



รายงานการวิจัย

การใช้สูตรอาหารดัดแปลงชนิดใหม่สำหรับแยกเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella*
และ *Shigella* จากตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม

Application of a new modified medium on detecting *Escherichia coli*,
Salmonella and *Shigella* from food and drink

อาจารย์ ดร. กมลวรรณ ชูชีพ
อาจารย์นิพัทธ์ มณีโชติ

RCH

RM

409

ก137ก

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน...131208

วัน,เดือน,ปี.2.6...แถ.2557

b.12602991

i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2554

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทะเบียนคุมเลขที่ ๙๙๗ ลงวันที่ ๘.๓.๕. 25๖5
ลงชื่อ _____

การใช้สูตรอาหารดัดแปลงชนิดใหม่สำหรับแยกเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* จากตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม

Application of a new modified medium on detecting *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella* from food and drink



(ลงชื่อ) _____ หัวหน้าโครงการ
(อาจารย์ ดร. กมลวรรณ ชูชีพ)

(ลงชื่อ) _____ ผู้ร่วมวิจัย
(อาจารย์นิพัทธ์ มณีโชติ)

การวิจัยนี้เป็นลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

(ลงชื่อ) _____
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดา เจริญพรพาณิชย์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ประธานคณะกรรมการกลั่นกรองและติดตามผลโครงการวิจัย
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)...การใช้สูตรอาหารดัดแปลงชนิดใหม่สำหรับแยกเชื้อ *Escherichia coli*,
Salmonella และ *Shigella* จากตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม

แหล่งเงิน .เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ..... 2554..... จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน..... 135,000..... บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย..... 1..... ปี ตั้งแต่..... ตุลาคม 2553..... ถึง..... กันยายน 2554 /

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. กมลวรรณ ชูชีพ..... สจล. วิทยาเขตชุมพร chkamonwan@hotmail.com.....

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

อาจารย์นิพัทธ์ มณีโชติ..... สจล. วิทยาเขตชุมพร pnipat@hotmail.com.....

บทคัดย่อ

เชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* เป็นเชื้อก่อเกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษที่สำคัญและมักพบการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มที่ผลิตหรือปรุงอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ ทำให้เกิดการระบาดของโรคท้องร่วง การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในห้องปฏิบัติการจะใช้อาหารจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อ (selective media) โดยใช้เวลาในการบ่มเชื้อประมาณ 1-2 วัน ที่อุณหภูมิ 35°C เพื่อให้การตรวจสอบเชื้อมีความสะดวก ลดการใช้อาหารจำเพาะสำหรับการเจริญของเชื้อ แต่ได้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำและเชื่อถือได้ จึงได้ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถตรวจสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิดซึ่งสามารถเจริญในอาหาร selective และ differential medium ชนิดเดียว เชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella choleraesuis* จากกรมวิทยาศาสตร์บริการ เชื้อ *Shigella dysenteriae* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลการวิจัยพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MBA สามารถแยกเชื้อทั้ง 3 ชนิดโดยเชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างของลักษณะโคโลนีที่ชัดเจน ใช้เวลาในการเพาะเชื้อเพียง 12 ชั่วโมง

คำสำคัญ : อาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*

Abstract

Escherichia coli, *Salmonella* and *Shigella* are important foodborne pathogens that easily contaminate in food and drink either through inadequate human sanitation or through cross-contamination by contact with other foods cause spreading of diarrhea. Selective media is used to determine these foodborne pathogenic bacteria which normally take about 1-2 days of incubation at 35°C. In order to facilitate the determination procedure and reduce the use of selective/differential media and the period for detection that show the accuracy and reliability, the medium that is both selective and differential medium was developed. *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis* were purchased from Department of Science Service while *Shigella dysenteriae* was from Department of Medical Sciences Thailand. The result showed that modified synthetic medium, MBA, could effectively distinguish the growth characteristics of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella* after incubation at 35°C for only 12 h.

Keywords : modified synthetic media, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ที่ได้เงินสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ที่อำนวยความสะดวกอุปกรณ์ เครื่องมือ เพื่ออำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยทั้งในและนอกเวลาราชการ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่พัสดุ เจ้าหน้าที่งานการเงิน เจ้าหน้าที่งานวิจัย ที่ช่วยประสานงานในส่วนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องและรับผิดชอบในหน้าที่เป็นอย่างดี



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญ (ต่อ)	V
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โรคอุจจาระร่วง	3
2.2 ลักษณะทั่วไปและการเกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i>	3
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	5
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	8
3.1 ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้คัดแยกเชื้อ <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i>	9
3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลง	9
3.3 ทดสอบเชื้อทางซีวเคมี	9
3.4 ตรวจสอบเชื้อในระดับโมเลกุล	9
3.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i> ใน ตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพที่สุด	11
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	
3.1 ดัดแปลงสูตรอาหารเพื่อให้สามารถคัดแยกเชื้อ <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i>	12
3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลง	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 ทดสอบเชื้อทางชีวเคมี	17
3.4 ตรวจสอบเชื้อในระดับโมเลกุล	17
3.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i> ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้อาหารสูตรดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพที่สุด	18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	21
เอกสารอ้างอิง	22



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะของอาหารสูตรดัดแปลง	12
ตารางที่ 2 ลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงแต่ละชนิด	13
ตารางที่ 3 การตรวจสอบทางชีวเคมีของเชื้อในอาหาร MILS medium และ TSI Agar	17



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โคโลนีของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MBA 12 h, 35°C	14
รูปที่ 2 โคโลนีของเชื้อ <i>Shigella dysenteriae</i> ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MBA 12 h, 35°C	14
รูปที่ 3 โคโลนีของเชื้อ <i>Salmonella chleraesuis</i> ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MBA 12 h, 35°C	15
รูปที่ 4 โคโลนีของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MKA 12 h, 35°C	15
รูปที่ 5 โคโลนีของเชื้อ <i>Shigella dysenteriae</i> ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MKA 12 h, 35°C	16
รูปที่ 6 โคโลนีของเชื้อ <i>Salmonella chleraesuis</i> ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MKA 12 h, 35°C	16
รูปที่ 7 ผลการสกัด DNA เชื้อ <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i> ในอาหารสูตรดัดแปลง (a) เทียบกับแถบ DNA ของเชื้อชนิดเดียวกันในอาหารสูตรดั้งเดิม (b)	17



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Escherichia coli, *Salmonella* และ *Shigella* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เจริญได้ดีในสภาวะอากาศร้อนชื้น จึงพบได้ทั่วไป เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 จัดเป็นเชื้อก่อโรคซึ่งถ้าพบปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มแล้วจะก่อให้เกิดการระบาดของโรคท้องร่วงหรืออุจจาระร่วง อาการโดยทั่วไป ได้แก่ ถ่ายเป็นน้ำ หรือถ่ายเหลวบ่อยครั้ง และมักพบอาการเป็นไข้และอาเจียนร่วมด้วย ดังนั้นการรับประทานอาหารหรือดื่มเครื่องดื่มที่มีเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ปนเปื้อนจะส่งผลเสียต่อสุขภาพอนามัยและความปลอดภัยของผู้บริโภค รวมทั้งมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจ เนื่องจากมีข้อกำหนดห้ามพบเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารและเครื่องดื่มที่นำเข้าและส่งออกในทุกประเทศ จากข้อมูลการเฝ้าระวังโรทางระบาดวิทยาโดยสาธารณสุขจังหวัดชุมพร พบว่าโรคอุจจาระร่วงเป็นสาเหตุของอัตราการป่วยต่อประชากรหนึ่งแสนคนมากเป็นอันดับที่ 2 ในปี พ.ศ. 2552

ความสำคัญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ คือ เป็นเชื้อก่อโรคที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ เกิดความสูญเสียทั้งทางสังคมและเศรษฐกิจ ดังนั้นขั้นตอนการตรวจเชื้อเหล่านี้ในอาหารจึงมีความสำคัญมาก โดยทั่วไปการตรวจวิเคราะห์เชื้อสาเหตุของโรคในท้องปฏิบัติการ ทำได้โดยการนำตัวอย่างอาหารมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค เมื่อเชื้อเจริญจึงนำเชื้อมาตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผลการตรวจเชื้อ ซึ่งการตรวจเชื้อแบบดั้งเดิมนั้นจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะกับแบคทีเรียต่างๆ เพื่อแยกเชื้อและนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในอาหาร วิธีการเหล่านี้มีความไวสูง ราคาไม่แพงและสามารถให้ข้อมูลทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ อย่างไรก็ตามวิธีการดั้งเดิม (conventional method) นี้ต้องใช้เวลาหลายวันกว่าจะรู้ผล เนื่องจากขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการแบ่งตัวเพื่อให้เห็นลักษณะของโคโลนีที่ดูได้ด้วยตาเปล่า ยิ่งกว่านั้นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพาะกล้าเชื้อลงบนจาน การนับโคโลนี ทำให้วิธีการตามขั้นต้นเหล่านี้ต้องอาศัยอุปกรณ์เครื่องแก้ว แร่งงานและเวลา

เชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* เป็นเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคท้องร่วง มีกำหนดว่าห้ามไม่ให้มีเชื้อ *Escherichia coli* ปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม และทุกประเทศมีข้อกำหนดว่าห้ามพบเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนในอาหารทุกประเภทที่นำเข้า ดังนั้นหากพบเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร จะส่งผลเสียต่อสุขภาพอนามัย และความปลอดภัยของผู้บริโภค อีกทั้งมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหาร การแยกเชื้อแต่ละชนิดนี้ จะใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อเชื้อและเมื่อเชื้อเจริญจะสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะโคโลนีและลักษณะการเจริญที่แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่นๆ เรียกว่า selective และ differential medium ตามลำดับ โดยทั่วไปในการแยกเชื้อจะเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C, 1 – 2 วัน

คณะผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มชนิดต่างๆ จึงได้ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่สามารถเป็นทั้ง selective และ differential medium เพื่อใช้ในการแยกเชื้อทั้งสามชนิดที่อาจพบปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานที่เชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae แต่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการแตกต่างกัน จึงนำความแตกต่างทางชีวเคมี มาใช้ในการเลือกแหล่งอาหารของเชื้อ โดย

เติมสารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด และเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ต้องการศึกษา นอกจากนี้มีการเติม supplement และ indicator เพื่อให้เชื้อเจริญและมี colony ที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถแยกเชื้อแต่ละชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มได้ โดยให้ผลการทดสอบที่แม่นยำ เชื่อถือได้ ลดระยะเวลาในการตรวจสอบเชื้อ ลดชนิดของ selective และ differential medium

1.2 วัตถุประสงค์

สามารถตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลงซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ลดต้นทุนในการตรวจสอบเชื้อ กว่า การใช้วิธีการตรวจสอบเชื้อแบบดั้งเดิม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้คัดแยกเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella*
2. ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลง โดยนำมาเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในสูตรอาหารแบบวิธีดั้งเดิม
3. ทดสอบเชื้อทางชีวเคมี
4. ตรวจสอบเชื้อในระดับโมเลกุล
5. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพที่สุด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การตรวจเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงจะเกิดประโยชน์ดังนี้

- 14.1 มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ ให้ผลการทดสอบที่แม่นยำ เชื่อถือได้ ใช้เวลาน้อยกว่าการตรวจสอบเชื้อโดยใช้สูตรอาหารดั้งเดิม
- 14.2 ลดต้นทุนในการตรวจเชื้อ ลดการใช้อุปกรณ์เครื่องแก้ว ขั้นตอน และแรงงานในการตรวจเชื้อจากตัวอย่าง
- 14.3 นำมาใช้ในการเรียนการสอนรายวิชา General Microbiology, Food Microbiology และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคอุจจาระร่วง

อุจจาระร่วงเป็นกลุ่มอาการ (Clinical syndrome) ที่มีสาเหตุกว้างขวาง โดยมีอาการถ่ายเป็นน้ำหรือถ่ายเหลวบ่อยครั้ง มักพบอาการเป็นไข้และอาเจียนร่วมด้วย อาการอุจจาระร่วงมักเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัสและปรสิตที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ อหิวาตกโรค (cholera), บิดไม่มีตัว (shigellosis), salmonellosis, yersiniosis, campylobacteriosis, viral gastroenteropathy และบิดมีตัว (amebiasis), giardiasis นอกจากนี้กลุ่มอาการอุจจาระร่วงอาจเกิดจากการติดเชื้อในกลุ่มเชื้อ *Escherichia coli*, non-O1 *Vibrio cholera* และ *Vibrio parahaemolyticus* รวมทั้งการเกิดอาการร่วมกับมาลาเรีย หัด และจากสารพิษ สำหรับประเทศกำลังพัฒนาอาจวินิจฉัยสาเหตุได้ถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ ที่เกิดจากการเจ็บป่วยแล้วมาใช้บริการด้านการรักษาที่โรงพยาบาลต่างๆ ที่มีเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการอย่างครบถ้วน

โดยทั่วไปในทางปฏิบัติ การเจ็บป่วยด้วยอุจจาระร่วง สามารถแบ่งตามลักษณะทางคลินิกได้ 6 ประเภท คือ

1. อุจจาระร่วงธรรมดา (Simple diarrhea) รักษาด้วยสารละลายเกลือแร่ทางปากที่มีน้ำ กลูโคส และเกลือแร่จำเป็น (ORS) โดยไม่จำเป็นต้องหาสาเหตุของการเจ็บป่วยแต่อย่างใด
2. บิด (Dysentery) มีอุจจาระถ่ายออกจากรู้น้อยแต่อาจพบว่ามีเลือดและมูกหรืออย่างใดอย่างหนึ่ง ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Shigella* หรือเชื้อตัวอื่นๆ
3. อุจจาระร่วงยืดเยื้อ (Persistent diarrhea) มีอาการติดต่อกันเกินกว่า 14 วัน
4. อุจจาระร่วงรุนแรงที่มีลักษณะเหมือนกับ cholera ที่มีอาการถ่ายเป็นน้ำจำนวนมาก
5. Viral gastroenteritis มีอาการอาเจียนเป็นสำคัญและบ่อยครั้งโดยที่อุจจาระร่วงไม่เป็นอาการหลัก
6. ลำไส้อักเสบเลือดออก (Hemorrhagic colitis) ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำแต่มีเลือดออกชัดเจน ไม่มีไข้ และตรวจไม่พบเม็ดเลือดขาวในอุจจาระ

ลักษณะทางคลินิกเหล่านี้หลายอย่างถือเป็นลักษณะเดียวกันเพราะมีพื้นฐานการรักษาเหมือนกัน คือ ต้องป้องกันการเสียชีวิตโดยการทดแทนการขาดน้ำและเกลือแร่

2.2 ลักษณะทั่วไปและการเกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษของเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้ flagella ที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) สามารถหมักย่อยน้ำตาล lactose ให้กรดและแก๊ส จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส มีระยะฟักตัว 3 - 4 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ทำให้เกิดอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง แต่ไม่บ่อยมีไข้ ตรวจอุจจาระจะพบเม็ดเลือดขาวปน เชื้อชนิดนี้ถูกใช้เป็นตัวชี้บ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและน้ำดื่ม (index microorganism) ดังนั้นในอาหารและน้ำดื่มที่ผ่านขั้นตอนอย่างถูกสุขลักษณะจะตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*

เชื้อ *E. coli* มักระบาดในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนา ในรูปแบบของอาหารสำเร็จ หรืออาหารบรรจุห่อ เช่น เนื้อ ผัก ซึ่งหากพบการปนเปื้อนของเชื่อน้อยกว่า 1000 CFU ก็สามารถก่อโรคได้ และหากมีการระบาด เช่น ในสถานรับเลี้ยงเด็ก ก็อาจก่อให้เกิดการระบาดต่อเป็น secondary infection ได้ เชื้อ *E. coli*

O157 นับเป็นโรคที่รายงานเป็นอันดับ 4 ของโรคติดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารของประเทศสหรัฐอเมริกา รองจากเชื้อ *Campylobacter*, *Samlonella* และ *Shigella*

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้ flagella ที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ต้องการสภาวะอากาศในการเจริญแบบ Facultative anaerobe ไม่สร้าง indole เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 35 - 37°C ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH \leq 4.5 ลักษณะที่สำคัญที่สุดของ gastroenteritis-causing *Salmonella* ที่ใช้แยกจากแบคทีเรียอื่นใน family *Enterobacteriaceae* เดียวกันกับ *Salmonella* คือ ความสามารถในการผลิต hydrogen sulfide (H_2S) จาก thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) และการไม่ ferment lactose และ sucrose ซึ่งเป็นลักษณะหลักที่ใช้แยก *Salmonella* และ *E. coli* เนื่องจากมักพบเชื้อทั้งสองชนิดนี้พร้อมๆ กัน *Salmonella* สามารถสร้างเอนไซม์ lysine decarboxylase ได้แต่ *Citrobacter freundii* สร้างไม่ได้ ความสามารถในการ ferment dulcitol ใช้แยก *Salmonella* จาก *Proteus* ในขณะที่ *Proteus* สามารถผลิตเอนไซม์ urease ที่ย่อย urea เป็น ammonia (NH_3) แต่ *Salmonella* เป็น urease negative

แม้จะมีการพัฒนาค้นคว้าข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ เกี่ยวกับแหล่งการแพร่กระจายของเชื้อในอาหาร ลักษณะการการเติบโตของเชื้อและการมีชีวิตรอดของเชื้อ รวมทั้งการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร แต่ก็พบว่า *Salmonella* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร (Salmonellosis) ที่พบได้มากที่สุดและยังคงพบจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้น อาจมีสาเหตุจากการที่เชื้อชนิดนี้มีหลายสปีชีส์ที่สามารถปนเปื้อนและเพิ่มจำนวนในอาหารโดยไม่ทำให้อาหารหลายชนิดมีคุณภาพผิดปกติ อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Salmonella typhimurium* ก่อให้เกิดการระบาดของ salmonellosis บ่อยครั้งที่สุด

โรคที่เกิดจาก *Salmonella* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ Enteric fever และ Intestinal salmonellosis สาเหตุของการก่อโรคทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่ต่างกัน คือ เกิดจากการบริโภคอาหารและน้ำที่มี *Salmonella* ที่ยังมีชีวิตอยู่เข้าไปในร่างกาย ในกรณีของ Enteric fever หรือ Typhoid fever เชื้อจะเพิ่มจำนวนในลำไส้ไม่มากนัก (limited proliferation) แต่การเกิดโรคนั้นมาจากความสามารถของเชื้อที่จะรุกเข้าไปในร่างกายผ่านทางระบบไหลเวียนเลือดแล้วไปเพิ่มจำนวนที่ตับ ซึ่งจะทำให้เกิดอาการที่ค่อนข้างรุนแรงจนถึงขั้นขาดงานได้ โดย *Salmonella* ที่เป็นสาเหตุของ Enteric fever คือ *Salmonella typhi* และ *Salmonella paratyphi* (อาการคล้ายเกิดจาก *S. typhi* แต่มีความรุนแรงน้อยกว่า) เชื้อทั้งสองนี้มีการปรับตัวให้สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเฉพาะในตัวตน (เชื้อนี้ไม่ก่อโรคในสัตว์) และสามารถแพร่กระจายผ่านจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้โดยผ่านจากอุจจาระที่ปนเปื้อนเข้าสู่ปาก (fecal oral route) การระบาดพบว่าหลายครั้งเกิดจากผู้ที่เป็นพาหะ (long-term carrier) ดังนั้นการแพร่ระบาดของโรคนี้อาจมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการมีสุขอนามัยที่ไม่ถูกต้อง (poor sanitation) การจัดการสุขาภิบาลที่ดีจะช่วยกำจัดหรือลดแหล่งเก็บเชื้อได้

Intestinal salmonellosis เป็นอาการอักเสบที่ส่วนหนึ่งของทางเดินอาหาร (gastroenteritis) แต่อาการจะไม่รุนแรงเท่า enteric fever เนื่องจาก เชื้อไม่รุกเข้าไปในกระแสเลือด จึงมีระยะเวลาป่วยสั้นกว่า อัตราการตายน้อยกว่า เชื้อนี้ไม่มี host เฉพาะ ดังนั้นจึงสามารถก่อโรคได้ทั้งในคน สัตว์หลายกลุ่ม เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทุกชนิด สัตว์ปีก และสัตว์เลื้อยคลาน (reptile) เป็นต้น เชื้อที่ถูกปล่อยออกมาในอุจจาระของสัตว์ติดเชื้อ (infected animal) โดยที่สัตว์ติดเชื้อเหล่านี้สามารถปล่อยเชื้อได้โดยไม่แสดงอาการป่วยจากเชื้อ (asymptomatic carrier) การแพร่กระจายโรคไปสู่สัตว์อื่นเป็นไปได้หลายทาง เช่น แมลง น้ำ อาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดี ทำให้โอกาสการแพร่กระจายและการติดเชื้อ gastroenteritis-causing *Salmonella* ไปสู่สัตว์อื่นมีสูงมาก อัตราพาหะ (carrier rate) ของ

บุคคลที่เลี้ยง การปนเปื้อนของซากสัตว์จากอุจจาระในระหว่างขบวนการฆ่า ช้ำและสูงขึ้นไปตาม ทำให้อุบัติการณ์ของ gastroenteritis-causing *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สูงมากขึ้นด้วย

หากมีการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในอาหารก็ถือว่าอาหารนั้นมีอันตรายต่อการบริโภค ดังนั้นในทางปฏิบัติปกติทั่วไปจึงไม่มีการนับจำนวน (enumerate) *Salmonella* จากอาหารที่นำมาตรวจสอบ จะเป็นแค่เพียงตรวจสอบว่าอาหารนั้นมี *Salmonella* หรือไม่เท่านั้น

Shigella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างแคปซูล สร้างเอนไซม์ catalase ไม่สามารถหมักยอน้ำตาล lactose แต่สามารถหมักยอน้ำตาล glucose ได้ เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 35 - 37°C มีขนาด DNA และมีปฏิกิริยาทางชีวเคมีคล้ายกับเชื้อ *E. coli* เชื้อสามารถอยู่รอดได้เป็นวัน ในอาหารแช่เย็น อาหารแช่เยือกแข็ง ในที่มีความเข้มข้นของเกลือแกง 5% และ pH 4.5 เชื้อสามารถเจริญและแบ่งตัวในอาหารได้หลายชนิด ทำให้เกิดโรคบิดไม่มีตัว (Shigellosis) ซึ่งเป็นโรคที่มีอาการถ่ายอุจจาระเหลวครั้งละจำนวนน้อยแต่บ่อยครั้ง ลักษณะอุจจาระจะเป็นมูกและเลือด หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง อาจอุจจาระเป็นน้ำเหลว จนถึงรุนแรง ถึงอุจจาระเลือดปนหนอง มักมีอาการปวดท้องเกร็งและถ่ายปวดเบ่งคล้ายถ่ายอุจจาระไม่สุด ภายหลังได้รับเชื้อประมาณ 1 - 2 วัน ในประเทศไทยพบว่าเชื้อ *S. dysenteriae* type 1 เป็นสาเหตุของอาการโรคบิดไม่มีตัวมากที่สุดและมีอัตราการป่วยตายสูงกว่าชิโรไทป์อื่น มักพบการระบาดมากตามจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) หมายถึง อาหารที่มีส่วนประกอบที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ จุลินทรีย์ต่างชนิดกันย่อมต้องการสารอาหารและสภาวะในการเจริญต่างกัน เช่น pH ของอาหาร อุณหภูมิในการเจริญ

อาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปจะมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีสารอาหารครบตามที่จุลินทรีย์นั้นต้องการ และสารอาหารมีความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น แบคทีเรียต้องการ pH ประมาณ 6.8 - 7.2 ส่วนเชื้อราต้องการ pH ค่อนไปทางกรดถึงกรดอ่อนคือ pH 5.5. - 6.5
3. ไม่มีสารพิษต่อจุลินทรีย์
4. ไม่มีการปนเปื้อน (contamination) ของสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์อื่น โดยหลังจากเตรียมอาหารแล้วต้องนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปกำจัดเชื้อ (sterilization) เช่น กำจัดเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอบน (pressure cooker หรือ autoclave) ก่อนนำมาใช้

แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามลักษณะการใช้งาน ได้ 5 ชนิด คือ

1. enriched medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะเป็นของเหลว ใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ โดยการเติมอาหารพิเศษเฉพาะที่ช่วยในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ
2. selective medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารบางอย่างลงไปเพื่อให้เฉพาะจุลินทรีย์ที่สนใจเจริญ และหรือมีการเติมสารบางอย่างเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ
3. differential medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เมื่อจุลินทรีย์เจริญจะสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะโคโลนีและลักษณะการเจริญที่แตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ทันที มักเป็นอาหารแข็ง เช่น EMB agar เมื่อใช้เลี้ยงเชื้อพบว่า *Escherichia coli* ที่เจริญบน EMB agar จะให้ลักษณะ

โคโลนีที่มีสีเหลืองคล้ายโลหะเรียกว่า metallic sheen แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่นๆ ซึ่งมักจะมีโคโลนีเยิ้มสีชมพูบนอาหารชนิดนี้

4. synthetic medium (chemically defined medium) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารที่ทราบชนิดและปริมาณองค์ประกอบอย่างแน่ชัด มีทั้งที่เตรียมเป็นอาหารเหลวและอาหารแข็ง เช่น MSG (Mineral salt glucose)
5. complete medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ที่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ มักเตรียมจากสารประกอบธรรมชาติซึ่งไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น NB (Nutrient broth) และ NA (Nutrient agar) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย แม้ว่าเชื้อราก็สามารถเจริญได้ ส่วน PDA (Potato dextrose agar) และ PDB (Potato dextrose broth) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อรา ซึ่งในการเตรียมต้องปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 5.5 - 6.5 ด้วยกระดาษ pH หรือเครื่องวัด pH

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* เป็นเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม การแยกเชื้อแต่ละชนิดนี้ จะใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อเชื้อและเมื่อเชื้อเจริญจะสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะโคโลนีและลักษณะการเจริญที่แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่นๆ ทำให้มีการคิดค้น ดัดแปลงและพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคซึ่งอาจปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มที่ใช้บริโภคในชีวิตประจำวัน การดัดแปลงสูตรอาหารอาศัยหลักการเติมสารที่ส่งเสริมการเจริญเฉพาะเชื้อที่ต้องการศึกษาและหรือเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ต้องการตรวจสอบ เช่น การเติม cofixime และ tellurite ลงในอาหาร Sorbitol MacConkey medium เพื่อแยกเชื้อ *E. coli* O157:H7 จาก radish sprouts (Fujisawa และคณะ, 2000) การใช้สารจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อที่มีการเติม supplement เช่น ceftazidime เพื่อใช้ในการแยกเชื้อในตระกูล Enterobacteriaceae การเติม diazonium salt ของ sulfanilic acid ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ออกจากเชื้ออื่นๆ ในตระกูล Enterobacteriaceae (Wauters และคณะ, 2004) รวมทั้งการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการใช้ combine media ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเชื้อที่มีลักษณะจำเพาะและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และเป็นการประหยัดอุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการปฏิบัติการ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข คิดค้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ชื่อ DMSc Salm Media-1 (DSM-1) ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์เชื้อที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม พบว่าให้ผลการตรวจสอบที่เร็วกว่าการใช้วิธีแบบดั้งเดิม ปัจจุบันมีการผลิตเพื่อจำหน่ายทางการค้า (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549)

บริษัท Merck พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจสอบเชื้อ coliforms/*E. coli* ภายใต้ชื่อ Chromocult Coliform Agar and Coliform Agar ES (enhanced selectivity) โดยเติม Tergitol 7 เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยไม่มีผลยับยั้งเชื้อ coliforms/*E. coli* (<http://www.scientistlive.com/European-Food>)

Wilson, 2004 พัฒนา chromogenic media ที่เหมาะสมสำหรับตรวจแยกเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย ซึ่งพบว่า chromogenic media มี sensitivity และ specificity 100% และ 94% ตามลำดับ



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ดำเนินการวิจัยตามขอบเขตของโครงการวิจัย ดังนี้

- 3.1 ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้คัดแยกเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella*
- 3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลง โดยนำมาเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในสูตรอาหารแบบวิธีดั้งเดิมที่ได้รับการยอมรับ
- 3.3 ทดสอบเชื้อทางชีวเคมี
- 3.4 ตรวจสอบเชื้อในระดับโมเลกุล
- 3.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพที่สุด

เชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (TISTR 292 ATCC 13311), *S. choleraesuis* (TISTR 1484 ATCC 14028) สั่งซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Shigella dysenteriae* type 1 (DMST 37004), *S. dysenteriae* type 2 (DMST 37005), *S. dysenteriae* type 3 (DMST 37006) สั่งซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1 คัดแปลงสูตรอาหารเพื่อให้สามารถคัดแยกเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella*

ข้อดีของอาหารดัดแปลงสูตร MSSA1

เป็น completed medium ที่มีสารอาหารมากพอสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเติม bile salt เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

ข้อดีของอาหารดัดแปลงสูตร MSSA2

เป็น completed medium ที่มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเติม bile salt เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

ข้อดีของอาหารดัดแปลงสูตร MSSA3

เป็น completed medium ที่มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเติม bile salt เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

ข้อดีของอาหารดัดแปลงสูตร MTSA

เป็น completed medium ที่มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเติม bile salt เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

ข้อดีของอาหารดัดแปลงสูตร MKA

เป็น completed medium ที่มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเติม bile salt เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ปริมาณ bile salt ที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยกว่าสูตรอาหาร MSSA1, 2, 3 5.7 เท่า

ข้อดีของอาหารดัดแปลงสูตร MBA

เป็น completed medium ที่มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเติม bile salt และ methylene blue เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลง โดยนำมาเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในสูตรอาหารดั้งเดิม

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ ในอาหารสูตรดัดแปลง (MSSA1, MSSA2, MSSA3, MTSA, MKA, MBA) เทียบกับการเลี้ยงในอาหารสูตรดั้งเดิม (EMB, SSA, Klingler Iron Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 1 - 2 วัน

3.3 ทดสอบเชื้อทางชีวเคมี

หลังจากเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารสูตรดัดแปลงและสูตรดั้งเดิมแล้ว ทดสอบเชื้อทางชีวเคมี โดยทดสอบเชื้อในอาหาร Motility Indole Lysine Sulfide medium และ Triple sugar Iron Agar

3.4 ตรวจสอบเชื้อในระดับโมเลกุล

นำเชื้อที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง สกัด DNA ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหาร LB Agar โดยวิธีการ pure plate 24-48 ชั่วโมง บ่มที่ 37 °C

2. เติม TE buffer 2 ml ชุดเชื้อที่ผิวหน้าอาหาร
3. ดูดมา 1 ml ใส่ microcentrifuge tubes
4. นำไป centrifuge ที่ 12000 rpm 10 นาที 37 °c
5. เทของเหลวใสส่วนบนจาก microcentrifuge tubes ที่
6. เติมเชื้อที่เหลือจาก plate ลงไปแล้วทำซ้ำในข้อที่ 4 และ 5
7. เติม TE buffer 200 µl ลงไปในหลอด microcentrifuge tubes, vortex
9. เติม lysozyme 100 µl
10. บ่มที่ 37°C (60 - 90 นาที)
11. เติม 10% SDS ลงไป 50 µl
12. บ่มที่ 37°C (60 - 90 นาที)
13. เติม 5 µl (รอให้ใสหากไม่ใสให้ใส่ proteinase K เพิ่ม)
14. เติม phenol:chloroform : isoamyl alcohol 800 µl
15. ทำ creamy
16. centrifuge ที่ 12000 rpm 10 นาที 37°C
17. ดูดส่วนที่ใสด้านบนใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่
18. เติม Chloroform:isoamyl alcohol
19. ทำซ้ำข้อที่ 16, 17 และ 18
20. เติม sodium acetate 20 µl
21. เติม 95% ethanol 800 µl
22. freeze (-20°C) overnight
23. centrifuge 37°C 12000 rpm 10 นาที
24. เทของเหลวทิ้ง
25. เติม 70% ethanol 800 µl
26. centrifuge 37°C 12000 rpm 10 นาที
27. เทของเหลวทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน
28. นำไปอบที่ 60°C ระเหยของเหลวออกให้หมดเหลือแต่ตะกอน
29. ใส่น้ำกลั่น 100 µl
30. ดัดให้ตะกอน (DNA) ละลายในน้ำกลั่นให้หมด
31. ดูด DNA ที่ละลายน้ำ 2 µl ผสมกับ bromtymol blue 8 µl
32. mix แล้วดูดขึ้นมา 10 µl
33. ใสลงใน agarose gel ที่เตรียมไว้ 10 µl
34. run gel 100V 400 mA 300 นาที
35. นำ gel ไปแช่ Ethidium bromide 1 ชั่วโมง
36. นำ gel ไปแช่น้ำ 30 นาที
37. นำเข้าเครื่อง gel document
38. บันทึกผล

3.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพที่สุด

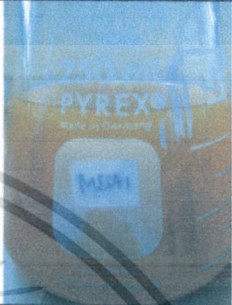


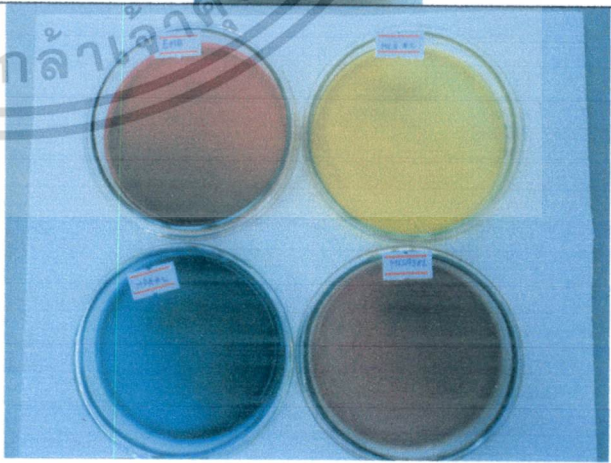
ตัวอย่างอาหารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ส้มตำปูปลาร้า แกงกะทิ และ น้ำลำไย โดยนำตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม อย่างละ 1 ml เจือจางตัวอย่างอาหารแบบ serial dilution ใช้เทคนิค spread plate ตัวอย่างอาหารเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงบนอาหารสูตรดัดแปลงที่ดีที่สุด บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 10 - 24 ชั่วโมง



บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 คัดแปลงสูตรอาหารเพื่อให้สามารถคัดแยกเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella*

อาหารสูตรดัดแปลง	รูปประกอบ
MSSA1	
MSSA2	
MTSA	
<div style="display: flex; flex-wrap: wrap; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 2px;">EMB</div> </div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 2px;">MKA</div> </div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 2px;">MBA</div> </div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 2px;">MSSA3</div> </div> </div> <p>อาหารสูตรดัดแปลงทุกชนิด มีลักษณะคงตัว เป็นเนื้อเดียวกัน มี pH 7.00±2.00</p>	

ตารางที่ 1 ลักษณะของอาหารสูตรดัดแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

©ลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลง โดยนำมาเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในสูตรอาหารดั้งเดิม

ผลการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* และ *Shigella* แสดงในตารางที่ 2

อาหารสูตรดัดแปลง	ลักษณะการเจริญของเชื้อ			เวลาที่ใช้บ่มเชื้อ ที่ 35°C
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	
MSSS1	โคโลนีใส ขนาดเล็ก อาหารเปลี่ยนเป็นสี เหลืองสดทั้ง plate	โคโลนีใส ขนาดเล็ก สี ของอาหารไม่ เปลี่ยน	โคโลนีใสมีขนาดเล็ก กว่าเชื้อที่เจริญใน จานอาหาร SSA สี ของอาหารไม่เปลี่ยน	16
MSSA2	โคโลนีใส ขนาดเล็ก อาหารเปลี่ยนเป็นสี เหลืองสดทั้ง plate	โคโลนีใส สีของ อาหารไม่เปลี่ยน	โคโลนีใสมีขนาดเล็ก กว่าเชื้อที่เจริญใน จานอาหาร SSA สี ของอาหารไม่เปลี่ยน	16
MSSA3	โคโลนีใส อาหารไม่ เปลี่ยนสี	โคโลนีใส สีของ อาหารไม่เปลี่ยน	โคโลนีใสมีขนาดเล็ก กว่าเชื้อที่เจริญใน จานอาหาร SSA สี ของ อ า ห า ร เปลี่ยนเป็นสีชา	12
MTSA	โคโลนีใส ขนาดเล็ก อาหารเปลี่ยนเป็นสี เหลืองสดทั้ง plate	โคโลนีใส สีของ อาหารไม่เปลี่ยน	โคโลนีใสมีขนาดเล็ก กว่าเชื้อที่เจริญใน จานอาหาร SSA สี ของอาหารไม่เปลี่ยน	16
MKA	โคโลนีใส ขนาดเล็ก อาหารเปลี่ยนเป็นสี ชมพู	โคโลนีใสมีจุดดำ กลางโคโลนี อาหาร เปลี่ยนเป็นสีชมพูทั้ง plate	โคโลนีใส ขนาดเล็ก อาหารเปลี่ยนเป็นสี ชมพู	12
MBA	โคโลนีสีน้ำเงินเข้ม กว่าสีของอาหาร สี ของอาหารไม่ เปลี่ยน	โคโลนีใสสีดำกลาง โคโลนี สีของอาหาร ไม่เปลี่ยน	โคโลนีใส สีของ อาหารไม่เปลี่ยน	12

ตารางที่ 2 ลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงแต่ละชนิด

* เป็นระยะเวลาสั้นที่สุดที่ใช้บ่มเชื้อจนสามารถเห็นการเจริญของเชื้อได้ชัดเจน

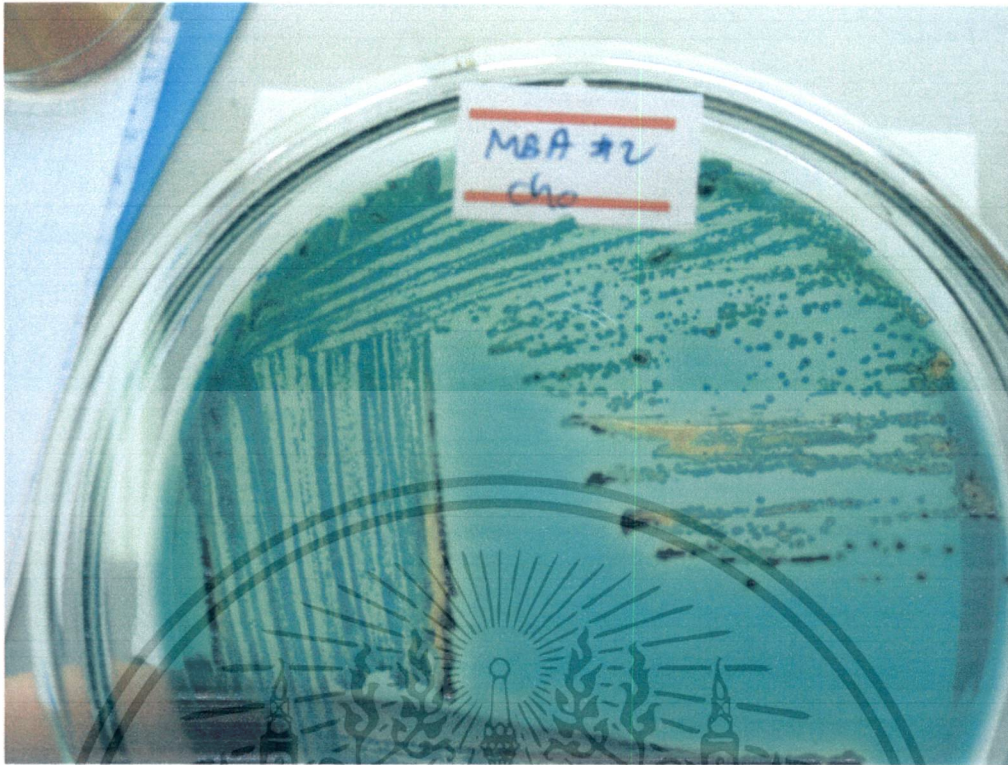


รูปที่ 1 โคลนิจของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MBA 12 h, 35°C



รูปที่ 2 โคลนิจของเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MBA 12 h, 35°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิใช้ข้อมูลไปลงนิตยสารและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

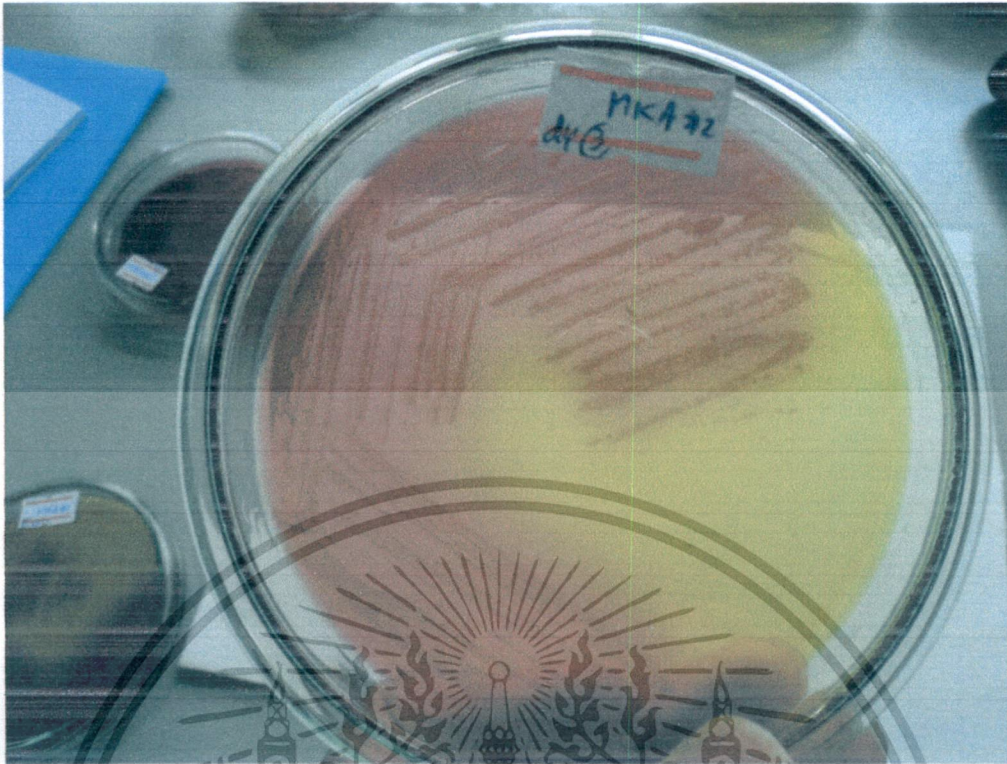


รูปที่ 3 โคโลนีของเชื้อ *Salmonella choleraesuis* ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MBA 12 h, 35°C



รูปที่ 4 โคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MKA 12 h, 35°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รูปที่ 5 โคลนิจของเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MKA 12 h, 35°C



รูปที่ 6 โคลนิจของเชื้อ *Salmonella chleraeusis* ที่เจริญในงานอาหารสูตรดัดแปลง MKA 12 h, 35°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเผยแพร่ หรือต้องอ้างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

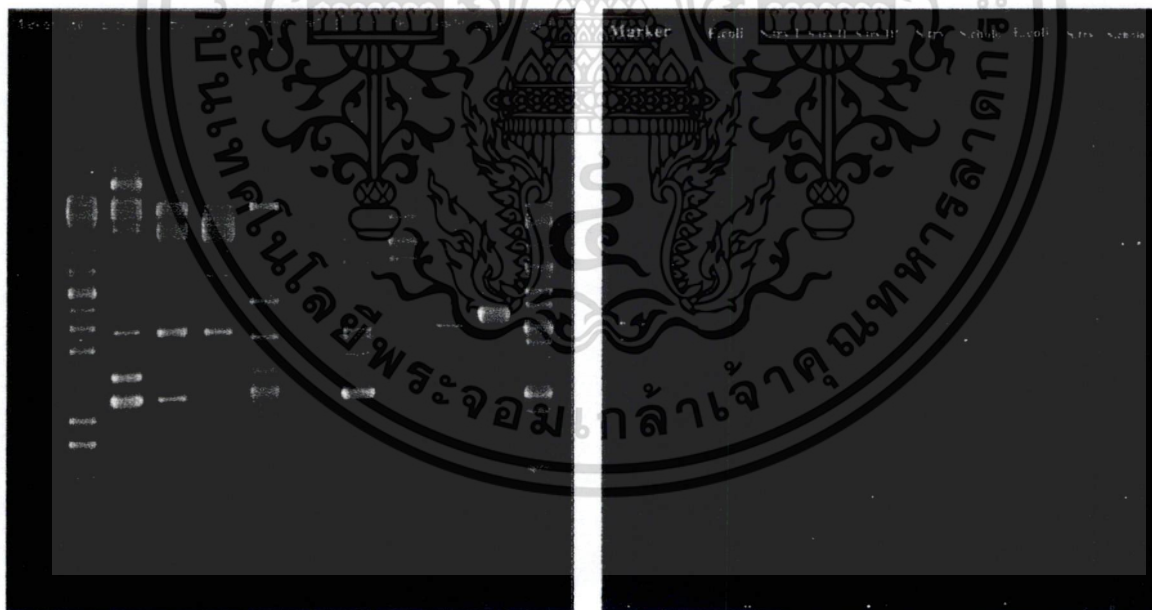
3.3 ทดสอบเชื้อทางชีวเคมี

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละชนิดที่เจริญในอาหารสูตรดัดแปลง ลงในอาหาร MILS medium และ TSI Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C, 1 – 2 วัน เพื่อทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

เชื้อ	อาหารที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี						
	MILS medium				TSI Agar		
	Motility	Indole	Lysine	Sulfide	Glucose fermentation	Lactose/Sucrose fermentation	H ₂ S production
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Salmonella</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 3 การตรวจสอบทางชีวเคมีของเชื้อในอาหาร MILS medium และ TSI Agar

3.4 ตรวจสอบเชื้อในระดับโมเลกุล



(a)

(b) *

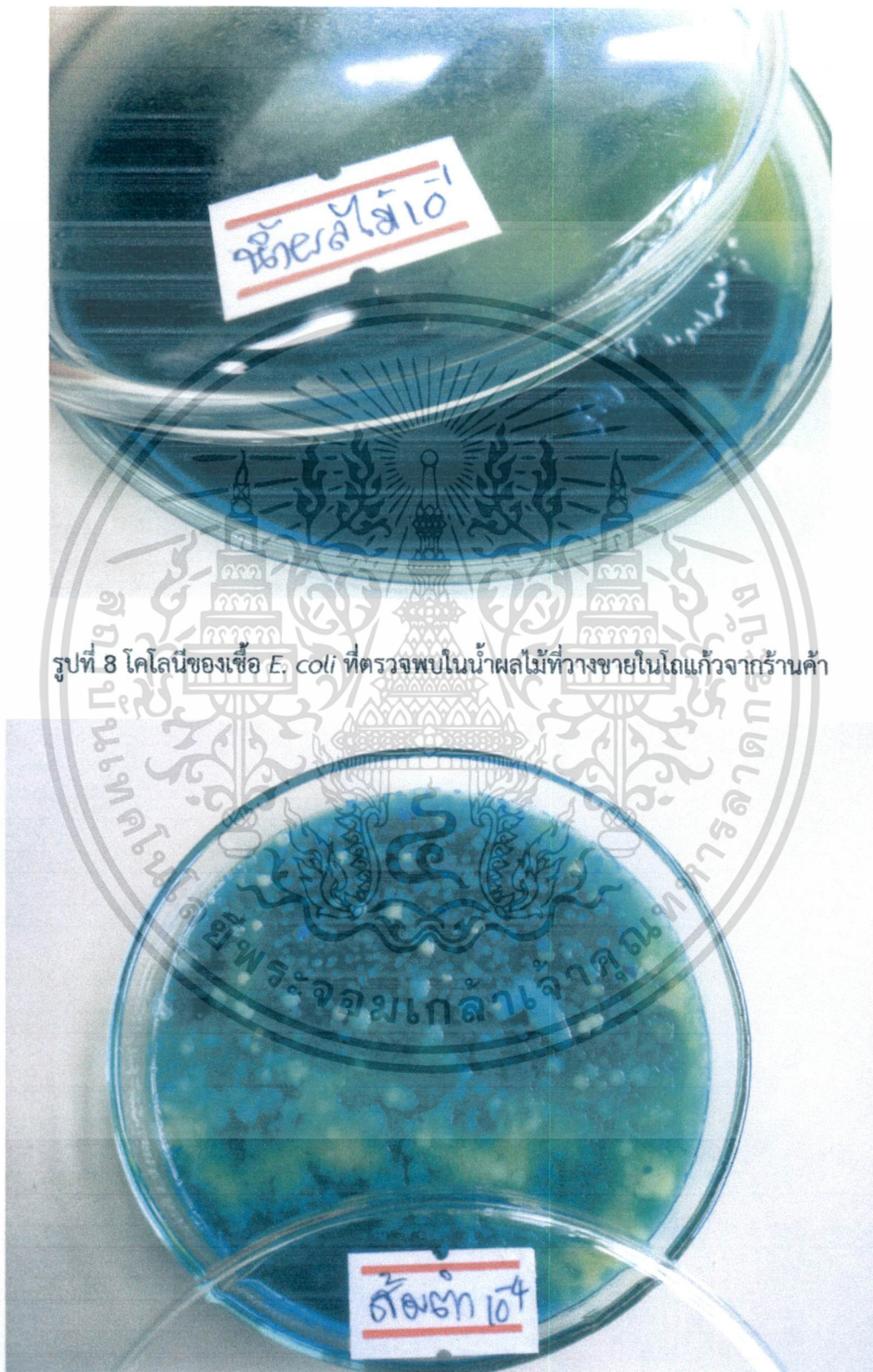
รูปที่ 7 ผลการสกัด DNA เชื้อ *E. coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในอาหารสูตรดัดแปลง (a) เทียบกับแถบ DNA ของเชื้อชนิดเดียวกันในอาหารสูตรดั้งเดิม (b)

* แถบ DNA จาง ไม่สามารถเห็นแถบ DNA เมื่อ print ภาพ แต่สามารถเห็นแถบ DNA ใน file งานวิจัย

131208

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามดัดแปลงหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากสำนักหอสมุดกลางพระจอมเกล้าลาดกระบัง

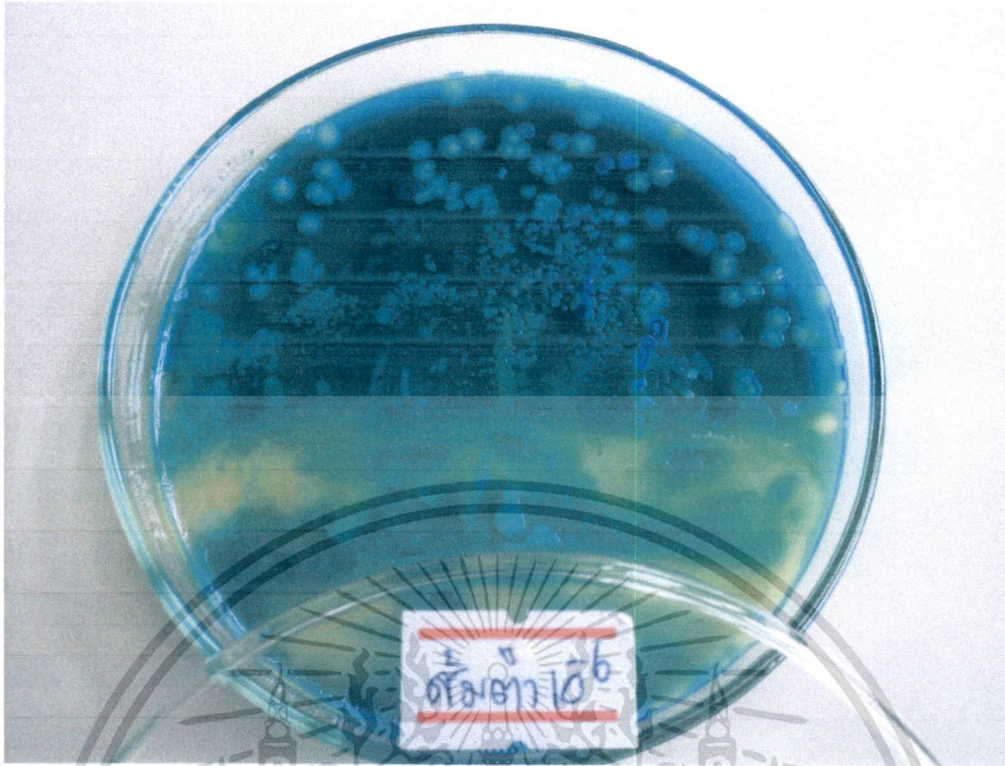
3.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพที่สุด



รูปที่ 8 โคลนินของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในน้ำผลไม้ที่วางขายในโตแก้วจากร้านค้า

รูปที่ 9 โคลนินของเชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *Shigella* ที่ตรวจพบในส้มตำ-ปลาร้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

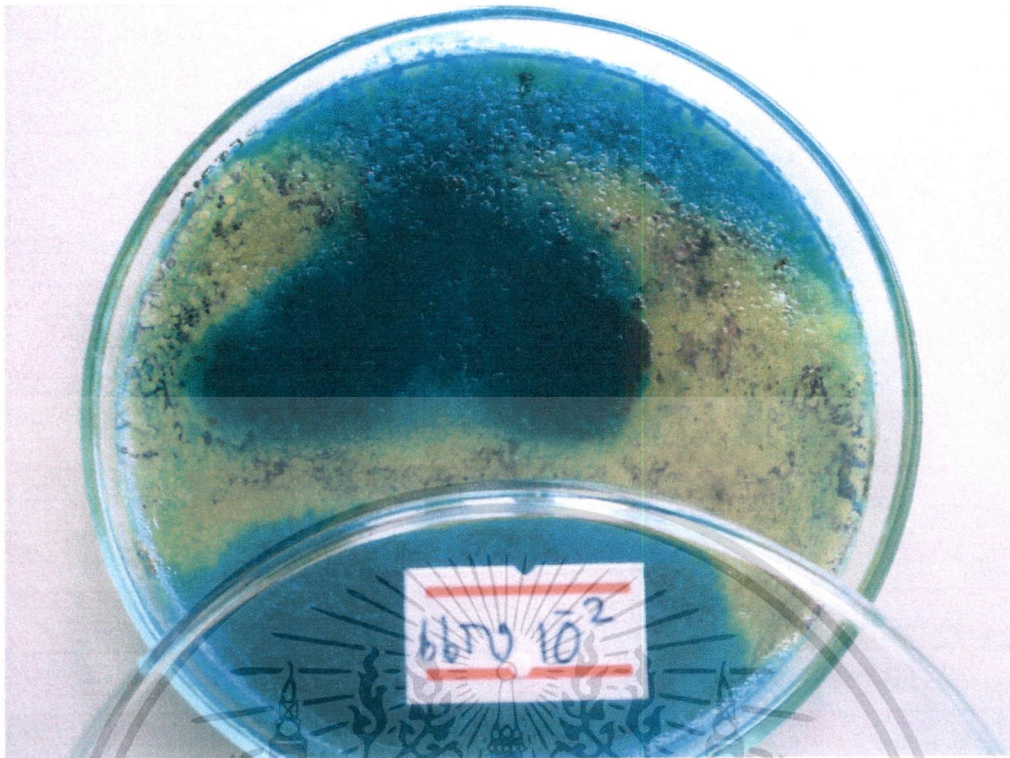


รูปที่ 10 โคลนของเชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *Shigella* ที่ตรวจพบในส้มตำ-ปลาร้า



รูปที่ 11 โคลนของเชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *Shigella* ที่ตรวจพบในส้มตำ-ปลาร้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 โคลนิจของเชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *Shigella* ที่ตรวจพบในแกงกะทิใส่ถาดวางขายในร้านค้า



รูปที่ 13 โคลนิจของเชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *Shigella* ที่ตรวจพบในแกงกะทิใส่ถาดวางขายในร้านค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้าม **อสังสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง** ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยได้ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้ในขั้นตอนการแยกเชื้อก่อโรคจากอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์เชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม ให้ใช้งานง่าย สะดวก รวดเร็ว แม่นยำและราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำหน่าย โดยมีขั้นตอนการตรวจเชื้อแบบดั้งเดิม ที่ถูกพัฒนาขึ้นซึ่งเป็นเทคนิคที่ยังคงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวัจนแต่จะมีการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้สามารถใช้งานได้ง่ายขึ้นและลดเวลาในการตรวจสอบเชื้อ ลดขั้นตอนการอาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์เครื่องแก้ว ส่งผลต่อการลดต้นทุนและแรงงานโดยรวมในการตรวจสอบเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในห้องปฏิบัติการ

อาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MBA สามารถตรวจแยกเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ได้ โดยที่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงลักษณะของเชื้อ เพียงแต่ให้สีโคโลนีที่ต่างกันเพื่อง่ายต่อการตรวจแยกเชื้อ ซึ่งอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง ไม่สามารถแยกเชื้อ *E. coli* และ *Shigella* ได้ ดังนั้น อาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MBA จึงเป็นทั้ง selective และ differential medium สำหรับตรวจแยกเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* และ *Shigella* ในอาหารและเครื่องดื่มได้ โดยใช้เวลาเพียง 12 ชั่วโมง ที่ 35°C

ผู้วิจัยจะพัฒนาสูตรอาหาร MBA ต่อไป เพื่อให้สามารถตรวจสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ได้เร็วขึ้น ควบคู่กับการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ specificity และ sensitivity รวมทั้งปรับปรุงแบบการทดสอบให้สามารถใช้งานได้สะดวกมากขึ้น เช่น พัฒนาเป็นแผ่นตรวจสอบเชื้อ เป็นต้น หลังจากมีการปรับปรุงสูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับตรวจแยกเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* และ *Shigella*

ตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ อาหารและเครื่องดื่มต่างๆ ไป ที่มีพบการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารเป็นพิษ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ทั้งในระดับการเรียนการสอนในห้องปฏิบัติการและสามารถพัฒนาเป็นการตรวจสอบเชื่อดังกล่าวที่ได้มาตรฐานต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Fujisawa T., Sata S., Aikawa K., Takahashi T., Yamai S. and Shimada T. 2000. Modification of Sorbitol MacConkey Medium Containing Cefixime and Tellurite for Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Radish Sprouts. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Vol. 66, No. 7. p. 3117-3118
2. Wauters G., Avesani V., Charlier J., Janssens M. and Delmée M. 2004. Histidine Decarboxylase in *Enterobacteriaceae* Revisited. J Clin Microbiol. Vol. 42 (12). P. 5923-5924.
3. Wilson G. 2004. Rapid and Economical Method for Biochemical Screening of Stool Isolates for *Salmonella* and *Shigella* Species. J. Clin. Microbiol. Vol. 42 no. 10. p. 4821-4823
4. Steven P., Dhartika P., Aref K., Joseph P. T., Stephan W. and Brian L. S. 2005. Detection of *Salmonella* Strains and *Escherichia coli* O157:H7 in Feces of Small Ruminants and Their Isolation with Various Media. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 71, No. 4. p. 2158-2161
5. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2549. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* อย่างเร็ว. Food innovation.
6. <http://www.scientistlive.com/European-Food>