การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM)

Identification of *Salmonella* spp. using duplex PCR technique with High Resolution Melting (HRM) analysis.

นางสาวปรีดานุช ทองจันทร์

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IDENTIFICATION OF *SALMONELLA* SPP. USING DUPLEX PCR TECHNIQUE WITH HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) ANALYSIS

MISS PREEDANUCH THONGCHAN

A COPERATIVE 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 *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM) Identification of *Salmonella* spp. using duplex PCR technique with High Resolution Melting (HRM) analysis.
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปรีดานุช ทองจันทร์ รหัสนักศึกษา 63050498
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ นายธีระรักษ์ ศรีนวลกราย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2566

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปรีดานุช ทองจันทร์ รหัสนักศึกษา 63050498
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ นายธีระรักษ์ ศรีนวลกราย

บทคัดย่อ

ซัลโมเนลลา (*Salmonella*) เป็นแบคทีเรียสกุล (genus) หนึ่งในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae ลักษณะเป็น Gram Negative Bacilli ซึ่ง *Salmonella* เป็นเชื้อก่อโรคเกี่ยวข้องกับอาหาร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทยและยังพบการปนเปื้อน *Salmonella* ในอาหารประเภทไข่ทางทวีปยุโรป นับได้ว่า *Salmonella* ถือเป็นปัญหาสำหรับอุตสาหกรรมอาหารอย่างมาก จึงมีกำหนดในราชกิจจานุเบกษาของกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการควบคุมโรค *Salmonella* สำหรับสัตว์ปีก เพื่อลดปัญหาการระบาดและการติดเชื้อ *Salmonella* ได้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR สำหรับตรวจเชื้อ *Salmonella* และสามารถจำแนกออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น เพื่อทดสอบความจำเพาะ (specificity) และปริมาณความหนาแน่นของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (limit of detection) *Salmonella* โดยใช้วิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ High Resolution Melting (HRM) โดยทดสอบกับเชื้อ *Salmonella enterica* จำนวน 58 Serovars ได้ผลการวิจัย ดังนี้ สามารถตรวจหาเชื้อ *Salmonella enterica* ได้อย่างจำเพาะและมีปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ถึง 10^4 เท่า มีความจำเพาะร้อยละ 92 และความไวร้อยละ 100 และมีความรวดเร็วสำหรับการคัดกรอง *Salmonella enterica* ในอาหาร ดังนั้นวิธีวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ High Resolution Melting (HRM) มีความน่าเชื่อถือ

คำสำคัญ : ซัลโมเนลลา เทคนิค Duplex PCR เทคนิค High Resolution Melting (HRM) Analysis เทคนิคการหาปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดของเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Identification *Salmonella* spp. using duplex PCR technique with High Resolution Melting (HRM) analysis
Students	Miss Preedanuch Thongchan Student ID 63050498
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	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

Salmonella is a genus of bacteria within the family Enterobacteriaceae. It is characterized as Gram-negative bacilli. *Salmonella* is a pathogenic microorganism associated with foodborne diseases. Public health research institutes have discovered the presence of *Salmonella* spp. in Thailand and have also found contamination of *Salmonella* in European egg-based foods. *Salmonella* is a significant issue for the food industry, prompting regulations outlined in the Royal Gazette by the Department of Livestock Development to control *Salmonella* in poultry, to reduce the spread and infection of *Salmonella*. The objectives of this research are to develop a PCR technique for detecting *Salmonella* and to differentiate it from other bacterial species. This involves testing for specificity and determining the limit of detection. The study employs the duplex PCR technique with High Resolution Melting (HRM) analysis. The research results indicate that *Salmonella enterica* can be detected specifically with a limit of detection as low as 10^4 times diluted. The method exhibits 92% specificity and 100% sensitivity and proves to be a rapid and reliable screening method for *Salmonella enterica* in food products. Consequently, the *Salmonella* analysis method using duplex PCR combined with HRM analysis is considered reliable.

Keywords: *Salmonella*, Duplex PCR technique, High Resolution Melting (HRM) Analysis, limit of detection

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

สหกิจศึกษาเล่มนี้สามารถสำเร็จสมบูรณ์ตามเป้าหมายได้ เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทาง ให้คำปรึกษา รวมทั้งตรวจเล่มสหกิจศึกษาเล่มนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาร่วม ที่ให้โอกาสในการทำสหกิจศึกษาในครั้งนี้ อีกทั้งยังให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาและแนวทางการแก้ไขปัญหา รวมทั้งตรวจเล่มสหกิจศึกษาเล่มนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ นายธีระรักษ์ ศรีนวลกราย จากบริษัท Talenome DNA Professional CO., LTD ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ ความรู้เกี่ยวกับเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ High Resolution Melting (HRM) และให้คำปรึกษาเพื่อแก้ไขสหกิจศึกษาเล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวฐิติลักขณ์ สว่างศรี นักวิทยาศาสตร์ รวมทั้งนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำเรื่องการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ภายในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเพื่อน พี่และน้องทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้กำลังใจตลอดระยะการทำสหกิจศึกษา สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่สนับสนุน ผลักดัน และให้กำลังใจในการทำสหกิจศึกษาครั้งนี้ ให้ได้สำเร็จดังที่คาดหวังไว้ หากสหกิจศึกษานี้มีความผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ปรีดานุช ทองจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขต	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 *Salmonella enterica*	4
2.1.1 ลักษณะของ *Salmonella*	4
2.1.2 การกระจายของ *Salmonella* spp.	4
2.2 การตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี RealTime PCR แบบ Duplex และวิเคราะห์ผลด้วย High Resolution Melting (HRM)	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	44
ภาคผนวก ก	45
ภาคผนวก ข	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การกระจายของ *Salmonella* สายพันธุ์ *enterica* ในตัวอย่างสัตว์ปีกต่างๆ	5
2.2	ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	7
3.1	*Salmonella enterica* จำนวน 58 Serovars	13
3.2	แสดงส่วนประกอบการเตรียม Master mix สำหรับ 1 ตัวอย่าง	15
3.3	แสดงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	16
3.4	แสดงส่วนประกอบ Master mix สำหรับการทดลอง Duplex PCR	19
3.5	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	19
4.1	แสดงผลการคำนวณความถูกต้องของผลตรวจ โดยอ้างอิงวิธี Gold standard (ISO 6579-1: 2017)	37
ข-1	แสดงค่าการตรวจนับเชื้อ *Salmonella* spp.	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
3.1	ตั้งค่าสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	16
3.2	เลือกแถวที่ต้องการให้เครื่องตรวจสอบ	17
3.3	แสดงการกำหนดชื่อ กำหนดตัวอย่าง และสีย้อมที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	17
4.1	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S.* Hadar เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB Agar) ที่อุณหภูมิ 37°c เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	21
4.2	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.* Hadar ในอาหาร Luria-Bertani Broth (LB Broth) เขย่าด้วยเครื่อง Shaking Incubator ที่อุณหภูมิ 37°c เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง	22
4.3	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, *S*. Paratyphi B Var.Java, *S*. Bangkok และ *Staphylococcus aureus* โดยมี No template control เป็นตัวบ่งบอกถึงการเกิดปฏิกิริยา	23
4.4	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, *S*. Paratyphi B Var.Java, *S*. Bangkok และ *Staphylococcus aureus* เมื่อลดปริมาตร primer specificity 1 ลำดับ	24
4.5	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, *S*. Virchow, *S*. Agona และ *Listeria* spp.	25
4.6	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Havitting, *S*. Yourba, *S*. Typhimurium, *S*. Worthington และ Out groups อื่น	26
4.7	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control โดยปรับ primer positive control 1 ลำดับ	27
4.8	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control โดยปรับ primer specificity 1 ลำดับ	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.9	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control โดยปรับ Hot Strat PCR Master mix 1 ลำดับ	29
4.10	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า ปฏิกิริยา PCR 35 รอบ	30
4.11	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า ปฏิกิริยา PCR 40 รอบ	31
4.12	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 เท่า ปฏิกิริยา PCR 45 รอบ	32
4.13	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Hadar และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า	33
4.14	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Enteritidis และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า	34
4.15	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของการประเมินการตรวจผล ครั้งที่ 1	35
4.16	Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของการประเมินการตรวจผล ครั้งที่ 2	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
HRM	High Resolution Melting
LOD	Limit Of Detective ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้
DNA	Deoxyribonucleic acid สารพันธุกรรมที่ส่วนประกอบของสิ่งมีชีวิตทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรม
Tm	Melting Temperature ที่สามารถคลายเกลียวดีเอ็นเอได้ครึ่งนึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Salmonella ถูกค้นพบโดย แดเนียล เอลเมอร์ แซลมอน (ชื่อ *Salmonella* มาจากนามสกุลผู้ค้นพบ) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีลักษณะรูปท่อน เคลื่อนที่โดยใช้แฟกเจลลา (flagella) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) และเจริญได้ในอุณหภูมิร่างกายของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญได้ คือ 5.2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เคยมีรายงานการเจริญเติบโตคือ 54°c *Salmonella* เจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จึงพบได้ในอาหารที่เป็นบรรจุภัณฑ์สุญญากาศ (vacuum packaging) *Salmonella* สามารถทนความร้อนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ และความชื้น เป็นต้น (NGThai, 2563) ชนิดของ *Salmonella* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Typhoidal *Salmonella* เป็นกลุ่มของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อยหรือไข้รากสาด ประกอบด้วยเชื้อ *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, และ Paratyphi C อีกชนิดหนึ่งคือ Non-typhoidal Salmonella หมายถึง *Salmonella* สายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งหมด หลักโดยย่อของการเขียนชื่อเชื้อ *Salmonella* spp. เช่น Genus: *Salmonella* เป็นตัวเอน ตัวแรกเขียนตัวใหญ่ Species *enterica* เป็นตัวเอน Serotype or serovar Typhi เป็น ตัวตรง ตัวแรกเขียนตัวใหญ่ ดังนั้นเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ *enterica* เขียนชื่อได้ดังนี้ *Salmonella enterica* serovars Typhi ในทางปฏิบัตินิยมเขียนให้สั้นลงว่า *Salmonella* serovars Typhi หรือ Salmonella Typhi หรือ *S.* Typhi ซึ่ง *Salmonella* โดยสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Enteritidis (กองบรรณาธิการ HD, 2563) และยังมี Serovars ต่างๆ มากกว่า 2,500 ชนิด (Brown et al., 2021) แหล่งที่มาของ *Salmonella* อาหารหลากหลายชนิดรวมถึงไก่ เนื้อวัว เนื้อหมู ไข่ ผลไม้ ถั่วงอก ผักอื่นๆ และแม้แต่อาหารแปรรูป เช่น เนยถั่ว พายหม้อแช่แข็ง และไก่ยัดไส้ เป็นต้น ไม่ใช่เพียงแค่อาหารเท่านั้นที่เป็นแหล่งกระจายของเชื้อสามารถติดต่อจากสัตว์ มาสู่คนและสัตว์อื่น ๆ เช่น หนู สัตว์ปีก แมลง วัว ควาย สุนัข แมว และม้า เป็นต้น (สถาบันอาหารกระทรวงอุตสาหกรรม, 2555)

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารมักเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวข้องกับทางเดินอาหาร ซึ่ง *Salmonella* ถือเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคเช่นกัน การรับเชื้อเข้าร่างกายเกิดจากการรับเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ผ่านอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อน จากนั้นเซลล์จุลินทรีย์เหล่านี้ได้เพิ่มจำนวน จนเกิดภาวะอาหารเป็นพิษ (อรชร และ จิราภรณ์, 2563) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella* เรียกว่า ผู้ป่วยโรคซัลโมเนลโลซิส (salmonellosis) ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการเป็นไข้ ถ่ายเหลว หรืออาเจียน โดยอาการอาจปรากฏอยู่นาน 8 – 72 ชั่วโมง ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่สุขภาพแข็งแรงอาจมีอาการดีขึ้นเองภายใน 2 – 3 วันโดยไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเป็นต้องรับการรักษา ในทางกลับกัน ผู้ป่วยบางรายอาจไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใดๆ อาการของผู้ป่วยอาจใช้เวลานานหลายชั่วโมงจนถึง 2 วัน จึงจะปรากฏอาการของโรค เช่น ปวดท้อง ท้องเสีย โดยอุจจาระอาจมีเลือดปน อาเจียน ปวดศีรษะ เวียนศีรษะ เป็นไข้ หนาวสั่น เบื่ออาหาร นอกจากนี้ หากผู้ติดเชื้อเป็นเด็ก ผู้สูงอายุ หรือผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง บวกกับมีอาการอุจจาระเป็นเลือด มีไข้สูง หรือมีภาวะขาดน้ำนานกว่า 2 – 3 วัน ควรไปพบแพทย์โดยเร็วที่สุด แม้อาการของ Salmonella Infection อาจไม่เป็นอันตรายถึงชีวิต แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวขึ้นกับเด็ก สตรีมีครรภ์ ผู้สูงอายุ ผู้ที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ หรือผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ (NGThai, 2563)

การป้องกันการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในโรงงานอุตสาหกรรมเป็นเรื่องสำคัญเนื่องจาก *Salmonella* สามารถทำให้ผู้บริโภคป่วยจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อนี้ โรงงานอุตสาหกรรมอาหารและสาธารณสุขที่ทำการควบคุมคุณภาพอาหารมักมีมาตรฐานการป้องกันและควบคุมการปนเปื้อนของ *Salmonella* และแบคทีเรียอื่น ๆ ในอาหารเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ปลอดภัยสำหรับการบริโภค WHO (องค์การอนามัยโลก) รายงานถึงสายพันธุ์ *Salmonella* ที่มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรคและทำให้เกิดโรคทางอาหารเป็นพิษ สายพันธุ์ของ *Salmonella* ที่เป็นที่รู้จักและสำคัญมีหลายสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium เป็นสายพันธุ์สองสายพันธุ์ที่ถูกรายงานว่าเป็นสายพันธุ์ที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคทางอาหารที่เป็นพิษในมนุษย์ (Kumar et al., 2019)

Salmonella enterica Enteritidis เป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญเนื่องจากมักก่อให้เกิดอาการของโรคในมนุษย์ที่รุนแรงกว่าสายพันธ์อื่นๆ และถูกกำหนดในราชกิจจานุเบกษาของกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการควบคุมโรค *Salmonella* สำหรับสัตว์ปีก ถ้าหากมีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis อาจจะส่งผลกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศ เศรษฐกิจ และชื่อเสียงของประเทศ ทำให้สูญเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมาก จากข้อมูลการตรวจยืนยัน 3 ปีที่ผ่านมาของห้องปฏิบัติการตรวจยืนยัน *Salmonella* และ *Shigella* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ได้ทำการรวบรวมข้อมูลและจำนวนที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่ส่งมาตรวจยืนยัน เชื้อบริสุทธิ์ที่ตรวจพบจากผู้ป่วย อาหารและสิ่งแวดล้อม พบว่าในว่า 2019 พบ *Salmonella* Enteritidis ที่มีอัตราเพิ่มขึ้นและต้องเฝ้าระวังกันอย่างต่อเนื่องทั้งต่อด้านของการระบาด และวิธีรับมือเมื่อเกิดการระบาดขึ้นมา (สถาบันวิทยาศาสตร์วิจัยสาธารณสุข, 2565)

การป้องกันการแพร่ระบาดของ *Salmonella* สิ่งแวดล้อม สถานประกอบการควบคุมตั้งแต่กระบวนการผลิตจนถึงการจำหน่ายการส่งออกควรถูกสุขอนามัย อาหารที่รับประทานควรปรุงสุก รักษาความสะอาด เช่น ล้างมือก่อนรับประทานอาหาร แยกบริเวณของดิบและของสุก ในกรณีที่มีการระบาด, ควรแยกสารทดสอบที่ติดเชื้อและป้องกันการกระจายของเชื้อโดยการฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kasturi and Drgon (2017) ได้ศึกษาประเมินการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT- PCR) โดยใช้ยีน invA ที่สามารถจำเพาะกับ *Salmonella* spp. สภาวะที่ใช้สำหรับการทำ RT- PCR คือ เริ่มแรก 95°c เป็นเวลา 3 นาที, 40 cycles เริ่มที่ 94 °c เป็นเวลา10 วินาที และสุดท้าย 60°c เป็นเวลา 30 วินาที โดยใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 46 นาที

Heymans et al. (2018) ได้ศึกษาการพัฒนาและประเมินผลสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. พร้อมกันระหว่าง *S*. Typhimurium และ *S*. Enteritidis ในอาหารต่างๆโดยการกำหนดเป้าหมายยีน invA ยีน STM4200 และยีน SEN1392 เพื่อตรวจจับและแยกความแตกต่างของ *Salmonella* spp. คือ *S*. Typhimurium และ *S*. Enteritidis ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าการวิเคราะห์ปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีการ qPCR อยู่ที่ประมาณ 40 CFU/100 g ในอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM)
2) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการที่พัฒนา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคาะห์ High Resolution Melting (HRM)
2) ศึกษาการตรวจเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ enterica 58 Serovars
3) ศึกษา specificity ที่ annealing 55°c และสามารถตรวจสอบเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ถึงความเจือจาง 10^4 เท่า

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในโรงงานอุตสาหกรรมได้
2) เทคนิคนี้สามารถจำแนกเชื้อ *Salmonella* ออกจากเชื้อชนิดอื่นได้
3) สามารถหาปริมาณความหนาแน่นของเชื้อ *Salmonella* ต่ำสุดที่ตรวจสอบได้
4) เพื่อลดขั้นตอนและเวลาสำหรับตรวจเชื้อ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Salmonella enterica*

2.1.2 ลักษณะของ *Salmonella* spp.

ซัลโมเนลลา (*Salmonella*) เป็นแบคทีเรียสกุล (genus) หนึ่งในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae ลักษณะเป็น Gram Negative Bacilli ขนาดกว้างประมาณ 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 2.0 -5.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative Anaerobe) *Salmonella* มี 2 Species คือ Bongori และ Enterica ซึ่ง *Salmonella enterica* spp. ยังแบ่งเป็น 6 Subspecies และแบ่งย่อยออกได้อีกมากกว่า 2,500 serotype (or serovar) หลักโดยย่อของการเขียนชื่อเชื้อ *Salmonella* spp. เช่น Genus: *Salmonella* (ตัวเอน ตัวแรกเขียนตัวใหญ่) Species *enterica* (ตัวเอน) Serotype (or serovar) Typhi (ตัวตรง ตัวแรกเขียนตัวใหญ่) ดังนั้น เชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ *enterica* เขียนชื่อได้ดังนี้ *Salmonella enterica* serovars Typhi ในทางปฏิบัตินิยมเขียนให้สั้นลงว่า *Salmonella* serovars Typhi หรือ *Salmonella* Typhi หรือ *S*. Typhi ซึ่ง *Salmonella* ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ *S*. Typhimurium และ *S*. Enteritidis เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม , นก และสัตว์เลื้อยคลาน สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดีและสามารถอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้นาน รวมทั้งน้ำ, ดิน และต้นพืชชนิดต่างๆ มีการประเมินความหลากหลายของ serovars ที่พบมากที่สุดเป็น *Salmonella enterica* ส่วนมากที่พบในสิ่งแวดล้อม

Brown et al. (2021) มีบันทึกในฐานข้อมูลสาธารณะของ *Salmonella* spp. มากกว่า 340,000 จีโนม เนื่องจาก *Salmonella* spp. อยู่ได้ในสภาพแวดล้อมได้หลากหลายจึงมีการวิจัยหลายที่ได้รับอนุญาตในการทดสอบความหลากหลายของฟีโนไทป์และเอกลักษณ์ของ *Salmonella* spp. เช่น การดื้อยา, Serovars, ความรุนแรง และจีโนมที่บ่งบอกคุณลักษณะของ *Salmonella* spp.

2.1.2 การกระจายของ *Salmonella* spp.

Kumar et al. (2019) ได้ศึกษาการกระจายของ *Salmonella* spp. ในสัตว์ปีกภายในประเทศอินเดีย ได้ผลการวิจัยว่า พบ *S*. Gallinarum ตัวแทนสาเหตุของไทฟอยด์ไก่และเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและการตายในสัตว์ปีกส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ปีก พบว่ามีสัดส่วนสูงสุดในช่วงปี 2011-2016 คิดเป็นร้อยละ 43.7 ของเชื้อ *Salmonella* ทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีการพบ *S*. Enteritidis และ *S*. Typhimurium ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวแทนที่มีการติดเชื้อในกระเพาะและลำไส้ของมนุษย์พบว่าเป็น serovars ที่แพร่หลายมากที่สุดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันดับสองและสามในช่วงระยะเวลาการศึกษา การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Salmonella* เกิดจากการบริโภคผลิตภัณฑ์ไข่หรือเนื้อสัตว์ Serovars ที่พบบ่อย ได้แก่ *S.* Gallinarum (43.7%), *S.* Enteritidis (30.6%), *S.* Typhimurium (21.9%), *S.* Infantis (2.7%), *S.* Montevideo (0.64%), *S.* Newport (0.26%) and *S.* Pullorum (0.13%) ส่วนใหญ่จะพบในเนื้อสัตว์ปีก (71%) เลือด (17.7%) อุจจาระ (7.7%) และไข่ (3.6%) (ดังตารางที่ 2.1) ซึ่งพบว่ามีการกระจายอย่างสม่ำเสมอเกือบทั่วอินเดีย

ตารางที่ 2.1: แสดงบริเวณที่พบ *Salmonella enterica*

Source	Year wise, n (%)						Total, n (%)
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Poultry meat	122 (79.2)	221 (81.5)	71 (38.2)	75 (100)	48 (62.3)	15 (100)	552 (71)
Heart blood	-	21 (7.7)	115 (61.8)	-	2 (2.6)	-	138 (17.7)
Faeces	19 (12.3)	14 (5.2)	-	-	27 (35.1)	-	60 (7.7)
Egg	13 (8.4)	15 (5.5)	-	-	-	-	28 (3.6)
Total	154	271	186	75	77	15	778

ที่มา: Pubmed.gov

พบรายงานจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2009) ว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งพบการปนเปื้อนในอาหารที่มีส่วนผสมของถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ที่ผสมพิสตาชิโอจึงต้องมีการเรียกคืนผลิตภัณฑ์จำนวนมากเนื่องจากเชื้อ *Salmonella* อาจทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงและบางครั้งถึงแก่ชีวิตในเด็กเล็กคนอ่อนแอหรือผู้สูงอายุและคนอื่น ๆ ที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ อาการเมื่อติดเชื้อ *Salmonella* มักจะมีไข้ท้องเสีย (ซึ่งอาจเป็นเลือด) คลื่นไส้อาเจียนและปวดท้อง ในบางกรณีการติด *Salmonella* ก่อให้เกิดการเจ็บป่วยที่รุนแรงมากขึ้น เช่น การติดเชื้อในหลอดเลือดแดง เยื่อบุหัวใจอักเสบและโรคข้ออักเสบ เป็นต้น

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข (2565) พบการระบาดของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย เช่น กรณีที่คุณยายวัย 66 ปี กินขนมจีบ และเสียชีวิต และมีผู้ที่กินแล้วท้องเสียรุนแรงเกือบ 20 คน เหตุเกิดที่ จ.สมุทรปราการ ทั้งนี้สาธารณสุขจังหวัดสมุทรปราการ เก็บตัวอย่างขนมจีบที่ผู้ป่วยรับประทานและนำส่งให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจสอบ พร้อมนำผลตรวจจากผู้ป่วยมาเปรียบเทียบ โดยผลเบื้องต้นจากตัวอย่างบางส่วนพบว่า มีเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* และการระบาดในต่างประเทศ โดยเมื่อวันที่ 2 กันยายน พ.ศ. 2564 ฝรั่งเศสรายงานว่ามีการติดเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ST11 เพิ่มขึ้น และภายในวันที่ 11 มกราคม พ.ศ. 2565 มีรายงานผู้ป่วยยืนยัน 272 ราย ใน 5 ประเทศในสหภาพยุโรปได้แก่ เดนมาร์ก ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ นอร์เวย์ สเปน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมถึงสหราชอาณาจักร ในปี พ.ศ. 2564 มีผู้เสียชีวิต 2 ราย ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการบริโภคไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ นับได้ว่าเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขของทั่วโลก

Salmonella Enteritidis เป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญเนื่องจากมักก่อให้เกิดอาการของโรคในมนุษย์ที่รุนแรงกว่าสายพันธ์อื่นๆ และถูกกำหนดในราชกิจจานุเบกษาของกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการควบคุมโรค *Salmonella* สำหรับสัตว์ปีก ถ้าหากมีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis อาจจะส่งผลกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศ ผลกระทบต่อเศรษฐกิจ และชื่อเสียงของประเทศ ทำให้สูญเสียค่าจ่ายจำนวนมาก จากข้อมูลการตรวจยืนยัน 3 ปีที่ผ่านมาของห้องปฏิบัติการตรวจยืนยันเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ได้ทำการรวบรวมข้อมูลและจำนวนที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่ส่งมาตรวจยืนยัน เชื้อบริสุทธิ์ที่ตรวจพบจากผู้ป่วย อาหารและสิ่งแวดล้อม พบว่าในว่า ปี 2019 พบ *Salmonella* Enteritidis จำนวน 12 ไอโซเลต จากตัวอย่างทั้งหมด 315 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.80 ปี 2020 พบ 14 ไอโซเลต จากตัวอย่างทั้งหมด 408 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.43 และปี 2021 พบ 24 ไอโซเลต จากตัวอย่างทั้งหมด 271 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.86 พบเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่มีอัตราเพิ่มขึ้นและต้องเฝ้าระวังกันอย่างต่อเนื่องทั้งต่อด้านของการระบาด และวิธีรับมือเมื่อเกิดการระบาดขึ้นมา ประชาชนควรหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารที่สุขๆดิบๆ ล้างมือให้สะอาดก่อนรับประทานอาหาร และล้างมือออกจากห้องน้ำ ดื่มน้ำสะอาด ผู้ประกอบอาหารต้องปฏิบัติตนให้มีสุขวิทยาที่ดี รวมถึงบริษัทเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการส่งออกอาหารต่างๆ

เนื่องจาก *Salmonella* spp. เป็นเชื้อก่อโรคจึงมีการตรวจสอบการปนเปื้อน *Salmonella* ในอาหาร ทั้งวิธีการ Conventional methods และวิธีการ Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT- PCR)

วิภาวดี อ้นท้วม และคณะ (2553) ได้ทดสอบการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดประเภทผักสวนครัว ด้วยวิธีเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และแยกสายพันธุ์ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี conventional method ซึ่งใช้เวลานานถึง 4-5 วันและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการทำวิธี conventional method สำหรับการแยกสายพันธุ์ *Salmonella* spp.

Rahn (1992) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ *S*. Typhimurium ภายในยีน invA ซึ่งทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* 630 serovars และ serovars ที่นิยมเจอมากที่สุดในประเทศแคนาดา 20 serovars นำไปทดลองด้วยเทคนิค PCR ซึ่งได้ผลการทดลองว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะกับยีน invA กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 284 คู่เบส (basepair: bp) ซึ่งมองเห็นได้ในเจลอะกาโรส 2% และในทางกลับกันไม่พบความจำเพาะกับแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้น ในการตรวจหา *Salmonella* spp. โดยใช้การเพิ่มปริมาณของยีน invA เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูง โดยที่สามารถตรวจพบ *Salmonella* spp 99.4% ของที่ทดสอบ และไม่สามารถตรวจพบ DNA จากแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ซึ่งยีน invA มีลำดับพิเศษที่เฉพาะเจาะจงกับ *Salmonella* spp และสามารถนำมาใช้ในการตรวจหา *Salmonella* spp เพื่อการวินิจฉัยโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kuppuswamy and Drgon (2017) ได้ศึกษาประเมินการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT- PCR) โดยใช้ยีน invA ที่สามารถจำเพาะกับ *Salmonella* spp. สภาวะที่ใช้สำหรับการทำ RT- PCR คือ เริ่มแรก 95°c เป็นเวลา 3 นาที, 40 cycles เริ่มที่ 94 °c เป็นเวลา10 วินาที และสุดท้าย 60°c เป็นเวลา 30 วินาที โดยใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 46 นาที ได้ผลการทดลองว่า สามารถตรวจสอบความจำเพาะได้ร้อยละ 100 แต่มีข้อจำกัดสำหรับการออกแบบโพรบซึ่งมีราคาแพง

ซึ่งการตรวจ *Salmonella* spp. โดยใช้วิธี conventional method เป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้เวลานานและสิ้นเปลืองสาร จึงเลือกใช้วิธี RT- PCR เพื่อลดขั้นตอนและประหยัดเวลา

2.2 การตรวจเชื้อ *Salmonella* spp.ด้วยวิธี RealTime PCR แบบ Duplex และวิเคราะห์ผลโดย High Resolution Melting (HRM)

Heymans et al. (2018) ได้ศึกษาการพัฒนาและประเมินผลสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. พร้อมกันระหว่าง *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ในอาหารต่างๆ การตรวจหาเชื้อโรคเหล่านี้รวดเร็วช่วยให้มีประสิทธิภาพและป้องกันการกระจายผลิตภัณฑ์อาหารที่ปนเปื้อนในตลาดต่อไป โดยการกำหนดเป้าหมายยีน invA ยีน STM4200 และยีน SEN1392 เพื่อตรวจจับและแยกความแตกต่างของ *Salmonella* spp. คือ *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ตามลำดับ และนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Duplex PCR ปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการทดสอบและการหาปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ ผลการวิจัยพบว่าการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ของสายพันธุ์อ้างอิงบน Bioanalyzer แสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์เพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเดียวที่มีขนาดที่คาดหวัง แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2: ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

Gene	Forward (F)/ Reverse (R)/ Probe (P)	Primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Primer /probe concentration (nM)
invA	F	GCTGCTTTCTCTACTTAAC	95	200
	R	GTAATGGAATGACGAACAT		200
	P	FAM-CATCACCATTAGTACCAGAATCAGT-BHQ1		200
STM4200	F	CACCTGATATAGAGTCCAA	101	200
	R	TATAGATGTTGTCGCCAA		200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	P	Cy5- AAGGTATTCTTGACTGAACAATGCC- BHQ1		200
SEN1392	F	GGATATGAGGTGCGTTTA	77	200
	R	CAGTGCCGGAATTATCTC		200
	P	HEX- CACCATGACCCGCAGACG-BHQ1		200
IAC	F	GATCAGCTACGTGAGGTCCTAC	145	200
	R	CTAACCTTCGTGATGAGCAATCG		200
	P	TEXAS-RED- AGCTAGTCGATGCACTCCAGTCCTCCT		150

ที่มา: Pubmed.gov

โดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา quantitative real time polymerase chain reaction: qPCR คือ 25 µl ปรกอบด้วยสารสกัดดีเอ็นเอ 2.5 µl เงื่อนไขการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ครั้งแรกเป็นเวลา 15 นาทีที่ 95°c ตามด้วย 40 รอบเป็นเวลา 60 วินาทีที่ 94°c และขั้นตอนสุดท้ายเป็นเวลา 60 วินาทีที่ 60°c

ปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ดังนั้น จึงตรวจสอบโดยการเจือจาง 10 เท่า ผลการวิจัยพบว่าการวิเคราะห์ปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีการ qPCR อยู่ที่ประมาณ 40 CFU/100 g ในอาหารโดยใช้วิธี Duplex PCR แทน conventional method และวิธีนี้อำนวยความสะดวกรวดเร็วขึ้นเมื่อพบผลิตภัณฑ์อาหารที่ปนเปื้อนอยู่ในตลาด แต่มีข้อจำกัดในการออกแบบ Probe ซึ่งมีราคาแพง

Senachai (2013) ได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* spp. พร้อมกันในตัวอย่างหอยแครง ซึ่ง *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. เป็นสาเหตุสำคัญของโรคที่เกิดจากอาหาร จึงใช้วิธีการ PCR แบบ Duplex PCR นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบการตรวจสอบที่มีความไว (sensitivity) ของ Duplex PCR ผลการทดลองพบว่าตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตำบลขอนแก่น ประเทศไทยโดยวิธี Duplex PCR อยู่ที่ 17% แต่ไม่พบเชื้อ *Shigella* spp. ซึ่งในการทดลองการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* spp. มีความไวสูงเฉพาะเจาะจงและรวดเร็วและสามารถใช้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการประเมินความปลอดภัยของอาหาร

สำหรับการทดลองด้วยวิธี RealTime PCR แบบ Duplex PCR จำเป็นต้องมีการใช้ positive control เข้ามาเกี่ยวข้องกับการทดลองเพื่อทดสอบดูการทำงานของปฏิกิริยาว่าปกติหรือไม่

Denyingyhot et al. (2022) ได้ทดสอบการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์ฮาลาลโดยใช้ multiplex PCR ซึ่งจะนำสัตว์ที่ได้คัดเลือกเป็นสายพันธุ์เป้าหมาย เช่น ลิง (*Macaca fascicularis*), สุนัข (*Canis lupus familiaris*), หนู (*Rattus argentiventer*), หมู (*Sus scrofa*) และแมว (*Felis catus*) ถูกสกัดและทำให้ดัดแปรรูปร่างโดยใช้ DNeasy Blood & Tissue Kit นำไปทดสอบ multiplex PCR โดยใช้สภาวะการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอ คือ เริ่มต้นที่ 95°c เป็นเวลา 15 นาที; 35 รอบที่ 95°c เป็นเวลา 30 วินาที, ที่ 58 °c เป็นเวลา 30 วินาที, ที่ 72 °c เป็นเวลา 30 วินาที, และสุดท้ายที่ 72 °c เป็นเวลา 2 นาที ได้ผลการทดลองว่าความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์ฮาลาลได้ โดยใช้ multiplex PCR ซึ่งในการทดสอบนี้สามารถลดความเสี่ยงในการละเมิดศาสนา เทคนิคนี้ส่งผลลัพธ์ที่สามารถมองเห็นได้โดยใช้เวลา 15 นาที และกระบวนการทั้งหมดใช้เวลา 90 นาที นอกจากนี้ มันสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการยืนยันคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลในประเทศไทย ลดต้นทุนของเครื่องมือที่แพงและลดความจำเป็นของผู้เชี่ยวชาญ

High Resolution Melting (HRM) analysis เป็นอีกหนึ่งวิธีของการวิเคราะห์แบบ post PCR analysis ที่ค่อนข้างสำคัญ เพื่อใช้ในการระบุการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในบริเวณที่สนใจ (region of interest) โดยวิธีการนี้อาศัยการตรวจวัดความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของ Melting curve ในขั้นตอนการทำ real-time PCR

Hu et al. (2020) ได้ศึกษาการตรวจ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) Analysis ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วการศึกษานี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อ *Salmonella* spp. อย่างมีประสิทธิภาพและยังให้วิธีการตรวจจับที่รวดเร็วและสะดวกยิ่งขึ้นสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยา เชื้อ *Salmonella* 5 Serovars ได้รับจากศูนย์ควบคุมโรคเจียงซีเพื่อพัฒนาวิธี High Resolution Melting (HRM) Analysis ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Salmonella* Choleraesuis ATCC 10708, *Salmonella* Heidelberg ATCC 8326, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 และ *Salmonella* Paratyphi A ATCC 9150 ผลการวิจัยพบว่าmelt peak ของทั้ง 5 serovars จะเปลี่ยนจาก 89 °C เป็น 80.5 °C, 81.5 °C, 79.5 °C, 81.0 °C และ 82.5 °C ตามลำดับ ความไวและความจำเพาะของวิธีการ High Resolution Melting (HRM) Analysis มีมากกว่า 90% ในการตรวจ แต่ในการทดสอบนี้มีข้อจำกัดที่ melt peak มีปริมาณใกล้เคียงกันมากเกินไปอาจจะทำให้เกิด melt peak ที่อุณหภูมิใกล้เคียงกันจนทำให้การตรวจสอบยาก

Wisittipanit et al. (2020) ทดสอบอาหารที่เกิดการปนเปื้อน *Salmonella* spp. มาวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM) ในประเทศไทย โดยการทดสอบ *Salmonella* จำนวน 40 serovars รวบรวมจากบ้านฟาร์มและโรงฆ่าสัตว์ในภาคเหนือของประเทศไทย ผลการวิจัยพบ *Salmonella* ที่แตกต่างกันหกชนิดส่วนใหญ่เป็น *S*. Weltevraden และเป็น *S*. Weltevreden DTW4-M1 เป็นส่วนใหญ่ จากความรู้เกี่ยวกับแหล่งที่มาของชนิดย่อยของเชื้อ *Salmonella* การแพร่เชื้อ *S*. Weltevraden ในภาคเหนือของประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะเป็นฟาร์มไม่ผ่านสุขอนามัยอาจมีการปนเปื้อนของอุจจาระไก่ภายในฟาร์มเป็นจำนวนมาก โดยสรุปการวิเคราะห์ High Resolution Melting (HRM) มีความรวดเร็วและจำเพาะ (specificity) ในการศึกษาสามารถทำได้ในสภาพแวดล้อมในท้องถิ่นทำให้สามารถควบคุมและมาตรการป้องกันได้อย่างรวดเร็วเพื่อต่อต้านการแพร่ระบาดของเชื้อ Salmonellosis ที่อาจเกิดขึ้น

Srisutham et al. (2023) ศึกษาการระบุ *Plasmodium* spp. 5 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี hexaplex PCR วิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM) โดยออกแบบไพรเมอร์ 5 สายพันธุ์สำหรับสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

มาลาเรียของมนุษย์โดยกำหนดเป้าหมายไปที่ Plasmodium 18 small subunit ribosomal RNA (18S rRNA) และยีนไมโทคอนเดรีย hexaplex PCR-HRM และใช้สภาวะปริมาณรวม 25 µl, ประกอบด้วย 0.64× Hot Start PCR Master mix, 1.25× Midori dye สีสำหรับการตรวจพบ DNA ในการวิเคราะห์ HRM, 115 nM ของแต่ละคู่ของโพรเมอร์ที่เฉพาะต่อ *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* หรือ *P. knowlesi*, 70 nM ของคู่ของโพรเมอร์ที่เฉพาะต่อ *P. falciparum*, 270 nM ของโพรเมอร์ที่เฉพาะต่อสายพันธุ์ Plasmodium, 70 nM ของคู่ของโพรเมอร์ที่เฉพาะต่อควบคุมภายใน, 20 nM ของโพรเมอร์, 3 µl ของเทมเพลต DNA สำหรับ *Plasmodium* spp. ดำเนินการโดยใช้สภาวะเริ่มที่ 95°c เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น สภาวะในรอบ 37 รอบที่ 95°c เป็นเวลา 30 วินาที, 57°c เป็นเวลา 45 วินาที, 72°c เป็นเวลา 30 วินาที, จากนั้น มีรอบ 13 รอบที่ 95°c เป็นเวลา 30 วินาที, 65°c เป็นเวลา 45 วินาที, 72°c เป็นเวลา 30 วินาที, และมีขั้นตอนสุดท้ายที่ 72°c เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิ HRM ถูกเพิ่มขึ้นจาก 75°c ไปยัง 95°c ผลการทดลองสำหรับการพัฒนาการตรวจจับและแยกความแตกต่างของ *Plasmodium* spp. ของมนุษย์ห้าคนพร้อมกันและรวดเร็ว ขีดจำกัด ของการตรวจจับ (Limit Of Detection) 2.354 -3.316 copies/uL โดยมีความไว 91.76% และความจำเพาะ 98.04%

ดังนั้น จึงเลือกใช้ High Resolution Melting (HRM) Analysis สำหรับการวิเคราะห์งานวิจัยนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือ

1. Autoclave (TOMY FLS-1000, Japan)
2. Automatic pipette (Gilson, France)
3. Biological safety cabinet class II (NuAire, USA)
4. Centrifuge 5418 (Eppendorf, Germany)
5. Centrifuge Tube 15 ml (Nest Biotechnology, China)
6. Dry Bath Incubator (Boekel Scientific, USA)
7. Filter Tips sterile (Merck SA, Germany)
8. Heater (Heidolph, Germany)
9. Incubator (Memmert, Germany)
10. Inoculation Loops (Biologix Group Limited, China)
11. Laboratory Bottle (Duran, Germany)
12. Laboratory Film (Bemis Amcor, USA)
13. Micro Centrifuge (Senova, China)
14. Micro Tube 1.5 ml (Eppendorf, Germany)
15. Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Singapore)
16. PCR Tube 0.2 ml (Bio-Rad Laboratories Ltd., Thailand)
17. Petri dishes ขนาด 90x15 ml (Nest Biotechnology, China)
18. Pipette Controller (Integra Bioscience AG, Switzerland)
19. Precision Balance 2 digits (Mettler toledo, Switzerland)
20. Quantitative Real-Time PCR รุ่น Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories Ltd., Thailand)
21. Refrigerator 4 degree (Panasonic, Thailand)
22. Safety cabinet (Augustin, Thailand)
23. Serological Pipette 10 ml (Nest Biotechnology, China)
24. Shaking incubator (Eppendorf, Germany)
25. Spatula

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือจำหน่าย เว้นแต่จะได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26. Vortex (Scientific Industries, USA)

สารเคมี

1. Agar Bacteriological (Oxoid, UK)
2. Clorox (The Clorox Company, California)
3. Distilled Water
4. Ethanol ความเข้มข้น 95% และ 70%
5. Hot Start PCR Master Mix (Talenome DNA Professional, Thailand)
6. HRM Dry (Talenome DNA Professional, Thailand)
7. LB Broth Miller (Merck SA, Germany)
8. Milli Q Water
9. Primers Positive Control Forward ลำดับ sequence “TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTACGTGCGGCGCCCATTAATAATTGGTGCCCCG” (Talenome DNA Professional, Thailand) (Anat Denyingyhot et al., 2022)
10. Primers Positive Control Reverse ลำดับ sequence “CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTCGTGCGGCGGCTGAAGCTAGGAGTAGTAAAAAG” (Talenome DNA Professional, Thailand) (Anat Denyingyhot et al., 2022)
11. Primers Salmonella Forward ลำดับ sequence “CGATAACAGCATCGTATTGTTG” (Talenome DNA Professional, Thailand) (Kasturi and Drgon, 2017)
12. Primers Salmonella Reverse ลำดับ sequence “AATTTACCACTCGCATCAAATC” (Talenome DNA Professional, Thailand) (Kasturi and Drgon, 2017)
13. Positive Template ลำดับ sequence “TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAcgtgcggcgCCCATTAATAATTGGTGCCCCGGACATAGCCTTCCCCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTTCCCCCTTCCTTTTTACTACTCCTAGCTTCAGCcgccgcacgAACGGGCGATCGTGCTTACAATCG” (Talenome DNA Professional, Thailand) (Anat Denyingyhot et al., 2022).
14. TE buffer (Talenome DNA Professional, Thailand)
15. QuickExtract™ Lucigen (Talenome DNA Professional, Thailand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 แบคทีเรียที่ใช้สำหรับการทดลอง

Salmonella สายพันธุ์ *enterica* จำนวน 58 serovars ดังแสดงในตารางที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ -80°c

ตารางที่ 3.1: *Salmonella* สายพันธุ์ *enterica* จำนวน 58 serovars

ลำดับ	ชื่อ	ลำดับ	ชื่อ
1	*Salmonella* Typhimurium	30	*Salmonella* Stanley
2	*Salmonella* Agona	31	*Salmonella* Virchow
3	*Salmonella* Chester	32	*Salmonella* Infantis
4	*Salmonella* Derby	33	*Salmonella* Augustenborg
5	*Salmonella* Heidelberg	34	*Salmonella* Bareilly
6	*Salmonella* Paratyphi B Var.Java	35	*Salmonella* Braenderup
7	*Salmonella* serovars Saintpaul	36	*Salmonella* serovars Livingstone
8	*Salmonella* serovars Schwarzengrund	37	*Salmonella* serovars Mbandaka
9	*Salmonella* Montevideo	38	*Salmonella* Javiana
10	*Salmonella* Oslo	39	*Salmonella* Fresno
11	*Salmonella* Rissen	40	*Salmonella* Amsterdam
12	*Salmonella* Singapore	41	*Salmonella* Anatum
13	*Salmonella* Tennessee	42	*Salmonella* Falkensee
14	*Salmonella* Thompson	43	*Salmonella* Give
15	*Salmonella* Bovismorbificans	44	*Salmonella* Lexington
16	*Salmonella* Newport	45	*Salmonella* Orion
17	*Salmonella* Hadar	46	*Salmonella* Weltervreden
18	*Salmonella* Albany	47	*Salmonella* Krefeld
19	*Salmonella* Altona	48	*Salmonella* Senftenberg
20	*Salmonella* Brunei	49	*Salmonella* Aberdeen
21	*Salmonella* Corvallis	50	*Salmonella* Cubana
22	*Salmonella* Emek	51	*Salmonella* Cubana
23	*Salmonella* Kentucky	52	*Salmonella* Idikan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

24	*Salmonella* Manhattan	53	*Salmonella* Kedougou
25	*Salmonella* Molade	54	*Salmonella* Poona
26	*Salmonella* Muenchen	55	*Salmonella* Worthington
27	*Salmonella* Enteritidis	56	*Salmonella* Hvittingfoss
28	*Salmonella* Panama	57	*Salmonella* Yoruba
29	*Salmonella* Eastbourne	58	*Salmonella* Bangkok

3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือ Luria-Bertani Broth (LB Broth) + 1.5 % Agar ซึ่งเราจะใช้อาหาร Luria-Bertani Broth (LB Broth) 25 กรัม, Agar 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ลงในขวด Duran ผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนจากเครื่อง Hot Plate และแม่เหล็กช่วยผสม เพื่อให้ Agar ละลายได้เร็วยิ่งขึ้น เมื่อละลายหมดแล้วให้นำแม่เหล็กออก ปิดจุกสำลี ห่อด้วยฟอยล์ สำหรับเตรียมนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°c เป็นระยะเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ พักให้อุ่นเพื่อเตรียมเทลง Plate เมื่ออุ่นแล้วเทลง plate ประมาณ 20 มิลลิลิตร ตาก plate ให้แข็งตัวและแห้งเพื่อสำหรับการใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บไว้อุณหภูมิ -80°c มาเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการ Streak Plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°c เป็นระยะเวลา 21±3 ชั่วโมง เชื้อจะแยกเป็น Single Colony จากนั้น นำลงเพาะเลี้ยงต่อใน Luria-Bertani Broth (LB Broth) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 ml ลงหลอดขนาด 15 ml ใช้ loop เขี่ย Single Colony จุ่มลงใน Luria-Bertani Broth (LB Broth) จากนั้นนำเข้าเครื่อง incubator แบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°c แบบ overnight เมื่อครบเวลาตรวจผล และเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °c เพื่อไว้ใช้สำหรับการทดสอบต่อไป

3.5 การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Salmonella*

เชื้อที่ได้รับการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง นำมาสกัดด้วยวิธีอย่างง่ายและสกัดด้วยชุด QIA EXTRACTION KIT โดยไปเปตเชื้อใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เทส่วน Supernatant ทิ้ง จากนั้นใส่สารสกัด QuickExtract™ Lucigen ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มด้วยเครื่อง Dry Bath Incubator ที่อุณหภูมิ 65°c เป็นระยะเวลา 10 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 98°c เป็นระยะเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเก็บเข้าตู้ 4°c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การตรวจวัดปริมาณ DNA และการคำนวณ CFU/ml

เมื่อสกัด DNA เสร็จเรียบร้อยแล้ว นำเชื้อที่สกัดมาวัดปริมาณของ DNA ด้วยเครื่องนาโนดรอป เพื่อดูความเข้มข้นของปริมาณ DNA ว่ามีมากน้อยแค่ไหน หรือจะทดสอบด้วยวิธีการคำนวณ Colony Forming Unit (CFU) นำเชื้อที่เลี้ยงแบบ overnight มา spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°c เป็นระยะเวลา 21±3 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการนับโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี นอกจากจะนับปริมาณเชื้อได้แล้วยังสามารถนำมาคำนวณหาปริมาณเชื้อตั้งต้นว่ามีปริมาณเชื้อเท่าไหร่ได้อีกด้วย โดยการใช้สูตร

$$CFU/ml = \frac{X}{Y} \times Z$$

X = จำนวนโคโลนีที่เรานับได้ (25-250 โคโลนี)

Y = ปริมาตรเชื้อที่เราใช้

Z = ระดับความเจือจางที่สามารถนับโคโลนีได้

3.7 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี Quantitative Realtime PCR และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM)

คำนวณตัวอย่างเพื่อเตรียม Master mix ได้อย่างถูกต้อง ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม มีดังนี้

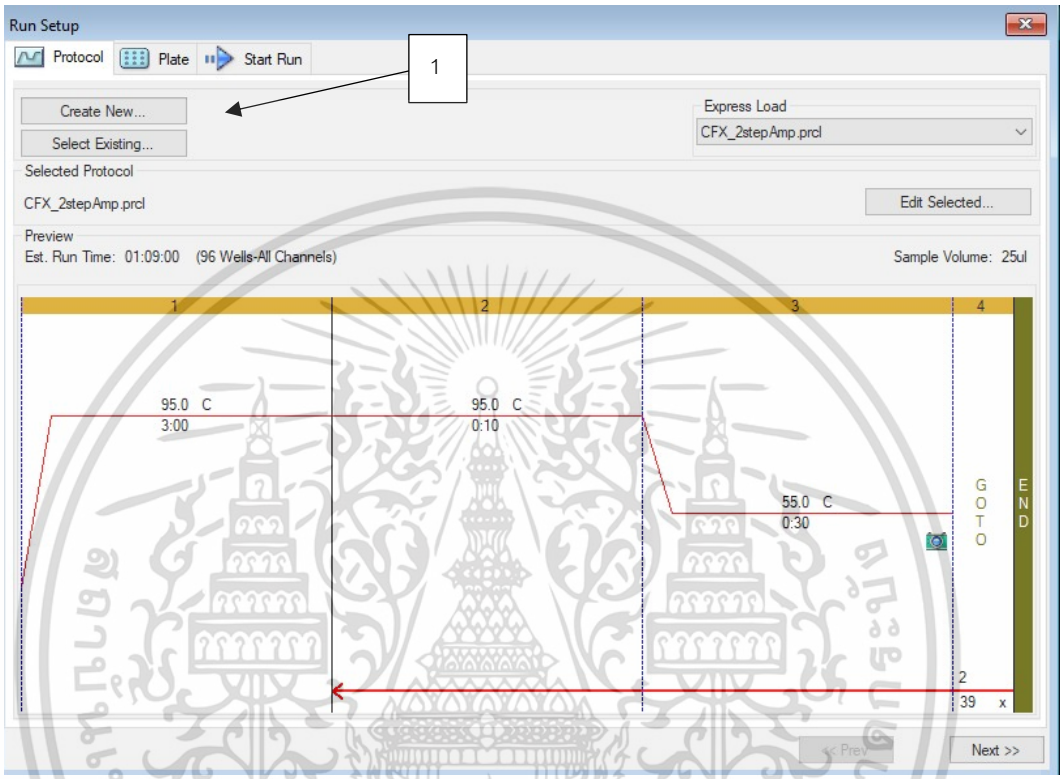
ตารางที่ 3.2: แสดงส่วนประกอบการเตรียม Master mix สำหรับ 1 ตัวอย่าง

Reagent	1X (µl)
Mx Hot Strat PCR mix	3
10 µM Forward	0.25
10 µM Reverse	0.25
HRM Dye	1
MilliQ water	15.5
DNA	5
Total	**25**

เมื่อเตรียมส่วนประกอบของ Master mix เรียบร้อยแล้ว ผสมให้เข้ากัน และนำใส่ PCR Tube 0.2 ml ปริมาตร 20 µl จากนั้นใส่ DNA ปริมาตร 5 µl ในหลอดตัวอย่าง และใส่ MillQ water

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณี...

5 µl แทนดีเอ็นเอ อีก 1 หลอด เพื่อใช้เป็นตัวทดสอบการทำงานของปฏิกิริยา จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Quantitative Real-Time PCR รุ่น Bio-Rad CFX Maestro ก่อนนำเข้าเครื่องควร short spin เพื่อให้สารละลายไม่ติดขอบ เปิดเครื่องและตั้งค่าเครื่องสำหรับ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงดังรูป 3.1



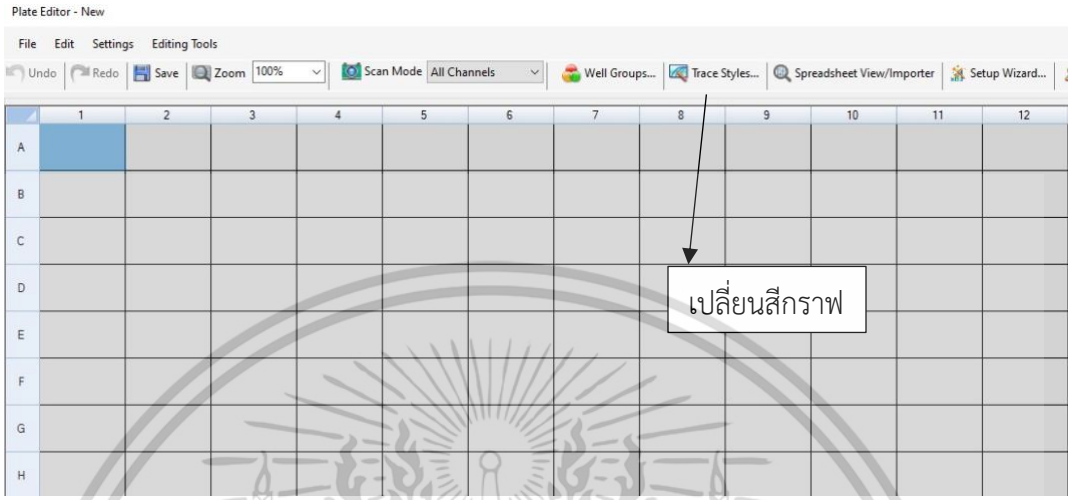
รูปที่ 3.1: แสดงการตั้งค่าเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ กด (หมายเลข 1) เพื่อตั้งค่าสภาวะ (แสดงดังตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3: แสดงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

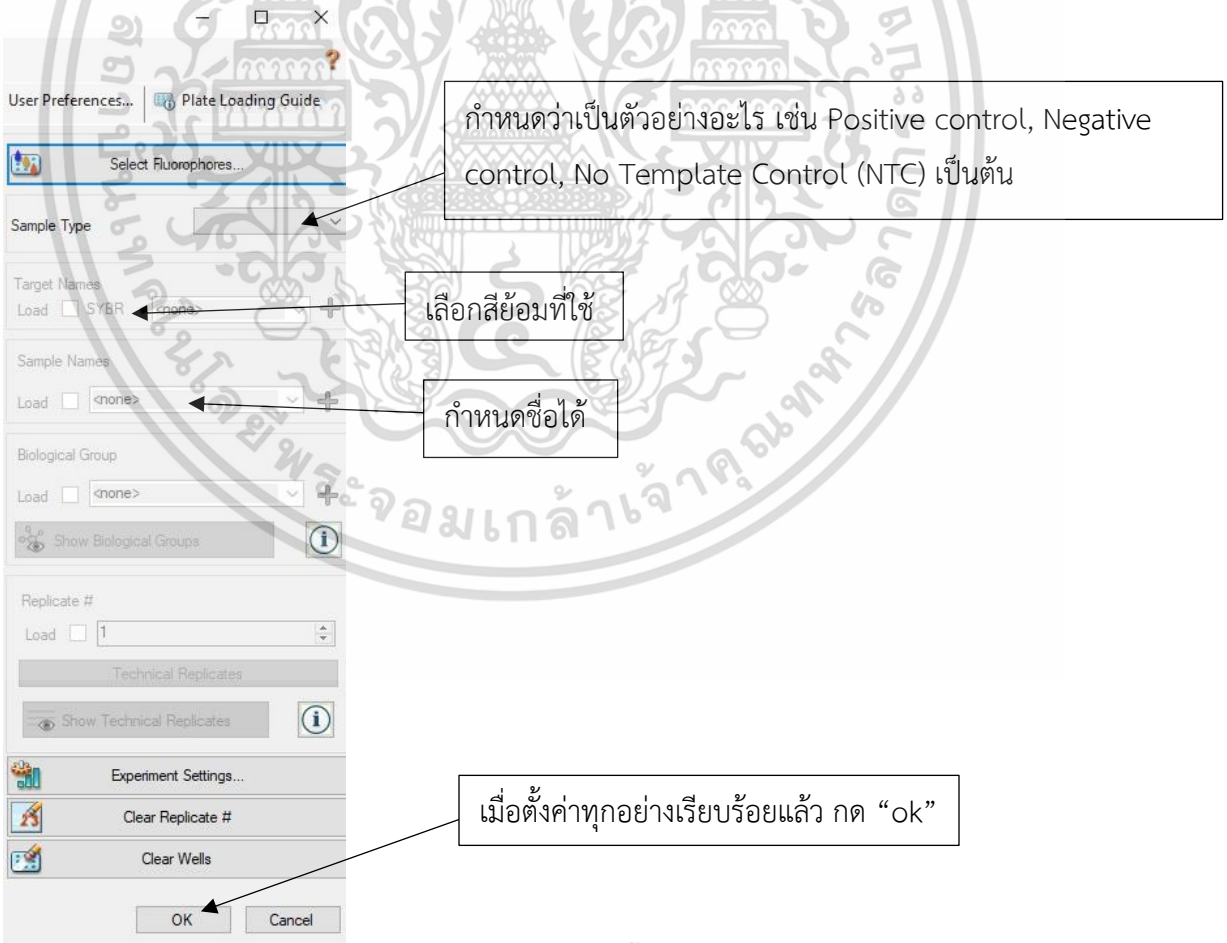
Process	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°c	5 min	1 cycle
Denaturation	95°c	30 sec	30 cycle
Annealing	55°c	30 sec	
Extension	72°c	30 sec	
Final extension	72°c	1 min	1 cycle
HRM	70-85°c		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อตั้งค่าสภาวะ เสร็จเรียบร้อย นำเชื้อใส่เครื่อง Bio-Rad CFX Maestro ขั้นตอนต่อไปเลือกแถวที่เราต้องการให้เครื่องตรวจสอบ แสดงดังรูป 3.2 สามารถกำหนดชื่อ กำหนดตัวอย่าง และสีย้อมที่ใช้ แสดงดังรูป 3.3



รูปที่ 3.2: เลือกแถวที่ต้องการให้เครื่องตรวจสอบ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.3: แสดงการกำหนดชื่อ กำหนดตัวอย่าง และสีย้อมที่ใช้สำหรับการ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอนสุดท้ายกด Start Run เพื่อให้เครื่อง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ก่อนเครื่องจะ Run ต้องรอให้ lid ถึง 105°c ป้องกันเครื่อง error ระหว่างเตรียมจะ Run ซึ่ง lid จะเป็นตัวที่สำคัญสำหรับการกดฝาหลอดเพื่อไม่ให้มีแรงดันทำให้ฝาเปิดออก และป้องกันการเกิดไอน้ำบริเวณฝาหลอด รอเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ให้เสร็จใช้ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 35 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองโดยตรวจหา Melting temperature (Tm) ของเชื้อ *Salmonella.*

3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อ *Salmonella*

3.8.1 การปรับความจำเพาะของ Primers

นำเชื้อที่สกัดมาวิเคราะห์เพื่อดูความจำเพาะ (specificity) ของ Primer โดยการปรับสภาวะตามความเหมาะสม เพื่อให้ peak มีความชัดเจนสำหรับการตรวจสอบและจำเพาะมากที่สุด เช่น การปรับอุณหภูมิ annealing, cycle ของ PCR, และ อุณหภูมิ HRM เพื่อให้ peak มีความสวยงามมากขึ้น เป็นต้น

3.8.2 การทดสอบความจำเพาะของ Primers

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว นำไปทดสอบกับตัวอย่างเป็นจำนวน 67 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อ *Salmonella enterica* เป็นจำนวน 58 Serovars และ แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหาร (Out groups) 4 ตัวอย่าง ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, Aeromonas hydrophila* และ *Listeria* spp. เป็นจำนวน 6 สายพันธุ์ เช่น *Listeria monocyogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Liateria ivanovii* และ *Listeria grayi* เป็นต้น

3.8.3 การปรับสภาวะของ Positive control โดยวิธี Duplex PCR

3.8.3.1 การทดสอบโดยใช้ Positive control

การใช้ Positive control เพื่อเปรียบเทียบดูปฏิกิริยาของ peak แต่ละ peak มีปัญหาหรือไม่ ทำให้แน่ใจว่า peak ที่แสดงขึ้นมาเป็นเชื้อที่เราสนใจ โดย Positive control ที่เราใช้ต้องมีการใส่ Template positive control ให้จำเพาะกับ Primers positive control สำหรับการทำปฏิกิริยา จากนั้นทำการปรับสภาวะ เมื่อใส่ positive template และไพรเมอร์ ของ positive template เพื่อใช้เป็น internal reaction control โดยวิธี Duplex PCR โดยให้ Melting peak ที่เกิดขึ้นทั้ง 2 peak อยู่คนละอุณหภูมิ เนื่องจากต้องเปรียบเทียบกันว่าปฏิกิริยาของ peak ในปฏิกิริยาเดียวกันเกิดปัญหาหรือไม่ และ peak มีความชัดเจนให้เหมาะสมกับการตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี Duplex PCR

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ Duplex PCR แล้ว ทดสอบกับ *Salmonella* 3 serovars คือ *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Hadar และ *Salmonella* Enteritidis เพื่อดูความจำเพาะกับเชื้อที่เราต้องการ ขั้นตอนแรกเตรียม Master mix สำหรับการทดลอง Duplex PCR ส่วนประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และตั้งค่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังแสดงในตาราง 3.5 ดังนี้

ตารางที่ 3.4: แสดงส่วนประกอบ Master mix สำหรับการทดลอง Duplex PCR

Reagent	1X (µl)
Mx Hot Start PCR mix	5
10 µM Forward	0.5
10 µM Reverse	0.5
10 µM PCR positive Forward	0.25
10 µM PCR positive Reverse	0.25
Positive template (10^5 copy)	1
HRM Dye	1
MilliQ water	11.5
DNA	5
Total	**25**

ตารางที่ 3.5: สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Denyingyhot et al., 2022)

Process	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°c	5 min	1 cycle
Denaturation	95°c	30 sec	45 cycle
Annealing	55°c	30 sec	
Extension	72°c	30 sec	
Final extension	72°c	1 min	1 cycle
HRM	70-95°c		

เมื่อตั้งค่าสภาวะเสร็จแล้ว ทำการ Run เครื่องเช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะ (specificity) การตรวจผลโดยสังเกต Melt peak ตำแหน่ง peak ที่ขึ้นสูงสุด, มี Out groups ตัวอื่นสามารถตรวจสอบได้ตำแหน่งเดียวกับเชื้อที่เราสนใจหรือไม่ และ กราฟของ Positive control ทำปฏิกิริยาปกติ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การทดสอบปริมาณความหนาแน่นของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Limit of Detection)

นำเชื้อที่สกัดมาทำ dilution 10^1 เท่า จนถึง 10^7 เท่า แล้วใช้ความเจือจางที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 และ 10^5 เท่า โดยนำเชื้อเพียง 3 serovars มาทำการทดสอบ คือ *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Hadar และ *Salmonella* Enteritidis เพื่อทดสอบว่าสามารถตรวจสอบความหนาแน่นของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้เท่าไหร่ โดยทดสอบ serovars ละ 3 ซ้ำ เนื่องจากปริมาณเชื้อมีน้อยมากอาจคลาดเคลื่อนจากการไปเปตได้

3.11 การประเมินการตรวจผล (Validation)

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM) และสามารถหาความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Limit of direction) แล้วนำไปทดสอบแบบ Bilnd test โดยสุ่มตัวอย่าง 60 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน *Salmonella* spp. หรือไม่มีการปนเปื้อน เพื่อสังเกตผลการตรวจสอบว่าสามารถตรวจสอบได้ถูกต้องและจำเพาะ (specificity) หรือไม่ โดยใช้วิธี Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ High Resolution Melting (HRM) และคำนวณความถูกต้องด้วยวิธี 2×2 table เปรียบเทียบกับ Gold Standard (ISO 6579-1: 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

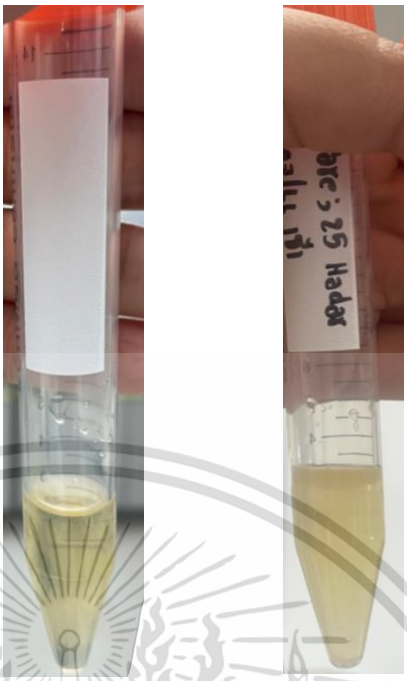
4.1 การเพาะเชื้อ *Salmonella* สำหรับการนำไปทดสอบ specificity และ sensitivity

การเพาะเลี้ยง *Salmonella enterica* 58 Serovars ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB Agar) โดยทำการ Streak เชื้อลงบนอาหารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะของโคโลนีเดี่ยวมีสีขาวขุ่น เงาวาว กลมนูน ผิวเรียบ สามารถสังเกตได้ง่าย ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

รูปที่ 4.1: แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S.* Hadar เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ที่อุณหภูมิ 37°c เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อเพาะเชื้อบนอาหาร LB Agar ครบทั้ง 58 Serovars แล้ว นำโคโลนีเดี่ยวของ *Salmonella* เพิ่มจำนวนโดยการนำไปเลี้ยงต่อใน Luria-Bertani Broth (LB Broth) และเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Incubator ที่อุณหภูมิ 37°c แบบ overnight พบว่าสีของอาหารมีความขุ่นขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.2B เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีการใส่เชื้อและอาหารเป็นสีเหลืองอ่อนใส ดังแสดงในรูปที่ 4.2A เนื่องจากมีการเจริญของเชื้อเพิ่มมากขึ้น จึงนำไปใช้ในขั้นตอนการสกัดเชื้อต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A) (B)

รูปที่ 4.2: แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.* Hadar ในอาหาร Luria-Bertani Broth (LB Broth) เขย่าด้วยเครื่อง Shaking Incubator ที่อุณหภูมิ 37°c แบบovernight B) และเปรียบเทียบกับอาหาร LB Broth เมื่อไม่ใส่เชื้อ (A)

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Luria-Bertani Broth (LB Broth) เขย่าด้วยเครื่อง Shaking Incubator ที่อุณหภูมิ 37°c แบบovernight ครบทั้ง 58 Serovars จึงนำไปสกัด DNA โดยใช้การสกัดแบบรวดเร็วจากสารสกัด QuickExtract™ Lucigen และนำไปทดสอบ specificity และ sensitivity โดยใช้เทคนิค Realtime PCR แบบ Duplex PCR ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ผลแบบ HRM ก่อนการทดสอบจำเป็นต้องมีการปรับสภาวะต่างๆ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่เหมาะสมมากที่สุด ซึ่งการปรับสภาวะต่างๆ ดังนี้

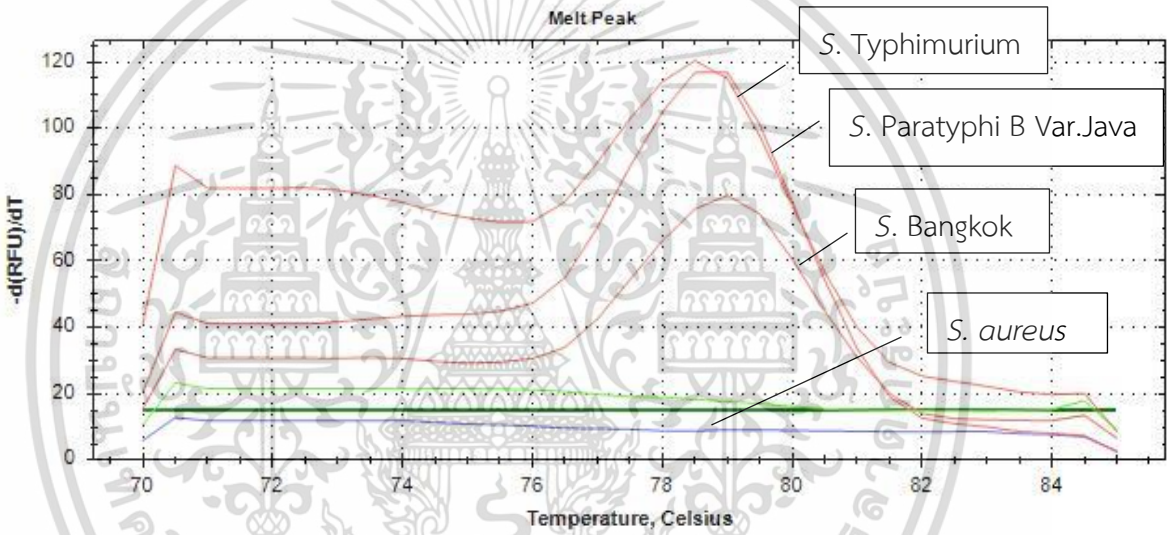
4.2 Optimized Specificity

4.2.1 ทดสอบ *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Paratyphi B Var.Java และ *Salmonella* Bangkok ร่วมทดสอบกับ *Staphylococcus aureus*

โดยใช้ สภาวะ คือ Hot Start PCR 0.24X, 10 µM Forward 200nM, 10 µM Reverse 200nM, HRM Dye 1 µl และ MilliQ water 15 µl ใช้ อุณหภูมิ annealing 60°c เป็นจำนวน 30 รอบ HRM อยู่ระหว่าง 70 – 85 °c (Kuppuswamy and Drgon, 2017) จากผลการทดลองการ

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบ Optimized Primer specificity ทดสอบ 3 Serovars คือ *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Paratyphi B Var.Java และ *Salmonella* Bangkok โดยใช้สภาวะข้างต้น ได้ผลการทดลองดังนี้ *Salmonella* ทั้ง 3 serovars สามารถตรวจสอบได้ Peak อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 77.50 - 78.50 ส่วน *Staphylococcus aureus* และ No template control ไม่พบ peak ที่ตำแหน่งเดียวกับ *Salmonella* spp. ทั้งสาม serovars อย่างไรก็ตามบริเวณที่อุณหภูมิ ระหว่าง 70 ถึง 77 องศา พบว่ามีค่า fluorescence ค่อนข้างสูง ที่อาจรบกวนการอ่านผลของเชื้อ *Salmonella* spp. จึงต้องทำการ optimized ต่อไป สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HRM จะทำการตั้งค่าเครื่องไว้ระหว่าง 70 – 85 °c เพราะ peak ของ *Salmonella* spp. อยู่ในช่วง 77±1.5 จะทำให้ peak สวยงามและเป็นระเบียบมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.3



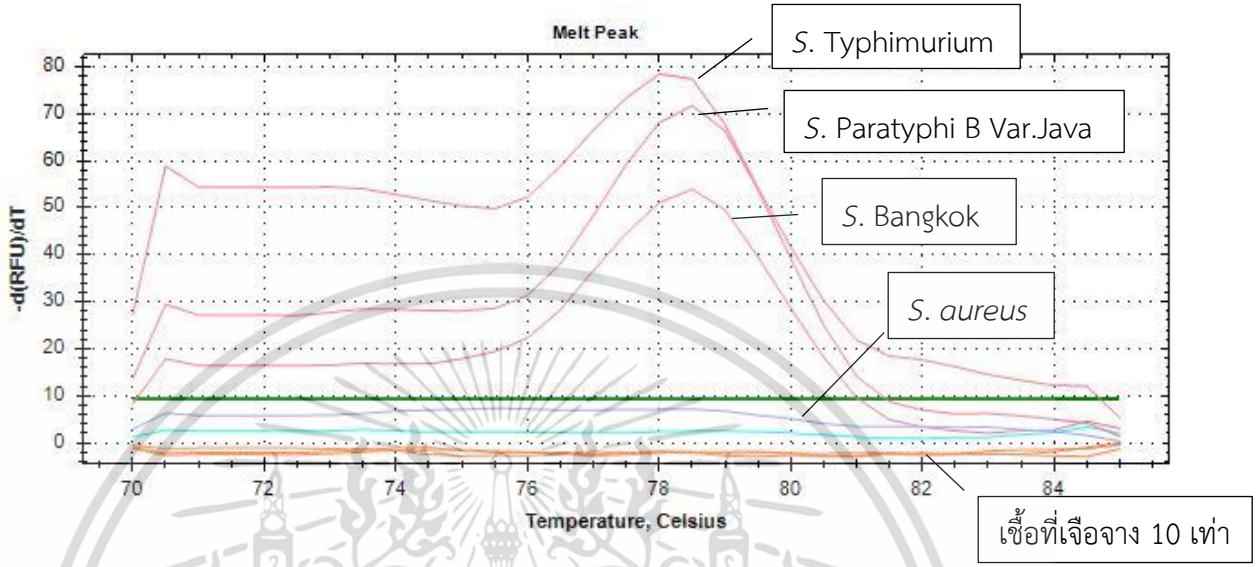
รูปที่ 4.3: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, *S.* Paratyphi B Var.Java, *S.* Bangkok และ *Staphylococcus aureus*

4.2.2 ครั้งที่ 2 ทดสอบ ซ้ำอีกรอบโดยลดปริมาณเชื้อที่นำมาทดสอบ และลดปริมาณไพรเมอร์

จากผลการทดลองข้างต้น อาจเกิดขึ้นจากปริมาณของไพรเมอร์มากเกินไปจึงทำการลดปริมาณลงครึ่งหนึ่ง โดยลดลงจาก 10 µM Forward 200nM, 10 µM Reverse 200nM เป็น 10 µM Forward 100nM, 10 µM Reverse 100nM โดยทดสอบเชื้อ 3 serovars คือ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, *S.* Paratyphi B Var.Java และ *S.* Bangkok ที่เจือจาง 10 เท่า แล้วนำมาตรวจสอบ พบว่า *Salmonella* ทั้ง 3 serovars สามารถตรวจสอบได้ที่ peak อยู่ในช่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

78 - 78.50 และ เชื้อที่นำมาเจือจาง 10 เท่า ไม่พบ peak ที่จำเพาะ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณเชื้อน้อย หรือขั้นตอนการสกัดได้ทิ้งส่วนเชื้อไปมากจึงทำให้ไม่สามารถแสดง peak ได้ และ เมื่อลดปริมาณของ primer ลง ผลไม่แตกต่างจากเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.4

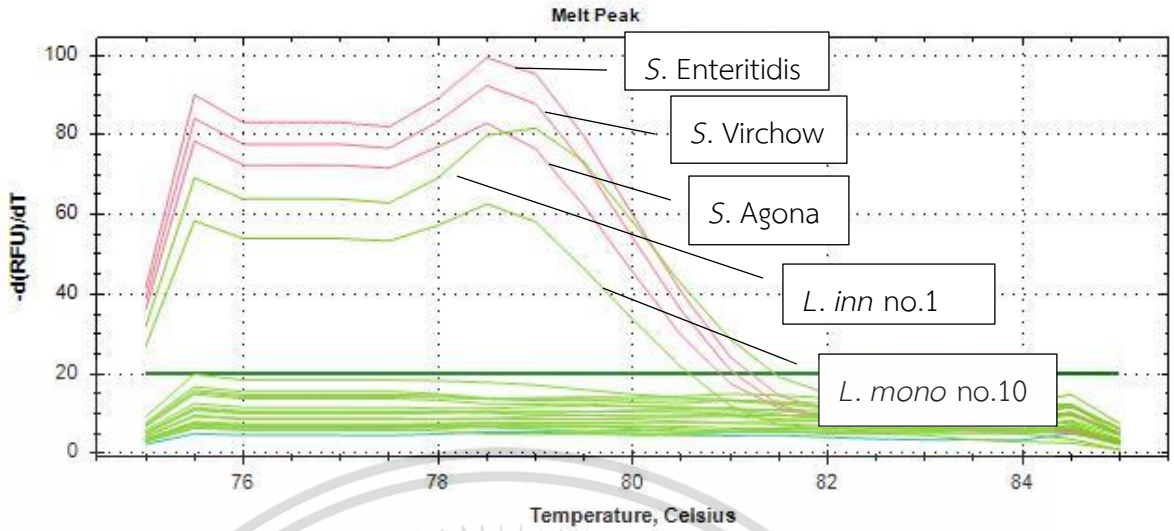


รูปที่ 4.4: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, *S.* Paratyphi B Var.Java, *S.* Bangkok และ *Staphylococcus aureus* เมื่อลดปริมาตร primer specificity 1 ลำดับ

4.2.3 ครั้งที่ 3 ทำการทดสอบ กับเชื้อชนิดอื่นเพื่อหาความจำเพาะของการตรวจ (specificity test)

การทดลองตรวจสอบ *Listeria* spp. จำนวน 20 ตัวอย่าง และ *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, *S.* Virchow, *S.* Agona โดยใช้สภาวะจากการทดลองครั้งที่ 2 พบว่า *Salmonella* ทั้ง 3 serovars สามารถตรวจสอบได้ ช่วง peak 77-78.5 ส่วน *Listeria* spp. ไม่พบ peak ที่จำเพาะของ *Salmonella* แสดงว่า primer มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* สูง อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบเชื้อ Listeria 2 species ได้แก่ *Listeria innocua* no.1 และ *Listeria monocyogenes* no.10 ที่สามารถตรวจพบ peak ที่ตำแหน่งเดียวกับ peak ของ *Salmonella* ซึ่งอาจจะเกิดจากการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในขั้นตอนการสกัดหรือไม่ หรือ สภาวะ ยังไม่เหมาะสม และ peak แสดงไม่ชัดเจน จึงทำการ optimized อุณหภูมิ annealing ในการทดลองต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

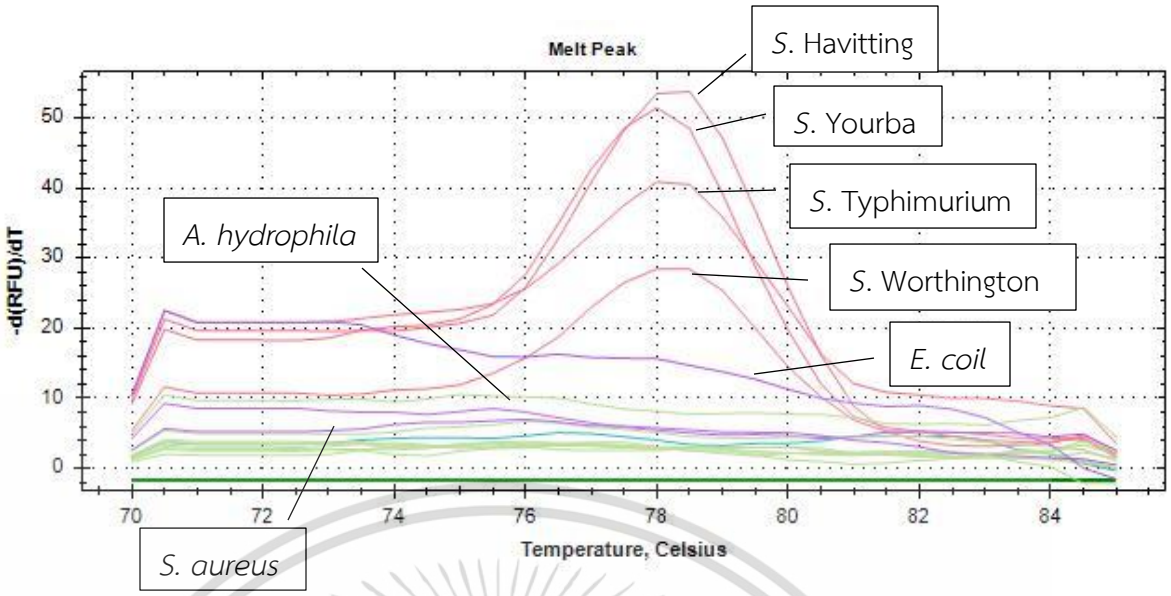


รูปที่ 4.5: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, *S.* Virchow, *S.* Agona และ *Listeria* spp.

4.2.4 ครั้งที่ 4 ลดอุณหภูมิ annealing เป็น 55°c, สกัด *Listeria monocyogenes* no.10 จากโคโลนี และนำ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* มาทดสอบ

โดยอ้างอิงสภาวะ การทดลองครั้งที่ 2 โดยลดอุณหภูมิ annealing เป็น 55°c นำ *Listeria monocyogenes* no.10 สกัดจากโคโลนี และนำ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* มาตรวจสอบ ได้ผลการทดลองดังนี้ *Salmonella enterica* serovars Hvitting, *S.* Yoruba, *S.* Typhimurium และ *S.* Worthington สามารถตรวจสอบ melt peak ได้ ในส่วนของ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* ไม่พบ melt peak นอกจากนี้ *Listeria monocyogenes* no.10 ที่สกัดจากโคโลนีใหม่ ไม่พบ melt peak ใดๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ดังนั้น การพบ melt peak ในการทดลองเดิม น่าจะเกิดจากการปนเปื้อนจากหลอดที่สกัดครั้งก่อน นอกจากนี้ การลด annealing temperature เป็น 55°c พบว่าภาพรวมของสภาวะนี้ peak ขึ้นชัดเจนมากขึ้นเนื่องจากการค่า fluorescence ลดลง ดังนั้นเราจึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการ specificity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Havitting, *S*. Yourba, *S*. Typhimurium, *S*. Worthington และ Out groups อื่น

ดังนั้นสภาวะที่เลือกใช้สำหรับการทดสอบ specificity คือ Hot Start PCR 0.24X, 10 µM Forward 100nM, 10 µM Reverse 100nM, HRM Dry 1 µl, MilliQ water 15.5 µl และใช้อุณหภูมิ annealing 55°c เป็นจำนวน 30 รอบ

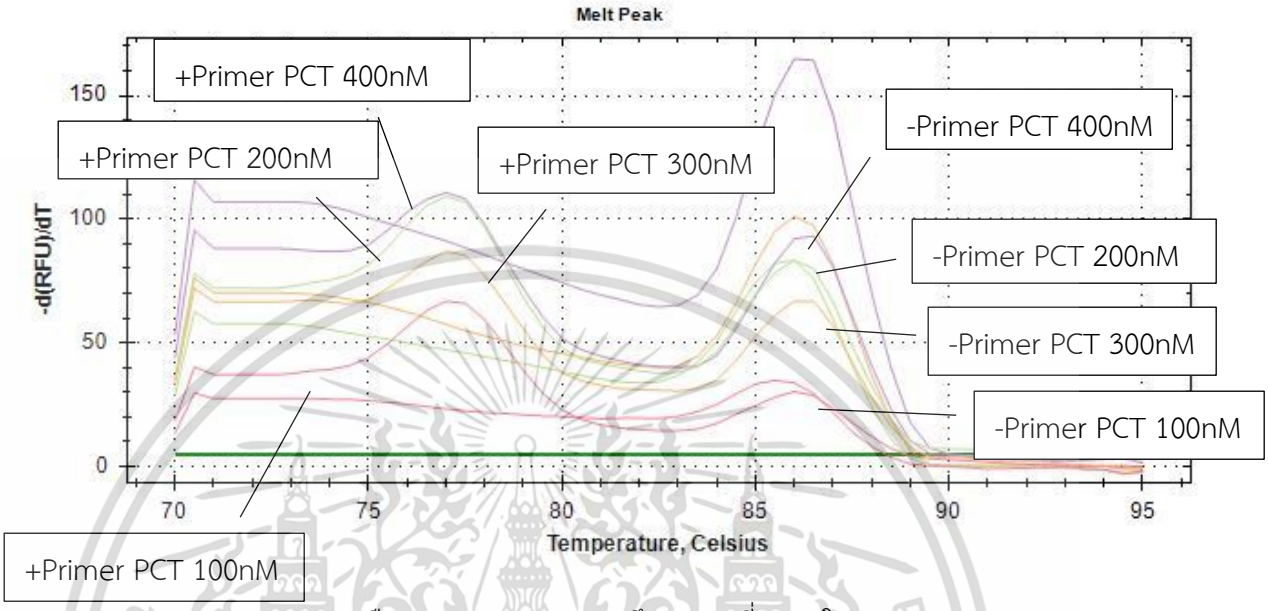
4.3 Optimized Duplex PCR การปรับสภาวะให้เหมาะสมเมื่อมีการใช้ positive reaction control โดยวิธีการ Duplex PCR และวิเคราะห์แบบ HRM

4.3.1 การปรับปริมาตร ของ primer positive control เป็น 100nM, 200nM, 300nM และ 400nM เพื่อดูความแตกต่างของ peak แต่ละลำดับ

โดยอ้างอิง สภาวะ จากการทดลองข้างต้น โดยปรับ primer positive control เป็น 100nM, 200nM, 300nM และ 400nM เพื่อดูความแตกต่างของ peak แต่ละลำดับ serovars ที่เรานำมาทดสอบ คือ *Salmonella* Typhimurium ได้ผลการทดลอง ดังนี้ *Salmonella* Typhimurium สามารถแสดง peak ที่ตำแหน่ง 77°c ผลของการปรับแต่ง primer positive control 100nM, 200nM, 300nM และ 400nM ได้ความสูงของ peak ที่ไล่ลำดับกันหมายความว่าเมื่อเราใส่ primer positive control ในปริมาตรที่น้อย จะทำให้ peak ขึ้นไม่สูงมาก ในทางกลับกัน เมื่อเราใส่ primer positive control ในปริมาตรที่มาก จะทำให้ peak ขึ้นสูง เว้นแต่ที่ปริมาตร 200nM และ 300nM พบว่าปริมาตร 200nM มี peak ที่สูงมากกว่าปริมาตร 300nM อาจจะเพราะที่ปริมาตร 200nM มีความจำเพาะมากกว่าจึงทำให้เห็น peak ที่ชัดเจนกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ดังนั้น เราจึงเลือกใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร primer positive control 100nM เพราะ peak *Salmonella* มีความชัดเจนเพียงพอต่อการตรวจสอบ, อุณหภูมิ peak *Salmonella* ไม่ใกล้เคียงกับ อุณหภูมิ peak ของ PCR positive control และทำให้ไม่สิ้นเปลือง primer อีกด้วย



หมายเหตุ: + คือ *Salmonella* แสดงถึง peak ที่เราสนใจ

\- คือ PCR positive control ที่แสดงถึงปฏิกิริยาสามารถทำงานปกติ

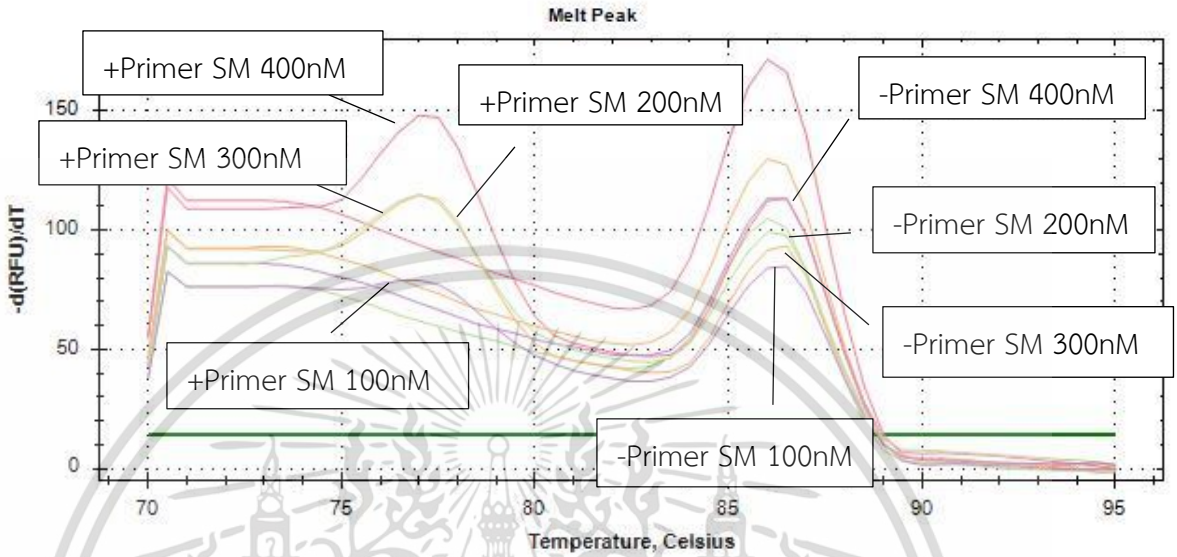
รูปที่ 4.7: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control โดยปรับ primer positive control ตามลำดับคือ 100nM (สีชมพู), 200nM (สีเขียว), 300nM (สีส้ม) และ 400nM (สีม่วง)

4.3.3 การปรับ primer specificity เป็น 100nM, 200nM, 300nM และ 400nM เพื่อดูความแตกต่างของ peak แต่ละลำดับ โดยใช้ primer positive control 400nM

โดยอ้างอิงสภาวะจากการทดลองข้างต้น โดยปรับ primer specificity เป็น 100nM, 200nM, 300nM และ 400nM เพื่อดูความแตกต่างของ peak แต่ละลำดับ โดยใช้ primer positive control 400nM Serovars ที่เรานำมาทดสอบ คือ *Salmonella* Typhimurium ได้ผลการทดลองดังนี้ *Salmonella* Typhimurium สามารถแสดง peak ที่ตำแหน่ง 77°C ความสูงของ peak จะแปรผันตรงกับปริมาตร primer specificity หมายความว่า เมื่อเราใช้ปริมาตร primer specificity 100nM จะได้ peak ที่ต่ำแต่ยังสามารถตรวจได้ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตร primer specificity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

200nM, 300nM และ 400nM ตามลำดับ ดังนั้น ปริมาตร primer specificity ที่เราเลือกใช้คือ 200nM peak ที่เราสนใจ (ที่ตรวจสอบเชื้อ) มีปริมาตรสูงกว่า peak ของ PCR positive control ดังแสดงในรูปที่ 4.8



หมายเหตุ: + คือ *Salmonella* แสดงถึง peak ที่เราสนใจ

\- คือ PCR positive control ที่แสดงถึงปฏิกิริยาสามารถทำงานปกติ

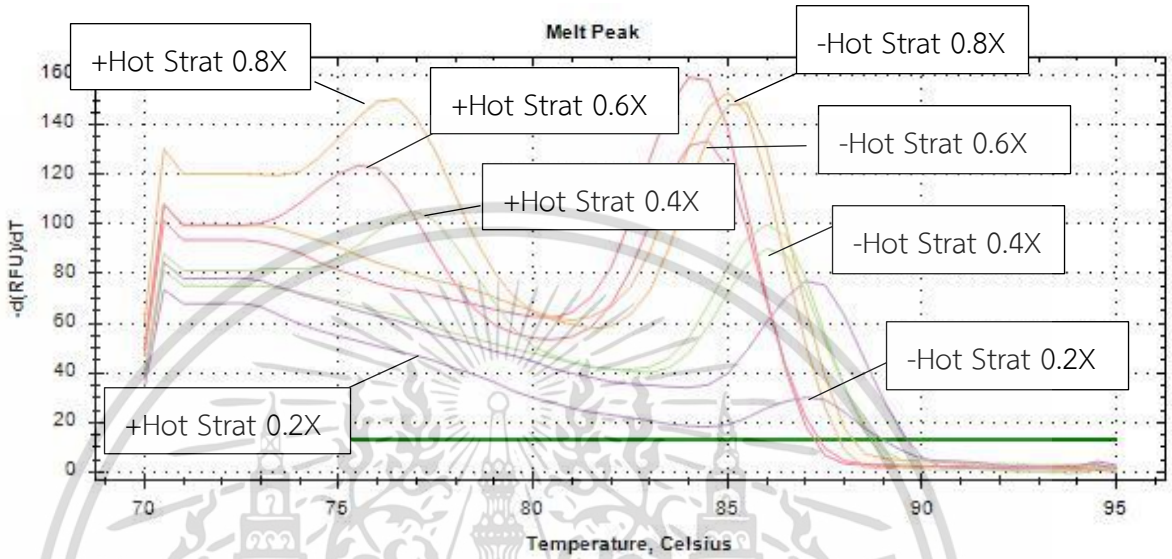
รูปที่ 4.8: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control โดยปรับ primer specificity ตามลำดับคือ 100nM (สีม่วง), 200nM (สีเขียว), 300nM (สีส้ม) และ 400nM (สีชมพู)

4.3.4 การปรับ Hot Strat PCR Master mix เป็น 0.2X, 0.4X, 0.6X และ 0.8X เพื่อดูความแตกต่างของ peak แต่ละลำดับ โดยใช้ Primer positive control 400nM และ Primer specificity 200nM

โดยอ้างอิง สภาวะ จากการทดลองข้างต้น โดยปรับ Hot Strat PCR Master mix เป็น 0.2X, 0.4X, 0.6X และ 0.8X เพื่อดูความแตกต่างของ peak แต่ละลำดับ โดยใช้ Primer positive control 40pnM และ Primer specificity 200nM Serovarsที่เรานำมาทดสอบ คือ *Salmonella* Typhimurium ได้ผลการทดลอง ดังนี้ *Salmonella* Typhimurium สามารถแสดง peak ที่ตำแหน่ง 77°c ผลของการปรับแต่ง Hot Strat PCR Master mix ทำให้ได้ peak ที่คลาดเคลื่อนกันทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.9 เนื่องจากใน Hot Strat PCR Master mix มีปริมาณของ dNTP, Enzyme, Buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ MgC_{12} ซึ่งตัวสำคัญที่เป็นผลให้เมื่อปรับเปลี่ยนปริมาตร คือ MgC_{12} ทำให้ primer สามารถจับกับสาย DNA ได้ง่ายมากขึ้น จึงทำให้ peak มีความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้น ปริมาตร Hot Strat PCR Master mix ที่เรานำมาใช้คือ 0.4X เป็นปริมาตรที่เหมาะสมในการตรวจสอบ เนื่องจากแสดงตำแหน่ง peak ของ *Salmonella* ได้ใกล้เคียงที่ 77°c



หมายเหตุ: + คือ *Salmonella* แสดงถึง peak ที่เราสนใจ

\- คือ PCR positive control ที่แสดงถึงปฏิกิริยาสามารถทำงานปกติ

รูปที่ 4.9: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ Negative control โดยปรับ Hot Strat PCR Master mix ตามลำดับคือ 0.2X (สีม่วง), 0.4X (สีเขียว), 0.6X (สีชมพู) และ 0.8X (สีส้ม)

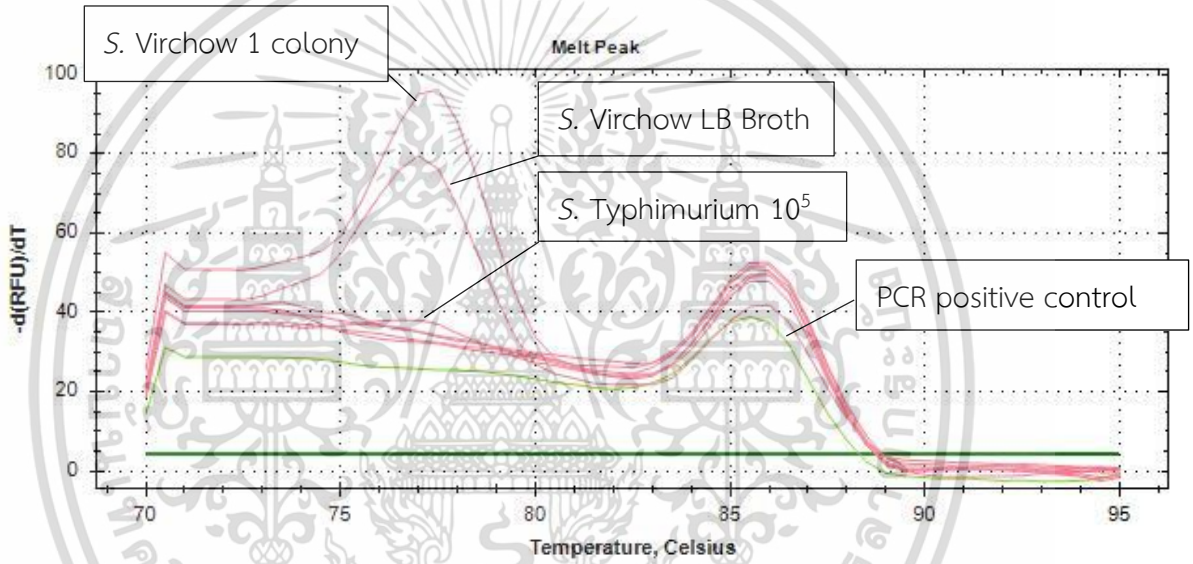
4.4 การทดสอบความหนาแน่นต่ำสุดของเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้ (Limit of Direction; LOD)

4.4.1 การทดสอบ *Salmonella* ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า และเปรียบเทียบกับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดจาก 1 โคโลนี กับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดแบบ Crude จาก LB Broth

โดยใช้ สภาวะ ดังนี้ Hot Start PCR 0.4X, 10 µM Forward 200nM, 10 µM Reverse 200nM, 10 µM PCR positive Forward 100nM, 10 µM PCR positive Reverse 100nM, Positive template 400nM, HRM Dye 1 µl และ MilliQ water 11.5 µl ใช้ อุณหภูมิ annealing 55°c เป็นจำนวน 35 รอบ HRM อยู่ระหว่าง 70-95°c จากผลการทดลองทดสอบ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่ว่าการนำไปใช้ประโยชน์ด้านใดๆ ไม่ว่าการดัดแปลง คัดลอก ทำซ้ำ หรือเผยแพร่ ต้องได้รับอนุญาตจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนเท่านั้น

Typhimurium เพื่อหาปริมาณของเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้ ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า และเปรียบเทียบกับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดจาก 1 โคโลนี กับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดจาก LB Broth ได้ผลการทดลองว่า สามารถตรวจสอบได้ที่ 10^5 เพียงค่าเดียวเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ดังนั้นจึงทดลองเพิ่มรอบของการทำ PCR เป็น 40 Cycle เพื่อให้มีเวลาที่ primer สามารถจับกับเส้น DNA ได้มากขึ้น และผลการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับ *S.* Virchow ที่สกัดเพียงหนึ่งโคโลนีกับ *S.* Virchow ที่สกัดจาก LB Broth ได้ผลว่าการสกัดเพียงหนึ่งโคโลนีมีปริมาณความเข้มข้นของ DNA น้อยกว่าแบบสกัดจาก LB Broth แต่การสกัดจากหนึ่งโคโลนีแสดง peak สูงกว่าการสกัดจาก LB Broth เนื่องจากการสกัดจาก LB Broth อาจมีการปนเปื้อนโปรตีนหรืออื่นๆ จึงทำให้ความสูงของ peak แตกต่างกัน



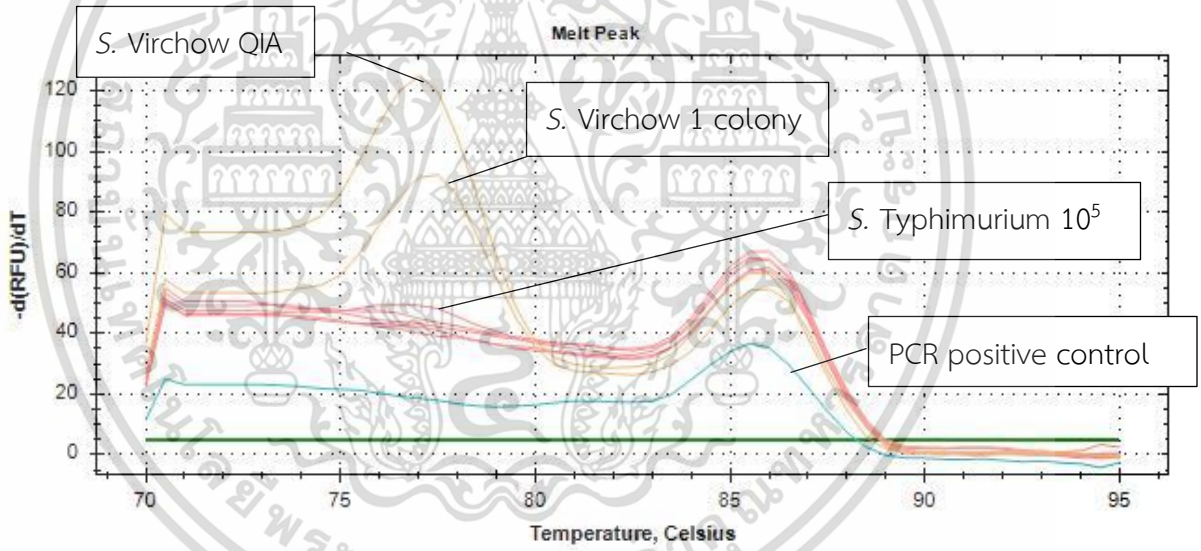
รูปที่ 4.10: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า และเปรียบเทียบกับ *S.* Virchow ที่สกัดจาก 1 โคโลนี กับ *S.* Virchow ที่สกัดจาก LB Broth โดยใช้สภาวะ ที่เลือก

4.4.2 การทดสอบ *Salmonella* ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า และเปรียบเทียบกับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วย QIA extraction kit กับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดแบบ Crude จากหนึ่งโคโลนี โดยเพิ่มรอบ PCR เป็น 40 Cycle

เนื่องจากสามารถตรวจความหนาแน่นต่ำสุดของเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 10^5 ซึ่งยังไม่เพียงพอต่อความต้องการทางอุตสาหกรรม โดยเพิ่มรอบการทำปฏิกิริยาเป็น 40 cycle โดยใช้ สภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้างต้น จากผลการทดลองทดสอบ *Salmonella* Typhimurium เพื่อหาปริมาณของเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า และเปรียบเทียบกับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี QIA extraction kit กับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี Crude จากหนึ่งโคโลนี ได้ผลการทดลองว่า สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับความเจือจางที่ 10^5 เท่า เพียงค่าเดียวเท่านั้น ส่วนที่ระดับความเจือจางที่ 10^4 เท่า มี peak ขึ้นในปริมาณที่ต่ำแต่ไม่แสดงที่ตำแหน่ง 77-78°c และที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2, 10^3 เท่า ไม่สามารถตรวจสอบได้ จึงจำเป็นต้องเพิ่มรอบการทำ PCR เป็น 45 รอบ ในส่วนผลการทดลองการเปรียบเทียบระหว่าง *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี QIA EXTRACTION KIT กับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี Crude จากหนึ่งโคโลนี ได้ผลการทดลองว่า การสกัดด้วยวิธี QIA extraction kit แสดง peak สูงกว่าการสกัดแบบ crude จากหนึ่งโคโลนี ดังแสดงในรูปที่ 4.11 อาจเกิดจากการสกัดด้วยวิธี QIA extraction kit เป็นการสกัดที่ละเอียดมากกว่าการสกัดแบบ crude ทำให้ปริมาณสิ่งปนเปื้อนถูกกำจัดมากเช่นเดียวกัน จึงแสดง peak ที่สูงกว่าและชัดเจนกว่า

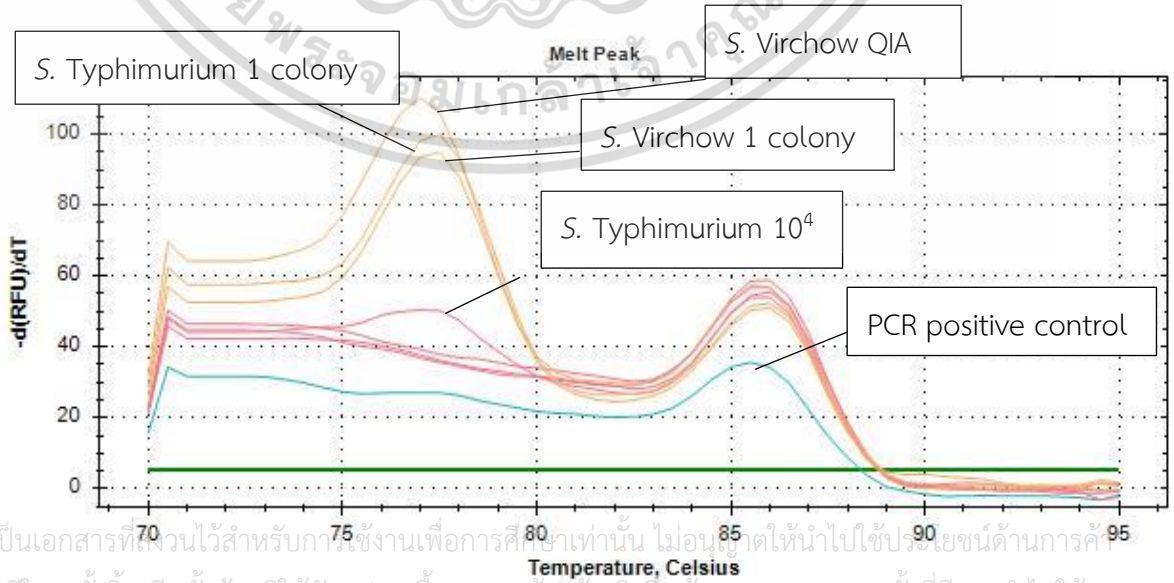


รูปที่ 4.11: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า และเปรียบเทียบกับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี QIA EXTRACTION KIT กับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี Crude จากหนึ่งโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 ทดสอบ *Salmonella* ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2, 10^3, 10^4เท่า และเปรียบเทียบกับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วย QIA extraction kit, *Salmonella* Virchow ที่สกัดแบบ Crude จากหนึ่งโคโลนี และ *Salmonella* Typhimurium ที่สกัดแบบ Crude จากหนึ่งโคโลนี โดยเพิ่มรอบ PCR เป็น 45 Cycle

เนื่องจากสามารถตรวจความหนาแน่นต่ำสุดของเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^4 และ 10^5 peak แสดงต่ำ จึงทำการเพิ่มรอบการทำปฏิกิริยาเป็น 45 cycle โดยใช้ สภาวะ ข้างต้น จากผลการทดลองทดสอบ *Salmonella enterica* serovars Typhimurium ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 เท่า และเปรียบเทียบกับ *Salmonella* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี QIA EXTRACTION KIT *Salmonella* Virchow ที่สกัดแบบ Crude จากหนึ่งโคโลนี และ *Salmonella* Typhimurium ที่สกัดแบบ Crude จากหนึ่งโคโลนี โดยเพิ่มรอบ PCR เป็น 45 Cycle ได้ผลการทดสอบ ดังนี้ สามารถตรวจสอบ *S*almonella Typhimurium ได้ที่ระดับความเจือจาง 10^4 เท่า ที่ตำแหน่ง 77°c แต่ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2 และ 10^3 เท่า ไม่สามารถตรวจสอบได้ เนื่องจากเชื้อมีจำนวนน้อยมากเกินไปหรือเทคนิคการไปเปตยังไม่มีความแม่นยำพอ จึงไม่สามารถตรวจสอบได้ และผลการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัด *Salmonella* Virchow สกัดแบบ crude จากหนึ่งโคโลนี, *Salmonella* Typhimurium สกัดแบบ crude จากหนึ่งโคโลนี และ *Salmonella* Virchow สกัดจาก QIA extraction kit แสดงความสูงของ peak จากต่ำไปสูง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 เนื่องจากวิธีการสกัดแบบ crude อาจมีการปนเปื้อนมากจึงทำให้มี peak ที่ต่ำกว่าการสกัดจาก QIA extraction kit ที่เป็นการสกัดแบบละเอียดมากกว่า ดังนั้น *Salmonella* Typhimurium สามารถตรวจสอบได้ถึงระดับความเจือจาง 10^{-4} เท่า และวิธีการสกัดแบบละเอียดสามารถแสดง peak ได้ชัดเจนกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดแบบ crude



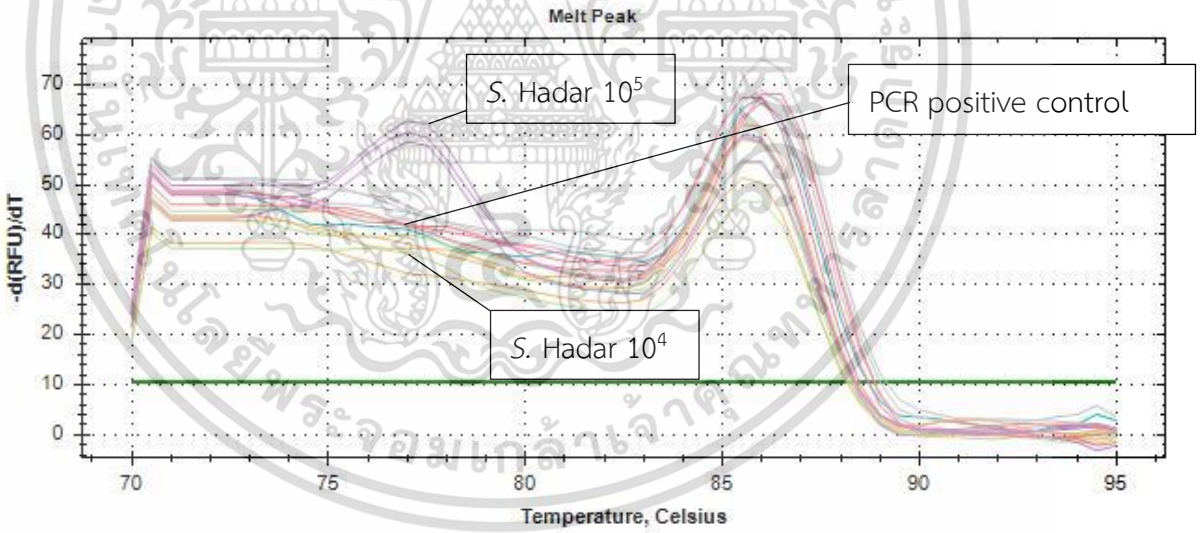
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.12: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Typhimurium และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 เท่า และเปรียบเทียบกับ *S.* Virchow ที่สกัดด้วยวิธี QIA extraction kit *S.* Virchow ที่สกัดแบบ Crude จากหนึ่งโคโลนี และ *S.* Typhimurium ที่สกัดแบบ Crude จากหนึ่งโคโลนี

จากการปรับ Substrate แล้ว เราควรเลือก substrate ที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้น สภาวะ ที่เราจะใช้สำหรับการทดสอบ Duplex PCR คือ Hot Strat PCR Master mix 0.4X, Primer Positive Control 100nM, Primer Specificity 200nM, Positive template 400nM, HRM Dye 1µl และ MilliQ water 11.5µl เป็นจำนวน 45 cycle

4.4.5 การทดสอบ *Salmonella* ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า เป็นจำนวน 3 ซ้ำ

โดยใช้ สภาวะ ข้างต้นจากผลการทดลองทดสอบ *Salmonella* Hadar สามารถตรวจสอบที่ระดับความเจือจาง 10^5 ทั้ง 3 ซ้ำ และ 10^4 เท่าสามารถตรวจได้เพียง 1 ซ้ำเท่านั้น แต่ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2 และ 10^3 เท่า ไม่สามารถตรวจสอบได้ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อยเกินไปหรือการไปเปตไม่มีความแม่นยำพอ ดังแสดงในรูปที่ 4.13



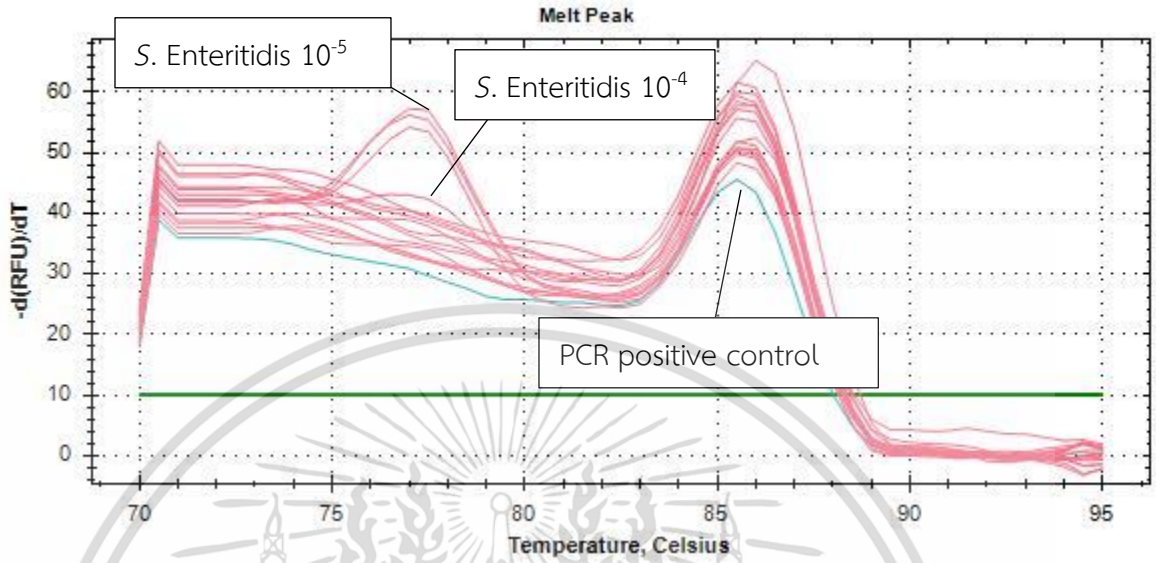
รูปที่ 4.13 Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Hadar และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่าเท่าเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

4.4.6 การทดสอบ *Salmonella* ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า เป็นจำนวน 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

โดยใช้ สภาวะ ข้างต้นจากผลการทดลองทดสอบ *Salmonella* Enteritidis สามารถตรวจสอบที่ระดับความเจือจาง 10^5 ทั้ง 3 ซ้ำ และ 10^4 เท่าสามารถตรวจได้เพียง 1 ซ้ำเท่านั้น แต่ที่

ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2 และ 10^3 เท่า ไม่สามารถตรวจสอบได้ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อยเกินไปหรือการไปเปตไม่มีความแม่นยำพอ ดังแสดงในรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14: Melt curve แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ระดับการเจือจาง *Salmonella enterica* serovars Enteritidis และ PCR positive control ที่ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่าเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

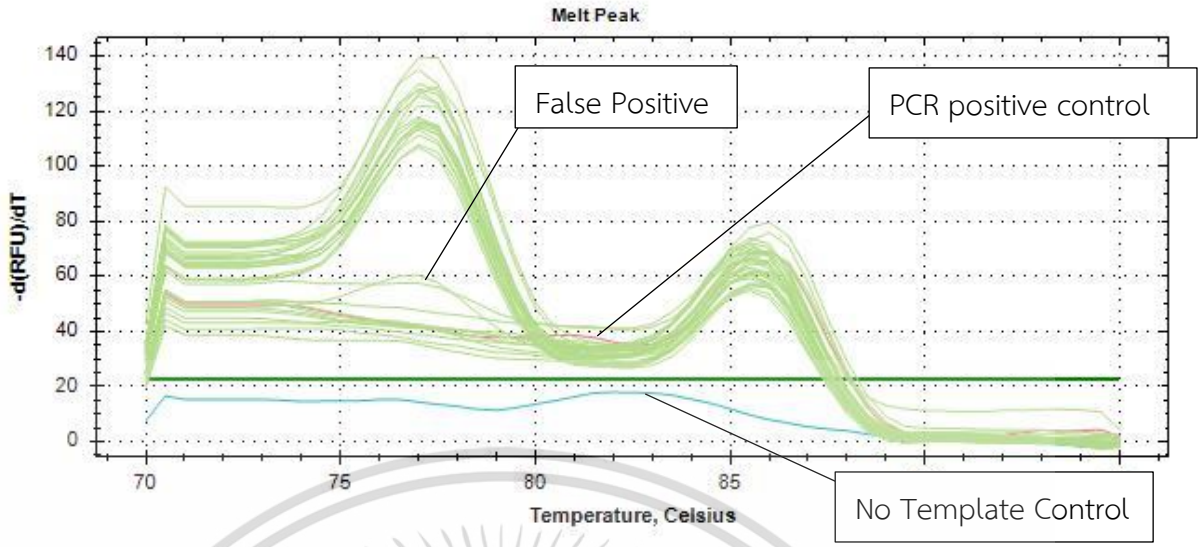
4.5 การประเมินการตรวจผล (Validation) โดยอ้างอิงวิธี Gold standard (ISO 6579-1: 2017)

โดยการนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับความเป็นจริง จะได้ผลการตรวจ คือตรวจพบเป็น *Salmonella* เรียกว่าผลบวกจริง (True Positive) ตรวจพบเป็น *Salmonella* ทั้งที่เป็นแบคทีเรียชนิดอื่น เรียกว่าผลบวกเท็จ (False Positive) ตรวจพบเป็นแบคทีเรียชนิดอื่น เรียกว่าผลลบจริง (True Negative) และตรวจพบเป็นแบคทีเรียชนิดอื่นทั้งที่เป็น *Salmonella* เรียกว่าผลลบเท็จ (False Negative)

4.5.1 การประเมินการตรวจผล ครั้งที่ 1 จำนวน 30 ตัว

โดยใช้สภาวะ ข้างต้นจากการทดลองประเมินการตรวจผล โดยใช้เงื่อนไขที่เหมาะสม ได้ผลการทดลอง ดังนี้ สามารถตรวจพบผลบวกจริง (True positive) จำนวน 20 ตัว ผลลบจริง (True negative) จำนวน 10 ตัว เป็นจำนวนทั้งหมด 30 ตัว ผลการประเมินการตรวจสอบพบว่าเป็นผลบวกเท็จ (False positive) จำนวน 1 ตัว จากการประเมินการตรวจผลตัวที่เป็น ผลบวกเท็จ คือ *Listeria welshimeri* ดังแสดงในรูปที่ 4.15 อาจเกิดจากการปนเปื้อนในไปเปตหรือขั้นตอนการสกัด

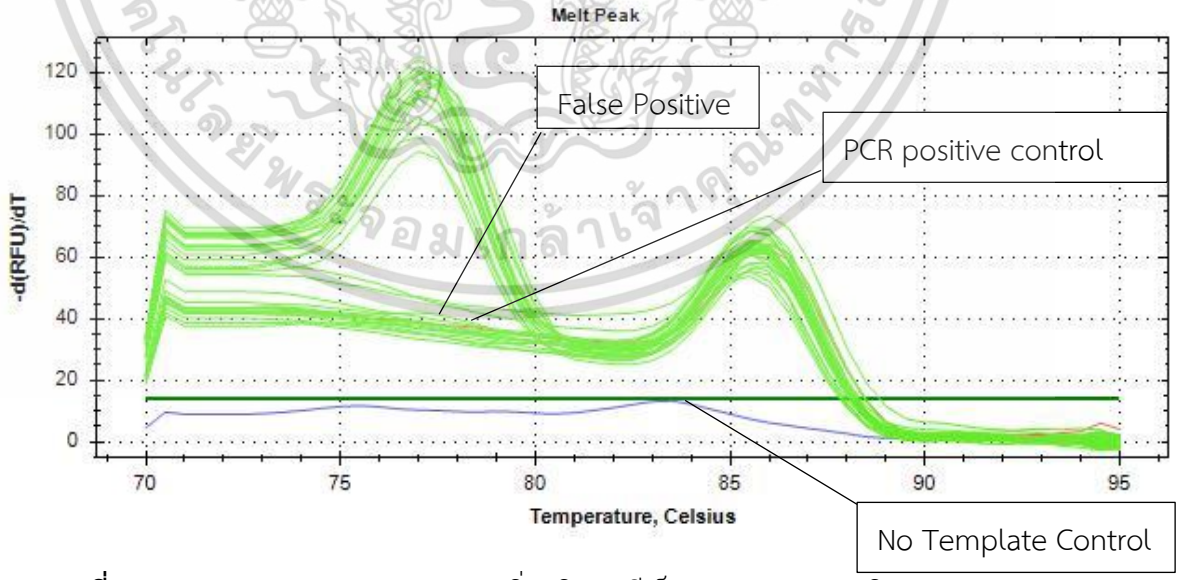
เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15: Melt curve แสดงการ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของการประเมินการตรวจผล

4.5.2 การประเมินการตรวจผล ครั้งที่ 2 จำนวน 30 ตัว

โดยใช้สภาวะ ข้างต้นจากการทดลองประเมินการตรวจผล โดยใช้เงื่อนไขที่เหมาะสม ได้ผลการทดลอง ดังนี้ สามารถตรวจพบผลบวกจริง (True positive) จำนวน 20 ตัว ผลลบจริง (True negative) จำนวน 10 ตัว เป็นจำนวนทั้งหมด 30 ตัว ผลการประเมินการตรวจสอบพบว่าเป็นผลบวกเท็จ (False positive) จำนวน 1 ตัว จากการประเมินการตรวจผลตัวที่เป็น ผลบวกเท็จ คือ *Listeria innocua* อาจเกิดจากการปนเปื้อนในไปเปตหรือขั้นตอนการสกัด ดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16: Melt curve แสดงการ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของการประเมินการตรวจผล

จึงนำผลประเมินการตรวจผล ทั้ง 2 ครั้ง ไปคำนวณความถูกต้องของการตรวจโดยอ้างอิงวิธี Gold standard ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การคำนวณความถูกต้องของผลตรวจ โดยอ้างอิงวิธี Gold standard ทั้ง 60 ตัว

วิธี Gold standard เป็นวิธีการตรวจที่ดีที่สุดภายใต้เงื่อนไขที่เหมาะสม ทั้งนี้อาจไม่ใช้การตรวจที่แม่นยำมากที่สุด และเมื่อได้ผลการตรวจสอบแล้วจึงนำมาคำนวณความไวต่อการตรวจสอบ (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความน่าจะเป็นที่สามารถตรวจผลบวกจริงได้ผลบวกจริง (Positive Predictive Value; PPV) ความน่าจะเป็นที่สามารถตรวจผลลบจริงได้ผลลบจริง (Negative Predictive Value; NPV) และความถูกต้องของผลการตรวจ (Diagnostic Accuracy)

4.6.1 ความไวต่อการตรวจสอบ (Sensitivity)

การตรวจสอบความไว (Sensitivity) เพื่อป้องกันการตรวจที่ผิดพลาด ถ้ามีความไวต่อการตรวจสอบสูงจะทำให้ไม่พลาดในการตรวจสอบหมายถึงว่าจะทำให้ผลลบเท็จ (False Negative) น้อย ทำให้ตรวจสอบถูกและแม่นยำมากขึ้น สูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{ Sensitivity} = \frac{\text{True Positive}}{\text{True Positive + False Negative}} \text{x}100$$

4.6.2 ความจำเพาะ (Specificity)

การตรวจสอบความจำเพาะ (Specificity) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เราสนใจ เช่น ถ้ามีความจำเพาะสูงจะทำให้สามารถตรวจสอบได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดนี้จริง ผลบวกเท็จ (False Positive) ลดลง หากตรวจสอบผิดพลาดจะทำให้มีผลกระทบมากมาย ทั้งด้านสุขภาพจนถึงขั้นเสียชีวิต ดังนั้น ควรจะมีความจำเพาะที่สามารถยอมรับได้ สูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{ Specificity} = \frac{\text{True Negative}}{\text{True Negative + False Positive}} \text{ x } 100$$

4.6.3 ความถูกต้องของผลตรวจ (Diagnostic Accuracy)

การคำนวณความถูกต้องของผลการตรวจ เพื่อให้ทราบว่ามีความถูกต้องมากน้อยแค่ไหน

$$\text{Diagnostic Accuracy} = \frac{\text{(True Positive + True Negative)}}{\text{(True Positive + False Negative + False Positive + True Negative)}}$$

จากผลการทดลองการคำนวณความถูกต้องของผลการตรวจ โดยอ้างอิงวิธี Gold standard ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.1 ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1: แสดงผลการคำนวณความถูกต้องของผลตรวจ โดยอ้างอิงวิธี Gold standard (ISO 6579-1: 2017)

	Gold standard (ISO 6579-1: 2017)			
		+	-	total
Test	+	35	2	37
	-	0	23	23
	total	35	25	60

Sensitivity = 100%

Specificity = 92%

Diagnostic Accuracy = 96.7%

พบผลบวกจริง (True positive) จำนวน 35 ตัว ผลลบจริง (True negative) จำนวน 23 ตัว และผลบวกเท็จ (False positive) จำนวน 2 ตัว เป็นจำนวนทั้งหมด 60 ตัว จากนั้นนำผลตรวจมาคำนวณความไวต่อการตรวจ (Sensitivity) ร้อยละ 100 ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 92 และความถูกต้องของผลตรวจ (Diagnostic Accuracy) ร้อยละ 96.7

จากการเปรียบเทียบการสกัดจากชุด QIA extraction kit สามารถแสดง peak ได้ชัดเจนมากกว่าการสกัดจากโคโลนี แต่ในข้อเท็จจริงการตรวจสอบ *Salmonella* spp. จำเป็นต้องใช้ความรวดเร็วเพื่อแก้ไขได้ทันที

จากการทดสอบความจำเพาะของเชื้อ *Salmonella* spp.โดยใช้เทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM) ผลการวิจัยพบว่าสามารถทดสอบความจำเพาะ (specificity) ได้เนื่องจาก primer มีความจำเพาะ (specificity) กับ Salmonella ผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahn et al. (1992) ที่พบว่า ยีน invA มีลำดับเฉพาะของ Salmonella และแสดงให้เห็นว่ายีนนี้เป็นเป้าหมาย PCR ที่เหมาะสม

จากการพัฒนาเทคนิค PCR สำหรับตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้เทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM) ผลการวิจัยพบว่า สามารถตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของและสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hu et al. (2020) ที่พบว่าเทคนิค High Resolution Melting (HRM) Analysis มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้กับความปลอดภัยของอาหารและการวิจัยทางระบาดวิทยาเกี่ยวกับการติดเชื้อ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการหาปริมาณความหนาแน่นของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (limit of detection) เท่ากับ 10^4 CFU/ml ซึ่งพบการทดลองที่สอดคล้องกัน Heymans et al. (2018) ได้ศึกษาการพัฒนาและประเมินผลสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. พร้อมกันระหว่าง *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ในอาหารต่างๆ โดยตรวจพบความหนาแน่นของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ที่ 40 CFU/100 g ในอาหารซึ่งไม่สามารถนำผลมาอภิปรายได้เนื่องจากเชื้อที่นำมาทดสอบแตกต่างกัน ในการทดสอบนี้เราใช้ *Salmonella enterica* เพียง 3 serovars เนื่องจาก *Salmonella* มีจำนวน serovars ที่หลากหลายถึง 2,500 serovars เราจึงเลือกเชื้อที่พบเจอมากที่สุดสำหรับการทดสอบความหนาแน่นของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Limited of Detection; LOD) เช่น *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Hadar และ *Salmonella* Enteritidis เป็นต้น สอดคล้องกับรายงานของ World Health Organization: WHO (2018) พบว่าเชื้อ *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium ซึ่งเป็น Serovars สำคัญที่สุดสองชนิดของ *Salmonella* ที่ส่งจากสัตว์สู่มนุษย์ในเกือบทั่วโลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM) สามารถใช้ในการตรวจเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ *enterica* จำนวน 58 serovars ได้ โดยแสดงผลเป็น melt peak ที่ 77±1 °c

2. สภาวะที่เหมาะสมในการใช้ตรวจดังนี้ Hot Start PCR 0.24X, 10 µM Forward 100nM, 10 µM Reverse 100nM, HRM Dye 1 µl และ MilliQ water 15.5 µl โดย ใช้ Initial denaturation 95°c เป็นเวลา 5 นาที, Denaturation 95°c เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing 55°c เป็นเวลา 30 วินาที, Extension 72°c เป็นเวลา 30 วินาที และFinal extension 72°c เป็นเวลา 1 นาที ใช้ 30 cycle สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HRM อยู่ระหว่าง 70–85°c

3. วิธีการที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อสายพันธุ์ของ *Salmonella* สายพันธุ์ *enterica* และไม่สามารถแสดง melt peak กับ Out groups ชนิดอื่น ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* และ *Listeria* spp. รวมทั้งหมด 6 สปีชีส์ เช่น *L. monocyogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* และ *L. grayi*

4. การทดสอบ *Salmonella* ด้วยวิธี Duplex PCR เพื่อทดสอบความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Limited Of Detection) ที่ระดับความเจือจาง 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 และ10^5 เท่า พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อได้ต่ำสุดที่ 10^4 colony forming unit (cfu) /ml โดยมี สภาวะที่เหมาะสม คือ Hot Start PCR 0.4X, 10 µM Forward 200nM, 10 µM Reverse 200nM, 10 µM PCR positive Forward 100nM, 10 µM PCR positive Reverse 100nM, Positive template 400nM, HRM Dye 1 µl และ MilliQ water 11.5 µl ใช้ Initial denaturation 95°c เป็นเวลา 5 นาที, Denaturation 95°c เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing 55°c เป็นเวลา 30 วินาที, Extension 72°c เป็นเวลา 30 วินาที และFinal extension 72°c เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 45 รอบ และการวิเคราะห์ด้วย HRM อยู่ระหว่าง 70-95°c

5. การประเมินการตรวจผล (validation) สุ่ม *Salmonella* สายพันธุ์ *enterica* และ เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น รวม 60 ตัวอย่าง เมื่อนำผลการทดลองการประเมินการตรวจผล (validation) มาคำนวณความถูกต้องของการตรวจ โดยอ้างอิง Gold Standard (Conventional method of *Salmonella*; ISO 6579-1: 2017) ได้ผลการคำนวณ ดังนี้ ความไวต่อการตรวจ (Sensitivity) ร้อยละ 100 ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 92 และความถูกต้องของผลตรวจ (Diagnostic Accuracy) ร้อยละ 96.7 ซึ่งวิธีวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ High Resolution Melting (HRM) มีความน่าเชื่อถือได้

เอกสารนี้อนุญาตให้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ว่ากรณีใดๆ จะนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ได้ ผู้ใช้งานจะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ระวังอย่าให้ plate แห้งจนเกินไปจะทำให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกจึงไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ

2. การเตรียม Master mix ก่อนใส่ส่วนประกอบแต่ละส่วน ควรผสมให้ดีก่อนใช้งานเพราะอาจมีการตกตะกอนได้ และควรเก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4°c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

วิภาวดี อ้นท้วม, พรเพ็ญ มรกตจินดา, วราภา มหากาญจนกุล และ นิภา โชคสัจจะวาที. 2553. การตรวจการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค PCR และคัดแยกสายพันธุ์ในกระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก.*วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 41(1): 568-571.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2565. **สถานการณ์ของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ระหว่างปี 2562-2564.** [Online]. Available: http://nih.dmsc.moph.go.th/login/showimgdetil.pop?id=1810. เข้าถึงวันที่ 20 สิงหาคม 2566

สถาบันอาหารกระทรวงอุตสาหกรรม. 2555. **ซาลโมเนลา.** [Online]. Available: https://fic.nfi.or.th/foodsafaty/upload/damage/pdf/salmonella_2.pdf. เข้าถึงวันที่ 20 สิงหาคม 2566

อรชร เมฆเกิดชู และ จิราภรณ์ สิริสัณห์. 2563. **เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร.** [Online]. Available: https://fostat.org/communication/fscm038/. เข้าถึงวันที่ 20 สิงหาคม 2566

Brown, E. W., Bell, R., Zhang, G., Timme, R., Zheng, J., Hammack, T. S. and Allard, M. W. 2021. ***Salmonella* genomics in public health and food safety**. *EcoSal Plus*, *9*(2):eESP-0008.

Chanamé Pinedo, L. E., Van Goethem, N., Mallioris, P., Pacholewicz, E., Pijnacker, R., Franz, E. and Mughini-Gras, L. 2023. **Assessing potential determinants of the stagnating trend in *Salmonella* Enteritidis human infections in Europe and option for intervention: a multi-criteria decision analysis**. *Available at SSRN 4281567*.

Denyingyhot, A., Srinulgray, T., Mahamad, P., Ruangprach, A., Sa, S., Saerae, T. 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: 108540.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food and Drug Administration. 2009. **Draft guidance for Industry: Measures to address the risk for contamination by *Salmonella* species in food containing a pistachio-derived product as an ingredient.** [Online]. Available: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/draft-guidance-industry-measures-address-risk-contamination-salmonella-species-food-containing เข้าถึงวันที่ 20 สิงหาคม 2566

Heymans, R., Vila, A., van Heerwaarden, C. A., Jansen, C. C., Castelijn, G. A., van der Voort, M. and Biesta-Peters, E. G. 2018. **Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR**. *PloS one*, 13(10): e0206316

กองบรรณาธิการ HD. 2563. ***Salmonella* ซาลโมนเนลลา คืออะไร ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้อย่างไร.** [Online]. Available: https://hd.co.th/salmonella เข้าถึงวันที่ 20 สิงหาคม 2566

Hu, M., Yang, D., Wu, X., Luo, M. and Xu, F. 2020. **A novel high-resolution melting analysis-based method for *Salmonella* genotyping.** *Journal of microbiological methods*, 172, 105806.

Kasturi, K. N., and Drgon, T. 2017. **Real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in environmental samples**. Applied and environmental microbiology, 83(14): e00644-17.

Kumar, Y., Singh, V., Kumar, G., Gupta, N. K. and Tahlan, A. K. 2019. **Serovar diversity of*Salmonella* among poultry**. *The Indian journal of medical research*, 150(1): 92.

Kumaravel, S., Jian, S. E., Huang, S. T., Huang, C. H. and Hong, W. Z. 2022. **Convenient and ultrasensitive detection of live Salmonella using ratiometric electrochemical molecular substrates**. Analytica Chimica Acta, 1190: 339244.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NGthai. 2563. **ซาลโมนเนลลา คืออะไร ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้อย่างไร.** [Online]. Available: https://ngthai.com/science/29446/salmonella-bacteria/**.** เข้าถึงวันที่ 20 สิงหาคม 2566

Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galan, J. E., Ginocchio, C. and Gyles, C. L. 1992. **Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*.** *Molecular and cellular probes*, 6(4): 271-279.

Senachai, P., Chomvarin, C., Wongboot, W., Boonyanugomol, W. and Tangkanakul, W. 2013. **Duplex PCR for detection of *Salmonella* and *Shigella* spp in cockle samples. *Southeast Asian J. Trop. Med.*** *Public Health,* 44(5): 866-874.

Srisutham, S., Rattanakoch, P., Kijprasong, K., Sugaram, R., Kantaratanakul, N., Srinulgray, T. and Imwong, M. 2023. **A novel sensitive hexaplex high-resolution melt assayfor identification of five human Plasmodium species plus internal control**. Acta tropica, 248: 107020.

World Health Organization: WHO. 2018. ***Salmonella* (non-typhoidal)**. [online]. Available: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal) เข้าถึงวันที่ 20 สิงหาคม 2566

Wisittipanit, N., Pulsrikarn, C., Wutthiosot, S., Pinmongkhonkul, S. and Pooncharoen, K. 2020. **Application of machine learning algorithm and modified high resolution DNA melting curve analysis for molecular subtyping of Salmonella isolates from various epidemiological backgrounds in northern Thailand**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 36: 1-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB Broth)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB Broth)	25	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร

1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth 25 กรัม ละลายใน Distilled Water ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LB Agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB Broth)	25	กรัม
Bacteriological agar	15	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร

2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth 25 กรัม และชั่ง Bacteriological agar 15 กรัม ละลายใน Distilled Water ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

2.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที

3. การสกัดด้วยชุดอุปกรณ์ QIA EXTRACTION KIT

3.1 ใส่เชื้อปริมาตร 200 µl และใส่ QIAGEN Protease (QP) 20 µl ลงในหลอด 1.5 ml และบัฟเฟอร์การสลายตัว (AL) 200 µl เป็นระยะเวลา 15 วินาที บ่มเป็นระยะเวลา 10 นาที (± 1 นาที) ที่อุณหภูมิ 56°C (± 1°C) เติมเอทานอล 200 µl Vortex เป็นระยะเวลา 15 วินาที หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบ 6,000 x g ทำให้ DNA จะถูกดูดซับลงบนเมมเบรนซิลิกาขณะที่ทำการปั่นเหวี่ยง

3.2 เก็บเมมเบรนซิลิกาแล้วเชื่อมเข้ากับ หลอด 1.5 ml อีกครั้ง เพื่อทำการล้างโดยใส่ AW1 500 µl และหมุนเหวี่ยงเป็นระยะเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบ 6,000 x g

3.3 เก็บเมมเบรนซิลิกาแล้วเชื่อมเข้ากับ หลอด 1.5 ml อีกครั้ง เพื่อทำการล้างโดยใส่ใส่ AW2 500 µl และหมุนเหวี่ยง 3 นาที ที่ความเร็วรอบ 20,000 x g

3.4 ใส่ AE 200 µl และบ่มเป็นเวลา 1 นาที หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบ 6,000 x g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ปริมาตร 1 ห่วง ของเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วงขนาดมาตรฐาน 10 µl หรือปริมาตร 10 µg

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Luria-Bertani Agar ที่อุณหภูมิ 37°c เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วงเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อปริมาตร 1 ห่วง ใส่ลงในหลอดทดลง 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml แล้วเจือจางแบบลำดับส่วนที่ความเจือจาง 10^1 ถึง 10^7 เมื่อเจือจางแบบลำดับส่วนแล้วนำระดับความเจือจาง 10^1 ถึง 10^5 มาเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร LB Agar นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°c เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนี ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข-1

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 แสดงค่าการตรวจนับเชื้อ *Salmonella* spp.

ความเจือจาง	จำนวนโคโลนี				× ความเจือจาง	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย		
10^4	16	4	13	11.0	11×10^5	1.1×10^6

หมายเหตุ: ที่ระดับความเจือจาง 10^5 มีจำนวนโคโลนีเดี่ยว มากกว่า 250 โคโลนี

ที่ระดับความเจือจาง 10^1 ถึง 10^3 ไม่พบโคโลนีเดี่ยว

ดังนั้นเชื้อ *Salmonella* spp. ปริมาตร 1 ห่วง ของเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วงขนาดมาตรฐาน 10 µl หรือประมาณ 10 µg มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1.10×10^6 CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มสหกิจศึกษา

วันที่ 15 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นางสาว ปรีดานุช ทองจันทร์ รหัสประจำตัว 63050498

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Resolution Melting (HRM)

ชื่อภาษาอังกฤษ Identification of *Salmonella* spp. Using duplex PCR technique with High Resolution Melting (HRM) analysis.

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00 %

ลงชื่อ.....ปรีดานุช ทองจันทร์.....

(นางสาวปรีดานุช ทองจันทร์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษา สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ลงชื่อ.....

(รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้