การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค duplex PCR และวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM)

Detection of *Listeria* species using duplex PCR with High Resolution Melting (HRM) analysis

นางสาวสุภัสภรณ์ ทองคำ

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DETECTION OF LISTERIA SPECIES USING DUPLEX PCR WITH HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) ANALYSIS

MISS SUPATSAPHORN THONGKHAM

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค duplex PCR และวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM) Detection of *Listeria* species using duplex PCR with High Resolution Melting (HRM) analysis
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุภัสภรณ์ ทองคำ รหัสนักศึกษา 63050527
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ นายธีระรักษ์ ศรีนวลกราย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
รศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	
นายธีระรักษ์ ศรีนวลกราย กรรมการและที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR และวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM)
ชื่อนักศึกษา นางสาวสุภัสภรณ์ ทองคำ รหัสนักศึกษา 63050527
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2566
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์
นายธีระรักษ์ ศรีนวลกราย

บทคัดย่อ

เชื้อลิสทีเรีย (*Listeria* spp.) เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร *Listeria monocytogenes* เป็นสปีชีส์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ที่เรียกว่า "Listeriosis" อีกทั้งความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำของเชื้อ *Listeria* spp. เป็นคุณลักษณะที่ทำให้เชื้อปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหารได้ง่าย ดังนั้นการบ่งชี้ชนิดของเชื้อลิสทีเรียจึงมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมอาหารในการลดความเสี่ยงการก่อโรคอย่างมาก ในการศึกษานี้ใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อเป็นการคัดแยกออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆในอุตสาหกรรมอาหาร โดยตรวจสอบด้วยวิธีด้วย Real-time PCR และวิเคราะห์ด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) ทำการทดสอบแบบ Single PCR Amplification และแบบ Duplex PCR Amplification เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ พบว่า Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย มีความจำเพาะและสามารถตรวจวัดได้เฉพาะเชื้อลิสทีเรียจำนวน 6 สปีชีส์ ดังนี้ *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua, Listeria welshimeri, Listeria seeligeri, Listeria ivanovii, Listeria grayi* และเมื่อทำการทดสอบ Limit of detection (LOD) ด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นโดยทดสอบที่ปริมาณเชื้อ 10^1- 10^5 CFU/ml โดยทำซ้ำกับเชื้อ *Listeria* 3 สปีชีส์ จากนั้นได้ทำการประเมินวิธีการที่พัฒนา (Validation) กับตัวอย่างจริง 60 ตัวอย่างแบบ Blind test โดยทำการเพิ่ม Positive Control นำไปทดสอบหา LOD ด้วยวิธี Duplex PCR Amplification สามารถตรวจวัดได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่เจือจางจนถึง 10^3 CFU/ml อีกทั้งการประเมินการใช้ Duplex PCR กับตัวอย่างจริง 60 ตัวอย่างแบบ Blind test เทียบผลการทดลองกับวิธี Gold standard (ISO 11290:2017) ได้ค่าความไวต่อการตรวจ (Sensitivity) เท่ากับ 100% และได้ค่าความจำเพาะ (Specificity) ของวิธี Duplex PCR ซึ่งตรวจหาเชื้อลิสทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 88.89% และได้ค่าความถูกต้องของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลตรวจ (Diagnostic Accuracy) เท่ากับ 95% ที่ Cut off ประมาณ 50 -d(RFU)/dT การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM) เป็นวิธีการที่ช่วยลดระยะเวลาการคัดแยกเชื้อลิสทีเรีย กับเชื้อชนิดอื่นๆในอุตสาหกรรมอาหารได้ ทำให้สามารถวิเคราะห์และควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ในบริเวณหรือตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

คำสำคัญ : เชื้อลิสทีเรีย, เทคนิค duplex PCR**,** High Resolution Melting (HRM) analysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Detection of *Listeria* species using duplex PCR with High Resolution Melting (HRM) analysis
Students	Miss Supatsaphorn Thongkham Student ID 63050527
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	School of Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Piengchan Sonthayanon
	Mr.Theerarak Srinulgray

Abstract

Listeria spp. is a group of bacteria of significant concern in the food industry. *Listeria monocytogenes* is a species that can cause a severe human illness known as "Listeriosis." Its ability to grow at low temperatures makes it a common contaminant in the food industry. Therefore, identifying different strains of *Listeria* is crucial for food industry applications to minimize disease risk. In this study, molecular biology techniques were employed to detect and differentiate *Listeria* species from other bacteria in the food industry. This was done using Real-time PCR and analyzed with High Resolution Melting (HRM) Analysis. Single PCR amplification and Duplex PCR amplification methods were used to test primer specificity, and it was found that the primers used for *Listeria* detection were specific and could specifically detect six species: *Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria welshimeri, Listeria seeligeri, Listeria ivanovii,* and *Listeria grayi.* The limit of detection (LOD) of the developed method was tested with different concentrations of *Listeria* spp. (ranging from 10^5 to 10^1 CFU/ml). The LOD was determined for the Duplex PCR amplification method, and it could detect as low as 10^3 CFU/ml of *Listeria*. The developed method was validated with blind test samples, consisting of 60 real samples, and positive controls were added to determine the LOD using the Duplex PCR amplification method. The results showed that the method could detect *Listeria* at concentrations as low as 10^3 CFU/ml. In comparison to the gold standard method (ISO 11290:2017), the sensitivity of the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา

Duplex PCR method was 100%, and its specificity for detecting *Listeria* spp. was 88.89%. The diagnostic accuracy was determined to be 95% using a cut-off of approximately 50 -d(RFU)/dT. Detecting *Listeria* spp. using the Duplex PCR technique in combination with High Resolution Melting (HRM) Analysis is a method that can reduce the time required for differentiating *Listeria* from other bacteria in the food industry. This enables rapid analysis and control of bacteria in samples, making it a valuable tool in the field of food safety and quality control.

Keywords: *Listeria* spp., duplex PCR technique, High Resolution Melting (HRM) analysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

สหกิจศึกษานี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้อย่างเรียบร้อย และตามเป้าหมายได้ จากการสนับสนุนของอาจารย์ที่ปรึกษารศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ที่ช่วยดูแลและสนับสนุนการทำงานของนักศึกษามาตลอดระยะเวลาของการสหกิจศึกษาครั้งนี้ คอยชี้แนะแนวทาง สั่งสอน ให้ความรู้ ตลอดจนมอบประสบการณ์ใหม่ๆที่ ช่วยให้นักศึกษาได้ก้าวข้ามอุปสรรค และสามารถเสร็จสิ้นสหกิจศึกษาในครั้งนี้ได้

ขอขอบคุณคุณธีระรักษ์ ศรีนวลกราย ที่คอยช่วยดูแล และถ่ายทอดกระบวนการคิด กระบวนการแก้ไขปัญหา คอยให้คำแนะนำ และสนับสนุนได้อย่างดี ในระหว่างระยะเวลาช่วงการทำสหกิจศึกษานี้

ขอบขอบคุณเจ้าหน้าที่ คณะเวชศาสตร์มหาลัย มหิดล ทุกท่าน ที่ค่อยดูแล ช่วยเหลือ บอกกล่าว และตักเตือนในเรื่องสำคัญต่างๆ ทำให้สามารถทำงานได้อย่างราบรื่นไม่ติดขัด และไม่มีปัญหาใดๆ

ขอขอบคุณปรีดานุช ทองจันทร์ นักศึกษา สหกิจศึกษาที่ได้ร่วมงานกัน ช่วยเป็นที่พึ่งพิง และก้าวข้ามปัญหาต่างด้วยกัน ตลอดระยะเวลาการทำสกิจศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณครอบครัวที่คอยสนับสนุนการเรียนมาตลอด คอยเป็นกำลังใจ เป็นที่ปรึกษา คอยให้การสนับสนุนและคอยอยู่เคียงข้างในทุกเวลา

ขอขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ คณะวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยบ่มเพาะและขัดเกลานักศึกษาตลอดระยะเวลา 4 ปี ที่ได้ทำการศึกษา

ขอขอบคุณมิตรสหายทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจ ห่วงใย และคอยอยู่เคียงข้าง ช่วยให้สามารถก้าวข้ามปัญหาและอุปสรรคต่างๆที่เกิดขึ้น

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้ที่อ่านงานวิจัยฉบับนี้ทุกท่าน ที่ให้ความสนใจแก่งานวิจัยฉบับนี้ ผู้ทำวิจัยคาดว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหาเชื้อในอุตสหกรรมอาหารในอนาคต

สุภัสภรณ์ ทองคำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เชื้อ *Listeria* spp. 3
2.1.1 ประวัติและความเป็นมา 3
2.1.2 ความสำคัญของเชื้อ *Listeria* spp. ในอุตสาหกรรมอาหาร 4
2.2 Real-time PCR 4
2.2.1 หลักการทำงาน 4
2.2.2 เทคนิค High Resolution Melting (HRM) Analysis 5
2.2.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค HRM Analysis ในอุตสาหกรรมอาหาร 7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 8
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 12
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 33
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 38
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 39
ภาคผนวก ข ปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ 40
ภาคผนวก ค จำนวนตัวอย่างเชื้อที่ใช้ทดสอบ 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ลำดับ Sequence ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ..... 9
4.1 แสดง PCR master mixture วิธีทดสอบแบบ Single PCR Amplification 12
4.2 แสดง Amplification program วิธีทดสอบแบบ Single PCR Amplification..... 13
4.3 แสดง PCR master mixture วิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification 19
4.4 แสดง Amplification program วิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification..... 19
4.5 แสดง PCR master mixture หลังปรับสภาวะวิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification 23
4.6 แสดง Amplification program หลังปรับสภาวะวิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification 23
4.7 แสดงผลการทดสอบ Validation 31
ข.1 แสดงค่าการตรวจนับเชื้อลิสทีเรีย 40
ค.1 แสดงตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ..... 41
ค.2 แสดงตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ..... 42
ค.3 แสดงตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ..... 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงปริมาณสัญญาณ Fluorescence ของ DNA Melt curve ตามปริมาณของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป..... 6
2.2 แสดง melting curve ของความแตกต่างของ base pair ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็น Homogenous, heterogenous และ wildtype ระหว่าง 120 bp และ 220 bp ของ amplicon 6
4.1 แสดงผลการทดสอบ Single PCR Amplification..... 13
4.2 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 1 15
4.3 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 2 15
4.4 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 3 16
4.5 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 4 16
4.6 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 5 17
4.7 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 6 17
4.8 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 7 18
4.9 แสดงผลการทดสอบ Duplex PCR Amplification 20
4.10 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการตรวจ positive control(Primer PCT). 24
4.11 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย..... 24
4.12 การหาความเข้มข้นของ Mx Hotstart PCR Mix..... 25
4.13 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 1 ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes* 26
4.14 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 2 เพิ่มจำนวนรอบของการทำ PCR..... 27
4.15 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 3 เพิ่มจำนวนรอบของการทำ PCR..... 28
4.16 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 4 ลดปริมาณของ Positive Control 29
4.17 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 5 ด้วยเชื้อ *Listeria innocua*..... 30
4.18 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 6 ด้วยเชื้อ *Listeria seeligeri*..... 30
4.19 ทดสอบ Validation ครั้งที่ 1..... 32
4.20 ทดสอบ Validation ครั้งที่ 2..... 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
spp.	Species
HRM	High Resolution Melting
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
dsDNA	double stand DNA
rRNA	Ribosomal RNA
Tm	Melting temperature
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
LOD	Limited of detection
PCT	Positive control template

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อลิสทีเรีย (*Listeria* spp.) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ และพืช ซึ่งมักนำไปสู่การปนเปื้อนในอาหาร เชื้อลิสทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ สร้างแคปซูล เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ทนทานต่อสภาวะต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมได้ดี เช่น ในสภาวะอาหารที่เป็นกรด (acid food) ในอาหารที่มี water activity ต่ำ และในสภาวะอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่ 4°C (อุณหภูมิตู้เย็น) ถึง 37°C (อุณหภูมิภายในร่างกาย) เชื้อลิสทีเรียมีหลายสปีชีส์ (species) เช่น *Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii, Listeria seeligeri, Listeria welshimeri, Listeria grayi, Listeria innocua* และอื่น ๆ อีกมากทั้งสายพันธ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคแต่หากทำการเพาะเชื้ออาจพบเชื้อลิสทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคปะปนกันอยู่ในอาหาร และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะสายพันธ์ *Listeria monocytogenes* เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค ซึ่งก่อโรคอาหารเป็นพิษ ติดต่อผ่านทางอาหาร (Rip and Gouws,2020) ทำให้เกิดโรคโรคลิสเทอริโอสิสมีอาการ คล้ายเป็นหวัด เช่น มีไข้ ปวดหัว มีอาการท้องเสีย อาเจียน โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด และการแท้ง ส่วนมากจะพบในอาหารที่พร้อมรับประทาน ในนม เนื้อสัตว์ปีก และอาหารแช่แข็ง เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในด้านความปลอดภัยทางอาหารอย่างมาก

ในปัจจุบันมีวิธีการทดสอบและตรวจหาเชื้อแบคทีเรียต่างๆมากมายทั้งการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความจำเพาะต่อเชื้อชนิดนั้นๆ หรือการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว (Rapid Test) เช่น 3M™ Petrifilm™ Environmental *Listeria* Plate (2566) แผ่นเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย เป็นการตรวจสอบที่สามารถหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียได้ อย่างเช่นในอาหารแช่แข็งต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ CFU/ml น้อยกว่า 1×10^5 เมื่อทำการตรวจสอบแล้วหากมีปริมาณเชื้อที่น้อยกว่าก็สามารถส่งสินค้าออกให้ผู้บริโภคได้ แต่ในกรณีของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคไม่ควรพบแม้หนึ่งโคโลนีภายในอาหารและบริเวณต่างๆของโรงงาน (กระทรวงสาธารณสุข,2563) การตรวจสอบในด้านปริมาณของเชื้อแบคทีเรียอาจจะไม่เพียงพอในด้านความปลอดภัยทางอาหาร อีกทั้งในปัจจุบันได้มีวิธีการทางชีวโมเลกุลที่สามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างแม่นยำและรวดเร็วขึ้นกว่า Conventional method (Bustin et al.,2009) ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำวิธีด้านชีวโมเลกุลแบบ Real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยการวัดปริมาณ Deoxyribonucleic Acid (DNA) ในขณะที่กระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) กำลังเกิดขึ้น จนเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR หลังจากนั้นจะทำการใช้วิเคราะห์ผลด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) โดยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น และวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของ DNA ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดขึ้น และนำมาสร้างกราฟที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของ DNA ด้วยวิธีวิเคราะห์ High Resolution Melting (HRM) เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและมีความแม่นยำในการตรวจสอบ DNA ซึ่งเหมาะสำหรับการค้นหาสารพันธุกรรมและการตรวจสอบเชื้อโรค (Reed et al., 1997)

การบ่งชี้ถึงเชื้อลิสทีเรียมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมอาหารอย่างมาก ดังที่กล่าวคือหากมีการปนเปื้อนเชื้อลิสทีเรียขึ้นอาจไม่ได้มีเพียงชนิดที่ไม่ก่อโรคอาจจะมีทั้งชนิดที่ก่อโรคร่วมด้วยทำให้การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อดูการเจริญเติบโตและนับวัดปริมาณของเชื้ออาจไม่เพียงพอต่อการควบคุมด้านความปลอดภัย ในการศึกษานี้จึงใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรียสายพันธ์ต่างๆ เพื่อเป็นการคัดแยกออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆในอุตสาหกรรมอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับเทคนิค High Resolution Melting (HRM) Analysis

2) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีการที่พัฒนาขึ้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ทำการทดสอบ Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ High Resolution Melting (HRM) กับเชื้อ *Listeria* spp. 6 สปีชีส์ กับเชื้อก่อโรคที่พบในอุตสาหกรรมอาหารชนิดอื่นๆอีก 4 ชนิด เช่น *Salmonella enterica, Escherichia coli, Aeromonas hydrophila, Staphylococcus aureus* จำนวนตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 67 ตัวอย่าง

2) ทำการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *Listeria* spp. ทั้ง 6 สปีชีส์ ที่นำมาทดสอบ ด้วยวิธีการ PCR ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ High Resolution Melting (HRM) Analysis

3) ประเมินการวิเคราะห์ด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) Analysis ว่าสามารถตรวจหา *Listeria* spp. ทั้ง 6 สปีชีส์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ High Resolution Melting (HRM)

2) วิธีการตรวจด้วย Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ High Resolution Melting (HRM) มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปต่อยอดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อ *Listeria* spp.

2.1.1 ประวัติและความเป็นมา

เชื้อลิสทีเรีย (*Listeria* spp.) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถก่อให้เกิดโรค สะสมได้ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง โดยบางสายพันธุ์อาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์ *Listeria* spp. มีหลากหลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์คือ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อ *Listeria* spp. ชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุของโรค Listeriosis ในมนุษย์(Rip and Gouws,2020) นอกจาก *Listeria monocytogenes* แล้วยังมี *Listeria ivanovii* และ *Listeria innocua* อีกสองสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อในมนุษย์ *Listeria monocytogenes* ถูกตั้งชื่อตามชื่อของแพทย์ชาวอังกฤษชื่อ Joseph Lister ซึ่งเป็นแพทย์ที่มีส่วนร่วมในการพัฒนาวิธีการฆ่าเชื้อในการผ่าตัดและป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1927 (Murray and Pirie ,1927) และในปี ค.ศ. 1929 ในสวีเดนและนอร์เวย์ (Nyfeldt and Thomassen,1929) ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา *Listeria monocytogenes* ได้รับความสนใจในการศึกษาเชื้อ *Listeria* spp. สามารถพบได้ในอาหารและสิ่งแวดล้อมต่างๆ การติดเชื้อ *Listeria* spp. สามารถติดเชื้อผ่านการรับประทานอาหารที่ปรุงสุกไม่เพียงพอหรือผ่านอาหารที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น นมและผลิตภัณฑ์จากนมที่ไม่ถูกควบคุมอย่างเหมาะสม ทำให้เกิดโรค Listeriosis ในมนุษย์ อาการของโรค Listeriosis อาจแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล อาการทั่วไป เกิดอาการไข้, ปวดเมื่อย, ปวดศีรษะ,อ่อนเพลีย, คลื่นไส้, อาเจียน, ท้องผูกหรือท้องเสีย และอาจเกิดอาการรุนแรงเมื่อเชื้อแบคทีเรียมาเข้าสู่กระแสเลือดและสามารถทำให้เกิดโรคที่ระบบประสาทที่ได้ โดยส่วนใหญ่ เด็กแรกเกิด ผู้สูงอายุ และบุคคลที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอมักเป็นกลุ่มเสี่ยงที่มีโอกาสที่จะเป็นโรคนี้

การควบคุมและป้องกันการป้องกันการติดเชื้อ *Listeria* spp. นั้นมักเกี่ยวข้องกับการประเมินความเสี่ยงจากอาหารที่มีโอกาสติดเชื้อ การสร้างและรักษาความสะอาดในสถานที่ปรุงอาหาร และการรักษาอาหารในอุณหภูมิเทียบเท่ากับหรือต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 7 วัน เป็นวิธีการส่วนใหญ่ในการป้องกันการติดเชื้อ การรับประทานอาหารที่ค่อนข้างร้อนและอาหารที่ปรุงสุกจะช่วยลดความเสี่ยง และควรเฝ้าระวังอาการไม่พึงประสงค์หลังการรับประทานอาหารที่เป็นไปได้ว่าอาจติดเชื้อ *Listeria* spp. การรับประทานอาหารที่มีความสะอาดและจากแหล่งที่เชื่อถือได้ก็เป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันโรค Listeriosis (Farber and Peterkin,1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ความสำคัญของเชื้อ *Listeria* spp. ในอุตสาหกรรมอาหาร

เชื้อ *Listeria* spp. เป็นเชื้อโรคที่มีความสำคัญสูงในอุตสาหกรรมอาหารด้วยหลายเหตุผลดังนี้ การก่อให้เกิดโรคร้ายแรงโดย *Listeria monocytogenes* เป็นสปีชีส์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ที่เรียกว่า "Listeriosis" โรคนี้สามารถทำให้เกิดอาการอักเสบที่ทางเดินอาหารและสามารถเป็นอันตรายสำหรับกลุ่มผู้ป่วยหรือคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ เช่น ผู้สูงอายุ, ผู้ตั้งครรภ์, เด็กแรกเกิดหรือผู้ป่วยร้ายแรง การป้องกันการติดเชื้อ *Listeria* spp. ในอาหารเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อป้องกันการเจ็บป่วยหรือเสียชีวิตจากโรค Listeriosis อีกทั้งความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำของเชื้อ *Listeria* spp. เป็นคุณลักษณะที่ทำให้เชื้อนี้มีความเสี่ยงสูงในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากอาหารที่ผลิตจะต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เช่น อาหารประเภทสดหรืออาหารที่อบแห้ง ทำให้เกิดความเสี่ยงที่จะถูกปนเปื้นด้วยเชื้อ *Listeria* spp. และเมื่อบริโภคอาหารที่ปนเชื้อนี้อาจทำให้เกิดการติดเชื้อได้ โรค Listeriosis มีอาการเฉียบพลันและรุนแรง (กระทรวงสาธารณสุข,2563) การระบุการติดเชื้อ *Listeria* spp. ในอาหารหรือบริเวณต่างๆของพื้นที่การผลิตได้อย่างรวดเร็วเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของโรคนี้ และยังช่วยให้บริษัทผลิตอาหารสามารถทำการถอนสินค้าจากตลาดและดำเนินการรับมือกับสินค้าที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. อย่างรวดเร็ว (Seyoum et al.,2015) การควบคุมและรักษาความปลอดภัยของอาหารเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างความน่าเชื่อถือจากผู้บริโภคและสร้างชื่อเสียงให้กับบริษัทที่ผลิตอาหารในระยะยาว การป้องกันการปนเปื้อน *Listeria* spp. จึงเป็นสิ่งจำเป็นในการรักษาความน่าเชื่อถือและเพิ่มความพึงพอใจ และความปลอดภัยให้แก่ลูกค้า

2.2 Real-time PCR

2.2.1 หลักการทำงาน

Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (Molecular Biology) ที่ใช้เพิ่มปริมาณของ DNA หรือ RNA ของตัวอย่างต่างๆที่ใช้ทดสอบ โดยสามารถตรวจดูปริมาณของ DNA หรือ RNA ในระหว่างกระบวนการทำงานแบบเรียลไทม์ (real-time) ทำให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่เกิดขึ้นได้เกือบทันที โดยหลักการทำงานของ Real-time PCR เริ่มจากการ Denaturation ที่อุณหภูมิสูง DNA ที่ต้องการย่อยถูกแยกออกจากกันโดยการทำให้สายทั้งสองของ DNA แยกออกจากกัน Annealing ที่อุณหภูมิต่ำ primer ที่ผ่านการออกแบบจะเข้าไปจับอย่างจำเพาะบนสายทั้งสองสายโดยเริ่มจากปลาย 5’ ไปหยุดที่ปลาย 3’ จากนั้นคือการ Extension ที่อุณหภูมิประมาณ 75 °C โดย DNA polymerase จะทำการสังเคราะห์สาย DNA ใหม่จากทางปลาย 5' ถึง 3' (Heid et al.,1996) กระบวนการ PCR ใน Real-time PCR แตกต่างจาก PCR ดั้งเดิมคือมีการวัดปริมาณ DNA ในเวลาเรียลไทม์ กระบวนการ qPCR ประกอบด้วยขั้นตอนพื้นฐานเหมือนกับ PCR ดั้งเดิม คือการเพิ่มปริมาณDNA

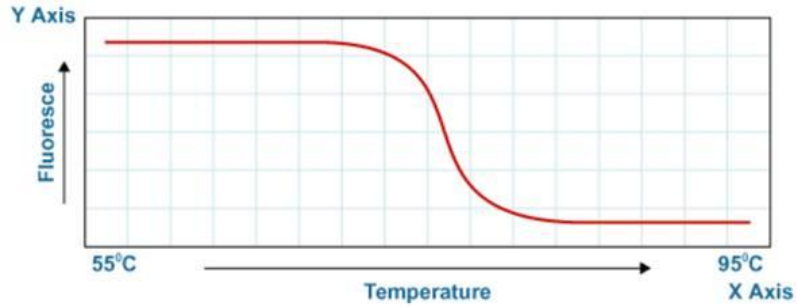
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่มีการเพิ่ม DNA binding dye หรือ DNA-specific fluorescent probe สารสีหรือแหล่งสัญญาณที่สามารถแทรกรวมเข้ากับ DNA ในขณะที่กระบวนการ PCR กำลังดำเนินการ เช่น SYBR Green เป็นสีที่มีความสามารถเชื่อมต่อกับทุกชนิดของ DNA และ RNA สี SYBR Green จะเชื่อมต่อกับ DNA และจะสามารถตรวจจับการเปล่งแสงได้เมื่อสายของ DNA หลุดจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวจากการให้ความร้อน ช่วยให้สามารถประเมินปริมาณเริ่มต้นของ DNA หรือ RNA ในตัวอย่างตั้งแต่เริ่มต้นของกระบวนการ (Taylor et al.,2019)

2.2.2 เทคนิค High Resolution Melting (HRM) Analysis

เทคนิค HRM Analysis เริ่มต้นขึ้นโดย Reed et al. (1997) ได้ใช้ SYBR Green I ในการวิเคราะห์การละลายและกลับมารวมตัวของ DNA และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงใน Tm (Melting temperature) ของ DNA เทคนิค HRM Analysis ได้รับการพัฒนาเพิ่มเติมโดย Zhou et al.(2005) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอในหลายตำแหน่ง เช่นการตรวจหา Single nucleotide polymorphisms (SNPs) โดยใช้เทคนิค HRM Analysis ในการตรวจสอบความแตกต่างในลำดับ DNA ในส่วนของ SNPs โดยทั่วไปเทคนิค High Resolution Melting (HRM) Analysis เป็นการวิเคราะห์แบบ post PCR analysis ที่ใช้ในการระบุการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในบริเวณที่สนใจ (region of interest) โดยวิธีการนี้อาศัยการตรวจวัดความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของ Melting curve ในขั้นตอนการทำ real-time PCR ซึ่งวิธีการนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ SNP genotyping, mutation scanning และ sequence scanning ในตัวอย่างของ DNA หลักการการทำงานของ HRM Analysis จะอาศัยหลักการของการแยกของสาย dsDNA โดยมีปัจจัยคือ ความยาวของเส้น dsDNA, GC content และความสมบูรณ์ของเส้น dsDNA โดยอาศัยสีที่มีความจำเพาะ รวมไปถึงเครื่อง Real-time PCR พร้อม software ที่สามารถตรวจจับความแตกต่างของเส้น DNA ระหว่างขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ที่สนใจ โดยเทคนิค PCR ระหว่างนี้ fluorescent dye ได้เข้าไปแทรกตาม double stranded DNA ทำให้ค่าปริมาณสี fluorescence ที่ตรวจวัดได้เพิ่มขึ้นตามปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบที่กำหนด เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR จะเป็นการเริ่มต้นการวิเคราะห์ HRM โดย DNA จะถูกเพิ่มอุณหภูมิจากประมาณ 50 องศาเซลเซียส ไล่ไปเรื่อยๆจนถึง 95 องศาเซลเซียสดังรูปที่ 2.1 การให้ความร้อนในวิธีการ HRM Analysis สามารถเปลี่ยนอุณหภูมิเริ่มต้นและอุณหภูมิที่สิ้นสุดได้ตามค่า Tm (melting temperature) ของสาย DNA ที่เราสนใจ ในขณะที่อุณหภูมิกำลังเพิ่มขึ้นเส้น DNA จะเริ่มมีการแยกออกเนื่องมาจาก hydrogen bond ระหว่างเส้น DNA ถูกทำลายโดยความร้อน ระหว่างนี้จะทำให้สี fluorescence มีการหลุดออกมาจากสาย dsDNA ทำให้สามารถวัดค่าสัญญาณจากสี fluorescence ได้

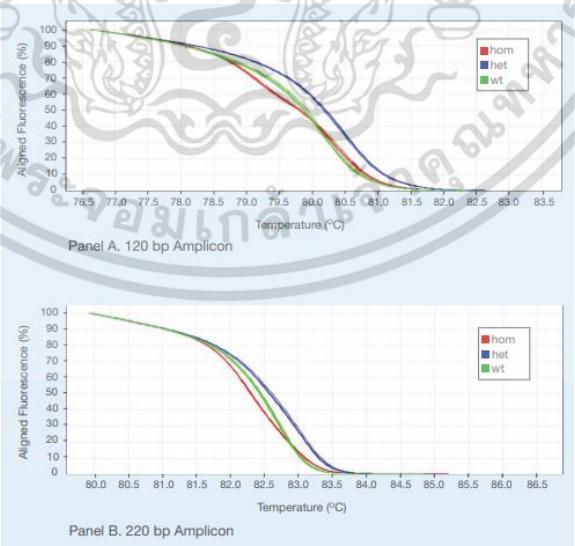
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดงปริมาณสัญญาณ Fluorescence ของ DNA Melt curve ตามปริมาณของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป

(Gibthai Co., 2566)

ผลของการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในขั้นตอน Melting analysis จะแสดงอยู่ในรูปแบบของกราฟ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของสัญญาณ fluorescence และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป จะเห็นได้ว่า หากมีความแตกต่างของเบสใน DNA จะส่งผลต่อการแปรผลของ HRM Analysis เพราะปัจจัยจาก GC content, Amplicon length และ strand complementarity ดังรูปที่ 2.2 และจากงานวิจัยของ Brunehild S.,et al. (1996) ได้ทำการเลือกใช้ลำดับเบสในบริเวณ 16s rRNA และ 23s rRNA โดยพบว่า 23s rRNA สามารถคัดแยกเชื้อลิสทีเรียได้ดีกว่า 16s rRNA ในระดับสปีชีส์ เนื่องจากจำนวนเบสของ 23s rRNA มีปริมาณที่มากกว่าซึ่งช่วยให้สามารถตรวจหาได้อย่างจำเพาะและเจาะจงยิ่งขึ้น ในการทดสอบครั้งนี้จึงได้นำลำดับเบสในส่วนของ 23s rRNA มาใช้ในการทดสอบ



รูปที่ 2.2 แสดง melting curve ของความแตกต่างของ base pair ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็น Homogenous, heterogenous และ wildtype ระหว่าง 120 bp และ 220 bp ของ amplicon

(Gibthai Co., 2566)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกหนึ่งปัจจัยสำคัญนอกจากเครื่อง Real-time PCR ที่สามารถรองรับระบบ HRM Analysis แล้วนั้น fluorescence dye เองก็มีส่วนสำคัญ สีที่นิยมใช้ในการทำ HRM Analysis ที่นิยมในปัจจุบันคือ Evagreen dye, SYTO9 ซึ่งเป็นสี saturated fluorescence ที่มีคุณสมบัติ PCR inhibition ที่ต่ำ ทำให้สามารถใส่ saturated fluorescence ใน PCR reaction ในความเข้มข้นที่สูงเพื่อให้เกิดสัญญาณ fluorescence มากที่สุดได้

2.2.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค HRM Analysis ในอุตสาหกรรมอาหาร

การใช้เทคนิค HRM Analysis (High Resolution Melting Analysis) ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารได้โดยอาศัยการตรวจวัดความแตกต่างความหลากหลายของ DNA sequences ในแบคทีเรียสปีชีส์ต่าง ๆ ทำให้สามารถช่วยในการระบุและตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในอาหารได้ดีขึ้น (Achtman,2008) การประยุกต์ใช้เทคนิค HRM Analysis ในอุตสาหกรรมอาหารมีข้อได้เปรียบที่สำคัญ อย่างเช่น ความรวดเร็วในการตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ, การลดความเสี่ยงในการแพร่ระบาดของโรคที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรียในอาหาร การทำ HRM Analysis ในอุตสาหกรรมอาหารยังต้องปฏิบัติตามมาตรฐานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ISO 22000 เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยและคุณภาพของอาหารที่ผลิตและจำหน่าย การใช้ HRM Analysis ในการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในอาหารมีข้อดีอย่างมากจากเทคนิคที่สามารถทำได้ไวและง่ายต่อการใช้งาน และสามารถใช้ในการตรวจวัดหลายแบคทีเรียในตัวอย่างเดียว แต่ต้องมีข้อมูลอ้างอิงที่เชื่อถือได้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความแม่นยำสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องมือ

1. Autoclave (Tomy FLS-1000)
2. Automatic pipette (Gilson, France)
3. Biological safety cabinet class II
4. Safety cabinet (Augustin)
5. Vortex (Scientific Industries, USA)
6. Dry Bath Incubator (Boekel Scientific, USA)
7. Inoculation Loops (Biologix Group Limited)
8. Filter Tips (Axygen Scientific)
9. Centrifuge Tube 15 มิลลิลิตร (Nest Biotechnology, China)
10. Microtube ขนาด 0.2, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร
11. Centrifuge 5418 (Eppendorf, Germany)
12. Micro Centrifuge (Senova, China)
13. Incubator 37 องศาเซลเซียส (Memmert)
14. Nanodrop 2000c (Thermo Scientific)
15. Heater (Heidolph, Germany)
16. Bio rad CFX96 real time system
17. Refrigerator 4 องศาเซลเซียส (Panasonic)
18. Shaking incubator (Eppendorf, Germany)
19. Laboratory Bottle (Duran, Germany)
20. Petri dishes ขนาด 90x15 มิลลิเมตร (Nest Biotechnology, China)
21. Spatula
22. Laboratory Film (Bemis Amcor, USA)
23. Serological Pipette 10 มิลลิลิตร (Nest Biotechnology, China)
24. Pipette Controller (Integra Bioscience AG, Switzerland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี

1. Tryptone soya Broth (Oxoid, UK)
2. Agar Bacteriological (Oxoid, UK)
3. Yeast Extract (Oxoid, UK)
4. TLN Extraction Mix (Lucigen)
5. Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย
6. Primers สำหรับใช้ในการตรวจ positive control
7. Positive Template
8. HRM Dry
9. MilliQ Water
10. TE buffer
11. Clorox
12. Ethanol ความเข้มข้น 95% และ 70%
13. Distilled Water

ตารางที่ 3.1 ลำดับ Sequence ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

Target	ตำแหน่งยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับ sequence (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
Listeria spp.	23s rRNA	Primers Listeria Forward	GAAGGATARGGAATCGCACGAA	Rodriguez-Lazaro, D., et al. (2004).
		Primers Listeria Reverse	AGCGTGAAATCAGGAACTTCCG	
PCR Positive control	Synthetic	Primers Positive Control Forward	TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAATTA TTATTCAATACCAAACACCACTATTCGTC	Denyingyhot, A., et al. (2022)
		Primers Positive Control Reverse	GATTGTAAGCACGATCGCCCGTTTATTA TTCTAGTACTGGTAATGAAAGTAGTAGT	

3.2 ตัวอย่างเชื้อ *Listeria* spp. และตัวอย่างเชื้อชนิดอื่นๆ

ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ทำการทดสอบมี *Listeria* spp. ทั้งหมด 6 สปีชีส์ ดังนี้ *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua, Listeria welshimeri, Listeria seeligeri, Listeria ivanovii, Listeria grayi* และเชื้อชนิดอื่น (outgroups) เช่น *Salmonella enterica, Escherichia coli, Aeromonas hydrophila, Staphylococcus aureus* ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจะเป็นเชื้อก่อโรคที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food born pathogen ซึ่งสามารถพบได้ในอุตสาหกรรมอาหาร จำนวนตัวอย่างเชื้อทั้งหมดคือ 67 ตัวอย่าง โดยมี *Listeria* spp. ทั้งหมด 6 สปีชีส์ ,*Salmonella enterica* 58 ซีโรวาร์ *Escherichia coli* 1 ตัวอย่าง, *Aeromonas hydrophila* 1 ตัวอย่าง และ *Staphylococcus aureus* 1 ตัวอย่าง

3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp.

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. 6 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Agar บ่มไว้ที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมา 1 โคโลนีใส่ลง Tryptone Soya Yeast Extract Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มใน Shaking incubator ที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดเชื้อเพื่อให้ได้ DNA มาใช้ในการทดสอบ โดยทำการดูดเชื้อจากที่บ่มแล้วใน tryptone soy broth มา 1 ml ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm/minute เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนน้ำทิ้งและเก็บส่วน pellet ข้างล่างไว้ จากนั้นใส่สารละลาย TLN Extraction Mix (Lucigen) 0.5 ml ผสมโดยการ vortex ให้เข้ากัน แล้วนำไปใส่ใน Dry Bath Incubator ที่ 65°C 10 นาที จากนั้นนำเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 98°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บตัวอย่าง DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.5 การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีการ Real-time PCR และวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM)

3.5.1 การทดสอบ Real-time PCR ด้วยวิธีทดสอบแบบ Single PCR Amplification

โดยใน 1 reaction จะใส่ Mx Hotstart PCR Mix, 10 µM primer Listeria forward,10 µM primer Listeria reverse, HRM Dye, MilliQ water, DNA รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา ทำการทดสอบที่เครื่อง Bio Rad CFX96 real time system โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 35 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 75-95°C

3.5.2 การทดสอบ Specificity กับ เชื้อแบคทีเรีย outgroup

ทำการทดสอบ specificity กับ เชื้อแบคทีเรีย outgroup ด้วยวิธี Single PCR Amplification โดยจะทำการทดสอบ condition ของ reaction เริ่มต้นเพื่อทำการทดสอบปฏิกริยาที่เกิดขึ้น และเพื่อให้ได้ condition ที่เหมาะสมต่อการทดสอบ

3.5.3 การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification

ทดสอบ Duplex PCR Amplification โดยทำการเพิ่ม PCR Positive primer และ Positive template เข้าไป โดยใน 1 reaction จะประกอบด้วย Mx Hotstart PCR Mix, 10 µM primer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

forward,10 µM primer reverse, 10 µM PCR Positive primer forward, 10 µM PCR Positive primer reverse, Positive template (10^5 copy), HRM Dye, MilliQ water, DNA รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยจะเลือกทำการปรับปริมาตรสารต่างๆของปฏิกริยา Duplex PCR Amplification ทำการทดลอง 3 การทดลอง โดยมีการเปรียบเทียบปริมาณของ Mx Hotstart PCR Mix , Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย และ Primers สำหรับใช้ในการตรวจ positive control เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดสอบถัดไป

3.5.4 การทดสอบ Limit of detection

ทดสอบ Limit of detection (LOD) ด้วยวิธี Duplex PCR Amplification โดยทำการ dilute เชื้อตัวอย่างที่ได้ทำการบ่มไว้ใน Tryptone soy broth โดยให้เชื้อตั้งต้นเท่ากับ 10^8 ทำการทดสอบที่ 10^5,10^4,10^3,10^2,10^1 ทำการทดสอบที่แต่ละความเจือจางอย่างล่ะ 3 ซ้ำ โดยทำซ้ำกับเชื้อ *Listeria* spp. 3 สปีชีส์

3.5.5 การประเมินการใช้ Duplex PCR กับตัวอย่างจริง (Validation)

ทำการทดสอบแบบ Blind test กับตัวอย่างเชื้อ 60 ตัวอย่างจากทั้งหมด 67 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Duplex PCR Amplification เทียบผลการทดลอง กับวิธี Gold standard (ISO 11290:2017) แล้วหา ค่าSpecificity และ Sensitivity ของวิธีการที่นำมาใช้ โดยใช้วิธี 2x2 table มาใช้ในการคำนวณ โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

		Gold standard (ISO 11290:2017)	
		+	-
test	+	TP	FP
	-	FN	TN

หมายเหตุ:True Positive (TP) คือ ผลบวกจริง

False Positive (FP) คือ ผลบวกเท็จ

False Negative (FN) คือ ผลลบเท็จ

True Negative (TN) คือ ผลลบจริง

1. คำนวณค่าความไวต่อการตรวจ (Sensitivity): Sensitivity = TP / (TP + FN)
2. คำนวณค่าความจำเพาะ (Specificity): Specificity = TN / (TN + FP)
3. คำนวณค่าความถูกต้องของผลตรวจ (Diagnostic accuracy):Diagnostic accuracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีการ Real-time PCR และวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM)

4.1 การทดสอบ Real-time PCR ด้วยวิธีทดสอบแบบ Single PCR Amplification

ทำการทดสอบปฏิกริยาของ PCR Master mix ว่ามีปฏิกริยา Amplification เกิดขึ้นโดยเริ่มต้นใส่ Mx Hotstart PCR Mix 3 µL, 10 µM primer forward 0.25 µL,10 µM primer reverse 0.25 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 15.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µL ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 30 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 75-95°C สามารถอ่านผล Melt curve ได้ดังตารางที่ 4.1-4.2

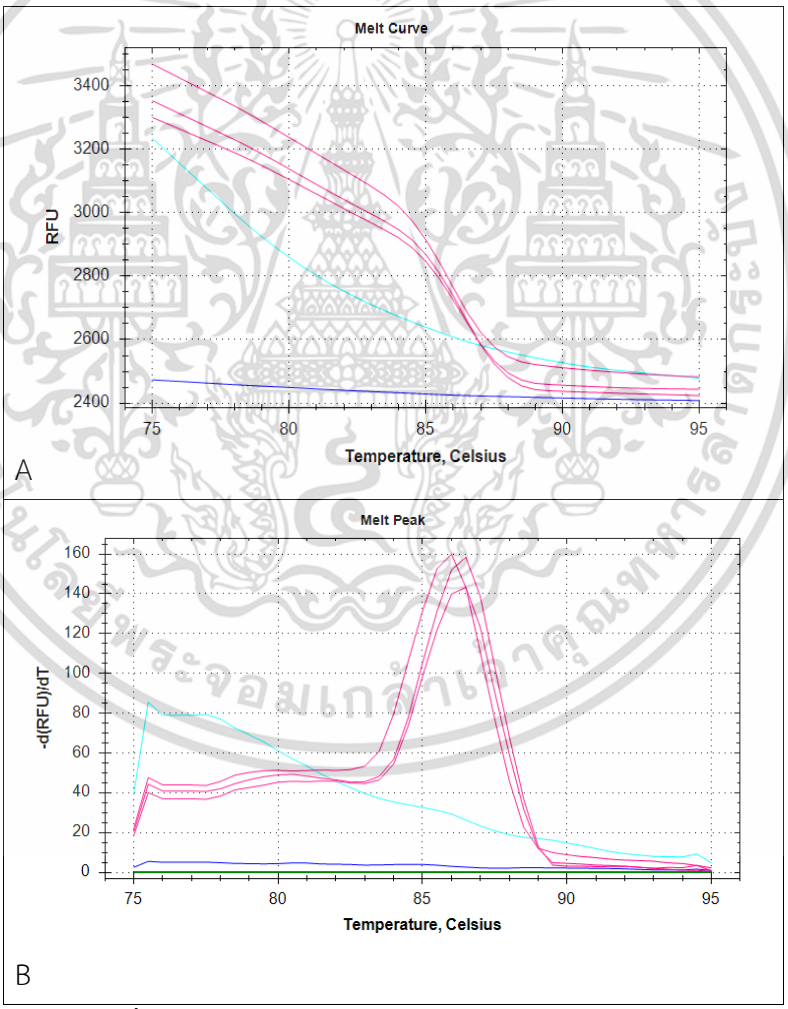
ตารางที่ 4.1 แสดง PCR master mixture วิธีทดสอบแบบ Single PCR Amplification

Reagent	1X (µl)	Final conc.
Mx Hot start PCR mix	3	0.24x
10 µM primer Listeria forward	0.25	200 nM
10 µM primer Listeria reverse	0.25	200 nM
HRM Dye	1	-
MilliQ water	15	-
DNA	5	-
Total	25	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดง Amplification program วิธีทดสอบแบบ Single PCR Amplification

Process	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
Denaturation	95°C	30 sec	30 cycle
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extention	72°C	1 min	1 cycle
HRM Analysis	75°C to 95°C		



รูปที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบ Single PCR Amplification

หมายเหตุ:*สีฟ้า คือ *Escherichia coli*, สีชมพู คือ *Listeria* spp. 3 สปีชีส์, สีน้ำเงิน คือ No Template Control

**A แสดง Melt Curve , B แสดง Metl Peak

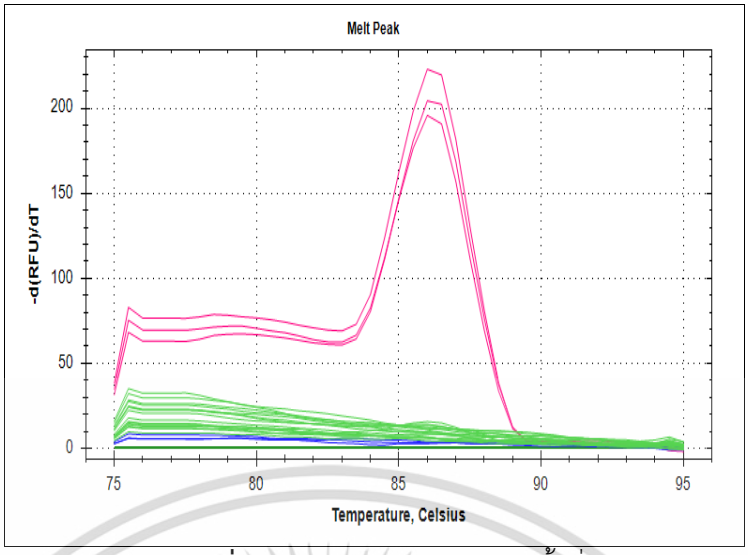
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และทำการทดสอบกับเชื้อลิสทีเรีย 3 สปีชีส์สามารถอ่านค่าได้จากเส้นสีชมพูที่ช่วงอุณหภูมิ 86°C±0.5 ดังแสดงในรูปที่ 4.1 เส้นสีฟ้าเป็นเชื้อชนิดอื่นคือ *Escherichia coli* ไม่เกิด peak ขึ้นที่บริเวณ เดียวกับเชื้อลิสทีเรีย ในส่วนของเส้นสีน้ำเงินคือ No Template control ไม่พบ peak ขึ้นที่บริเวณ 86°C จึงทำการเลือกใช้ ปฏิกริยาของ PCR Master mix ดังกล่าวในการทดลองขั้นต่อไป

4.2 การทดสอบ Specificity กับ เชื้อแบคทีเรีย outgroups

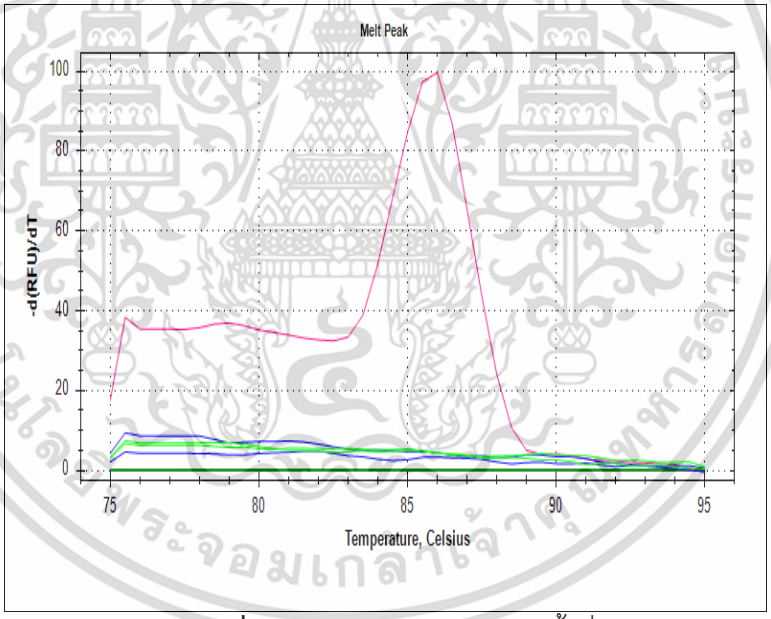
จากการทดสอบปฏิกริยาของ PCR Master mix เพื่อทดสอบการเกิดกระบวนการ PCR และการอ่านค่า Melt peak ด้วยวิธี High Resolution Melting Temperature (HRMA) ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ใช้ในการทดสอบ คือ primers ที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย โดยทดสอบกับเชื้อตัวอย่าง outgroups คือ *Salmonella enterica* จำนวนทั้งหมด 58 ซีโรวาร์ (Serovars) โดยใช้ ปฏิกริยาของ PCR Master mix จากการทดสอบที่ 4.1 ได้ผลดังนี้ ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย โดยทดสอบกับเชื้อ *Listeria* spp. ทั้งหมด 6 สปีชีส์ ดังนี้ *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua, Listeria welshimeri, Listeria seeligeri, Listeria ivanovii, Listeria grayi* และเชื้อชนิดอื่นเช่น *Salmonella enterica, Escherichia coli, Aeromonas hydrophila, Staphylococcus* โดยมีตัวอย่าง *Salmonella enterica* จำนวนทั้งหมด 58 ซีโรวาร์ แบ่งทดสอบกับตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 7 ครั้ง ดังรูปภาพที่ 4.2-4.8 ผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า primer ที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย มีความจำเพาะและสามารถตรวจพบ Melting peak ของเชื้อลิสทีเรียทั้ง 6 สปีชีส์เท่านั้น จึงนำ primer ที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย ไปทดสอบในขั้นตอน Duplex PCR Amplification

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 1

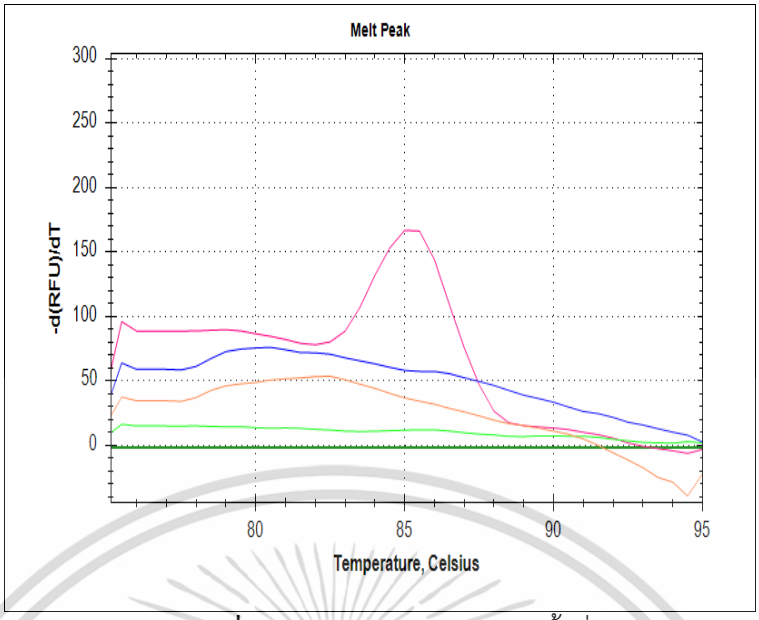
หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Salmonella enterica* 16 ซีโรวาร์, สีชมพู คือ *Listeria* spp. 3 สปีชีส์, สีน้ำเงิน คือ No Template Control



รูปที่ 4.3 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 2

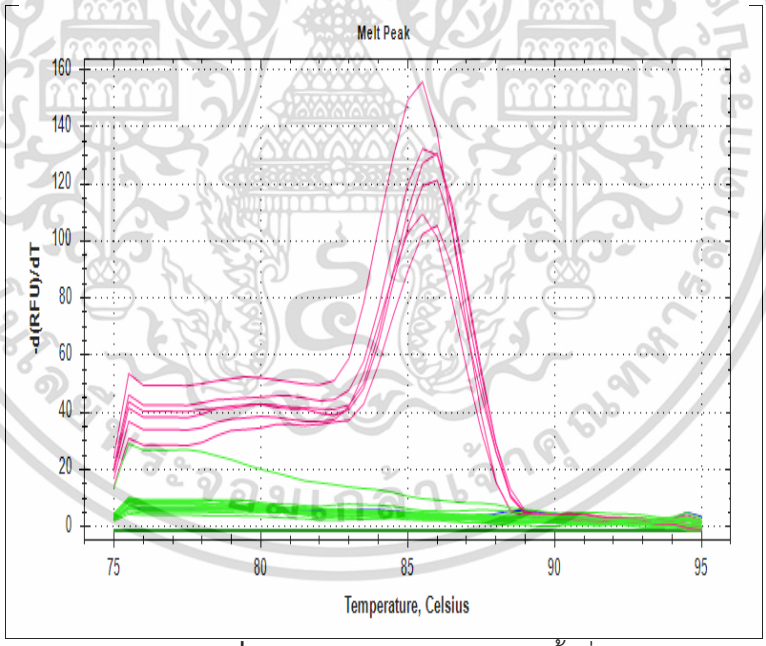
หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Salmonella enterica* 2 ซีโรวาร์, สีชมพู คือ *Listeria* spp. 1 สปีชีส์, สีน้ำเงิน คือ No Template Control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 3

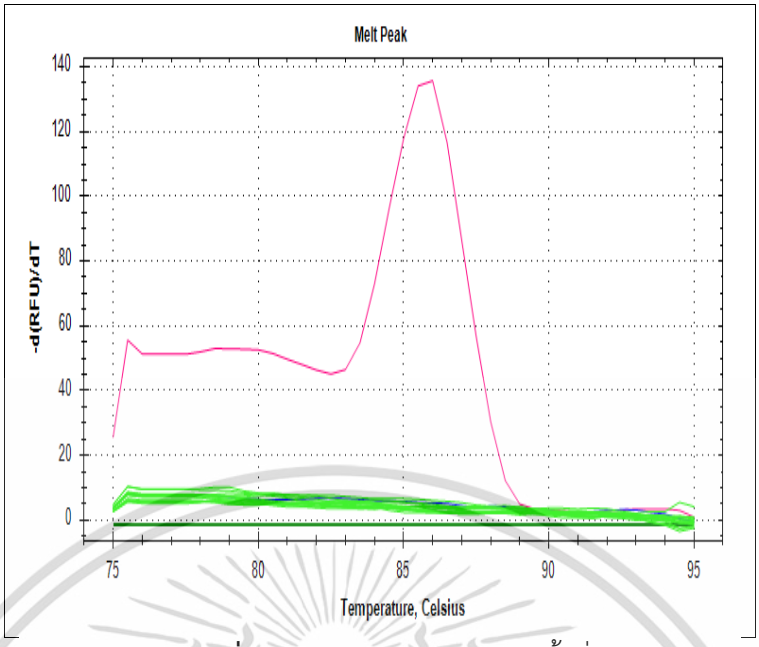
หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Staphylococcus aureus*, สีส้ม คือ *Aeromonas hydrophila*, สีชมพู คือ *Listeria* spp. 1 สปีชีส์, สีน้ำเงิน คือ No Template Control



รูปที่ 4.5 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 4

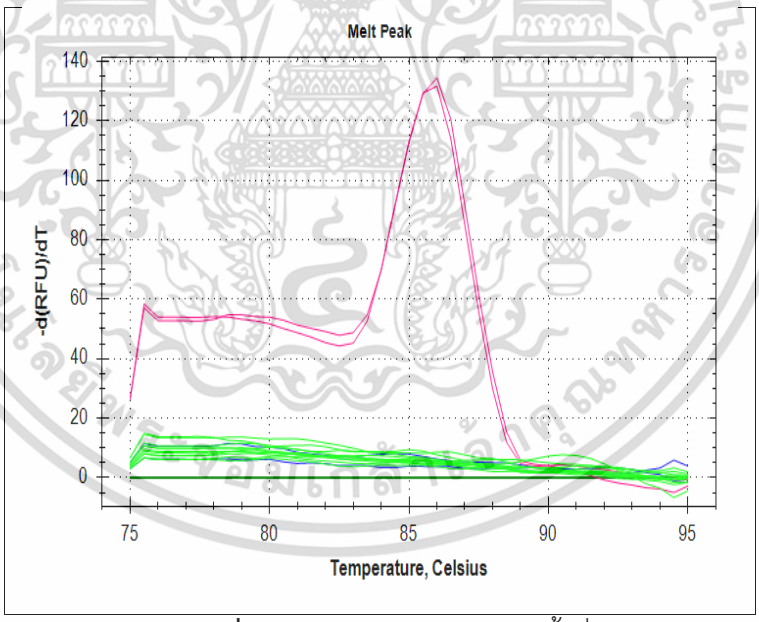
หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Salmonella enterica* 16 ซีโรวาร์, สีชมพู คือ *Listeria* spp. 6 สปีชีส์, สีน้ำเงิน คือ No Template Control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 5

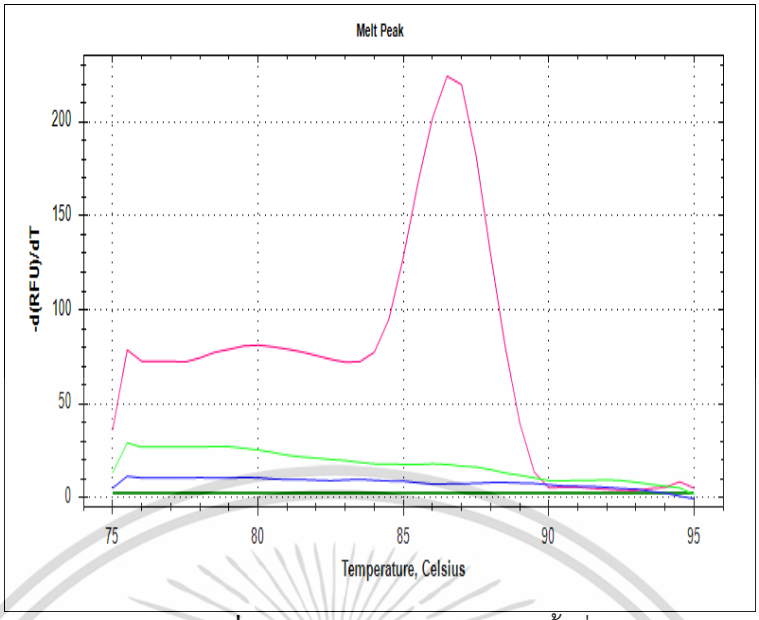
หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Salmonella enterica* 13 ซีโรวาร์, สีชมพู คือ *Listeria monocytogenes*, สีน้ำเงิน คือ No Template Control



รูปที่ 4.7 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 6

หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Salmonella enterica* 11 ซีโรวาร์, สีชมพู คือ *Listeria* spp. 2 สปีชีส์, สีน้ำเงิน คือ No Template Control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ทดสอบ specificity ครั้งที่ 7

หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Salmonella enterica* 16 ซีโรวาร์, สีชมพู คือ *Listeria seeligeri*, สีน้ำเงิน คือ No Template Control

4.3 การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification

ทำการทดสอบปฏิกริยา PCR Master Mix ของกระบวนการ Duplex PCR Amplification โดยทำการเพิ่ม PCR Positive primer และ Positive template เข้าไป โดยใน 1 reaction จะประกอบด้วย Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 0.25 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 0.25 µL, Positive template (10^5 copy) 1 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 35 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 75-95°C โดยวิธีการนี้จะทำให้สามารถอ่านผล Melt peak ได้ 2 peak ในปฏิกริยาที่มีเชื้อลิสทีเรีย ส่วนในกรณีที่ไม่มีเชื้อลิสทีเรียจะเกิด Melt peak เพียง 1 peak ซึ่งเป็นของ Positive control ที่ใส่เข้าไปใน 1 reaction (ตารางที่4.3-4.4) ได้ผลดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

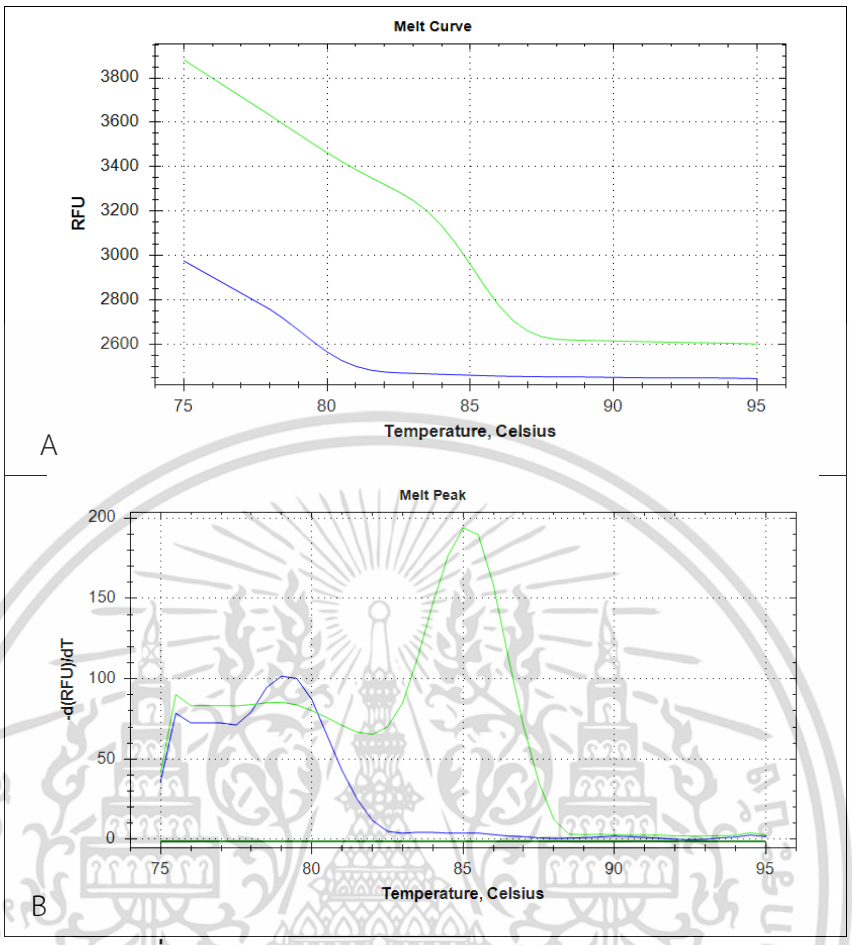
ตารางที่ 4.3 แสดง PCR master mixture วิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification

Reagent	1X (µl)	Final conc.
Mx Hot start PCR mix	5	0.4x
10 µM primer Listeria forward	0.5	200 nM
10 µM primer Listeria reverse	0.5	200 nM
10 µM primer PCR positive forward	0.5	200 nM
10 µM primer PCR positive reverse	0.5	200 nM
Positive template (10^5 copy)	1	-
HRM Dye	1	-
MilliQ water	11.5	-
DNA	5	-
Total	25	

ตารางที่ 4.4 แสดง Amplification program วิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification

Process	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
Denaturation	95°C	30 sec	35 cycle
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extention	72°C	1 min	1 cycle
HRM Analysis	75°C to 95°C		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบ Duplex PCR Amplification

หมายเหตุ:*สีเขียว คือ *Listeria* spp., สีน้ำเงิน คือ Positive Control)

**A แสดง Melt Curve , B แสดง Metl Peak

จากผลการทดสอบ Duplex PCR ดังรูปที่ 4.9 พบ peak ที่อุณหภูมิ 79°C ซึ่งเป็น peak ของ Positive Template และ peak ที่อุณหภูมิ 86°C±0.5 ซึ่งเป็น peak ที่บ่งชี้เชื้อลิสทีเรีย ในตัวอย่างลิสทีเรีย อย่างไรก็ตาม peak ของ positive control มี peak เพียงเล็กน้อยอาจทำให้การอ่านค่าผิดได้ และอยู่ใกล้กับ melting peak ของ เชื้อลิสทีเรีย นอกจากนี้ การตั้งค่าการวิเคราะห์ HRM ที่ 75-95°C มีความใกล้เคียง peak ที่อ่านค่าได้ของ Positive control (79°C) ดังนั้นจึงทำการทดลองเปลี่ยนค่าการอ่าน Melt peak จากที่ 75-95°C เปลี่ยนเป็นอ่านค่า Melt peak ที่ 70-95°C อีกทั้งได้ทำการทดสอบหาความแตกต่างของความปริมาณสารต่างๆที่ใส่ในปฏิกริยา Duplex PCR Amplification ทำการทดลอง 3 การทดลอง โดยมีการเปรียบเทียบปริมาณของ Mx Hotstart PCR Mix , Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย และ Primers สำหรับใช้ในการตรวจ positive control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดสอบการหาความแตกต่างของ Primers สำหรับใช้ในการตรวจ positive control จะทำการทดสอบ 4 ความเข้มข้นคือ 100 nM, 200 nM, 300 nM และ 400 nM โดยใน 1 reaction จะประกอบด้วย Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, Positive template (10^5 copy) 1 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 35 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C

ทำการทดสอบการหาความแตกต่างของ Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรียจะทำการทดสอบ 4 ความเข้มข้นคือ 100 nM, 200 nM, 300 nM และ 400 nM โดยใน 1 reaction มีได้ผลดังนี้ โดยใน 1 reaction จะประกอบด้วย Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 1 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 1 µL, Positive template (10^5 copy) 1 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 35 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C

ในส่วนของปริมาณ Mx Hotstart PCR Mix จะทำการทดสอบ 4 ความเข้มข้นคือ 0.2x, 0.4x, 0.6x และ 0.8x ใน 1 reaction จะประกอบด้วย 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 0.5 µL, Positive template (10^5 copy) 1 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 35 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C

จากการทดสอบหาความแตกต่างของปริมาณ Primers สำหรับใช้ในการตรวจ positive control (Primer PCT) (รูปภาพที่ 4.10) พบว่าที่ความเข้มข้นของของ Primer PCT เท่ากับ 100 nM (เส้นสีแดง) สามารถมองเห็น peak ที่เกิดขึ้นของ primer PCT ได้ค่อนข้างต่ำหรือมองเห็นได้ไม่ชัดเจน ความเข้มข้นที่ 200 nM (เส้นสีเขียว) สามารถมองเห็น peak ของ primer PCT ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน ความเข้มข้นที่ 300 nM (เส้นสีน้ำเงิน) สามารถมองเห็น peak ของ primer PCT ได้อย่างชัดเจนแต่ความสูง peak ของเชื้อลิสทีเรียลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และความเข้มข้นที่ 400 nM (เส้นสีชมพู) สามารถมองเห็น peak ทั้งสองพีคได้อย่างชัดเจนและมีความสูงที่ไล่เลี่ยกันจึงนำปริมาตรนี้ไปทดสอบต่อในขั้นตอนถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบหาความแตกต่างของปริมาณ Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย (รูปภาพที่ 4.11) พบว่าที่ความเข้มข้นของ Primer *Listeria* เท่ากับ 100 nM (เส้นสีแดง) สามารถมองเห็น peak ที่เกิดขึ้นของ primer PCT ได้ค่อนข้างสูงเนื่องจากความเข้มข้น primer PCT ที่เลือกใช้ เท่ากับ 400 nM ทำให้ปริมาณ Positive template เพิ่มขึ้นได้เยอะขึ้นในกระบวนการ PCR ความเข้มข้นที่ 200 nM (เส้นสีเขียว) สามารถมองเห็น peak ของ primer PCT ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน ความสูงของ peak ของเชื้อลิสทีเรียมีความสูงพอเหมาะ ความเข้มข้นที่ 300 nM (เส้นสีน้ำเงิน) สามารถมองเห็น peak ของ primer PCT ได้น้อยและไม่ค่อยชัดเจนแต่ความสูง peak ของเชื้อลิสทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ความเข้มข้นที่ 400 nM (เส้นสีชมพู) สามารถมองเห็นได้แค่ 1 peak คือพีคของเชื้อลิสทีเรียเนื่องจากปริมาณไพรเมอร์ที่มากขึ้น และปริมาณ DNA ของเชื้อที่มีในตั้งต้นทำให้ไม่สามารถมองเห็น peak ของ Primer PCT จากการทดสอบทั้งหมดความเข้มข้นของ Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรียที่ 200 nM (เส้นสีเขียว) สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนทั้ง 2 peak จึงนำปริมาตรนี้ไปทดสอบต่อในขั้นตอนถัดไป

จากการทดสอบหาความแตกต่างของปริมาณ Mx Hotstart PCR Mix (รูปภาพที่ 4.12) พบว่าที่ความเข้มข้นของ Mx Hotstart PCR Mix เท่ากับ 0.2x (เส้นสีแดง) สามารถมองเห็น peak ที่เกิดขึ้นของ primer PCT ได้ไม่ชันเจนเนื่องจากความเข้มข้นของ primer PCT ที่เลือกใช้เท่ากับ 0.4x ทำให้ปริมาณ Positive template เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากปริมาณ Mx Hotstart PCR Mix ที่ลดลง ทำให้ค่า ของ substrate ที่จำเป็นลดน้อยลง อีกทั้งปริมาณ DNA ตั้งต้นของเชื้อลิสทีเรียมีปริมาณที่มากกว่า Positive Template ที่ใส่เข้าไปในปฏิกิริยา ทำให้เกิดการแย่ง substrate ที่จำเป็น ทำให้ไม่สามารถ amplification ในส่วนของ Positive Control ได้อย่างที่ควร ความเข้มข้นที่ 0.4x (เส้นสีเขียว) สามารถมองเห็น peak ของ primer PCT ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน ความสูงของ peak ของเชื้อลิสทีเรียมีความสูงพอเหมาะ ความเข้มข้นที่ 0.6x (เส้นสีน้ำเงิน) peak ของ primer PCT มีความสูงที่ใกล้เคียงกับความสูงของเชื้อลิสทีเรีย และความเข้มข้นที่ 0.8x (เส้นสีชมพู) peak ของ primer PCT มีความสูงที่มากกว่าความสูงของเชื้อลิสทีเรีย และยังพบว่า การเพิ่มหรือลดปริมาณความเข้มข้นของ Mx Hotstart PCR Mix ทำให้เกิดการเลื่อนของอุณหภูมิเนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของ substrate ต่างๆที่ใส่ใน Mx Hotstart PCR Mix มีผลทำให้อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไป จากการทดสอบแล้วจึงเลือก Mx Hotstart PCR Mix ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.4x (เส้นสีเขียว) ซึ่งให้ค่าอุณหภูมิของเชื้อลิสทีเรียที่ 85°C ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณจาก Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

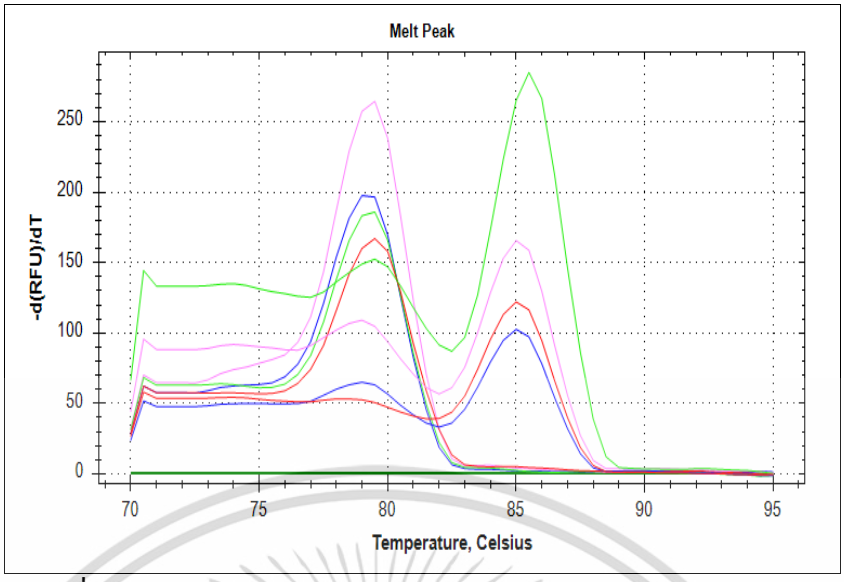
ตารางที่ 4.5 แสดง PCR master mixture หลังปรับสภาวะวิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification

Reagent	1X (µl)	Final conc.
Mx Hot start PCR mix	5	0.4x
10 µM primer Listeria forward	0.5	200 nM
10 µM primer Listeria reverse	0.5	200 nM
10 µM primer PCR positive forward	0.5	200 nM
10 µM primer PCR positive reverse	0.5	200 nM
Positive template (10^5 copy)	1	-
HRM Dye	1	-
MilliQ water	11.5	-
DNA	5	-
Total	25	

ตารางที่ 4.6 แสดง Amplification program หลังปรับสภาวะวิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification

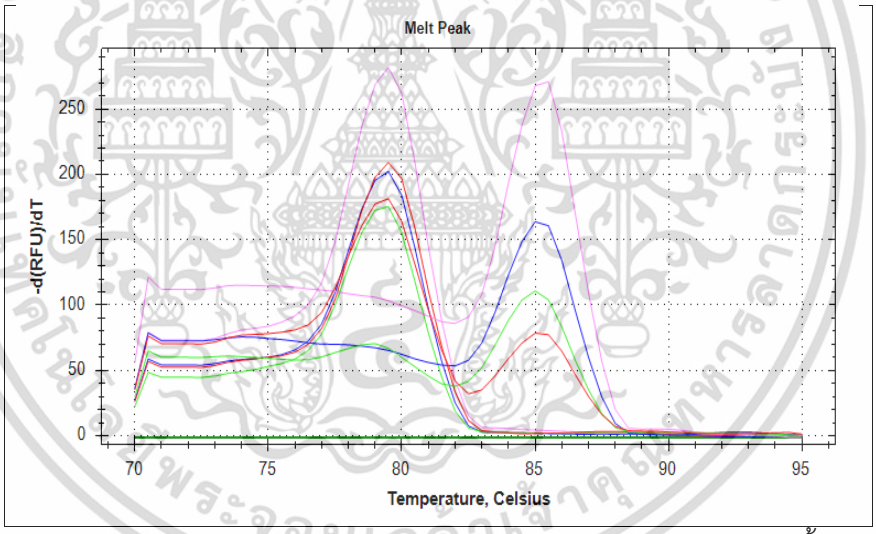
Process	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
Denaturation	95°C	30 sec	35 cycle
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extention	72°C	1 min	1 cycle
HRM Analysis	70°C to 95°C		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การปรับสภาวะความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการตรวจ Positive control(Primer PCT)

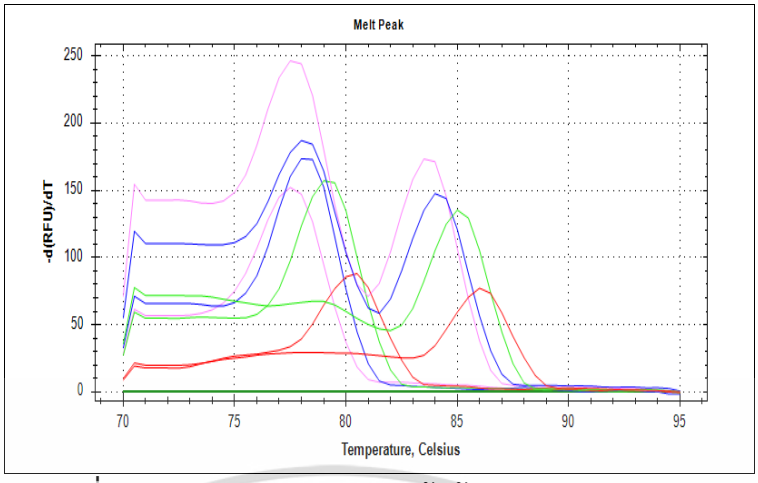
หมายเหตุ:*สีแดง = 100 nM, สีเขียว = 200 nM, สีน้ำเงิน =300 nM, สีชมพู = 400 nM



รูปที่ 4.11 การปรับสภาวะความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย

หมายเหตุ:*สีแดง = 100 nM, สีเขียว = 200 nM, สีน้ำเงิน =300 nM, สีชมพู = 400 nM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การปรับสภาวะความเข้มข้น Mx Hotstart PCR Mix

หมายเหตุ:*(สีแดง = 0.2x, สีเขียว = 0.4x, สีน้ำเงิน = 0.6x, สีชมพู = 0.8x)

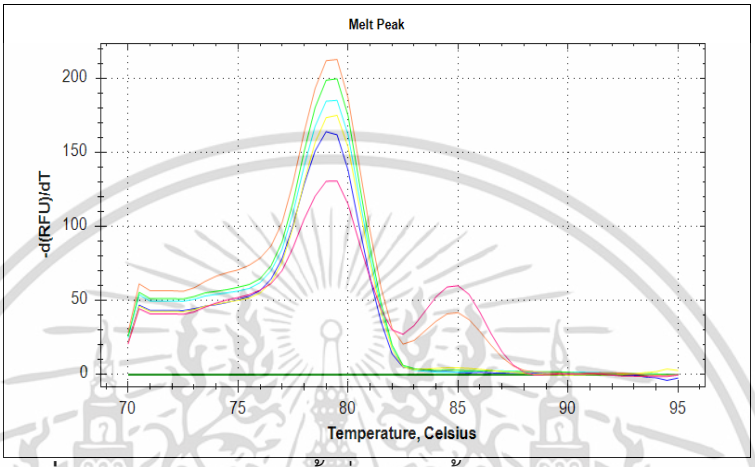
จากการทดสอบการเปรียบเทียบปริมาตรของสารต่างๆที่ใส่ในปฏิกริยา PCR ทั้ง 3 การทดสอบ (รูปภาพที่ 4.10-4.12) จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละการทดสอบมาใช้ดังตารางที่ 4.5 - 4.6 คือ Primers สำหรับใช้ในการตรวจ positive control ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200 nM Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรียความเข้มข้นเท่ากับ 200 nM และที่ความเข้มข้นของ Mx Hotstart PCR Mix ที่ใช้เท่ากับ 0.4x โดยมีปฏิกริยา PCR ดังนี้ Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 1 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 1 µL, Positive template (10^5 copy) 1 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 35 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C มาใช้ในการทดสอบขั้นถัดไป

4.4 การทดสอบ Limit of detection

จากการทดสอบ Limit of detection (LOD) ด้วยวิธี Duplex PCR Amplification โดยทำการเจือจางเชื้อตัวอย่างที่ได้ทำการบ่มไว้ใน Tryptone Soya Yeast Extract Broth 3 มิลลิลิตร ให้เชื้อตั้งต้นเท่ากับ 10^8 ทำการทดสอบที่ 10^5,10^4,10^3,10^2,10^1 ทำการทดสอบที่แต่ละความเจือจางอย่างล่ะ 3 ซ้ำ โดยทำซ้ำกับเชื้อ *Listeria* 3 สปีชีส์ ดังนี้ *Listeria monocytogenes, Listeria innocua* และ *Listeria seeligeri* เริ่มทำการทดสอบที่ *Listeria monocytogenes* ด้วยปฏิกริยา PCR ดังตารางที่ 4.5 -4.6 ดังนี้ Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 1 µL, 10 µM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR Positive primer reverse 1 µL, Positive template (10^5 copy) 1 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 35 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C ได้ผลการทดสอบดังนี้

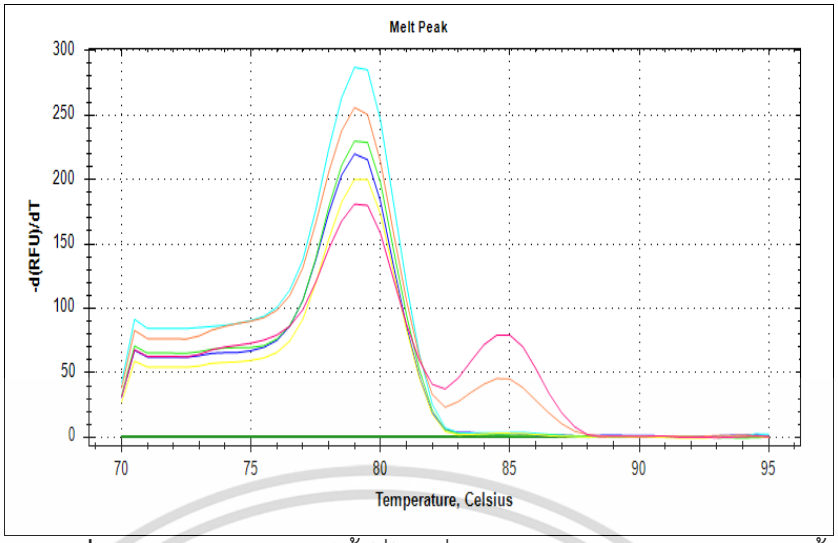


รูปที่ 4.13 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 1 ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes*

หมายเหตุ:*สีชมพู = 10^5 , สีส้ม = 10^4, สีเหลือง = 10^3, สีเขียว = 10^2, สีฟ้า = 10^1, สีน้ำเงิน = Positive Control

จากการทดสอบ LOD ครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.13) พบว่าสามารถตรวจหาได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่เจือจางจนถึง 10^4 CFU/ml และได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนรอบของการ PCR และตรวจสอบดูอีกครั้งว่าสามารถตรวจวัดได้ดีขึ้นหรือไม่ด้วย ปฏิกิริยา PCR ข้างต้น โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 40 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

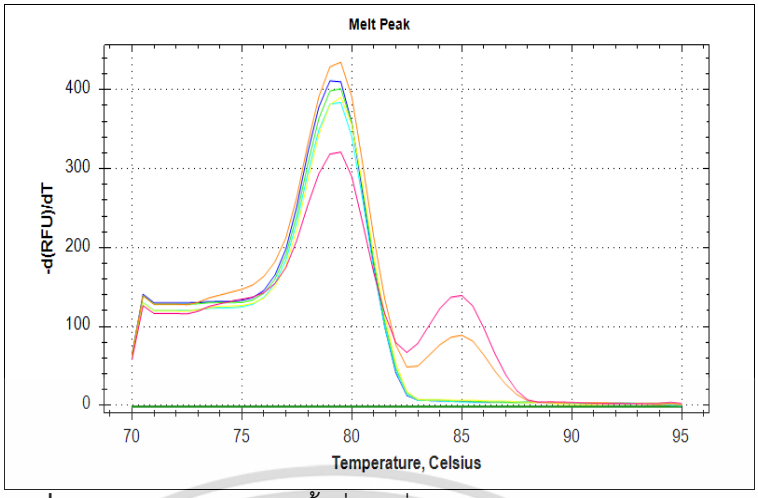


รูปที่ 4.14 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 2 เพิ่มจำนวนรอบของการ PCR ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes*

หมายเหตุ:*สีชมพู = 10^5 , สีส้ม = 10^4, สีเหลือง = 10^3, สีเขียว = 10^2, สีฟ้า = 10^1, สีน้ำเงิน = Positive Control

การทดสอบ LOD ครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.14) เป็นการเพิ่มจำนวนรอบเพื่อทดสอบว่าการเพิ่มจำนวนรอบมีส่วนช่วยในการตรวจวัดหรือไม่ จากการทดสอบยังคงตรวจวัดได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่เจือจางจนถึง 10^4 CFU/ml และได้ทำการเพิ่มจำนวนรอบของการ PCR และตรวจสอบดูอีกครั้งว่าสามารถตรวจวัดได้ดีขึ้นหรือไม่ด้วย ปฏิกิริยา PCR ดังนี้ Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5µL, 10 µM PCR Positive primer forward 1 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 1 µL, Positive template (10^5 copy) 1 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 45 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

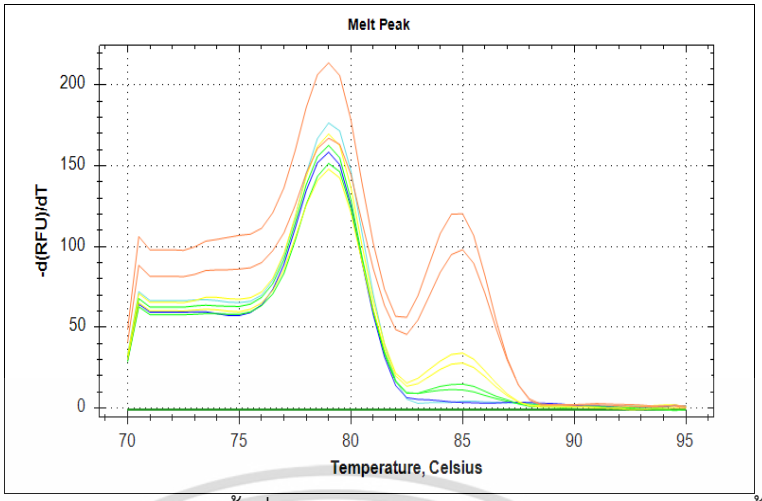


รูปที่ 4.15 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 3 เพิ่มจำนวนรอบของการ PCR ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes*

หมายเหตุ:* สีชมพู = 10^5 , สีส้ม = 10^4, สีเหลือง = 10^3, สีเขียว = 10^2, สีฟ้า = 10^1, สีน้ำเงิน = Positive Control

จากการทดสอบ LOD ครั้งที่ 3 (รูปที่ 4.15) ยังคงตรวจวัดได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่ dilute จนถึง 10^4 CFU/ml และเมื่อดูจากความสูงของ peak จะพบว่าเมื่อปริมาณความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อลิสทีเรียมีความเข้มข้นน้อยลงความสูงของ peak Positive Control จะมีความสูงที่เพิ่มมากขึ้น จากการสังเกต จึงได้ทำการลดเทมเพลตและปริมาณของ Positive Control ลงเพื่อลดการแย่ง substrate กัน ระหว่าง Positive Control และ DNA ของเชื้อลิสทีเรีย ทำการทดสอบที่ปฏิกริยา PCR ดังนี้ Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 0.5 µL, Positive template (10^5 copy) 0.5 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 45 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C ได้ผลดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

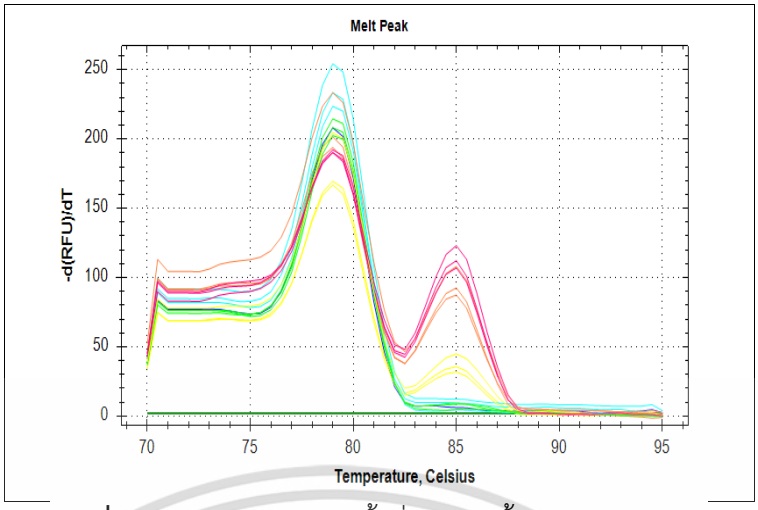


รูปที่ 4.16 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 4 ลดปริมาณของ Positive Control ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes*

หมายเหตุ:*สีส้ม = 10^4, สีเหลือง = 10^3, สีเขียว = 10^2, สีฟ้า = 10^1
สีน้ำเงิน = Positive Control

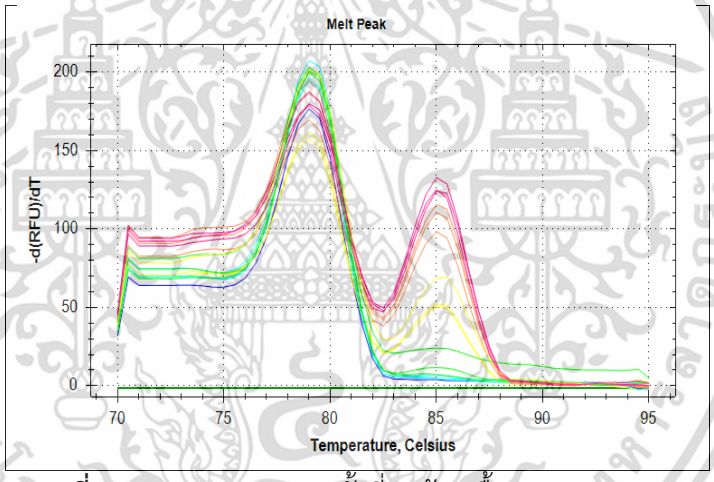
จากการทดสอบ LOD ครั้งที่ 4 (รูปที่ 4.16) ลดเทมเพลตและปริมาณของ Positive Control ลง เพื่อลดการแย่ง substrate กัน ระหว่าง Positive Control และ DNA ของเชื้อลิสทีเรีย สามารถตรวจวัดได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่ dilute จนถึง 10^3 CFU/ml อีกทั้งที่ 10^2 CFU/ml (เส้นสีเขียว) ยังมีลักษณะของ peak ที่อุณหภูมิ 85°C จากผลการทดสอบจึงได้ทำการเปลี่ยนปฏิกิริยาของ PCR เป็นดังนี้ Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 0.5 µL, Positive template (10^5 copy) 0.5 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 45 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C และทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป ทำการทดสอบทดสอบที่ 10^5,10^4,10^3,10^2,10^1 ทำการทดสอบที่แต่ละความเจือจางอย่างล่ะ 3 ซ้ำ โดยทำซ้ำกับเชื้อ *Listeria innocua* และ *Listeria seeligeri* สามารถตรวจวัดได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่ dilute จนถึง 10^3 CFU/ml (เส้นสีเหลือง) (รูปที่ 4.17-4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 5 ด้วยเชื้อ *Listeria innocua*

หมายเหตุ:*สีชมพู = 10^5 , สีส้ม = 10^4, สีเหลือง = 10^3, สีเขียว = 10^2, สีฟ้า = 10^1, สีน้ำเงิน = Positive Control



รูปที่ 4.18 ทดสอบ LOD ครั้งที่ 6 ด้วยเชื้อ *Listeria seeligeri*

หมายเหตุ:*สีชมพู = 10^5 , สีส้ม = 10^4, สีเหลือง = 10^3, สีเขียว = 10^2, สีฟ้า = 10^1, สีน้ำเงิน = Positive Control

จากการทดสอบ Limit of detection (LOD) ด้วยวิธี Duplex PCR Amplification โดยทำการ dilute เชื้อตัวอย่างที่ได้ทำการบ่มไว้ใน tryptone soy broth 3 มิลลิลิตร ให้เชื้อตั้งต้นเท่ากับ 10^8 ทำการทดสอบที่ 10^5,10^4,10^3,10^2,10^1 ทำการทดสอบที่แต่ละความเจือจางอย่างล่ะ 3 ซ้ำ โดยทำซ้ำกับเชื้อ *Listeria* spp. 3 สปีชีส์ สามารถตรวจวัดได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่เจือจางจนถึง 10^3 CFU/ml (เส้นสีเหลือง) และจากงานวิจัยของ Moravkova, M., et al. (2017) และ Li, F., et al. (2020) สามารถตรวจวัดเชื้อลิสทีเรียได้น้อยที่สุดคือเชื้อที่ความเจือจาง 10^3 CFU/ml ด้วยวิธีการ Real-time PCR จึงนำผลที่ได้เป็นตัวกำหนดค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ของการทดสอบด้วยวิธี Duplex PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบ Validation

นำปฏิกริยาของ PCR เป็นดังนี้ Mx Hotstart PCR Mix 5 µL, 10 µM primer forward 0.5 µL,10 µM primer reverse 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer forward 0.5 µL, 10 µM PCR Positive primer reverse 0.5 µL, Positive template (10^5 copy) 0.5 µL, HRM Dye 1 µL, MilliQ water 11.5 µL, DNA 5 µL รวมทั้งหมด 25 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยมี Amplification program ดังนี้ Initial denaturation 95°C 5 นาที 1 รอบ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing 60°C 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที 3 ขั้นตอนทำซ้ำ 45 รอบ Final extension 72°C 1 นาที 1 รอบ และตั้งการอ่าน Melt peak ที่ 70-95°C มาใช้ในการทดสอบ Validation

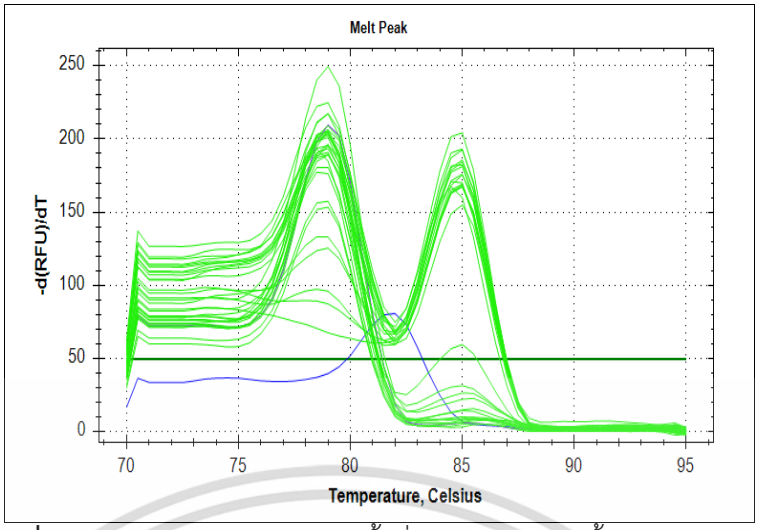
ทำการประเมิน วิธี Duplex PCR Amplification แบบ Blind test ใช้ตัวอย่างเชื้อ 60 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 67 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่เป็น Gold standard (conventional culture and biochemical test) โดยใช้วิธี 2x2 table มาใช้ในการคำนวณเพื่อหา ค่าspecificity และ Sensitivity ของ วิธี Duplex PCR โดยจะตั้งค่า Cut off ไว้ที่ 10^3 ได้ค่าของ fluorescence Dye ประมาณ 50 -d(RFU)/dT นำผลที่ได้มาคำนวณค่า Specificity และ Sensitivity ของวิธี Duplex PCR ในการใช้ตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย ที่ใช้ในการทดสอบ โดยใช้วิธี 2x2 table มาใช้ในการคำนวณ ได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 4.19 - 4.20 ได้ผลตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบ Validation (Blind test ทั้งหมด 60 ตัวอย่าง)

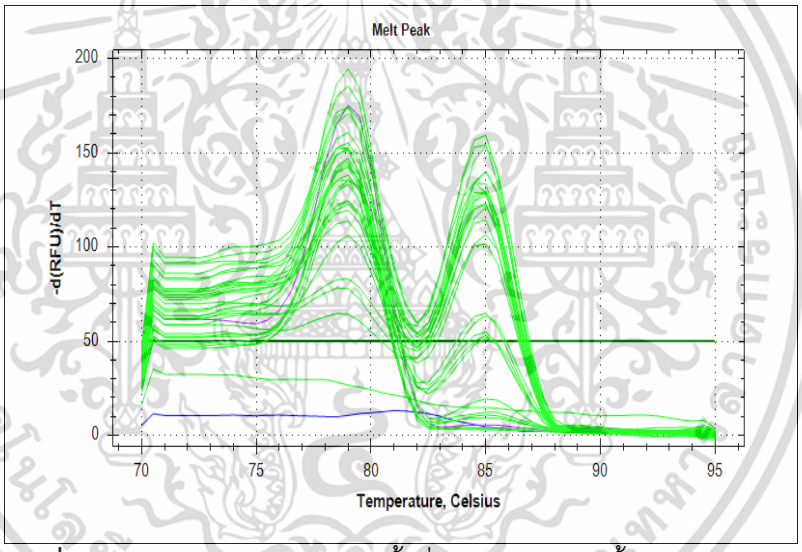
		Gold standard (ISO 11290:2017)		
		+	-	Total
Test Validation	+	33	3	36
	-	0	24	24
	Total	33	27	60

โดยมีผลบวกจริง (True Positive) เท่ากับ 33 ตัวอย่าง ผลบวกเท็จ (False Positive) 3 ตัวอย่าง ผลลบเท็จ (False Negative) 0 ตัวอย่าง และ ผลลบจริง (True Negative) 24 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า specificity และ sensitivity จะได้ค่าความไวต่อการตรวจ (sensitivity) เท่ากับ 100% และได้ค่าความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Duplex PCR ในการใช้ตรวจหาเชื้อลิสทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 88.89% และได้ค่าความถูกต้องของผลตรวจ (Diagnostic Accuracy) เท่ากับ 95% ที่ Cut off ประมาณ 50 -d(RFU)/dT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 ทดสอบ Validation ครั้งที่ 1 (Blind test ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง)



รูปที่ 4.20 ทดสอบ Validation ครั้งที่ 2 (Blind test ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบการตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีการ Realtime PCR และวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM) พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อลิสทีเรียได้จากวิธีทดสอบแบบ Single PCR Amplification จะพบว่า Primers สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย มีความจำเพาะและสามารถตรวจวัดได้เฉพาะเชื้อลิสทีเรีย ทั้ง 6 สปีชีส์ เท่านั้น ดังนั้นจึงนำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อลิสทีเรีย ไปทดสอบในกระบวนการถัดไปคือการตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีทดสอบแบบ Duplex PCR Amplification โดยทำการเพิ่ม Positive Control ซึ่งเป็นตัวควบคุมในกระบวนการ PCR ที่แสดงให้เห็นชัดว่าปฏิกริยา PCR เกิดขึ้นและทำงานได้ปกติในปฏิกริยานั้นๆ ปรับปริมาณของสารต่างๆในปฏิกริยาและนำไปทดสอบหา Limit of detection (LOD) ด้วยวิธี Duplex PCR Amplification ทดสอบที่ 10^5,10^4,10^3,10^2,10^1 ทำการทดสอบที่แต่ละความเจือจางอย่างล่ะ 3 ซ้ำ โดยทำซ้ำกับเชื้อ *Listeria* 3 สปีชีส์ สามารถตรวจวัดได้ที่น้อยสุดคือเชื้อที่เจือจางจนถึง 10^3 CFU/ml จากนั้นนำปฏิกริยาของ PCR ที่ได้มาทำการประเมินการใช้ Duplex PCR กับตัวอย่างจริง 60 ตัวอย่าง แบบ Blind test เทียบผลการทดลองกับวิธี Gold standard (conventional culture and biochemical test) ได้ค่าความไวต่อการตรวจ (sensitivity) เท่ากับ 100% และได้ค่าความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Duplex PCR ซึ่งตรวจหาเชื้อลิสทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 88.89% และได้ค่าความถูกต้องของผลตรวจ (Diagnostic Accuracy) เท่ากับ 95% ที่ Cut off ประมาณ 50 - d(RFU)/dT

จากผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการตรวจวัดเชื้อลิสทีเรียด้วยวิธี Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM) ซึ่งทำให้สามารถแยกเชื้อลิสทีเรียได้ผ่านค่า Tm (Melting Temperature) ที่มีความจำเพาะของดีเอ็นเอเป้าหมายและ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเท่านั้น ทำให้สามารถจำแนกเชื้อลิสทีเรียทั้ง 6 สปีชีส์ แยกจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่มักพบได้ในอุตสาหกรรมอาหารได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM) เป็นวิธีการที่ช่วยลดระยะเวลาการคัดแยกเชื้อลิสทีเรีย กับเชื้อชนิดอื่นๆในอุตสาหกรรมอาหารได้ ทำให้สามารถวิเคราะห์และควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ในบริเวณหรือตัวอย่างที่นำมาทดสอบ อีกทั้งยังสามารถต่อยอดในการตรวจด้วยวิธีการ Multiplex PCR ทำให้สามารถตรวจวัดเชื้อได้หลายชนิดมากยิ่งขึ้น หรือตรวจวัดสปีชีส์ต่างๆของเชื้อชนิดนั้นๆได้โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงยิ่งขึ้น อีกทั้งยังช่วยประหยัดระยะเวลาการตรวจสอบที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้เป็นอย่างดี ไม่

จำเป็นต้องคัดแยกให้เป็นเชื้อ 1 โคโลนีก่อนการทดสอบ แต่ไพรเมอร์ที่ใช้ต้องมีความจำเพาะต่อเชื้อชนิดนั้นอย่างมากมิฉะนั้นจะทำให้เกิดปัญหาต่อๆไปได้ หรือในขั้นตอนที่มีการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ควรระมัดระวังอย่างมากในการตรวจสอบหากเชื้อที่นำมาตรวจสอบมีการปนเปื้อนจะทำให้เกิดปัญหาได้ในขั้นนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณะสุข. 2563. **กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน หลักเกณฑ์เงื่อนไข และวิธีการในการตรวจวิเคราะห์ ของอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค**. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. ฉบับที่ 416. หน้า 9. [Online]. Available: https://dl.parliament.go.th/backoffice/viewer2300/web/viewer.php. เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 ส.ค. 2566

บริษัท กิบไทย จำกัด. 2563. **High-Resolution Melting (HRM) Technology**. [Online]. Available: https://www.gibthai.com/service/article_detail/212/High-Resolution-Melting-HRM-Technology. เข้าถึงเมื่อวันที่ 2 ก.ย. 2566

Achtman, M., and Wagner, M. 2008. **Microbial diversity and the genetic nature of microbial species**. Nat Rev Microbiol, 6(6), 431-440.

Brunehild S., Alain R., Sabine D., Fionna Q., and Claude M. 1996. **Comparative Analysis of 16S and 23S rRNA Sequences of Listeria Species**. International journal of systematic bacteriology, 46(3). 669-674.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. 2009. **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments**. Clin Chem, 55(4), 611-622.

Denyingyhot, A., Srinulgray, T., Mahamad, P., Ruangprach, A., Sa-I, S., Saerae, T., Vesaratchavest, M., Dahlan, W., and Keeratipibul, S. 2022. **Modern on-site tool for monitoring contamination of halal meat with products from five non-halal animals using multiplex polymerase chain reaction coupled with DNA strip**. Food Control, 132.

European Commission. 2023. **Microbiological criteria**. [Online]. Available: https://food.ec.europa.eu/safety/biological-safety/food-hygiene/microbiological-criteria_en#listeria-monocytogenes. เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 ส.ค. 2566

Farber, J. M., and Peterkin, P. I. 1991. **Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen**. Microbiological Reviews, 55(3), 476-511.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. 1996. **Real time quantitative PCR**. Genome research, 6(10), 986-994.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hu, A., L. Kong, Z. Lu, J. Qiao, F. Lv, F. Meng and X. Bie 2022. **Research on nanogold-assisted HRM-qPCR technology for highly sensitive and accurate detection of Vibrio parahaemolyticus**. Lwt 162.

International Organization for Standardization. 2018. **ISO 22000:2018 – Food safety management**. [Online]. Available: https://www.iso.org/files/live/sites/isoorg/files/store/en/PUB100430.pd. เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 ส.ค. 2566

International Organization for Standardization. 2022. **ISO 11290:2017 – Standards for Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes and Listeria spp. in the food chain**. [Online]. Available: https://www.iso.org/standard/60313.html. เข้าถึงเมื่อวันที่ 2 ก.ย. 2566

Li, F., Ye, Q., Chen, M., Zhang, J., Xue, L., Wang, J., Wu, S., Zeng, H., Gu, Q., Zhang, Y., Wei, X.,Ding, Y., and Wu, Q. 2020. **Multiplex PCR for the Identification of Pathogenic Listeria in Flammulina velutipes Plant Based on Novel Specific Targets Revealed by Pan-Genome Analysis**. Front Microbiol, 11, 634255.

Moravkova, M., Verbikova, V., Michna, V., Babak, V., Cahlikova, H., Karpiskova, R., and Kralik, P. 2017. **Detection and Quantification of Listeria monocytogenes in Ready-to-eat Vegetables, Frozen Vegetables and Sprouts Examined by Culture Methods and Real-time PCR**. Journal of Food and Nutrition Research, 5(11), 832-837.

Narimisa, N., Amraei, F., Sholeh, M., Mirkalantari, S., Razavi, S., Kalani, B. S., Lotfollahi, L., and Jazi, F. M. 2022. **Genotyping of Listeria monocytogenes isolates by high-resolution melting curve (HRM) analysis of tandem repeat locus**. Braz J Infect Dis, 26(2), 102348.

Neri, D., Antoci, S., Iannetti, L., Ciorba, A. B., D'Aurelio, R., Del Matto, I., Di Leonardo, M., Giovannini, A., Prencipe, V. A., Pomilio, F., Santarelli, G. A., and Migliorati, G. 2019. **EU and US control measures on Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in certain ready-to-eat meat products: An equivalence study**. Food Control, 96, 98-103.

Norton, D. M., M. A. McCamey, K. L. Gall, J. M. Scarlett, K. J. Boor and M. Wiedmann. 2001. **Molecular studies on the ecology of Listeria monocytogenes in the smoked fish processing industry**. Appl Environ Microbiol 67(1): 198-205.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reed, G. H., Wittwer, C. T., and Sensabaugh, G. F. 1997. **High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics**. Pharmacogenomics, 8(6), 597-608.

Rip, D. and P. A. Gouws. 2020. **PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Characterization of Listeria monocytogenes Isolates from Ready-to-Eat Foods, the Food Processing Environment, and Clinical Samples in South Africa**. J Food Prot 83(3): 518-533.

Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., and Pla, M. 2004. **Simultaneous quantitative detection of Listeria spp. and Listeria monocytogenes using a duplex real-time PCR-based assay**. FEMS Microbiol Lett, 233(2), 257-267.

Seyoum, E. T., D. A. Woldetsadik, T. K. Mekonen, H. A. Gezahegn and W. A. Gebreyes. 2015. **Prevalence of Listeria monocytogenes in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia**. J Infect Dev Ctries 9(11): 1204-1209.

Tamburro, M., M. L. Sammarco, I. Fanelli and G. Ripabelli. 2019. **Characterization of Listeria monocytogenes serovar 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b by high resolution melting analysis for epidemiological investigations**. Int J Food Microbiol 310: 108289.

Taylor, S. C., K. Nadeau, M. Abbasi, C. Lachance, M. Nguyen and J. Fenrich. 2019. **The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time**. Trends Biotechnol 37(7): 761-774.

U.S. Food and Drug Administration. 2022. **BAM Chapter 10: Detection of Listeria monocytogenes in Foods and Environmental Samples and Enumeration**. [Online]. Available: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration. เข้าถึงเมื่อวันที่ 2 ก.ย. 2566

Vossen, R. H., E. Aten, A. Roos and J. T. den Dunnen. 2009. **High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening**. Hum Mutat 30(6): 860-866.

Zhou, L., L. Wang, R. Palais, R. Pryor and C. T. Wittwer. 2005. **High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution**. Clin Chem 51(10): 1770-1777.

3M. 2005. **Petrifilm Listeria Plate Interpretation Guide**. [Online]. Available: https://multimedia.3m.com/mws/media/371803O/petrifilm-listeria-plate-interpretation-guide-en.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 2 ก.ย. 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Broth (TSYEB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth	30	กรัม
Yeast Extract	6	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth 30 กรัม และชั่ง Yeast Extract 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth	30	กรัม
Yeast Extract	6	กรัม
Bacteriological agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth 30 กรัม ชั่ง Yeast Extract 6 กรัม และชั่ง Bacteriological agar 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรฆ

1.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การตรวจวัดปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเชื้อลิสทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ใน Tryotone Soya Yeast Extract Broth 24 ชั่วโมง มาทำการเจือจางที่อัตราการเจือจาง 10^{-1} จนถึง 10^{-7} จากนั้นนำมา spread plate ลงบน Tryotone Soya Yeast Extract Agar นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีเดี่ยว ได้ผลดังตาราง

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 แสดงค่าการตรวจนับเชื้อลิสทีเรีย

อัตราการเจือจาง	จำนวนซ้ำ			x อัตราการเจือจาง	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		
10^{-4}	TNTC	TNTC	217	217×10^{5}	2.17×10^{7}
10^{-5}	219	42	199	154×10^{6}	1.54×10^{8}
10^{-6}	12	11	15	13×10^{7}	1.3×10^{8}
10^{-7}	3	0	0	1×10^{8}	1×10^{8}

หมายเหตุ:ที่อัตราการเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-2} มีจำนวนโคโลนีอยู่ติดกันเป็นแผ่น = spr
ที่อัตราการเจือจางที่ 10^{-3} มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 300 โคโลนี = TNTC

ดังนั้นจะพบว่าปริมาณตั้งต้นของเชื้อลิสทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ เลี้ยงไว้ใน Tryotone Soya Yeast Extract Broth 24 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์อยู่ที่ 10^{8} CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 แสดงตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

No.	Bacteria
1	*Listeria ivanovii*
2	*Listeria innocua*
3	*Listeria monocytogenes*
4	*Listeria seeligeri*
5	*Listeria welshimeri*
6	*Listeria grayi*
7	*Salmonella* Typhimurium
8	*Salmonella* Agona
9	*Salmonella* Chester
10	*Salmonella* Derby
11	*Salmonella* Heidelberg
12	*Salmonella* Paratyphi B
13	*Salmonella* Saintpaul
14	*Salmonella* Schwarzengrund
15	*Salmonella* Stanley
16	*Salmonella* Virchow
17	*Salmonella* Infantis
18	*Salmonella* Augustenborg
19	*Salmonella* Bareilly
20	*Salmonella* Braenderup
21	*Salmonella* Livingstone
22	*Salmonella* Mbandaka
23	*Salmonella* Montevideo
24	*Salmonella* Oslo
25	*Salmonella* Rissen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค.2 แสดงตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

No.	Bacteria
26	*Salmonella* Singapore
27	*Salmonella* Tennessen
28	*Salmonella* Thompson
29	*Salmonella* Bovismorbificans
30	*Salmonella* Newport
31	*Salmonella* Hadar
32	*Salmonella* Albany
33	*Salmonella* Altona
34	*Salmonella* Brunei
35	*Salmonella* Corvallis
36	*Salmonella* Emek
37	*Salmonella* Kentucky
38	*Salmonella* Manhattan
39	*Salmonella* Molade
40	*Salmonella* Muenchen
41	*Salmonella* Enteritidis
42	*Salmonella* Panama
43	*Salmonella* Eastbourne
44	*Salmonella* Javiana
45	*Salmonella* Fresno
46	*Salmonella* Amsterdam
47	*Salmonella* Anatum
48	*Salmonella* Falkensee
49	*Salmonella* Give
50	*Salmonella* Lexington

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค.3 แสดงตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

No.	Bacteria
51	*Salmonella* Orion
52	*Salmonella* Weltervreden
53	*Salmonella* Krefeld
54	*Salmonella* Senftenberg
55	*Salmonella* Aberdeen
56	*Salmonella* Cubana
57	*Salmonella* Havana
58	*Salmonella* Idikan
59	*Salmonella* Kedougou
60	*Salmonella* Poona
61	*Salmonella* Worthington
62	*Salmonella* Hvittingfoss
63	*Salmonella* Yoruba
64	*Salmonella* Bankok
65	*Aeromonas hydrophila*
66	*Escherichia coli*
67	*Staphylococcus aureus*

หมายเหตุ: *Salmonella* spp. ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* โดยมีจำนวนของซีโรวาร์ทั้งหมด 58 ซีโรวาร์ สามารถเขียนได้ดังนี้ *Salmonella* serovar Typhimurium หรือ *Salmonella* Typhimurium หรือ *S.* Typhimurium

รวมจำนวนเชื้อตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้เท่ากับ 67 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มสหกิจศึกษา

วันที่ 15 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นางสาวสุภัสภรณ์ ทองคำ รหัสประจำตัว 63050527

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การตรวจหาเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR และวิเคราะห์ผลแบบ High Resolution Melting (HRM)

ชื่อภาษาอังกฤษ Detection of *Listeria* species using Duplex PCR with High Resolution Melting (HRM) Analysis

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00%

ลงชื่อ.....สุภัสภรณ์ ทองคำ.....

(นางสาวสุภัสภรณ์ ทองคำ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ลงชื่อ.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

อาจารย์ที่ปรึกษา