 การเก็บตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบ

อาหารที่นำมาทดสอบ ได้แก่ อาหารพร้อมรับประทานที่วางขายในท้องตลาดในภาคตะวันออก โดยเน้นในจังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558 จำนวน 58 ตัวอย่าง ตัวอย่างเช่น ปลาแซลมอล และปลาดิบต่างๆ บนซูชิ ฮอทดอก ปูอัด โดยหลังจากซื้อที่ตลาดแล้วจะนำมาทำการทดสอบทันที

3.12 การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารพร้อมรับประทาน

ทำการทดสอบตรวจหาการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes*ในอาหารพร้อมรับประทานที่วางขายในท้องตลาด จำนวน 58 ตัวอย่างดังที่กล่าวข้างต้น โดยมีวิธีการเตรียมอาหารก่อนนำมาทดสอบดังข้อ 10 แต่ไม่มีการเติมแบคทีเรียลงไปการทำ multiplex PCR ใช้สภาวะดังที่กล่าวข้างต้นpositive control ใช้ purified DNA และ negative control ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

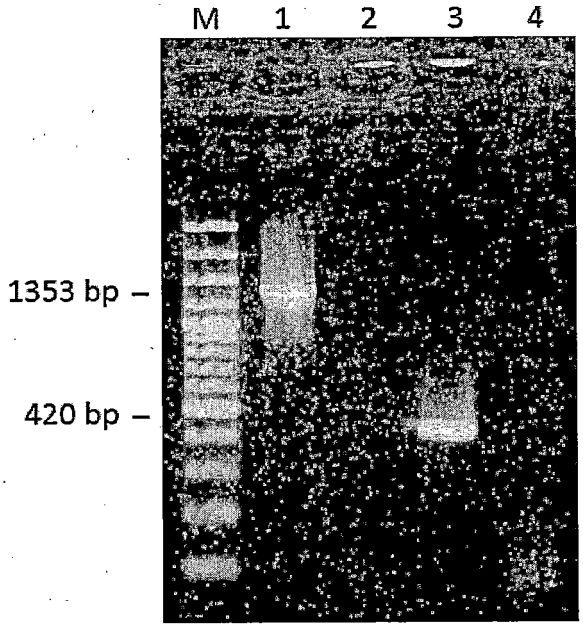
ออกแบบ Primersโดยเลือกบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้บน *Prf*A gene สำหรับ *L. monocytogenes*และ Coagulase (*coa*) gene สำหรับ *S. aureus* จากฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) มาใช้ในการออกแบบคู่ของ Primer ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ BioEdit (Version 7.0.4) และนำ Primer ที่ออกแบบขึ้นมาตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไปโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Oligos (version 9.1) โดยกำหนดให้มี %GC content มากกว่าร้อยละ50 สายนิวคลีโอไทด์เป็นสายสั้น (oligonucleotide) ไม่เกิน 24 นิวคลีโอไทด์ ค่า *T*m ไม่สูงหรือต่ำเกินไป และที่สำคัญคือ primer ที่ออกแบบขึ้นทั้งสองคู่จะต้องมีค่า *T*m ใกล้เคียงกัน โดยคู่ของ primer ที่ผ่านการออกแบบแล้วนั้นแสดงดังตารางที่1 และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Standard Nucleotide BLAST เพื่อทดสอบความจำเพาะ

ตารางที่ 4-1 คู่ Primers ที่ออกแบบได้

Target	Primer			
	Name	Sequence	Position	Product Size
coa gene	Stap_F_59	5'-GGGATAACAAAGCAGATGCG-3'	59-78	1353 bp
		Tm = 60°C %GC content = 50		
	Stap_R_1411	5'-ACGTTGATTCAGTACCTTGTG-3'	1391-1411	
		Tm = 60°C %GC content = 42.86		
*prf*A gene	Lis_F_147	5'-GAGTATTAGCGAGAACGGGA-3'	147-166	420 bp
		Tm = 60°C %GC content = 50		
	Lis_R_566	5'-TAACAGCTGAGCTATGTGCG-3'	547-566	
		Tm = 60°C %GC content = 50		

4.2 การทำ monoplex PCR สำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด เพื่อทดสอบ primers

Primersที่ถูกออกแบบขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยา Simplex PCR โดยใช้ DNA เป้าหมายของแบคทีเรียแต่ละชนิด จะให้ PCR Product ขนาด 1,353 bp สำหรับเชื้อ *S. aureus* (ภาพที่ 4-1, Lane 1) และขนาด 420 bp สำหรับเชื้อ *L. monocytogenes*(ภาพที่ 1, Lane 3) ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทน DNA เพื่อใช้เป็น negative control (ภาพที่ 4-1, Lane 2 และ 4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า primersที่ถูกออกแบบสามารถจับกับ DNA เป้าหมายได้อย่างจำเพาะและสามารถเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ DNA ได้ PCR Product ที่มีขนาดตามที่คาดไว้



ภาพที่ 4-1 การวิเคราะห์ PCR Product ที่เกิดขึ้นใน Monoplex PCR

Lane M:100 bp marker

Lane 1: Monoplex PCR สำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

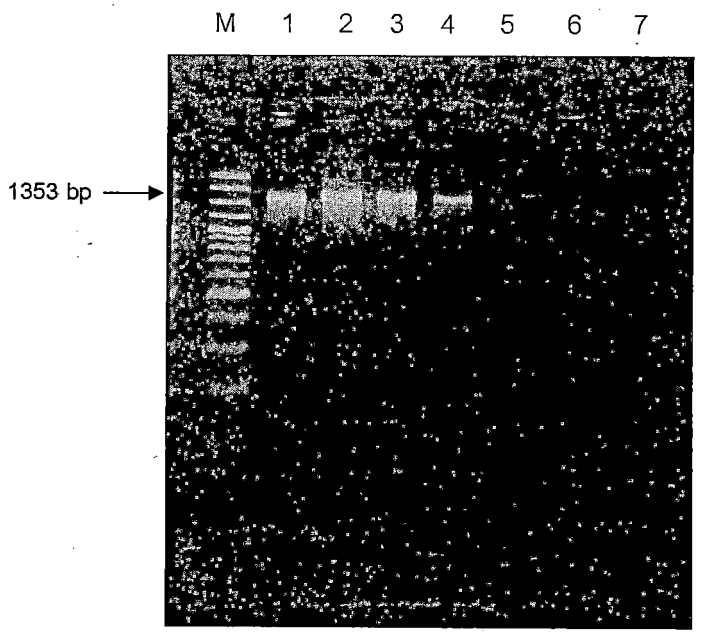
Lane 2: Negative Control สำหรับปฏิกิริยาของ *S. aureus*

Lane 3: Monoplex PCR สำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

Lane 4: Negative Control สำหรับปฏิกิริยาของ *L. monocytogenes*

4.3 การทดสอบหาความไวของmonoplex PCRจาก DNA สกัดบริสุทธิ์

การทดสอบความไวของปฏิกิริยา monoplex PCR คือการหาปริมาณ DNA ของแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยที่สุดที่จะสามารถตรวจหาได้ โดย DNA ของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ถูกนำมาเจือจางแบบ 10 เท่าและนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใส่คู่ของ primer ที่จำเพาะของแต่ละเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดของเชื้อ *S. aureus* ที่ monoplex PCR นี้ ตรวจหาได้คือ 0.001ng (1 pg) โดย PCR Product มีขนาด 1,353 bp (ภาพที่ 4-2, Lane 5) และปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ monoplex PCR นี้ ตรวจหาได้คือ0.865 pg โดย PCR Product มีขนาด 420bp (ภาพที่ 4-3, Lane 5) สำหรับ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อในปฏิกิริยาแทน DNA ไม่ปรากฏแถบ DNA เกิดขึ้น (ภาพที่ 4-2 และ 4-3, Lane 7)



ภาพที่ 4-2 Sensitivity ของ monoplex PCR กับ DNA ของเชื้อ *S. aureus*

Lane M: 100 bp Marker

Lane 1: *S.aureus*DNA (10 ng)

Lane 2: *S.aureus*DNA (1.0 ng)

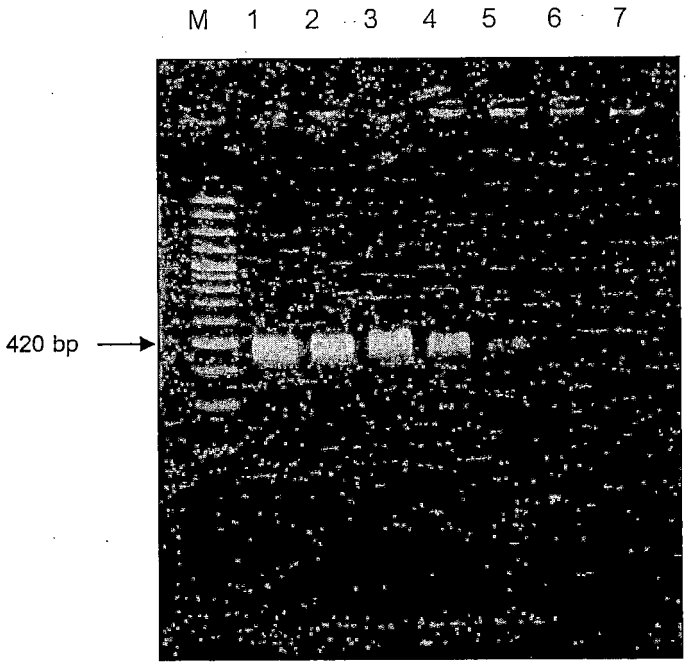
Lane 3:*S.aureus*DNA (0.1 ng)

Lane 4: *S.aureus*DNA (0.01 ng)

Lane 5: *S.aureus*DNA (0.001 ng)

Lane 6: *S.aureus*DNA (0.1 pg)

Lane 7: Negative control



ภาพที่ 4-3 Sensitivity ของ monoplex PCR กับ DNA ของเชื้อ *L.monocytogenes*

Lane M: 100 bp Marker

Lane 1: *L. monocytogenes* DNA (8.65 ng)

Lane 2: *L. monocytogenes* DNA (0.865 ng)

Lane 3: *L. monocytogenes* DNA (0.0865 ng)

Lane 4: *L. monocytogenes* DNA (0.0086 ng)

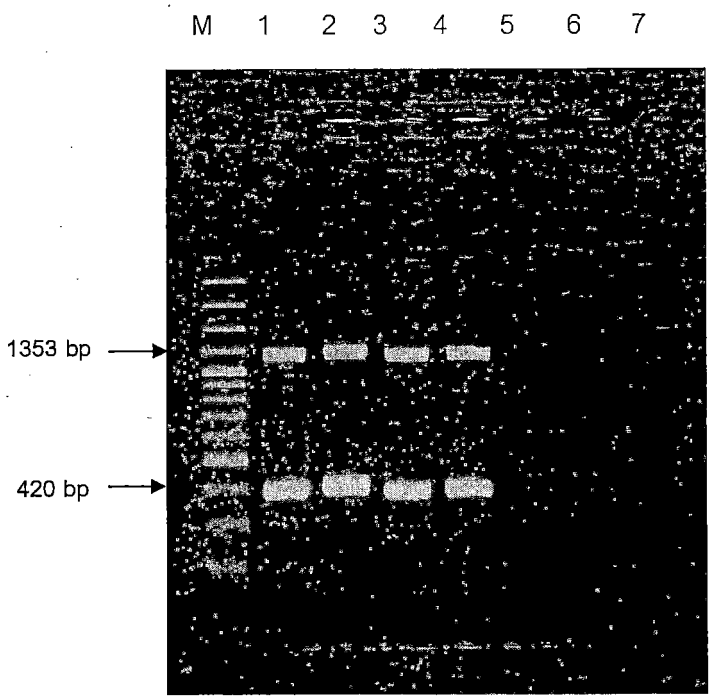
Lane 5: *L. monocytogenes* DNA (0.865 pg)

Lane 6: *L. monocytogenes* DNA (0.0865 pg)

Lane 7: Negative control

4.4 **การทำ multiplex PCRสำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด**

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ multiplex PCR เช่น ปริมาณสารต่างๆ ของปฏิกิริยา รวมถึงอุณหภูมิและเวลา ในขั้นตอนต่างๆ เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* พร้อมกันนั้น เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อทั้งสองดังกล่าวพบว่าให้ PCR product ขนาด 1,353bp และ 420 bp สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ*L. monocytogenes* ตามลำดับ (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-4 ผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ด้วย Multiplex PCR

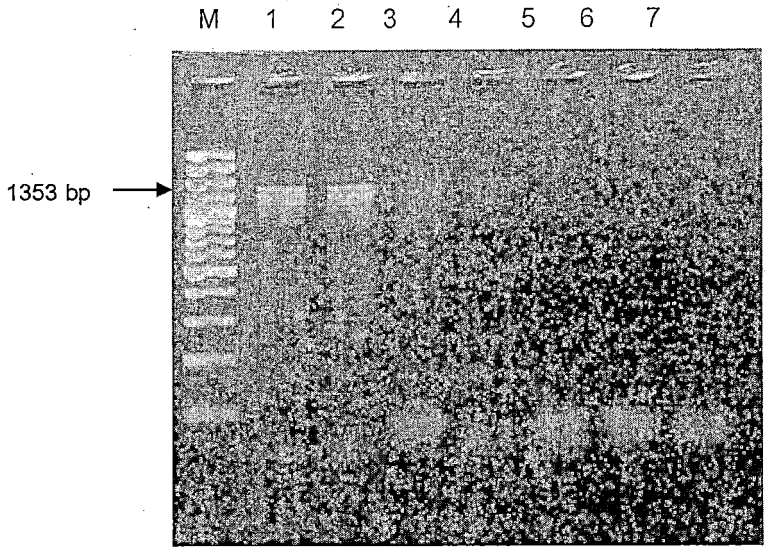
Lane M: 100 bp Marker

Lane 1 - 4: *S. aureus* DNA และ *L. monocytogenes*DNA

Lane 5: Negative control

4.5 การทดสอบหาความไวของ Multiplex PCR ในการตรวจหา DNA ของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes*

DNA ของเชื้อ *S. aureus*และ *L. monocytogenes* ถูกนำมาเจือจาง 10 เท่า และนำมาทดสอบหาปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดที่ multiplex PCR สามารถตรวจหาได้ ผลการทดสอบ พบว่า ปริมาณ DNA น้อยที่สุดของเชื้อ *S. aureus* ที่ multiplex PCR สามารถตรวจได้ คือ 1 ng (ภาพที่ 4-5, lane 4) และปริมาณ DNA น้อยที่สุดของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ multiplex PCR สามารถตรวจได้ คือ 0.15 ng (ภาพที่ 4-6, lane 5)



ภาพที่ 4-5 Sensitivity ของ multiplex PCR กับ DNA ของเชื้อ *S. aureus*

Lane M: 100 bp Marker

Lane 1: *S. aureus*DNA (1.00 µg)

Lane 2: *S. aureus* DNA (0.10 ug)

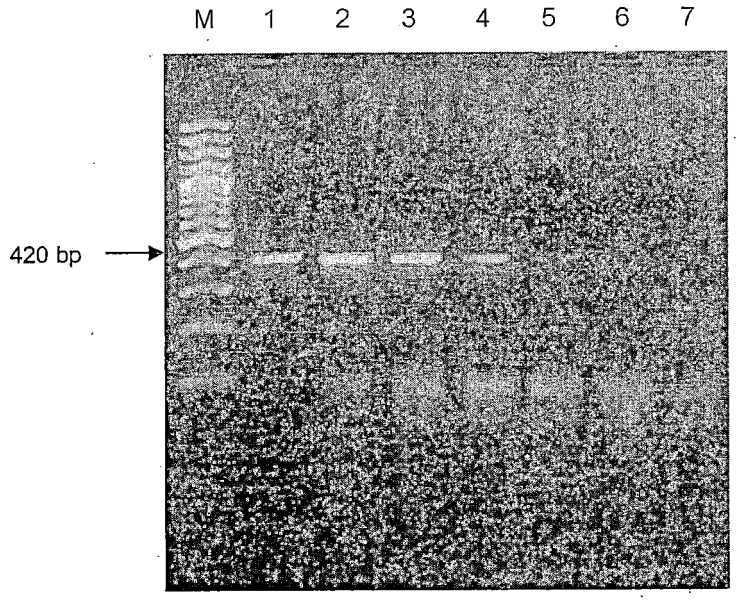
Lane 3: *S. aureus* DNA (10.00 ng)

Lane 4: *S. aureus* DNA (1.00 ng)

Lane 5: *S. aureus* DNA (0.10 ng)

Lane 6: *S. aureus* DNA (10 pg)

Lane 7: Negative control



ภาพที่ 4-6 Sensitivity ของ multiplex PCR กับ DNA ของเชื้อ *L.monocytogenes*

Lane M: 100 bp Marker

Lane 1: *L. monocytogenes* DNA (1.55 µg)

Lane 2: *L. monocytogenes* DNA (0.15 µg)

Lane 3: *L. monocytogenes* DNA (15 ng)

Lane 4: *L. monocytogenes* DNA (1.5 ng)

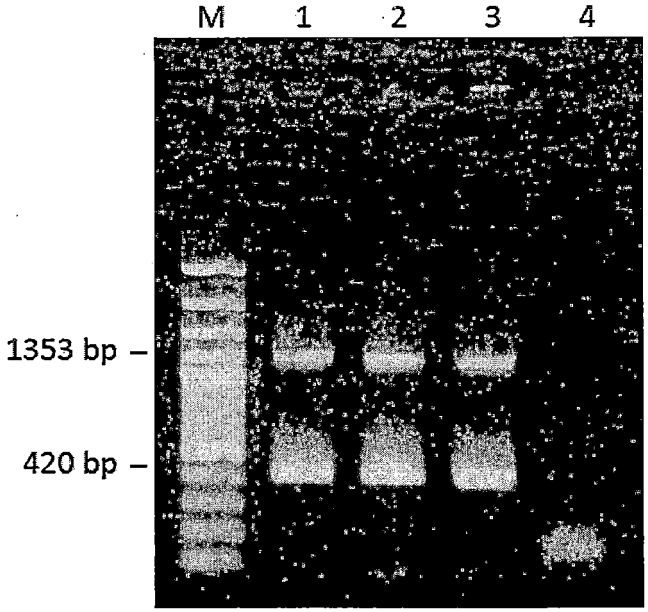
Lane 5: *L. monocytogenes* DNA (0.15 ng)

Lane 6: *L. monocytogenes* DNA (15 pg)

Lane 7: Negative control

4.6 การศึกษาความจำเพาะของ multiplex PCR

เพื่อยืนยันถึงความจำเพาะของ primersในการทำ multiplex PCR ว่าจะไม่สามารถเกิด PCR product จากแบคทีเรียชนิดอื่น จึงได้ทำการทดสอบกับ DNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มักมีการปนเปื้อนในอาหารได้แก่ *Escherichia coli* และ *Vibrio cholera*ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในอาหารและก่อโรคทางเดินอาหารได้เช่นกัน จากผลการทดลองพบว่า Multiplex PCR นี้ไม่เพิ่มขยายจำนวน DNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นที่เกี่ยวข้อง ยกเว้นแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหาเท่านั้น (*S. aureus* และ *L. monocytogenes*) (ภาพที่ 4-7)



ภาพที่ 4-7 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีการ Multiplex PCRในการตรวจหาแบคทีเรียชนิดอื่น

Lane M: 100 bp marker

Lane 1: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* (Positive Control)

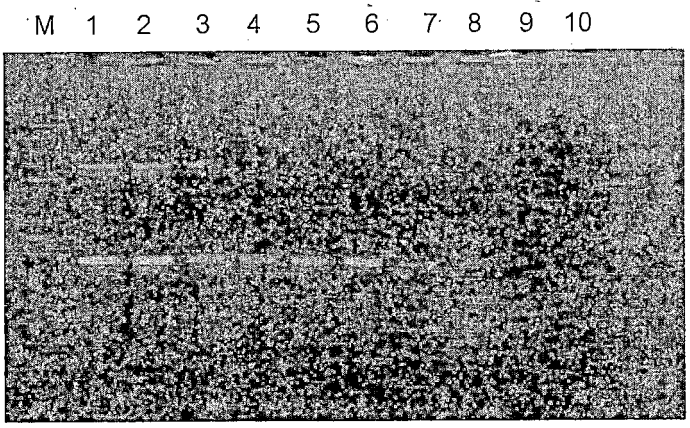
Lane 2: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ร่วมกับเชื้อ *E. coli*

Lane 3: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ร่วมกับเชื้อ *V. cholerae*

Lane 4: Negative Control

4.7 การทดสอบความไวของ Multiplex PCR ในการตรวจหาเชื้อในอาหาร โดยการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ multiplex PCR และเพื่อทำการทดสอบว่าแบคทีเรียจำนวนน้อยที่สุดเท่าไรในอาหาร ที่ multiplex PCR จะสามารถตรวจหาได้ จึงทำการจำลองการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ที่ทราบจำนวนเซลล์แล้วและใส่ลงในอาหารที่ปราศจากเชื้อใดๆ การทดลองเริ่มโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อLB broth เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วย Hemacytometer และปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 10^6 cells/ml และเจือจาง 10 เท่า จนถึง 1 cell/ml ด้วย LB broth จากนั้นผสมเชื้อแต่ละชนิด จำนวนชนิดละ 1 ml ลงในเนื้อปลา (ที่ปราศจากเชื้อ)5 กรัม เติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปให้มีปริมาตรสุดท้าย20 ml ผสมให้เข้ากันด้วยการปั่นด้วยเครื่อง homogenizer นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวจำนวน 1 ml ไปปั่นด้วย centrifuge 500 rpm เป็นเวลา 5 นาที และนำ supernatant ไปปั่นอีกครั้งหนึ่งที่ 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ก้นหลอด นำมาปั่นล้างด้วย 0.85% NaCl เพื่อชะล้างสิ่งเจือปนอื่นออกไป จากนั้นนำมาสกัด DNA ด้วย Nucleic Acid Extraction Kit ซึ่ง DNA ที่ได้จากแต่ละหลอดนำมาทำทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียทั้งสองด้วย multiplex PCR และตรวจสอบผลด้วย gel electrophoresis ผลการทดสอบพบว่า multiplex PCR สามารถตรวจหาเชื้อ*S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารได้อย่างน้อยที่สุด คือ 10^5cells/ อาหาร 5 g(ภาพที่ 4-8, lane 3) และ 1 cell/ อาหาร 5 g ตามลำดับ (ภาพที่ 4-8, Lane 8)



ภาพที่ 4-8 ผลการทดสอบหาความไวในการตรวจหาจำนวนเซลล์ของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ที่ใส่ลงไปในอาหาร ด้วย Multiplex PCR

Lane M: 100 bp marker

Lane 1: Positive Control (ใช้ DNA ของ *S. aureus*และ *L. monocytogenes*)

Lane 2: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหาร จำนวนชนิดละ 10^6 cells

Lane 3: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหาร จำนวนชนิดละ 10^5 cells

Lane 4: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหาร จำนวนชนิดละ 10^4 cells

Lane 5: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหาร จำนวนชนิดละ 10^3 cells

Lane 6: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหาร จำนวนชนิดละ 10^2 cells

Lane 7: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหาร จำนวนชนิดละ 10 cells

Lane 8: ผลการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหาร จำนวนชนิดละ 1 cell

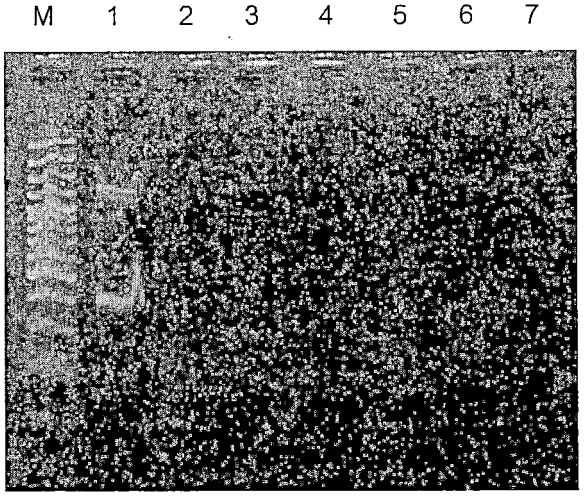
Lane 9: Negative Control (ทำเหมือนการทดลองที่ใส่เชื้อ แต่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อแทน)

Lane 10: Negative Control

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
641.3
ก428ก

4.8 การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารพร้อมรับประทานจากท้องตลาด

เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับประทานที่ขายตามท้องตลาดในจังหวัดชลบุรี ได้แก่ ตลาดวังมุข ตลาดถนนคนเดิน ตลาดนัดหลังมหาวิทยาลัยบูรพา โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558 จำนวน 58 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาดิบต่างๆ (บนซูชิ) ฮอทดอก แฮม ปูอัด เป็นต้น ได้นำมาทดสอบเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารและการทำ multiplex PCR ดังที่ได้ทดสอบมาแล้ว ผลการทดสอบพบว่า อาหารพร้อมรับประทาน ทั้ง 58 ตัวอย่าง ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* หรือ *L. monocytogenes* เลย ทั้งนี้ในการทดสอบมีpositive control โดยใช้ purified DNA ของเชื้อทั้งสอง และ negative control ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



ภาพที่ 4-9 ตัวอย่างผลการทดสอบการตรวจหาการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับประทาน ด้วย Multiplex PCR

Lane M: 100 bp marker

Lane 1: Positive Control (*S. aureus*และ *L. monocytogenes*)

Lane 2- 6: ผลการทดสอบกับอาหารพร้อมรับประทาน ในตัวอย่างที่ 31 - 35

Lane 7: Negative Control

357934

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลและวิจารณ์

S. aureus และ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สามารถพบได้ในอาหาร โดยเฉพาะในอาหารพร้อมรับประทาน เนื่องจากอาหารที่พร้อมรับประทานจะไม่ผ่านการให้ความร้อนมากนักและส่วนใหญ่จะเก็บไว้โดยการแช่เย็น ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อ *L. monocytogenes* สามารถเจริญเติบโตได้ (Azevedo et al., 2005) อีกทั้งอาหารประเภทนี้มักจะมีวิธีการเตรียมด้วยการใช้มือสัมผัส ดังนั้นอาจมีการปนเปื้อนของ *S. aureus* จากผิวหนังของผู้ประกอบอาหารได้ง่าย (Balaban and Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003)

การวิจัยนี้ได้ออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อ Coagulase *(coa)* gene ของเชื้อ *S. aureus* โดยให้ PCR product ขนาด 1,353 bp และ *PrfA* gene ซึ่งเป็น virulence gene ของเชื้อ *L. monocytogenes* โดยให้ PCR product ขนาด 420 bp และนำมาใช้ใน multiplex PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารพร้อมรับประทานซึ่งใช้เวลาในการทดสอบตั้งแต่เริ่มเตรียมอาหารเพื่อทดสอบจนถึงทราบผล ประมาณ 10 – 12 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี standard method โดยการเพาะเลี้ยงและพิสูจน์เชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งใช้เวลาอย่างน้อย 2 – 3 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการ multiplex PCR นี้ เป็นวิธีการที่รวดเร็ว

การทดสอบความไวและความจำเพาะของ multiplex PCR ในการทดลองนี้ พบว่า สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้อย่างต่ำสุดคือ 1 ng และ 0.15 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยจำลองการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองในอาหาร พบว่าจำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่ multiplex PCR สามารถตรวจหาได้คือ 10^5เซลล์ ต่ออาหาร 5 กรัม หรือ ประมาณ 10^4เซลล์ ต่ออาหาร 1 กรัม และจำนวนเซลล์ของ *L. monocytogenes* ที่น้อยที่สุดที่ multiplex PCR สามารถตรวจหาได้คือ 1 เซลล์ ต่ออาหาร 5 กรัม จากผลการทดลองยังพบว่า multiplex PCR นี้มีความจำเพาะมาก เนื่องจาก primers ที่ใช้ไม่เพิ่มจำนวนแบคทีเรียชนิดอื่นนอกจาก *S. aureus* และ *L. monocytogenes* โดยเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อที่ก่อโรคในอาหารชนิดอื่นๆ ได้แก่ *E. coli* และ *V. chelerae* ก็พบว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นจากเชื้อดังกล่าว

ประสิทธิภาพของการทดสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียในอาหารอาจขึ้นอยู่กับหลายกระบวนการ ตัวอย่างเช่น วิธีการเตรียมอาหารก่อนนำมาสกัด DNA ของเชื้อ การ enrichment การปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรีย การสกัด DNA ของแบคทีเรีย รวมถึงความไวของ multiplex PCR ด้วย อย่างไรก็ตามวิธี multiplex PCR ที่ได้พัฒนาในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพที่ดีมีความไวสูงเนื่องจากจากการทดลองพบว่าสามารถตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้แม้ในอาหารมีปริมาณเชื้อต่ำ ปริมาณเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ที่สามารถทำให้ก่อโรคได้ (infectious dose) จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะและปัจจัยหลายๆ อย่าง อย่างไรก็ตามข้อมูลจาก Public Health

Agency of Canada (http://www.phac-aspc.gc.ca/index-eng.php) ได้มีการระบุว่า infectious dose ของ *L. monocytogenes* มีจำนวนเท่ากับ 10 - 10^8 เซลล์ สำหรับคนปกติ และ 0.1 - 10^7 เซลล์ ในคนที่มีภูมิคุ้มกันไม่ดี ซึ่งจากการวิจัยครั้งนี้จะเห็นได้ว่า multiplex PCR สามารถตรวจหาเชื้อในช่วงของ infectious dose ได้

เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับประทานที่ขายในแถบจังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี multiplex PCR ผลการตรวจสอบพบว่าอาหารที่นำมาทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 58 ตัวอย่าง ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เลย อย่างไรก็ตามเพื่อเฝ้าระวังการเกิดการปนเปื้อนดังกล่าวอาจจะต้องมีการตรวจหาแบคทีเรียในอาหารเป็นระยะๆ ต่อไป

วิธี multiplex PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจหาการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้ เนื่องด้วยความไวและความจำเพาะที่สูงของ multiplex PCR และไม่เพียงแต่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนในอาหารพร้อมรับประทานเท่านั้นแต่จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและจากตัวอย่างอื่นๆ ได้อีกด้วยอย่างไรก็ตามวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารยังคงต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องต่อไป เพื่อให้มีวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเป็นประโยชน์สูงสุดในการเฝ้าระวังและป้องการการติดเชื้อ

ข้อเสนอแนะ

1. พัฒนาวิธีการต่อไปเพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร
2. พัฒนาเพื่อให้เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้อีก

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดไปสู่การผลิตชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ที่มีความสะดวก รวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะได้เพื่อให้ผู้ขายหรือผู้ผลิตใช้ตรวจหาการปนเปื้อนการแบคทีเรียทั้งสองชนิดพร้อมกันได้ ทำให้ชุมชนผู้ผลิตและจำหน่ายทราบถึงวงจรแพร่ระบาดและผลกระทบที่ได้เมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารพร้อมรับประทานที่ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียเข้าไปในร่างกาย และยังทำให้ตระหนักถึงความสำคัญของการตรวจสอบอาหารเพื่อให้อาหารปลอดภัยก่อนมีการจำหน่ายไปยังผู้บริโภคซึ่งเป็นการตัดวงจรการแพร่ระบาดด้วย สำหรับขั้นตอนในการนำผลงานวิจัยด้วยการจัดworkshop เชิญผู้ส่วนเกี่ยวข้องมาเข้าร่วมและ ให้ความรู้ผ่านทางวิทยุกระจายเสียงของชุมชน เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Anono, E., Sugita, J., Kawasaki, J., Sakakaibara, H., Takahashi, T., Endo, K., Deguchi, Y. 1997. Evaluation of the polymerase chain reaction method for identification of *Vibrio vulnificus* isolated from marine environments. J Food prot 60: 81-83.
2. Asoa , T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S., 2003. An exyensive outbreak of Staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimate of enterotoxin A in the incriminated milk and powerdered skim milk. Epidermiol Infect 130:33-40.
3. Azevedo, I., Regalo, M. and Mena. 2005. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. Food Control, 16, 121-124.
4. Bai , J., Shi, X., Nagaraja, T.G. 2010. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. J Microbiol Methods 82: 85-89.
5. Balaban, N. and Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enerotoxins. Int J Food Microbiol 61: 1-10.
6. Beaubrun , J.J-G., Cheng, C-M., Chen, K-S, Ewing, L. and Hanes, D.E. 2012. The evaluation of a PCR-based method for identification of Salmonella enteric serotypes from environmental samples and various food matrices. 31: 199-209.
7. Bergoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, editor. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker. P 464-523.
8. Canadian Food Inspection Agency (CFIA), 2009. Health Hazard Alert. Certain maple leaf, shopsy's and hygrade brand wieners may contain *Listeria monocytogenes*. http://www.inspection.gc.ca/english/corpaffr/recarapp/2009/20090803e.shtml.
9. Canadian Food Inspection Agency (CFIA), 2010. Health Hazard Alert. Ready-to-eat cooked meats produced by Establishment 294 (Smith's Quality Meats) may contain *Listeria monocytogenes*. http://www.inspection.gc.ca/english/corpaffr/recarapp/2010/20100611be.shtml.
10. Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ & Mahon BE (2013) Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. Emerg Infect Dis 19: 1-9; quiz 184.
11. Evans, M.R., Swaminathan, B, Graves, L.M., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., Fink, R.C., Kernodle, S., Katheriou, S. 2004. Genetic markers unique to *Listeria monocytogenes* serotype 4b

diffferentiat epidemic clone II (hot dog outbreak strains) from other lineages. Applied and Environmental Microbiology 0: 2383-2390.

12. Farber, J.M.and Peterkin, P.L1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, Microbiological Reviews 55: 476-511.
13. Gombas, D.E., Chen, Y., Clavero, R.S., Scott, V.N., 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready –to-eat foods. Journal of Food protection 66: 559-569.
14. Hofer, E., Ribeiro, R., Feitosa, D.P. 2000. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to1997. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 95: 615-620.
15. Jeffers, G.T., Bruce, J.L., McDonough, P.L., Scarlet, J., Boor, K.J., Wiedman, M., 2001. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes*isolate from human and animal listeriosis cases. Microbiology 147: 1095-1104.
16. Jeyasekaran, G., Thirumalai R.,Shakila, R.J., Thangarani, A.J., and Sukumar, D. 2011. Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the specific detection of toxin-producing *Vibrio cholerae* in fish and fishery products. Appl Microbiol Biotechnol 90: 1111-1118.
17. Jorgensen, H.J., Mork, t., Hogasen, H.R., Rovik, L.M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol 99: 158-167.
18. Kim, H., Bhunia, A.K., 2008. SEL, a selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 74: 4853-4866.
19. Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genet Mol Res 2: 63-67.
20. Li, y., Zhuang, S., Mustapha, A., 2005. Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products. Meat Sci 71: 402-406.
21. Malorny , B., Lofstrom, C., Wagner, M., Kramer, N., Hoorfar, J. 2008. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real time PCR for quantitative microbial risk assessment. Appl. Environ Microbiol 74: 1299-1304

22. McLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V,O' Neill G. 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction J Food Protect 63: 479-488

23. Miettinen, H.and Wirtanen, G. 2006. Ecology of *Listeria* spp. In a fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. International Journal of Food microbiology 112: 138-146.

24. Nam , H.M. Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., Oliver, S.P. 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. In dairy farm environment samples. Int J Food Microbiol 102: 161-171.

25. Nightingale, K.K., Windham, k., Wiedmann, M. 2005.Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. Journal of Bacteriology 187: 5537-5551.

26. Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V. and Pavlik I. 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinarni Medicina*, 49: 343–358.

27. Pelisser, M.R., Klein, C.S., Ascoli, K.R., Zotti, T.R., Arisil ACM, 2009. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. Braz J Microbiol 40: 145-148.

28. Public Health Agency of Canada. (2015). Food Safety. Retrieved from http://www.phac-aspc.gc.ca/index-eng.php.

29. Safarik, I., Safarikava, M., and Forsythe, S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995; 78: 575-585.

30. Tang, Y., Elis, N.M. Hopkins, M.K. Smith, D.H., Dodge, D.E. Persing, D.H. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusal aerobic pathogenic gram-negative bacilli. J. Clin Microbiol 36: 3674-3679.

31. Thompson, F.L., Lida, T., Swings, J.S. 2004. Biodiverisity of *Vibrios*. Microbiol Mol Biol Rev 68: 403-431.

32. Wiedmann, M., 2003. ASDA foundation Scholar Award-an integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. Journal of Dairy science 86: 1865-1875.

33. Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health (2008) Outbreak of Listeria monocytogenes infections associated with pasteurized milk from a local dairy--Massachusetts, 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 57: 1097-1100.

34. Outbreak of invasive listeriosis associated with the consumption of hog head cheese--Louisiana, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 60: 401-405.

ภาคผนวกโครงการ

ระยะเวลาของโครงการ: 1 ปี (กันยายน 2556 – สิงหาคม 2557)

ผลการดำเนินงาน:

☐ ตามแผนที่วางไว้ ☒ ล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้ ☐ เปลี่ยนแผนงานที่วางไว้เดิม

รายละเอียดของผลการดำเนินงาน:(ตามที่ระบุในข้อเสนอโครงการวิจัย)

1. การดำเนินงานตามแผน

กิจกรรมหลัก	เดือน	ผู้รับผิดชอบ
1.การออกแบบ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR	เม.ย. 56- พ.ค.56	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส
2.การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและการสกัด genomic DNA จากแบคทีเรีย	พ.ค.56-มิ.ย.56	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส
3.การทำ monoplex PCR สำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด เพื่อทดสอบ primer	มิ.ย.56-ส.ค. 56	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส
4. การทดสอบหาความไวของคู่ primer PCR ต่อ DNA เป้าหมายที่สกัดบริสุทธิ์ด้วย monoplexPCR	ส.ค. 56-ก.ย. 56	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส
5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR	ส.ค. 56 - ก.ย. 56	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส ดร. กุลวรา พูลผล ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช
6. การศึกษาความจำเพาะของคู่ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR	ก.ย. 56 –ต.ค. 56	ดร. กุลวรา พูลผล ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช
7. การทดสอบหาความไวในการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ DNA บริสุทธิ์จากแบคทีเรียทั้งสองชนิดพร้อมกัน	ต.ค. 56 – พ.ย. 56	ดร. กุลวรา พูลผล ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช
8. การทดสอบหาความไวในการตรวจหาจำนวนเซลล์ของ *S. aureus* และ*L. monocytogenes* ด้วย Multiplex PCR	ต.ค. 56 – พ.ย. 56	ดร. กุลวรา พูลผล ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช

9. การทดสอบ Multiplex PCR โดยการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร	ธ.ค. 56– ม.ค.57	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส ดร. กุลวรา พูลผล ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช
10. การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารพร้อมรับประทาน	ธ.ค. 56 – ม.ค. 57	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส ดร. กุลวรา พูลผล ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช
11. เขียนรายงานฉบับสมบูรณ์และ manuscript	ก.พ. 57-มี.ค. 57	ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส ดร. กุลวรา พูลผล ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช

2. ผลการดำเนินการโดยสรุปตามแผน

ระยะเวลา (เดือน)	การดำเนินการ
กันยายน 2556– มกราคม 2557	1.การออกแบบ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR 2.การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและการสกัด genomic DNA จากแบคทีเรีย 3.การทำ monoplex PCR สำหรับ DNA เป้าหมายแต่ละชนิด เพื่อทดสอบ primer 4. การทดสอบหาความไวของคู่ primer PCR ต่อ DNA เป้าหมายที่สกัดบริสุทธิ์ด้วย monoplexPCR
กุมภาพันธ์ 2557– กันยายน 2557	5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR 6. การศึกษาความจำเพาะของคู่ primer ที่ใช้ใน multiplex PCR 7. การทดสอบหาความไวในการตรวจหาแบคทีเรียทั้งสองชนิดด้วย Multiplex PCR
พฤศจิกายน 2557 – มกราคม 2558	8. การทดสอบ Multiplex PCR โดยการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร 9. การทดสอบหาความไวในการตรวจหาจำนวนเซลล์ของ *S. aureus*และ *L. monocytogenes*โดยการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียด้วย Multiplex PCR 10. การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารพร้อมรับประทานในท้องตลาด

ปัญหาและอุปสรรคของการวิจัย:

1. การดำเนินการไม่เป็นไปตามแผนที่กำหนด เนื่องจาก ได้รับเงินทุนช้า
2. ใช้ระยะเวลานานในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ multiplex PCR รวมทั้งการทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมการเตรียมตัวอย่างอาหารเพื่อจะนำมาทดสอบ
3. เครื่อง centrifuge ที่คณะมี 2 เครื่อง เสียในระยะเวลาเดียวกัน
4. มีการปนเปื้อนของเชื้อใน stock ที่เก็บไว้ ซึ่งต้องมีการแยกเชื้อและทำการพิสูจน์ใหม่

แนวทางแก้ไขเพื่อดำเนินการวิจัยต่อไป:

1. มีการบำรุงรักษาและตรวจสอบเครื่องมืออย่างสม่ำเสมอ
2. มีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ให้ดี

ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ ยังไม่มี

สรุปการใช้งบประมาณ: (งบประมาณทั้งโครงการ 360,000 บาท)

รายการ	รายรับ (บาท)	รายจ่าย (บาท)	คงเหลือ (บาท)
<u>รายรับ</u>			
รับเงินทุนวิจัยงวดที่ 1 (50%)	180,000		
รับเงินทุนวิจัยงวดที่ 2 (40%)	144,000		
<u>รายจ่าย</u>			
1. ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาตรี		55,000	
2. หมวดค่าใช้สอย			
- ค่าพาหนะเดินทางไปซื้อตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการทดลอง		1,000	
3. หมวดค่าวัสดุ			
- ค่าชุดสกัด bacterial DNA		32,684	
- ค่าสารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ใน PCR		31,760	
- ค่าอาหารที่ใช้ในการทดสอบ		2,500	
- ค่าสารเคมีอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์, NaCl ฯลฯ		20,000	
- ค่าวัสดุเครื่องแก้ว		15,000	
- ค่าวัสดุอื่นๆ เช่น ถุงมือ ถุงพลาสติก สำลี		5,000	
4. หมวดค่าครุภัณฑ์			
- ค่าเครื่อง Thermocycler		155,000	
5.หมวดค่าใช้จ่ายอื่น ๆ			
- ค่าธรรมเนียมการโอนเงินค่า เครื่อง Thermocycler		175	
รวมทั้งสิ้น	324,000	318,119	5,881

หมายเหตุ เงินทุนวิจัยงวดที่ 3 (10%) จะได้รับเมื่อส่งเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว จากนั้นจะนำไปใช้เป็นค่าใช้จ่ายการการนำเสนอผลงานวิจัยต่อไป