

การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี
ชนิด MALDI-TOF MS

IDENTIFICATION OF *Listeria* spp. USING MALDI-TOF
MASS SPECTROMETRY

ธนบดี พยุหะ

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี
ชนิด MALDI-TOF MS

IDENTIFICATION OF *Listeria* spp. USING MALDI-TOF
MASS SPECTROMETRY

ธนบดี พยุหะ

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

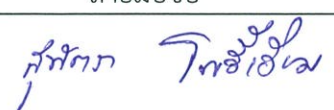

IDENTIFICATION OF *Listeria* spp. USING MALDI-TOF
MASS SPECTROMETRY

TANABODEE PAYUHA

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อสหกิจศึกษา	การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Listeria</i> ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีชนิด MALDI-TOF Identification of <i>Listeria</i> spp. Using MALDI-TOF Mass Spectrometry
ชื่อนักศึกษา	นายธนบดี พยุหะ รหัสนักศึกษา 57050695
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์นิเทศ	
ผศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมและผู้นิเทศ	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อสหกิจศึกษา	การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Listeria</i> ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีชนิด MALDI-TOF
ชื่อนักศึกษา	นายธนบดี พยุหะ รหัสนักศึกษา 57050695
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์

บทคัดย่อ

เชื้อ *Listeria* เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค listeriosis ซึ่งสามารถพบการระบาดได้ทั่วโลก โดยส่วนใหญ่การติดเชื้อเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นสปีชีส์หลักที่ก่อให้เกิดโรค การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารและกระบวนการผลิตจึงมีความสำคัญเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยการตรวจสอบและการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยวิธีการดั้งเดิม มีวิธีการหลายขั้นตอน ทำให้ใช้ระยะเวลา ค่าใช้จ่ายและแรงงานในการทดสอบจำนวนมาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีชนิด Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight (MALDI-TOF MS) มาใช้บ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* โดยศึกษาภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อและการเตรียมโปรตีน เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมต่อลักษณะของโปรตีนหรือแมสสเปกตรัมของเชื้อ *Listeria* จำนวน 6 สปีชีส์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* และ *L. grayi* จากนั้นทำการสร้างและตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลโปรตีนที่พัฒนาขึ้นโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของ Bruker Daltonik (Germany) พบว่าจากจำนวนตัวอย่างเชื้อ *Listeria* ทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ ฐานข้อมูลโปรตีนที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ทั้ง 6 สปีชีส์ มีค่าร้อยละ 100 นอกจากนั้นการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยฐานข้อมูลโปรตีนที่พัฒนาขึ้นยังให้คะแนนอยู่ในช่วง 2.367 ถึง 2.767 ซึ่งมีความน่าเชื่อถือในระดับสปีชีส์ อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนข้อมูลโปรตีนที่มีคุณภาพและความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ในการสร้างฐานข้อมูลเป็นสิ่งสำคัญต่อการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ให้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : *Listeria* การบ่งชี้ชนิด เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีชนิด MALDI-TOF ฐานข้อมูลโปรตีน

Title	Identification of <i>Listeria</i> spp. Using MALDI-TOF Mass Spectrometry
Student	Mr. Tanabodee Payuha Student ID 57050695
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Piengchan Sonthayanon

Abstract

Listeria is a food-borne pathogen that is the causative agent of listeriosis, worldwide. The most of cases occur after consumption of foods contaminated with *Listeria monocytogenes* that is the major pathogenic species. Detection of *L. monocytogenes* in contaminated foods and food production is important for the safety of consumers. The conventional methods for the detection and identification of *Listeria* spp. are expensive, laborious and time consuming. This study uses Matrix-Assisted Laser Desorption Time- Of- Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) to identification of *Listeria* spp. Optimization of culture condition and protein preparation were performed in order to get the optimal conditions for protein profiles or mass spectra. Protein profiles of 6 *Listeria* spp., including *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* and *L. grayi* were analyzed and constructed to In-house database. Validation of In-house protein database was compared with Biotyper version DB4613 database (Bruker Daltonik, Germany). The results revealed that sensitivity and specificity of identification among 14 strains of all 6 *Listeria* spp. using In-house database was 100%. Moreover, identification of *Listeria* spp. using In-house database had high confidence identification at the species level in the range of score values from 2.367 to 2.767. However, the high number of protein databases with good quality and reproducibility of the mass spectra is important for the reliability on identification of *Listeria* spp. using MALDI-TOF MS.

Keywords : *Listeria*, Identification, MALDI-TOF MS, Protein database

กิตติกรรมประกาศ

สหกิจศึกษาเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายท่านดังนี้

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

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ร่วมและผู้นิเทศ ที่ให้โอกาสในการทำสหกิจศึกษาในครั้งนี้ อีกทั้งยังให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และเสนอแนวทางแก้ไขปัญหา รวมทั้งตรวจเล่มสหกิจศึกษาเล่มนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. มัลลิกา อิมวงค์ หัวหน้าภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้โอกาสในการทำสหกิจศึกษา ณ ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรภาค เรียมทอง รองหัวหน้าภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษา ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคโปรตีโอมิกส์ และให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขสหกิจศึกษาเล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งให้โอกาสในการฝึกทักษะในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ นายสุธิ มั่งมี นักศึกษาปริญญาเอก รวมทั้งนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอก ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำเรื่องการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ให้ความรู้ คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการทำสหกิจศึกษาเล่มนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และผู้ปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ รวมทั้งให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาและการปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเพื่อน พี่และน้องทุกคนที่ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการทำสหกิจศึกษา สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำสหกิจศึกษาครั้งนี้ จนสำเร็จได้ดังที่คาดหวังไว้ หากโครงการพิเศษนี้มีความผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เชื้อ <i>Listeria</i> spp.	4
2.1.1 ประวัติ	4
2.1.2 ลักษณะและการจัดจำแนกเชื้อ	4
2.1.3 โรค listeriosis.....	5
2.1.4 การควบคุมเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> ในอุตสาหกรรมอาหาร	6
2.1.5 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Listeria</i>	8
2.2 เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีชนิด Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight (MALDI-TOF MS)	11
2.2.1 หลักการและวิธีการใช้งาน	11
2.2.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	14
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	14
3.2 สารเคมี.....	14
3.3 สายพันธุ์แบคทีเรีย	15
3.4 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย.....	15
3.5 การหาภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS.....	15
3.5.1 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	15
3.5.2 การเตรียมโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS	15
3.6 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS	16
3.6.1 การสร้างฐานข้อมูลโปรตีน (In-house database).....	16
3.6.2 การตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลโปรตีน (In-house database).....	16
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	18
4.1 การหาภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ <i>Listeria</i> spp.....	18
4.1.1 การทดสอบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย.....	18
4.1.2 การทดสอบวิธีการเตรียมโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS.....	21
4.2 การสร้างฐานข้อมูลโปรตีนและการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ <i>Listeria</i> spp.....	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง.....	36
ภาคผนวก.....	39
ภาคผนวก ก.....	40
ภาคผนวก ข.....	42
ภาคผนวก ค.....	43
ภาคผนวก ง.....	47

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงผลลักษณะอาหารที่ต้องไม่พบเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> ตามปริมาณที่กำหนด.....	7
2.2 แสดงผลการทดสอบที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Listeria</i>	9
4.1 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ของเชื้อ <i>L. welshimeri</i> ATCC 35879 ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	19
4.2 แสดงความหมายของช่วงคะแนนที่ได้จากการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1	20
4.3 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ ของเชื้อ <i>L. grayi</i> ATCC 19120 ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid extraction.....	23
4.4 แสดงค่าความไวและความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Listeria</i> ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น	25
4.5 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ ของเชื้อ <i>L. grayi</i> ATCC 19120 ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid extractionในการตรวจสอบฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น.....	33
ข-1 แสดงค่าการตรวจนับเชื้อ <i>Listeria</i> spp.	42
ค-1 แสดงค่าความไวและความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Listeria</i> ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น (In-house database)	44
ค-2 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ของเชื้อ <i>Listeria</i> ในการตรวจสอบฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS.....	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค-3 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ของเชื้อ <i>Listeria</i> spp. ในการตรวจสอบฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS.....	46
ง-1 แสดงภาวะที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นของเชื้อ <i>Listeria</i> spp.	47

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> 4
2.2	การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> ที่มีลักษณะคล้ายรูปทรง 8
2.3	แผนภาพแสดงการตรวจสอบเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> ตามวิธีมาตรฐาน (ISO 11290-1)..... 10
2.4	ลักษณะของเครื่อง MALDI-TOF MS และแผนภาพแสดงหลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS 11
3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลองที่ใช้ในการศึกษา..... 17
4.1	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>L. welshimeri</i> ATCC 35879 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 (A) 24 (B) และ 48 (C) ชั่วโมง 18
4.2	สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ <i>L. welshimeri</i> ATCC 35879 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และเตรียมโปรตีนด้วยวิธี extended direct transfer โดยเลขในวงเล็บหมายถึงค่า log score ที่ได้จากการบ่งชี้ชนิดด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 20
4.3	สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ <i>L. grayi</i> ATCC 19120 ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid extraction เมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเลขในวงเล็บ หมายถึงค่า log score ที่ได้จากการบ่งชี้ชนิดด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 23
4.4	การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle Component Analysis) ของสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูล (In-house database) ของเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> (จุดสีแดง) เชื้อ <i>L. innocua</i> (จุดสีเขียว) เชื้อ <i>L. ivanovii</i> (จุดสีเหลือง) เชื้อ <i>L. welshimeri</i> (จุดสีน้ำเงิน) เชื้อ <i>L. seeligeri</i> (จุดสีเขียวเข้ม) และเชื้อ <i>L. grayi</i> (จุดสีม่วง)..... 26
4.5	MSP Dendrogram เมื่อใช้ MSP ของเชื้อ <i>Listeria</i> spp. จากฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 27
4.6	MSP Dendrogram เมื่อใช้ MSP ของเชื้อ <i>Listeria</i> spp. จากฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น (In-house database)..... 28
ข-1	การเจือจางเชื้อ <i>Listeria</i> spp. ในสารละลายน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 เป็นแบบลำดับส่วน..... 42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

Listeria spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย คือ สามารถเจริญในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง (pH) กว้างคือที่ pH 4.5 ถึง 9 และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 45 องศาเซลเซียส ในปัจจุบัน *Listeria* spp. มีทั้งหมด 17 สปีชีส์ (Orsi และ Wiedmann, 2016) อย่างไรก็ตาม สปีชีส์ที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารที่สำคัญคือ *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค listeriosis สามารถพบการระบาดได้ทั่วโลก โดยผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง ได้แก่ หญิงตั้งครรภ์และทารกในครรภ์ ผู้สูงอายุโดยเฉพาะผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ โดยส่วนใหญ่การติดเชื้อเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *L. monocytogenes* อาการที่สำคัญของโรคคือมีภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteraemia) ซึ่งในหญิงมีครรภ์อาจทำให้เกิดการแท้งหรือทารกแรกคลอดเสียชีวิต หรืออาจทำให้เกิดอาการไม่รุนแรง เช่น มีไข้ ปวดหัว ปวดท้อง ปวดกล้ามเนื้อ ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อ 0.1 ถึง 10 คนต่อประชากร 1,000,000 คนทั่วโลก ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการติดเชื้อค่อนข้างต่ำแต่มีอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อสูง (World Health Organization; WHO, 2018) นอกจากนี้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพบว่ามีในสหภาพยุโรปมีอัตราการติดเชื้อและเสียชีวิตด้วยโรค listeriosis เพิ่มขึ้น ในปี พ.ศ. 2559 พบอัตราการติดเชื้อกว่า 2,536 คน และอัตราการเสียชีวิต 247 คน (European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC, 2018) โดยเชื้อ *L. monocytogenes* สามารถแพร่กระจายได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม มูลสัตว์ น้ำเสีย ดิน แหล่งน้ำ ผัก อาหารสัตว์ อุจจาระของมนุษย์ และผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท โดยเฉพาะในอาหารพร้อมรับประทาน (ready to eat foods) เช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์และอาหารทะเล นมและผลิตภัณฑ์จากนม และผักผลไม้ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาหารแช่เย็นที่ไม่ผ่านการปรุงด้วยความร้อน เนื่องจากเชื้อ *L. monocytogenes* สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิต่ำ และยังสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะแช่แข็งได้ นอกจากนี้สามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อได้ในสิ่งแวดล้อมของโรงงานระหว่างกระบวนการผลิต เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่สามารถเกาะติดกับพื้นผิวหลายชนิดในโรงงาน จึงอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ ดังนั้นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* จึงเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารและกระบวนการผลิตให้มีมาตรฐาน

โรงงานอุตสาหกรรมอาหารต้องมีการจัดการคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารให้สอดคล้องกับกฎระเบียบ ข้อบังคับ ข้อกำหนดหรือมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ เช่น การปฏิบัติตามหลักเกณฑ์และวิธีปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practices; GMP) และมาตรฐานการบริหารจัดการความปลอดภัยของอาหาร โดยอาศัยการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point; HACCP) ซึ่งต้องมีการวิเคราะห์อันตรายและ

ป้องกันความเสี่ยงของอันตราย โดยเชื้อ *L. monocytogenes* อาจทำให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตต่อผู้บริโภคได้ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมอย่างเข้มงวด นอกจากนั้นยังมีการควบคุมทางกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหาร โดยในประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้ระบุว่ามีเชื้อ *L. monocytogenes* ปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์นมพร้อมบริโภคชนิดเหลวที่ผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์ และเนยแข็ง เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดด้านจุลชีววิทยา (Commission regulation (EC) No 2073/2005) ของสหภาพยุโรป ซึ่งต้องไม่มีเชื้อ *L. monocytogenes* ปนเปื้อนในอาหารพร้อมรับประทานหลายชนิด ดังนั้นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* จึงมีความจำเป็นเพื่อเป็นการควบคุมให้ผลิตภัณฑ์อาหารและกระบวนการผลิตมีคุณภาพและได้มาตรฐาน สามารถควบคุมการปนเปื้อนและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อได้ อีกทั้งยังเป็นการป้องกันผลกระทบทางธุรกิจที่จะเกิดขึ้นอีกด้วย

การตรวจสอบและบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยวิธีการดั้งเดิม (conventional methods) คือการนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Listeria* spp. ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้มีหลายขั้นตอน จากนั้นจึงสังเกตลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่มีความจำเพาะแล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม ได้แก่ การทดสอบคาทาเลส (catalase test) การย้อมสีแกรม (gram stain) การทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test) การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis test) การทดสอบ CAMP (Christie, Arkins and Munch-Petersen test) และการทดสอบการใช้น้ำตาล (carbohydrate utilization test) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) อย่างไรก็ตามการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิคเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายต่อการทดสอบสูง ใช้ระยะเวลาในการทดสอบนานในระดับชั่วโมงถึงหลายวัน บางเทคนิคต้องใช้แรงงานและผู้ที่มีทักษะสูง ใช้สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ในการทดสอบจำนวนมาก และอาจบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ได้เพียงระดับสกุล (genus) ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) โดยการใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีชนิด Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight (MALDI-TOF MS) มาใช้ในการตรวจสอบและบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้ง *Listeria* spp.

ในปัจจุบัน MALDI-TOF MS เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจและระบุชนิดของจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งใช้ทั้งด้านการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการวินิจฉัยทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถใช้ตรวจตัวอย่างจุลินทรีย์ในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว มีความน่าเชื่อถือ ต้นทุนต่อการทดสอบแต่ละตัวอย่างต่ำ และการเตรียมตัวอย่างทำได้ง่าย โดยมีการนำเทคนิค MALDI-TOF MS มาใช้ในการตรวจสอบและบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ซึ่งสามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตามการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากจำนวนฐานข้อมูลที่ใช้อ้างอิงกับตัวอย่างยังมีไม่มากพอ ทำให้การบ่งชี้ชนิดขาดความถูกต้องและความน่าเชื่อถือ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อลักษณะของโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. ซึ่งจะส่งผลต่อสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูล และทำการสร้างฐานข้อมูลที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจสอบเชื้อ *Listeria* spp.

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อลักษณะของโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

1.2.2 เพื่อสร้างฐานข้อมูลโปรตีนที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

1.2.3 เพื่อพัฒนาวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจสอบเชื้อ *Listeria* spp. อย่างมีประสิทธิภาพ ในอุตสาหกรรมอาหาร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อลักษณะของโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. และทำการสร้างฐานข้อมูลโปรตีนที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS จากเชื้อ *Listeria* spp. สายพันธุ์อ้างอิงและเชื้อ *Listeria* spp. สายพันธุ์อื่นๆ ที่ทราบสปีชีส์แล้วจากเทคนิคทางชีวโมเลกุล และพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ให้ง่ายและรวดเร็ว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลโปรตีนในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

1.4.2 ทำให้การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *L. monocytogenes* ในอุตสาหกรรมอาหารทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

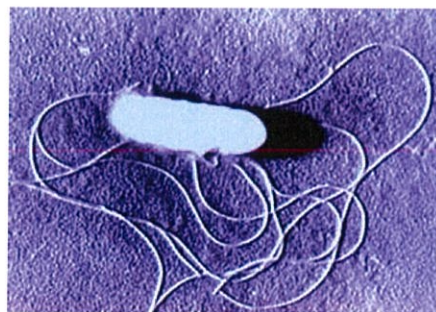
2.1 เชื้อ *Listeria* spp.

2.1.1 ประวัติ

Murray และคณะ รายงานถึงเชื้อ *Listeria* เป็นครั้งแรกในปี 1926 โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคระบาดและการตายในกระต่าย ในปี 1924 และตั้งชื่อจุลินทรีย์นั้นว่า *Bacterium monocytogenes* ขณะเดียวกัน Pirie พบจุลินทรีย์ชนิดใหม่ในปี 1927 และตั้งชื่อว่า *Listerella hepatolytica* ต่อมาพบว่าจุลินทรีย์ที่ค้นพบทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกัน และให้ชื่อใหม่ว่า *Listerella monocytogenes* และเปลี่ยนเป็น *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ในเวลาต่อมา (Ryser และคณะ, 2007)

2.1.2 ลักษณะและการจัดจำแนกเชื้อ

เชื้อ *Listeria* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล สามารถเคลื่อนที่ได้ที่อุณหภูมิประมาณ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส ด้วย peritrichous flagella แสดงดังรูปที่ 2.1 สามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilms) ได้ และสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย คือสามารถเจริญในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงคือที่เกลือความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% NaCl) หรือสูงกว่า เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง (pH) กว้างคือที่ pH 4.5 ถึง 9 และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Ryser และคณะ, 2007) ในปัจจุบัน *Listeria* spp. มีทั้งหมด 17 สปีชีส์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* และ *L. booriae* (Orsi และ Wiedmann, 2016) อย่างไรก็ตามบางสปีชีส์เท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ และในสัตว์ สปีชีส์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคได้แก่ *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua* และ *L. grayi* (Public Health England, 2016) ซึ่งสปีชีส์ที่สำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ได้แก่ *L. monocytogenes* ซึ่งจำแนกอยู่ในเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนและสัตว์ที่มีความเสี่ยงระดับ 2 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557)



รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ *Listeria monocytogenes*

(ที่มา : <http://blog.nelsonjameson.com/listeria-vs-the-dairy-industry>)

2.1.3 โรค listeriosis

2.1.3.1 ลักษณะอาการ

โรค listeriosis เป็นโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ (foodborne disease) ที่มีความสำคัญโรคหนึ่ง เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้แก่เชื้อ *L. monocytogenes* โดยผู้ที่ติดเชื้อจะแสดงอาการของโรคตั้งแต่ 1 ถึง 4 สัปดาห์ หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไปและในบางรายอาจนานถึง 70 วัน กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการป่วยจากการติดเชื้อ ได้แก่ สตรีมีครรภ์และทารกในครรภ์ ผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 65 ปี และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็ง เบาหวาน ผู้ป่วยโรคตับหรือไต ผู้ที่มีอาการติดแอลกอฮอล์ (alcoholism) รวมทั้งผู้ที่ติดเชื้อ HIV อาการที่สำคัญของโรคคือ ภาวะโลหิตเป็นพิษ (bacteraemia) และภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดอาการอื่นๆ ได้แก่ มีไข้ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ และอาจมีอาการทางกระเพาะและลำไส้ เช่น คลื่นไส้และท้องร่วง ในรายที่เป็นมากอาจมีอาการหมดสติ หากการติดเชื้อแพร่ไปถึงระบบประสาทส่วนกลาง อาจมีอาการ เช่น ปวดศีรษะ เมื่อยคอ มึนงง เสียการทรงตัว ชักและเข้าชั้นโคมา นอกจากนี้ประมาณ 1 ใน 3 ของคนไข้เหล่านี้จะถึงขั้นเสียชีวิต การติดเชื้อในระหว่างตั้งครรภ์สามารถทำให้แท้งบุตร ทารกตายในครรภ์หรือทารกติดเชื้อด้วยได้ (Centers for Disease Control and Prevention; CDC, 2017)

2.1.3.2 การแพร่กระจายและการระบาดของโรค

เชื้อ *L. monocytogenes* สามารถพบการกระจายได้ทั่วไปในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสีย ดิน แหล่งน้ำ มูลสัตว์ และสามารถปนเปื้อนในอาหารได้ โดยเฉพาะอาหารพร้อมรับประทานและผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง เช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์และอาหารทะเล ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์หมัก เช่น ไส้กรอก นมและผลิตภัณฑ์จากนม เช่น ชีส และผักผลไม้ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาหารแช่เย็นที่ไม่ผ่านการปรุงด้วยความร้อน

การติดเชื้อของผู้ที่ป่วยด้วยโรค listeriosis มีประมาณ 0.1 ถึง 10 รายต่อประชากร 1 ล้านคนต่อปี ขึ้นอยู่กับประเทศและภูมิภาคต่างๆ ของโลก (WHO, 2018) อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อมีอัตราการเสียชีวิตสูงกว่าโรคที่เกิดจากอาหารอื่นๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา การติดเชื้อ *L. monocytogenes* เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน จุลินทรีย์ โดยมีผู้ติดเชื้อประมาณ 1,600 คน และเสียชีวิตประมาณ 260 คน ในแต่ละปี (CDC, 2017) นอกจากนี้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพบว่ามีในสหภาพยุโรปมีอัตราการติดเชื้อและเสียชีวิตด้วยโรค listeriosis เพิ่มขึ้น ในปี พ.ศ. 2559 พบอัตราการติดเชื้อกว่า 2,536 คน และอัตราการเสียชีวิต 247 คน ซึ่งการเพิ่มขึ้นของโรค listeriosis ที่เป็นที่น่ากังวลอย่างยิ่ง เพราะการติดเชื้อส่วนใหญ่มาจากอาหารปรุงสำเร็จ และอาจนำไปสู่การเสียชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ (ECDC, 2018)

2.1.3.3 การป้องกันและการรักษา

การป้องกันการติดเชื้อ *L. monocytogenes* ที่สำคัญคือการรับประทานอาหารที่สะอาดและปรุงสุก เนื่องจากเชื้อ *L. monocytogenes* สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส (European Food Safety Authority; EFSA, 2018) โดยเฉพาะผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อควรหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน

อาหารดิบ หรือผักผลไม้ที่ไม่สะอาด นอกจากนั้นการรักษาผู้ที่ติดเชื้อทำได้โดยการให้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม ampicillin หรืออาจใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น gentamycin (Bartlett, 2016)

2.1.4 การควบคุมเชื้อ *L. monocytogenes* ในอุตสาหกรรมอาหาร

เชื้อ *L. monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารที่สำคัญ ซึ่งนอกจากจะส่งผลทางด้านสาธารณสุขแล้ว ยังส่งผลให้เกิดผลกระทบทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในขั้นตอนการผลิตอาหาร การเรียกคั้นอาหาร และการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *L. monocytogenes* การตรวจเชื้อ *Listeria* spp. และเชื้อ *L. monocytogenes* ในวัตถุดิบในสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิตและในผลิตภัณฑ์อาหารจึงมีความสำคัญและมีความจำเป็น ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดความเสียหายเหล่านี้สำหรับผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมอาหารและผู้บริโภคได้ ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารที่ผลิต โดยต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์และวิธีปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) เพื่อป้องกันผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากการปนเปื้อนของอันตรายโดยเฉพาะจากจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร นอกจากนั้นยังมีมาตรฐานการบริหารจัดการความปลอดภัยของอาหาร โดยอาศัยการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (HACCP) ซึ่งเป็นระบบการป้องกันและควบคุมอันตรายที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตจนถึงการจำหน่ายไปยังผู้บริโภค ซึ่งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต้องมีการจัดการคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารให้สอดคล้องกับกฎระเบียบ ข้อบังคับ ข้อกำหนด เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีมาตรฐาน (วรารุณี, 2558)

2.1.4.1 กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเชื้อ *L. monocytogenes*

ประเทศไทยได้ออกกฎหมายเพื่อให้ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานอาหารเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่ตรวจพบได้ในอาหารแต่ละชนิดสอดคล้องตามหลักสากล (โคเด็กซ์) ตามกระบวนการผลิตอาหารและนอกจากนั้นยังเป็นการคุ้มครองความปลอดภัยผู้บริโภค สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ. 2556 เรื่องมาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดยกำหนดให้ต้องไม่พบเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหารหลายชนิด (กระทรวงสาธารณสุข, 2556) แสดงดังตารางที่ 2.1 ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดด้านจุลชีววิทยา (Commission regulation (EC) No 2073/2005) ของสหภาพยุโรป และข้อกำหนดเรื่องการควบคุมปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหารสำเร็จรูปพร้อมบริโภคแช่เย็นหรือแช่แข็ง (Guidance for Industry Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods) ของประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งกำหนดให้ต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับประทาน อาหารสำเร็จรูปที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. monocytogenes* ได้แก่ นมที่มีไขมันสูง เช่น เนยเหลวและครีม เนยแข็ง เช่น cottage cheese และ ricotta cheese กุ้งและปูต้มสุก กะหล่ำปลีและเมลอน อาหารทะเลรมควัน สลัดและแซนวิชที่มีส่วนผสมของอาหารทะเล และอาหารสำเร็จรูปที่มีความเสี่ยงต่ำต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. monocytogenes* ได้แก่ อาหารที่มี pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.4 อาหารที่มีน้ำอิสระ (water activity) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.92 และอาหารแช่แข็ง (สถาบันอาหาร, 2551)

ตารางที่ 2.1 แสดงผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องไม่พบเชื้อ *L. monocytogenes* ตามปริมาณที่กำหนด

	ผลิตภัณฑ์	ปริมาณที่กำหนด
ผลิตภัณฑ์นมพร้อมบริโภคชนิดเหลวที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์	นมโค	ไม่พบใน 25 มิลลิลิตร
	นมปรุงแต่ง	
เนยแข็ง	ผลิตภัณฑ์ของนม	ไม่พบใน 25 กรัม
	ที่มี $a_w \geq 0.9$	
	ที่มี a_w ระหว่าง 0.82-0.9 ที่มี $a_w \leq 0.82$	
ครีม	ครีมที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์	ไม่พบใน 25 กรัม
ไอศกรีม	ไอศกรีมนม ไอศกรีมดัดแปลง ไอศกรีมผสม ไอศกรีมนม ไอศกรีมดัดแปลง ไอศกรีมผสม (ชนิดเหลวที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์ และชนิดผงหรือแห้ง)	ไม่พบใน 25 กรัม
ผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภคชนิดเหลวที่มี pH ≥ 4.3 เฉพาะที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์	เครื่องดื่ม	ไม่พบใน 25 มิลลิลิตร (เฉพาะที่ใส่นม)
	ชา	
	กาแฟ	
	น้ำนมถั่วเหลือง	
เครื่องดื่มชนิดเข้มข้นหรือชนิดแห้ง	เครื่องดื่มชนิดเข้มข้นที่ใส่นม	ไม่พบใน 25 กรัม
อาหารดิบ	เนื้อสัตว์สดของสัตว์น้ำ แช่เย็นหรือแช่แข็ง	ไม่พบใน 25 กรัม
	ผัก ผลไม้ สลัด ส้มตำ	ไม่พบใน 25 กรัม (เฉพาะผักหรือที่มีผักเป็นองค์ประกอบ)
อาหารพร้อมบริโภค	อาหารทะเล เช่น ปลา กุ้ง หมึก หอย ซาชิมิ อาหารปรุงสุกทั่วไป เช่น อาหารปรุงสำเร็จ (ประเภทข้าวแกง ก๋วยเตี๋ยว ขนมจีน) ยำ ไส้กรอก หมูยอ ปูอัด ปลาหมึกปรุงรส ซูชิ	ไม่พบใน 25 กรัม

(ที่มา : ดัดแปลงจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค, 2556)

2.1.5 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria*

เชื้อ *Listeria* สามารถบ่งชี้ชนิดได้ในระดับสปีชีส์ด้วยการใช้การทดสอบหลายชนิดรวมกัน โดยวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ และการทดสอบทางชีวเคมี แสดงดังตารางที่ 2.2 โดยการย้อมสีแกรม (gram stain) การทดสอบคาทาเลส (catalase test) การทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test) การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis test) การทดสอบ CAMP (Christie, Arkins and Munch-Petersen test) และการทดสอบการใช้น้ำตาล (carbohydrate utilization test) (Gasanov และคณะ, 2005) ซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *L. monocytogenes* ตามวิธีมาตรฐาน (ISO 11290-1) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ เพื่อใช้ในการตรวจสอบและบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ได้แก่ เทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีการนำมาใช้ทั้งในการตรวจสอบการปนเปื้อนของอาหารรวมถึงใช้ในการวินิจฉัยทางการแพทย์ (Allerberger, 2003)

2.1.5.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* ตามวิธีมาตรฐาน

วิธีมาตรฐาน ISO 11290-1 เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Listeria* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *L. monocytogenes* โดยขั้นตอนการตรวจสอบมีดังนี้ ใส่ตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Half Fraser broth บ่มตามระยะเวลา แล้วเปลี่ยนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser broth จากนั้นแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM หรือ Oxford Agar (OA) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser broth เมื่อบ่มตามที่กำหนดแล้วทำการแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งดังกล่าวเช่นกัน เลือกลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Listeria* spp. โดยนำมาทำการแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA ซึ่งเป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง จากนั้นทดสอบทางชีวเคมีโดยทำการทดสอบคาทาเลส จะให้ผลบวก โดยเกิดฟองก๊าซ การทดสอบการเคลื่อนที่โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบบร่มกาง (umbrella-like) แสดงดังรูปที่ 2.2 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงให้ผลบวก โดยเกิดโซนใสรอบโคโลนี (β -hemolysis) การทดสอบการใช้น้ำตาล rhamnose น้ำตาล mannitol และน้ำตาล xylose โดยจะให้ผลบวกต่อน้ำตาล rhamnose โดยทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น และเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและการทดสอบ CAMP อ่านผลโดยดูการเสริมฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (β -hemolysis) ในกรณีเสริมฤทธิ์กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Rhodococcus equi* (รัชฎาพร และดวงดาว, 2559) แสดงดังรูปที่ 2.3



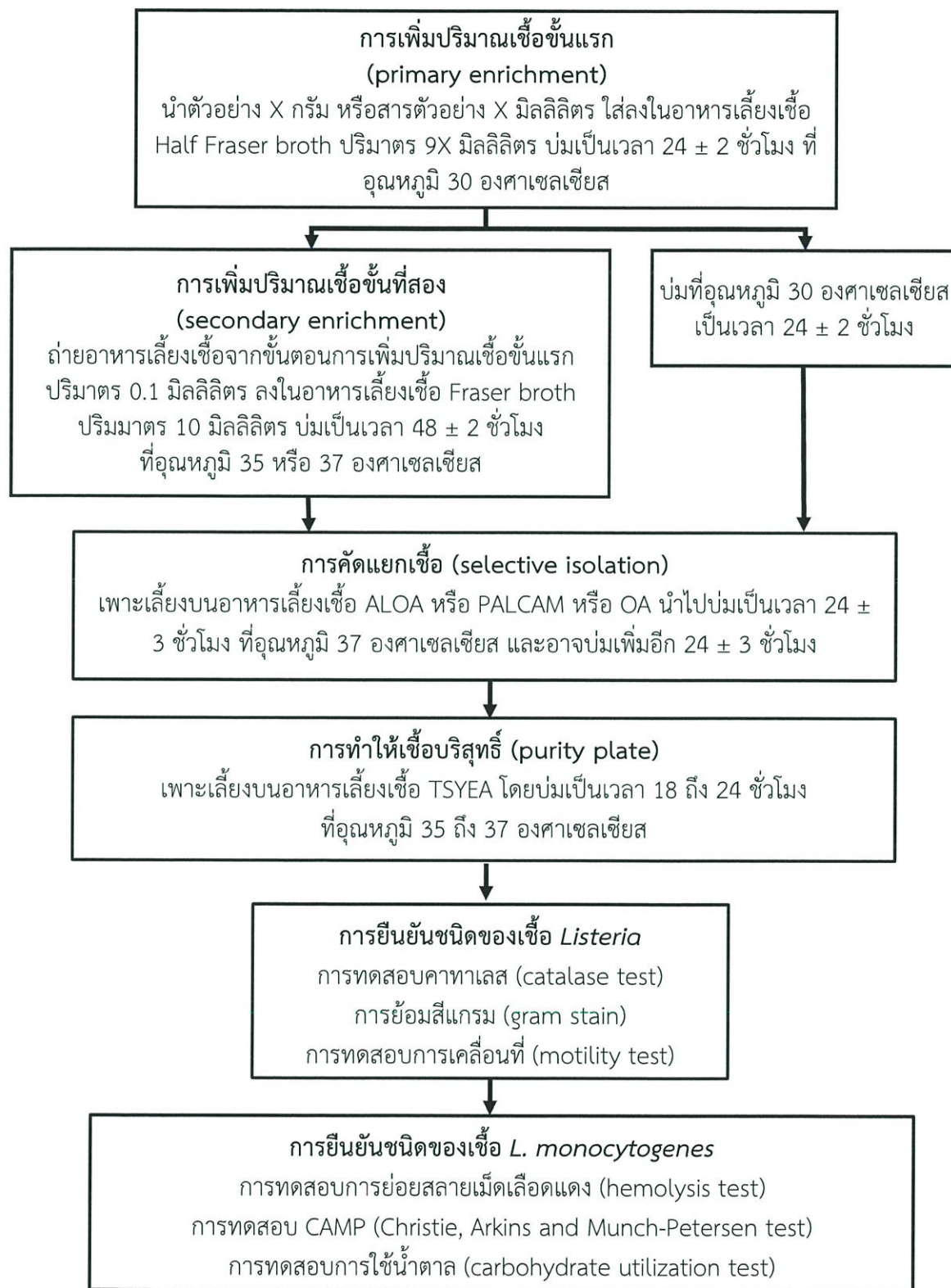
รูปที่ 2.2 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่มีลักษณะคล้ายรูปร่มกาง (ที่มา : http://people.uepi.ca/jlewis/html/lab_4_coryne-_mycobacterium.html)

ตารางที่ 2.2 แสดงผลการทดสอบที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria*

การทดสอบ	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>	
Hemolysis	+	-	+	+	-	-	
Catalase	+	+	+	+	+	+	
Oxidase	-	-	-	-	-	-	
การใช้น้ำตาล	L-Rhamnose	+	+/-	-	-	+/-	+/-
	D-Mannitol	-	-	-	-	-	+
	D-Xylose	-	-	+	+	+	-
	α -Methyl-Mannoside	+	+	-	-	+	+
CAMP	<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>R. equi</i>	+	-	+	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง ให้ผลบวก
 - หมายถึง ให้ผลลบ
 +/- หมายถึง ให้ผลบวกหรือผลลบ

(ที่มา : Goldman และ Green, 2009)



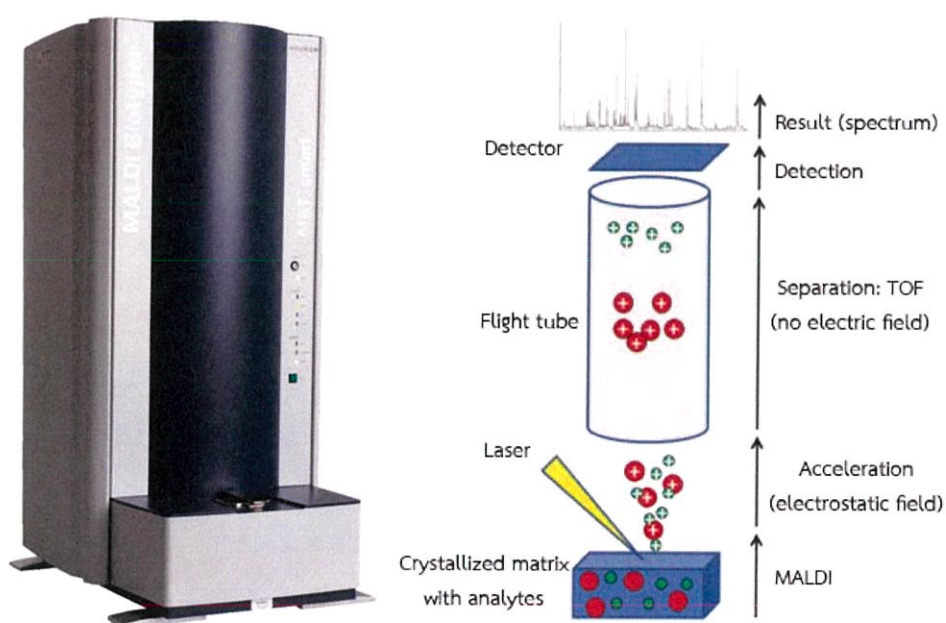
รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงการตรวจสอบเชื้อ *L. monocytogenes* ตามวิธีมาตรฐาน (ISO 11290-1)
หมายเหตุ : X หมายถึง ปริมาณของตัวอย่าง

2.2 เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีชนิด Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight (MALDI-TOF MS)

2.2.1 หลักการและวิธีการใช้งาน

เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีชนิด Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight (MALDI-TOF MS) เป็นการใช้เครื่องแมสสเปกโตรเมเตอร์ (mass spectrometer) ชนิดหนึ่งที่นิยมกันในปัจจุบัน โดยแมสสเปกโตรเมเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มวลหรือน้ำหนักของสาร โดย MALDI-TOF MS เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล (biomolecules) เช่น โปรตีน ไขมัน น้ำตาล รวมถึงสารพันธุกรรม โดยเป็นเทคนิคทำให้สารเกิดไอออนไนเซชัน (ionization) หรือ แยกตัวเป็นไอออน

การทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS เริ่มจากการนำสารตัวอย่างผสมกับสารเมทริกซ์ (matrix) ซึ่งเป็นสารที่ดูดซับพลังงาน สารตัวอย่างจะเกิดเป็นผลึก (co-crystallization) ร่วมกับสารเมทริกซ์ ซึ่งทำหน้าที่ในการเป็นตัวกลางถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ (laser) ไปยังสารตัวอย่าง พลังงานจากเลเซอร์จะทำให้สารตัวอย่างและสารเมทริกซ์แยกตัวเป็นไอออน จากนั้นไอออนจะผ่านเข้าสู่ห้องสุญญากาศ และวิเคราะห์มวลสารด้วย mass analyzer ชนิด time-of-flight (TOF) หรือ TOF mass analyzer โดยขนาดของไอออนจะแยกกันใน TOF mass analyzer ตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) ซึ่งอัตราส่วนมวลต่อประจุวัดโดยเวลาที่ไอออนเดินทางในห้องสุญญากาศดังกล่าวไปยังตัวตรวจจับ (detector) โดยไอออนที่มีมวลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีมวลมาก จึงเดินทางไปยังตัวรับได้เร็วกว่า ทำให้สามารถคำนวณระยะเวลาที่ตัวอย่างเคลื่อนที่และบอกขนาดมวลสารได้ ซึ่งทำให้ได้ผลลัพธ์เป็นแมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของสารตัวอย่าง (Singhal และคณะ, 2015) แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ลักษณะของเครื่อง MALDI-TOF MS และแผนภาพแสดงหลักการการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS

(ที่มา : <http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/bruker-recibe-la-aprobacion-de-lacfd-para-comercializar-el-sistema-ivd-maldi-bioper-en-china/> และ <https://www.bcdiagnostics.com/products/instruments/maldi-tof-ms/>)

2.2.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์

การระบุชนิดของจุลินทรีย์ในอดีตใช้เวลาประมาณ 2 ถึง 3 วัน และมีหลายกระบวนการ เช่น การเพาะเชื้อ การย้อมสีแกรม การทดสอบทางชีวเคมี เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ที่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนสำหรับใช้ในการระบุชนิดเชื้อได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว โดยวิเคราะห์โปรตีนขนาดเล็กที่คาดว่าเป็นคุณสมบัติของเชื้อแต่ละชนิดด้วยเครื่อง MALDI-TOF ผลที่ได้จะแสดงเป็นลักษณะโปรตีน (protein profile) ข้อมูลทั้งหมดของเชื้อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมและเทียบกับข้อมูลของเชื้อมาตรฐาน (reference spectra strains) หากข้อมูลตรงกันก็สามารถทราบชนิดของเชื้อได้ เรียกเทคนิคนี้ว่า MALDI-biolyser ข้อดีคือการแยกชนิดเชื้อมีความจำเพาะสูง ใช้ปริมาณเชื้อในการวิเคราะห์น้อย ทำได้ง่ายและรวดเร็ว (ศิริพร และคณะ, 2555)

การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเนื่องจากความสามารถในการทำซ้ำ และความไวของการวิเคราะห์ ข้อได้เปรียบของ MALDI-TOF เมื่อเทียบกับวิธีการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยวิธีอื่น คือสามารถวิเคราะห์ผลได้ภายในเวลาอันรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ได้ทั้งทางการแพทย์และในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นความรวดเร็วและความง่ายในการเตรียมตัวอย่าง รวมถึงค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนต่อตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ทำให้เทคนิคนี้เหมาะสำหรับกรวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณมากและใช้งานเป็นประจำ (Public Health England, 2014)

Barbuddhe และคณะ (2008) ทำการศึกษาการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยใช้เชื้อ *Listeria* spp. จำนวน 6 สปีชีส์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* และ *L. grayi* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาข้ามคืน และทำการเตรียมโปรตีนในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction พบว่าสามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ได้ในระดับสปีชีส์และระดับสายพันธุ์

Thouvenot และคณะ (2018) ทำการศึกษาการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ที่มีการแพร่ระบาดด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และทำการเตรียมโปรตีนในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction พบว่า การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* และ *L. welshimeri* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS มีความถูกต้องร้อยละ 100 อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มจำนวนฐานข้อมูลจำเป็นต่อความถูกต้องต่อการบ่งชี้ชนิดด้วยเทคนิคดังกล่าว

Jadhav และคณะ (2015) ทำการศึกษาการบ่งชี้ชนิดและแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. monocytogenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) อาหารเลี้ยงเชื้อ Horse Blood Agar (HBA) อาหารเลี้ยงเชื้อ Oxford Agar (OA) อาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM และอาหารเลี้ยงเชื้อ Agar *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA) โดยทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบที่เรียมีผลต่อสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ และจะส่งผลต่อความถูกต้องในการบ่งชี้ชนิดของ

เชื้อแบคทีเรีย โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA และอาหารเลี้ยงเชื้อ HBA ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงให้ความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดมากที่สุด

Schulthess และคณะ (2014) ทำการศึกษาการพัฒนาและประเมินผลของระบบ MALDI-biolyser ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง จำนวน 64 สปีชีส์ โดยศึกษาการเตรียมโปรตีน 3 วิธี ได้แก่ วิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid พบว่าวิธี ethanol/formic acid extraction ให้ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุดและสามารถเก็บสเปกตรัมได้ทุกครั้ง ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธี ethanol/formic acid extraction ในการสร้างฐานข้อมูลของเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อทำการสร้างฐานข้อมูลและตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลแล้วพบว่า การบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.1.1 Autoclave (TOMY digital biology, Japan)
- 3.1.2 Automatic pipette (Eppendorf, Germany)
- 3.1.3 Balance (METTLER TOLEDO, USA)
- 3.1.4 Biological safety cabinet class II (NuAire, USA)
- 3.1.5 Centrifuge (Eppendorf, Germany)
- 3.1.6 Incubator (Memmert, Germany)
- 3.1.7 Infrared Micro-Sterilizer (Hercuvan lab systems, Malaysia)
- 3.1.8 Inoculation loop ขนาดมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร (ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์, ประเทศไทย)
- 3.1.9 Laboratory Bottle (Duran, Germany)
- 3.1.10 Mass spectrometer ชนิด MALDI-TOF รุ่น Autoflex Speed TOF/TOF MS System (Bruker Daltonik, Germany)
- 3.1.11 MTP 384 polished steel target (Bruker Daltonik, Germany)
- 3.1.12 MTP target frame III (Bruker Daltonik, Germany)
- 3.1.13 Petri dishes ขนาด 90x15 มิลลิเมตร (Biologix, USA)
- 3.1.14 Spatula
- 3.1.15 Tip
- 3.1.16 Toothpicks
- 3.1.17 Tube ขนาด 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3.1.18 Vortex (Scientific Industries, USA)
- 3.1.19 Weighing boat

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth, Lennox (Becton Dickinson, USA)
- 3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth (Merck, Germany)
- 3.2.3 Acetonitrile (Honeywell, USA)
- 3.2.4 Bacterial Test Standard (Bruker Daltonik, Germany)
- 3.2.5 Bacteriological agar (Oxoid, UK)
- 3.2.6 Bruker matrix HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) (Bruker Daltonik, Germany)
- 3.2.7 Ethanol (Merck, Germany)
- 3.2.8 Formic acid (Honeywell, USA)
- 3.2.9 Glycerol (Merck, Germany)

- 3.2.10 Standard solution ที่ใช้สำหรับเทคนิค Mass spectrometry (50% acetonitrile, 47.5% water, 2.5% trifluoroacetic acid; Fluka, Germany)
- 3.2.11 Ultrapure sterile water
- 3.2.12 Yeast extract (Oxoid, UK)

3.3 สายพันธุ์แบคทีเรีย

เชื้อ *Listeria* ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* และ *L. grayi* โดยเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิงจาก American Type Culture Collection (ATCC) 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090, *L. seeligeri* ATCC 35967, *L. welshimeri* ATCC 35897, *L. ivanovii* ATCC 19119 และ *L. grayi* ATCC 19120 และเชื้อ *Listeria* สายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ *L. monocytogenes* (n=4) และ *L. innocua* (n=4) ที่ได้รับการยืนยันสปีชีส์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล สำหรับใช้ในการสร้างฐานข้อมูลและการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูล

3.4 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *Listeria* ทุกสายพันธุ์จะเก็บใน glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Broth (TSYEB) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.5 การหาภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

3.5.1 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อที่เก็บใน glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEB มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA) โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 24 และ 48 ชั่วโมง

3.5.2 การเตรียมโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS

3.5.2.1 วิธี direct transfer (Bruker Daltonik, Germany)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Listeria* spp. มาป้ายและเขียนบนพื้นที่วงกลมบน MTP 384 polished steel target จากนั้นนำสารละลายเมทริกซ์ HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน standard solution (acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 50 และกรด trifluoroacetic ความเข้มข้นร้อยละ 2.5) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาหยดลงบนเชื้อแบคทีเรียและปล่อยให้แห้งก่อนนำไปวิเคราะห์

3.5.2.2 วิธี extended direct transfer (Bruker Daltonik, Germany)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Listeria* spp. มาป้ายและเขียนบนพื้นที่วงกลมบน MTP 384 polished steel target จากนั้นนำกรด formic ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาหยดลงบนเชื้อแบคทีเรียปล่อยให้แห้ง ตามด้วยสารละลายเมทริกซ์ HCCA เหมือนวิธี direct transfer และปล่อยให้แห้งก่อนนำไปวิเคราะห์

3.5.2.3 วิธี ethanol/formic acid extraction (Bruker Daltonik, Germany)

เชื้อโคโลนิของเชื้อด้วยเข็มเชื้อแบบห่วง (inoculation loop) ขนาดมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ให้ได้เชื้อปริมาณ 1 ห่วง (ประมาณ 10 ไมโครกรัม) แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (resuspend) ในน้ำปลอดเชื้อ (ultrapure sterile water) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งแล้วใช้ automatic pipette ดูดส่วนใสออกให้หมด จากนั้นเปิดฝาหลอดทดลองแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้ ethanol ระเหยออกให้หมด จากนั้นเติมกรด formic ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย automatic pipette เติม acetonitrile 50 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย automatic pipette นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนใส 1 ไมโครลิตร มาหยดลงบน MTP 384 polished steel target ปล่อยให้แห้งและตามด้วยสารละลายเมทริกซ์ HCCA เหมือนวิธี direct transfer และปล่อยให้แห้งก่อนนำไปวิเคราะห์

3.6 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

3.6.1 การสร้างฐานข้อมูลโปรตีน (In-house database)

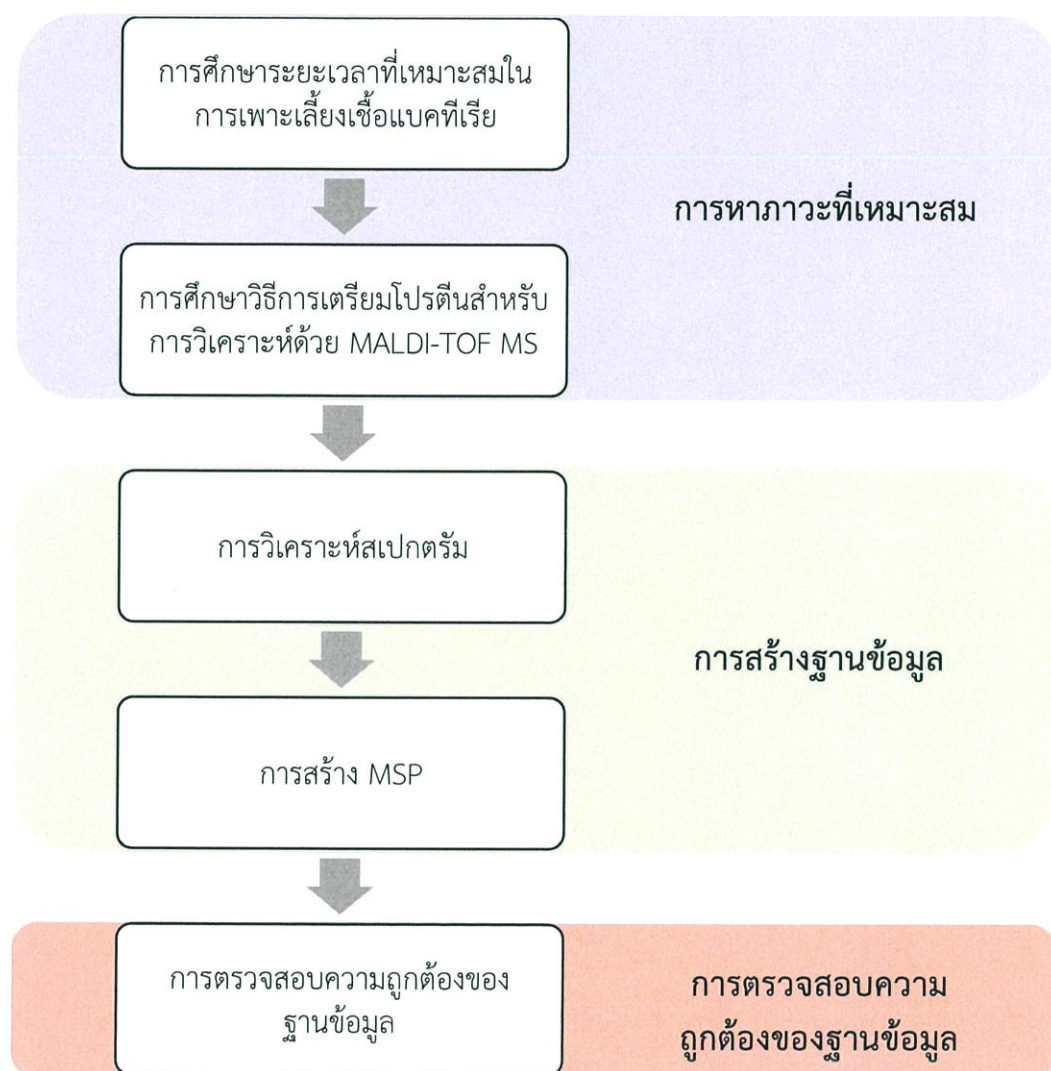
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS จะใช้เครื่อง mass spectrometer รุ่น Autoflex Speed TOF/TOF MS System (Bruker Daltonik, Germany) ในการวิเคราะห์เชื้อ *Listeria* ทุกสายพันธุ์ โดยในการสร้างฐานข้อมูลจะเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่เหมาะสมในขั้นตอน 3.5 โดยก่อนการวิเคราะห์แต่ละครั้งจะทำการเทียบวัดเครื่องมือ (calibration) ด้วย Bacterial Test Standard (BTS) จากนั้นทำการวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper RTC version 3.1 (Bruker Daltonik, Germany) โดยใช้ฐานข้อมูล Biotyper database version DB4613 (Bruker Daltonik, USA) บันทึกสเปกตรัมที่ได้แบบอัตโนมัติด้วยซอฟต์แวร์ flexControl version 3.4 (Bruker Daltonik, Germany) โดยใช้ linear positive mode ที่ความถี่ของเลเซอร์ 1,000 ครั้งต่อวินาที (Hertz) วัดขนาดของมวลในช่วง 2,000 ถึง 20,000 ดาลตัน (Dalton) และแต่ละสเปกตรัม (spectrum) จะเกิดจากการยิงเลเซอร์ 1,200 ช็อต (shot) โดยยิงครั้งละ 200 ช็อต จาก 6 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์ทำการวิเคราะห์ 24 ชั่วโมง โดยการหยดลงบน MTP 384 polished steel target จำนวน 24 ตำแหน่ง ซึ่งจะได้สเปกตรัมจำนวน 24 สเปกตรัมต่อสายพันธุ์ จากนั้นนำสเปกตรัมที่ได้มาวิเคราะห์หาสเปกตรัมที่มีลักษณะใกล้เคียงกันจำนวน 20 สเปกตรัม แล้วใช้ซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 ในการสร้าง Main Spectrum Profile (MSP) ซึ่ง MSP จะใช้เป็นสเปกตรัมอ้างอิงในฐานข้อมูล

3.6.2 การตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลโปรตีน (In-house database)

นำสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูลของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 20 สเปกตรัมมาใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูล โดยทำการวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 (Bruker Daltonik, Germany) 2 แบบ คือ ใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 (Bruker Daltonik, USA) และใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น ซึ่งขั้นตอนที่ใช้ในการศึกษาแสดงดังรูปที่ 3.1

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle Component Analysis; PCA) ด้วยซอฟต์แวร์ ClinProTools version 3.0 (Bruker Daltonik, Germany)



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้

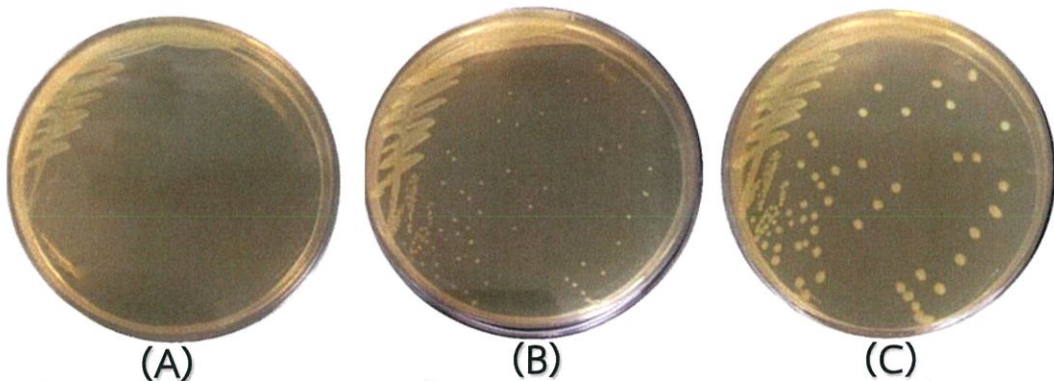
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การหาภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ *Listeria* spp.

4.1.1 การทดสอบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์หลังจากขั้นตอน pre-enrichment และ selective isolation ในการแยกและตรวจหาเชื้อ *Listeria* จากอาหารด้วยวิธีมาตรฐานตามหลักการของ International Organization for Standardization หรือ ISO 11290-1 โดยทำการบ่มเชื้อ *Listeria* ทั้ง 6 สปีชีส์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.1A จะได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อลักษณะเป็นจุดขนาดประมาณ 0.5 ถึง 1 มิลลิเมตร สังเกตเห็นได้ยากและมีขนาดเล็ก ไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ทดลอง เมื่อบ่มเชื้อต่อไปจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง สามารถสังเกตลักษณะของโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น โดยโคโลนีมีลักษณะนูนต่ำ รูปร่างกลม สีขาวเหลือง มีขนาดประมาณ 1 ถึง 1.5 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.1B จากนั้นบ่มเชื้อต่อไปจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีที่ได้จะมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดประมาณ 1.5 ถึง 5 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1C



รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. welshimeri* ATCC 35879 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 (A) 24 (B) และ 48 (C) ชั่วโมง

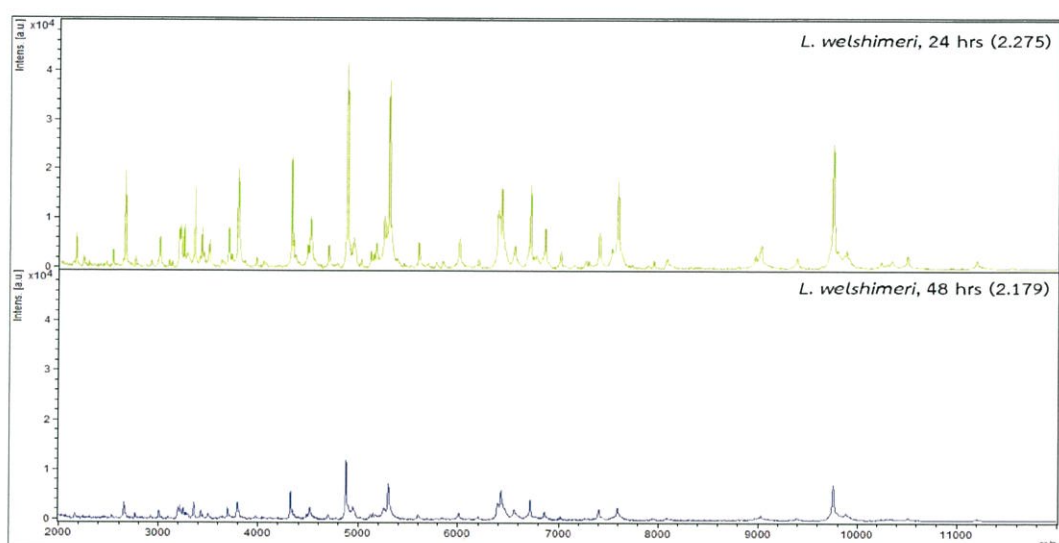
เมื่อทราบลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Listeria* ทั้ง 6 สปีชีส์ นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *L. welshimeri* ATCC 35879 ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาเตรียมโปรตีนด้วยวิธี extended direct transfer ซึ่งเป็นวิธีที่แนะนำโดย Bruker Daltonik ในการเตรียมโปรตีนเพื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ พบว่าลักษณะโปรตีน (protein profile) หรือแมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเชื้อที่บ่มเป็น

ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนพีก (peak) ของโปรตีนมากกว่า โดยเฉพาะในช่วงโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ คือประมาณ 8,500 ถึง 11,500 ดาลตัน (Dalton) รวมทั้งมี Intensity สูงกว่าโปรตีนของเชื้อที่บ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.2 นอกจากนี้ยังพบว่าความถูกต้องในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ของเชื้อ *L. welshimeri* ATCC 35879 ที่บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับร้อยละ 80 อย่างไรก็ตามช่วงคะแนนความเชื่อมั่นในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS หรือค่า log score จากเชื้อที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า 1.937 ถึง 2.275 ซึ่งสูงกว่าเชื้อที่บ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่มีค่าเท่ากับ 1.741 ถึง 2.179 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 อย่างไรก็ตามช่วงคะแนนดังกล่าวเป็นคะแนนในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความน่าเชื่อถือในระดับสกุล (genus) เท่านั้น ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 4.2 โดยสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Jadhav และคณะ (2015) ซึ่งทำการศึกษาการบ่งชี้ชนิดและแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. monocytogenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) อาหารเลี้ยงเชื้อ Horse Blood Agar (HBA) อาหารเลี้ยงเชื้อ Oxford Agar (OA) อาหารเลี้ยงเชื้อ PALCAM และอาหารเลี้ยงเชื้อ Agar *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA) โดยทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer และใช้สารละลายเมทริกซ์ HCCA พบว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าร้อยละของตัวอย่างในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความน่าเชื่อถือในระดับสกุล รวมถึงในระดับสปีชีส์สูงกว่าเชื้อที่บ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และการบ่งชี้ชนิดของตัวอย่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA และอาหารเลี้ยงเชื้อ HBA มีความน่าเชื่อถือในระดับสปีชีส์ถึงร้อยละ 91 และร้อยละ 89 เพื่อให้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือรวมทั้งมีความรวดเร็วมากที่สุด จึงเลือกใช้เชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA และอาหารเลี้ยงเชื้อ HBA ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในการบ่งชี้ชนิดและแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes*

ตารางที่ 4.1 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ของเชื้อ *L. welshimeri* ATCC 35879 ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	ค่า log score	ความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ (ร้อยละ)			บ่งชี้ชนิดไม่ถูกต้อง (ร้อยละ)	ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ (ร้อยละ)
		ความน่าจะเป็นในระดับสกุล	ระดับสกุล	ระดับสปีชีส์		
24 (n=5)	1.937 - 2.275	1 (20)	4 (80)	0	0	0
48 (n=5)	1.741 - 2.179	2 (40)	3 (60)	0	0	0

การเปลี่ยนแปลงภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อรวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่งผลต่อคุณภาพและความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของลักษณะโปรตีนหรือสเปกตรัม ซึ่งความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของสเปกตรัมจะส่งผลต่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ ชนิดของจุลินทรีย์ (Goldstein และคณะ, 2013 ; Williams และคณะ, 2003) ดังนั้นเชื้อ *Listeria* spp. ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการสร้างฐานข้อมูลโปรตีนในการศึกษา เนื่องจากระยะเวลาดังกล่าวเป็นระยะเวลาที่รวดเร็วที่สุดที่ทำให้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Listeria* มีขนาดใหญ่พอที่จะนำไปทดลองได้ รวมทั้งลักษณะโปรตีนของเชื้อที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีคุณภาพดีกว่าเชื้อที่บ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ *L. welshimeri* ATCC 35879 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และเตรียมโปรตีนด้วยวิธี extended direct transfer โดยเลขในวงเล็บหมายถึงค่า log score ที่ได้จากการบ่งชี้ชนิดด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613

ตารางที่ 4.2 แสดงความหมายของช่วงคะแนนที่ได้จากการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1

ช่วงคะแนน	คำอธิบาย
2.300 – 3.000	การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์มีความน่าเชื่อถืออย่างสูงในระดับสปีชีส์
2.000 – 2.299	การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์มีความน่าเชื่อถือในระดับสกุล หรือมีความน่าจะเป็นในระดับสปีชีส์
1.700 – 1.999	การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์มีความน่าจะเป็นในระดับสกุล
0.000 – 1.699	การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่มีความน่าเชื่อถือ

(ที่มา : Bruker Daltonik, Germany)

4.1.2 การทดสอบวิธีการเตรียมโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

จากการทดลองที่ 4.1.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. เพื่อนำไปใช้ในการสร้างฐานข้อมูลที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* พบว่าเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป จึงเลือกเชื้อที่บ่มเป็นระยะเวลาดังกล่าวมาศึกษาวิธีการเตรียมโปรตีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ที่ส่งผลต่อลักษณะโปรตีน โดยวิธีการเตรียมโปรตีนที่ใช้ในการศึกษานี้มี 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธี direct transfer 2) วิธี extended direct transfer และ 3) วิธีการสกัดด้วย ethanol และกรด formic หรือ ethanol/formic acid extraction พบว่าลักษณะโปรตีนหรือของวิธีการเตรียมโปรตีนทั้ง 3 วิธี มีลักษณะใกล้เคียงกันและโปรตีนในช่วงขนาด 2,000 ถึง 12,000 ดาลตัน เป็นช่วงที่พีคของโปรตีนมี intensity สูงดังแสดงในรูปที่ 4.3 โดยวิธี direct transfer ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและใช้ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อยที่สุด เนื่องจากใช้เพียงโคโลนีเดียวของเชื้อแบคทีเรียและสารละลายเมทริกซ์ HCCA ในการวิเคราะห์ โดยสารละลายเมทริกซ์ HCCA นอกจากช่วยทำให้เกิดผลึก (co-crystallization) และทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนของโปรตีนแล้ว ยังมีคุณสมบัติช่วยในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้สามารถวิเคราะห์โปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ได้ (intracellular proteins) (Singhal และคณะ, 2015) โดยพบว่าการเตรียมโปรตีนด้วยวิธีดังกล่าว ทำให้ได้สเปกตรัมที่มี intensity สูงกว่าวิธี extended direct transfer ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการบ่งชี้ชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ ซึ่งมีชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์หนา การเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer จึงอาจทำให้สเปกตรัมที่ได้มีคุณภาพต่ำ ซึ่งส่งผลต่อความถูกต้องในการวิเคราะห์ (McElvania และคณะ, 2013) และวิธี ethanol/formic acid extraction เป็นวิธีการเตรียมโปรตีนที่ได้จำนวนพีคของโปรตีนมากที่สุดและมี intensity สูงที่สุด โดยเฉพาะโปรตีนที่มีขนาดใหญ่หรือในช่วง 9,000 ถึง 11,200 ดาลตัน จะมี intensity สูงกว่าการเตรียมโปรตีนด้วยวิธีอื่นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการเตรียมโปรตีนด้วยวิธีนี้มีความยากและใช้ระยะเวลานานกว่าวิธีอื่นเนื่องจากมีขั้นตอนและใช้สารเคมีหลายชนิดในการสกัดโปรตีนของจุลินทรีย์ (Freiwald และ Sauer, 2009) โดยในการสกัดโปรตีนด้วยวิธีดังกล่าว จะใช้โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 1 หลั ของเข็มเชื้อแบบห้วงขนาดมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร หรือประมาณ 10 ไมโครกรัม ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 5.57×10^9 CFU/ml (ข้อมูลแสดงดังภาคผนวก ค) จากนั้นนำสารละลายมาป้ายและเขียนบน MTP 384 polished steel target ซึ่งการเกิดผลึกและการแตกตัวเป็นไอออนของโปรตีนจะเกิดได้ดีขึ้น ทำให้สเปกตรัมที่ได้มีคุณภาพสูงซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของความสามารถในการทำซ้ำ เนื่องจากการนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาป้ายและเขียนบน MALDI target plate โดยตรงอาจรบกวนกระบวนการเกิดผลึกจากสารเมแทบอไลต์ (metabolites) รงควัตถุ (pigments) และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อบนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (Alatoom และคณะ, 2011) นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 และใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 จากวิธีการเตรียมโปรตีนทั้ง 3 วิธี พบว่าวิธี direct transfer มีค่า log score สูงกว่าวิธี extended direct transfer คือ 0 ถึง 2.204 และ 1.804 ถึง 2.021

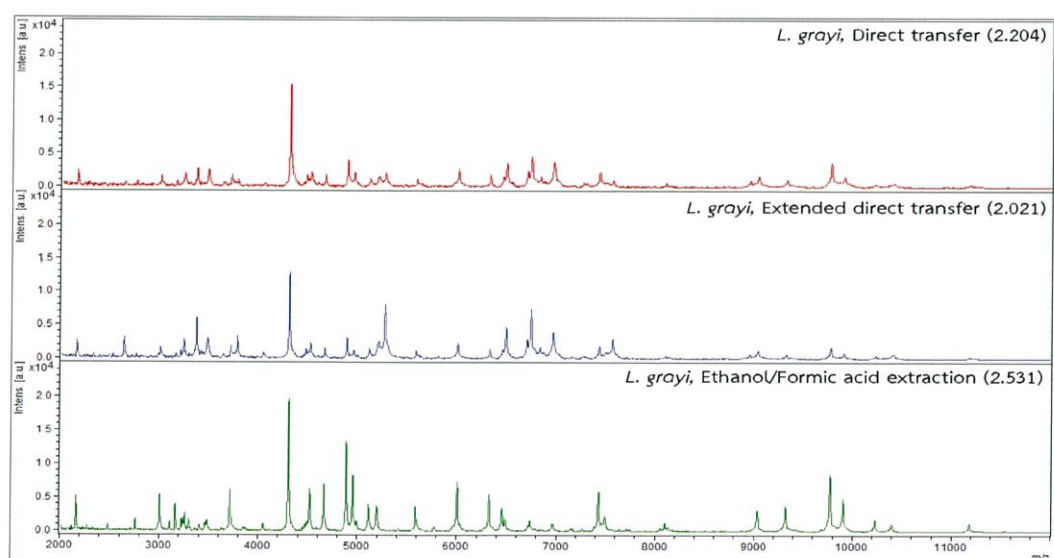
ตามลำดับ โดยวิธี direct transfer มีความถูกต้องในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียเพียงร้อยละ 80 เนื่องจากมีตัวอย่างที่ไม่สามารถเก็บสเปกตรัมได้ ทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้ ในขณะที่วิธี extended direct transfer มีความถูกต้องร้อยละ 100 แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมโปรตีนทั้ง 2 วิธี ให้ค่า log score ในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความน่าเชื่อถือในระดับสกุลหรือมีความน่าจะเป็นในระดับสกุลเท่านั้น และการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างที่ทำการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction มีความถูกต้องทั้งหมดและค่า log score ที่ได้ยังมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการเตรียมโปรตีนอีก 2 วิธี คือ 2.137 ถึง 2.531 ซึ่งเป็นค่ามีความน่าเชื่อถือในระดับสปีชีส์หรือมากกว่า 2.3 ถึงร้อยละ 91.67 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธี ethanol/formic acid extraction ในการเตรียมโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. เพื่อใช้ในการสร้างฐานข้อมูลโดยสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Barbuddhe และคณะ (2008) ซึ่งทำการศึกษการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยใช้วิธี ethanol/formic acid extraction ในการเตรียมโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. ซึ่งทำให้ได้สเปกตรัมที่มีคุณภาพดี มีความสามารถในการทำซ้ำเหมาะสำหรับใช้ในการสร้างฐานข้อมูล สามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เสียสภาพแล้วสามารถเก็บรักษาใน ethanol ได้เป็นระยะเวลา นานและเมื่อสกัดโปรตีนแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา ประมาณ 1 สัปดาห์ โดยไม่ทำให้คุณภาพของสเปกตรัมลดลงเนื่องจากลักษณะโปรตีนหรือที่ได้มีคุณภาพดี และรายงานวิจัยของ Schulthess และคณะ (2014) ซึ่งทำการพัฒนาและประเมินผลของระบบ MALDI biotyper ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง โดยศึกษาการเตรียมโปรตีนทั้ง 3 วิธี พบว่าวิธี ethanol/formic acid extraction ให้ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุดและสามารถเก็บสเปกตรัมได้ทุกครั้ง ในการวิเคราะห์ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่งจำนวน 190 สายพันธุ์ 64 สปีชีส์ ซึ่งรวมถึงเชื้อ *Listeria* spp. ด้วย ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธี ethanol/formic acid extraction ในการสร้างฐานข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากความสามารถในการทำซ้ำของสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากการโปรตีนด้วยวิธีดังกล่าว นอกจากนั้นวิธี ethanol/formic acid extraction ยังเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนสำหรับการสร้างฐานข้อมูล

ตารางที่ 4.3 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ ของเชื้อ *L. grayi* ATCC 19120 ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid extraction

วิธีการเตรียมโปรตีน	ค่า log score	ความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ (ร้อยละ)			บ่งชี้ชนิดไม่ถูกต้อง (ร้อยละ)	ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ (ร้อยละ)
		มีความน่าจะเป็นในระดับสากล	ระดับสากล	ระดับสปีชีส์		
DT (n=5)	0 - 2.204	1 (20)	3 (60)	0	0	1 (20)
eDT (n=5)	1.804 - 2.021	1 (20)	4 (80)	0	0	0
EtOH-FA (n=24)	2.137 - 2.531	0	2 (8.33)	22 (91.67)	0	0

หมายเหตุ : DT หมายถึง การเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer
 eDT หมายถึง การเตรียมโปรตีนด้วยวิธี extended direct transfer
 EtOH-FA หมายถึง การเตรียมโปรตีนด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction



รูปที่ 4.3 สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ *L. grayi* ATCC 19120 ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid extraction เมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเลขในวงเล็บ หมายถึงค่า log score ที่ได้จากการบ่งชี้ชนิดด้วยซอฟต์แวร์ MALDI Biotyper OC version 3.1 เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613

4.2 การสร้างฐานข้อมูลโปรตีนและการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ *Listeria* spp.

การสร้างฐานข้อมูลโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเตรียมโปรตีนด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction ซึ่งทำให้ได้ลักษณะโปรตีนหรือแมสสเปกตรัมที่มีความเหมาะสม จากนั้นนำภาวะดังกล่าวมาใช้กับเชื้อ *Listeria* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์ เพื่อสร้างฐานข้อมูลดังขั้นตอน 3.6.1 ทำให้ได้สเปกตรัมทั้งหมดจำนวน 280 สเปกตรัม เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle Component Analysis) ของสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูลของเชื้อ *Listeria* ทั้ง 6 สปีชีส์ พบว่าเชื้อ *L. monocytogenes* และเชื้อ *L. innocua* มีความกระจายของข้อมูล เนื่องจากจำนวนสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์และใช้สร้างฐานข้อมูลมีจำนวนมากกว่าสปีชีส์อื่นๆ และกลุ่มข้อมูลของเชื้อ *L. monocytogenes* เชื้อ *L. innocua* และเชื้อ *L. welshimeri* มีความใกล้เคียงกันมาก โดยเมื่อนำสเปกตรัมของเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์ มาวิเคราะห์อีกครั้งพบว่าสเปกตรัมของเชื้อดังกล่าวสามารถแยกกลุ่มกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ดังนั้นสเปกตรัมของเชื้อ *Listeria* spp. ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความสามารถในการทำซ้ำและเหมาะสมสำหรับการสร้าง Main Spectrum Profiles (MSP) เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูล (In-house database) โดยจะได้ MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. จำนวน 14 สเปกตรัม ซึ่งมากกว่าฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ที่มี MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. จำนวน 12 สเปกตรัม

การตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลของเชื้อ *Listeria* spp. โดยเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น เมื่อใช้สเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูลของเชื้อ *Listeria* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 20 สเปกตรัม โดยเชื้อ *L. monocytogenes* มี 5 สายพันธุ์ หรือ 100 สเปกตรัม เชื้อ *L. innocua* มี 5 สายพันธุ์ หรือ 100 สเปกตรัม เชื้อ *L. ivanovii* มี 1 สายพันธุ์ หรือ 20 สเปกตรัม เชื้อ *L. seeligeri* มี 1 สายพันธุ์ หรือ 20 สเปกตรัม เชื้อ *L. welshimeri* มี 1 สายพันธุ์ หรือ 20 สเปกตรัม และเชื้อ *L. grayi* มี 1 สายพันธุ์ หรือ 20 สเปกตรัม พบว่าความไวในการบ่งชี้ชนิดด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ของเชื้อ *L. monocytogenes* และเชื้อ *L. ivanovii* มีค่าร้อยละ 90 และ 95 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *L. innocua* เชื้อ *L. seeligeri* เชื้อ *L. welshimeri* และเชื้อ *L. grayi* ทุกสปีชีส์ มีค่าร้อยละ 100 และเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น ความไวในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ทั้ง 6 สปีชีส์ มีค่าร้อยละ 100 และความจำเพาะในการบ่งชี้ชนิดด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ของเชื้อ *L. innocua* และเชื้อ *L. ivanovii* มีค่าร้อยละ 95 และ 99.23 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *L. monocytogenes* เชื้อ *L. seeligeri* เชื้อ *L. welshimeri* และเชื้อ *L. grayi* ทุกสปีชีส์ มีค่าร้อยละ 100 และเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น พบว่าความจำเพาะในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* spp. ทั้ง 6 สปีชีส์ มีค่าร้อยละ 100 เช่นเดียวกับความไว ดังแสดงในตารางที่ 4.4 นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper

version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น ทำให้การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* มีความน่าเชื่อถืออย่างสูงในระดับสปีชีส์ ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ง-1

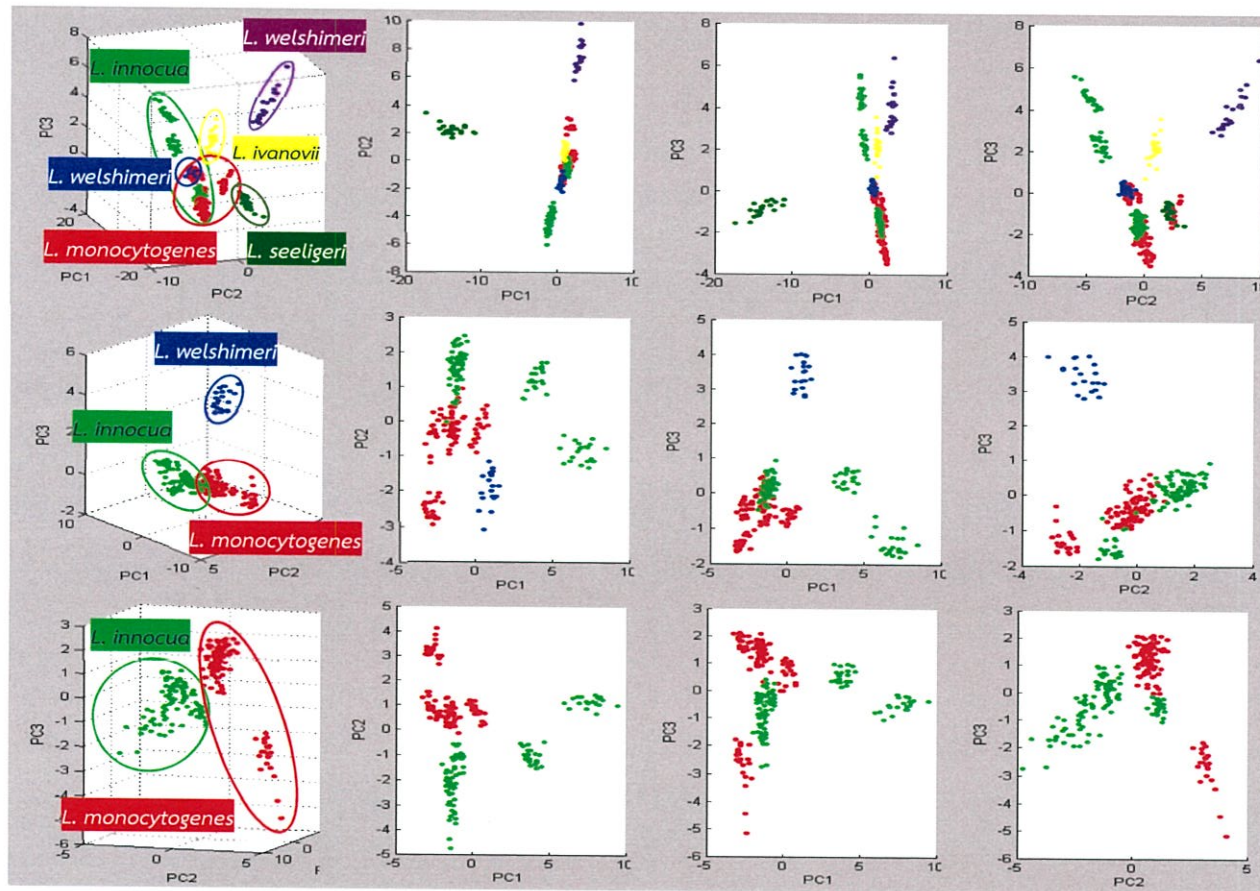
การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ความไวในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *L. monocytogenes* และเชื้อ *L. ivanovii* และความจำเพาะในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *L. innocua* และเชื้อ *L. ivanovii* มีค่าต่ำกว่าความไวและความจำเพาะในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อดังกล่าวเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น เมื่อพิจารณาแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของ MSP หรือ MSP dendrogram ของเชื้อ *Listeria* spp. จากฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าเชื้อ *Listeria* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์คือเชื้อ *L. monocytogenes* เชื้อ *L. innocua* และเชื้อ *L. ivanovii* มีความสัมพันธ์ในระดับโปรตีนใกล้เคียงกันมากซึ่งสอดคล้องกับ MSP dendrogram ที่ใช้ MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. จากฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าความไวและความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น

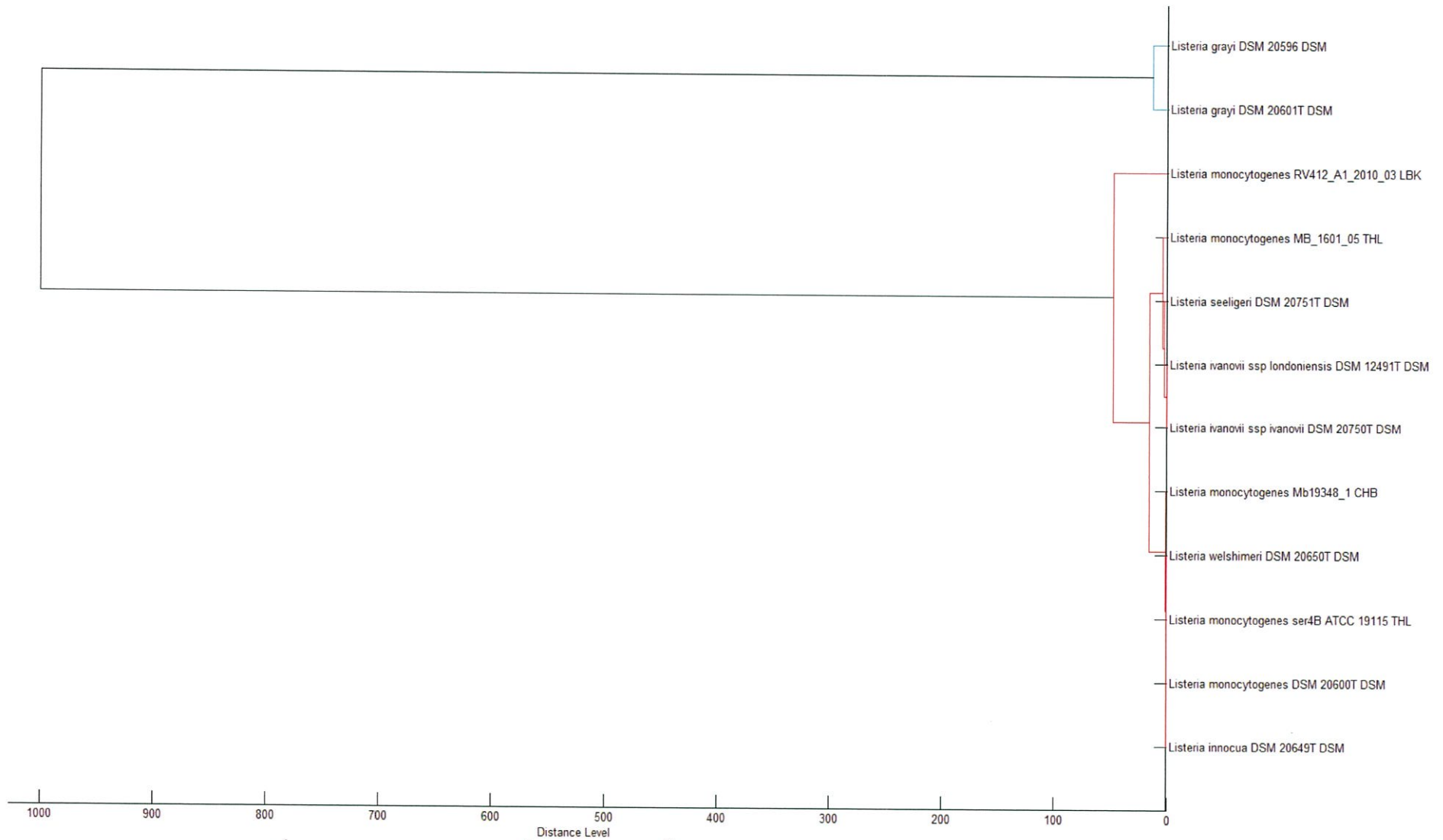
ตัวอย่าง	ฐานข้อมูล			
	commercial		commercial และ In-house DB	
	ความไว (ร้อยละ)	ความจำเพาะ (ร้อยละ)	ความไว (ร้อยละ)	ความจำเพาะ (ร้อยละ)
<i>L. monocytogenes</i> (n=100)	90	100	100	100
<i>L. innocua</i> (n=100)	100	95	100	100
<i>L. ivanovii</i> (n=20)	95	99.23	100	100
<i>L. seeligeri</i> (n=20)	100	100	100	100
<i>L. welshimeri</i> (n=20)	100	100	100	100
<i>L. grayi</i> (n=20)	100	100	100	100
รวม n=280				

หมายเหตุ : commercial หมายถึง ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613

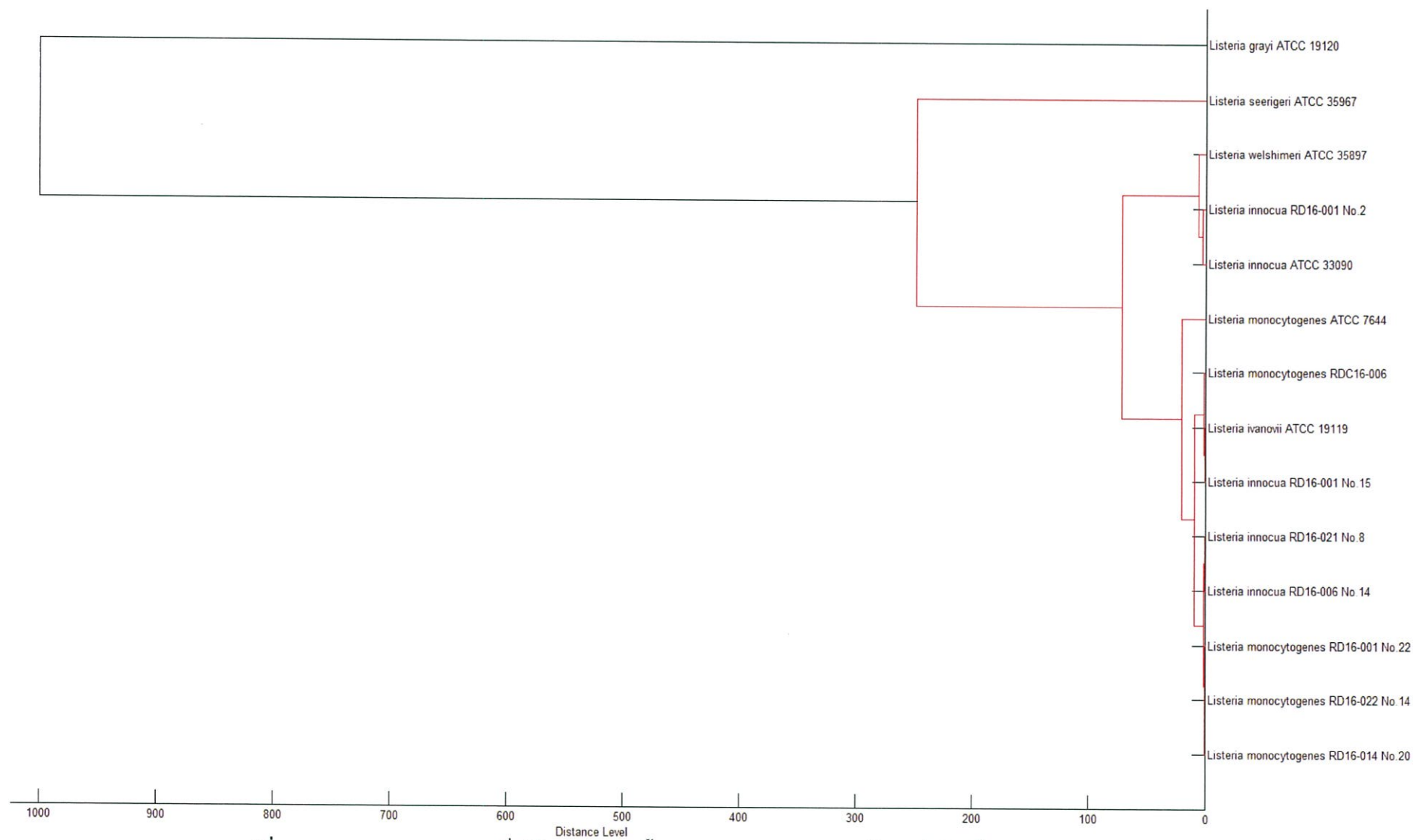
In-house DB หมายถึง ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น



รูปที่ 4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle Component Analysis) ของสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูล (In-house database) ของเชื้อ *L. monocytogenes* (จุดสีแดง) เชื้อ *L. innocua* (จุดสีเขียว) เชื้อ *L. ivanovii* (จุดสีเหลือง) เชื้อ *L. welshimeri* (จุดสีน้ำเงิน) เชื้อ *L. seeligeri* (จุดสีเขียวเข้ม) และเชื้อ *L. grayi* (จุดสีม่วง)

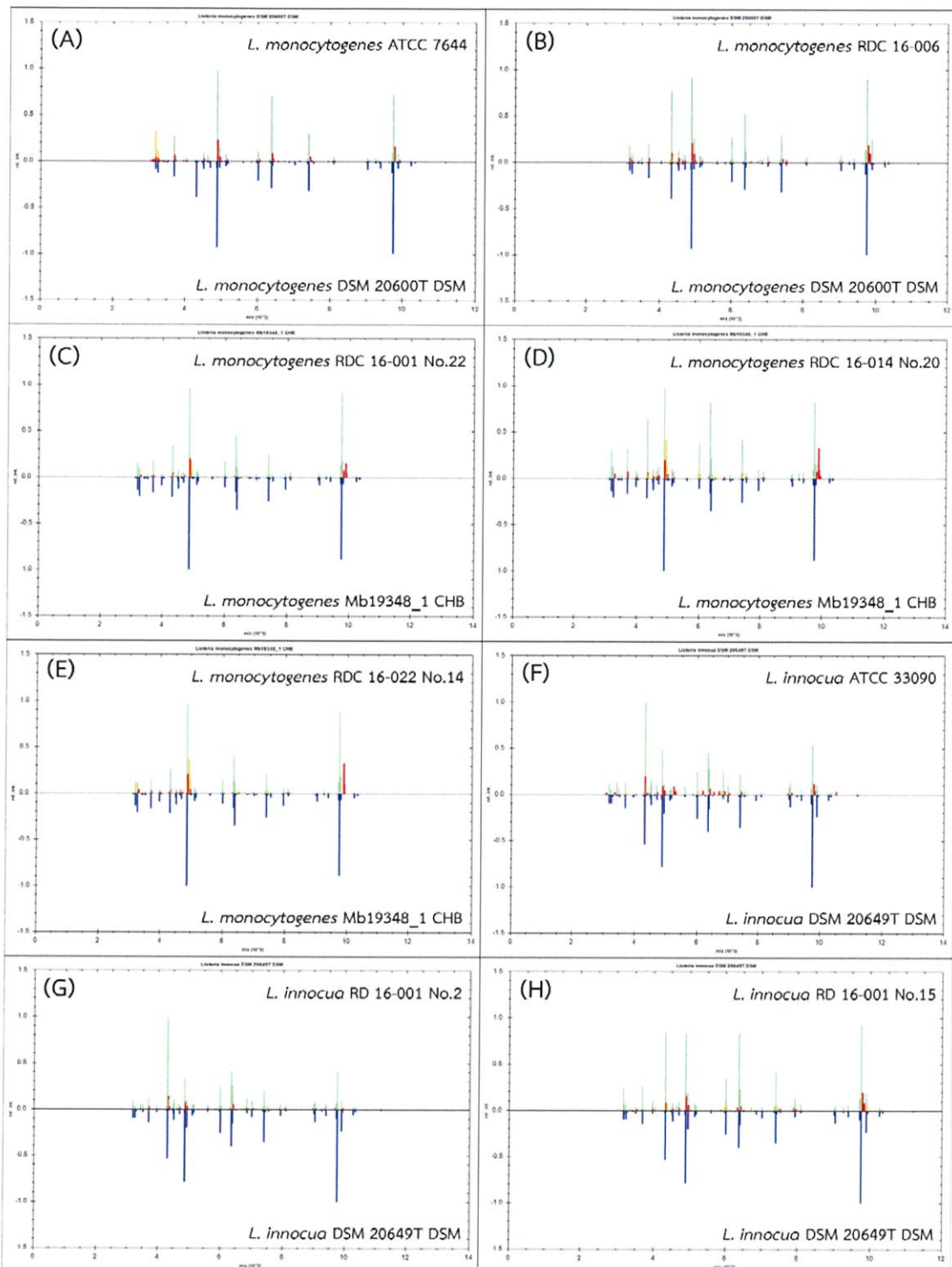


รูปที่ 4.5 MSP Dendrogram เมื่อใช้ MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. จากฐานข้อมูล Biotyper version DB4613

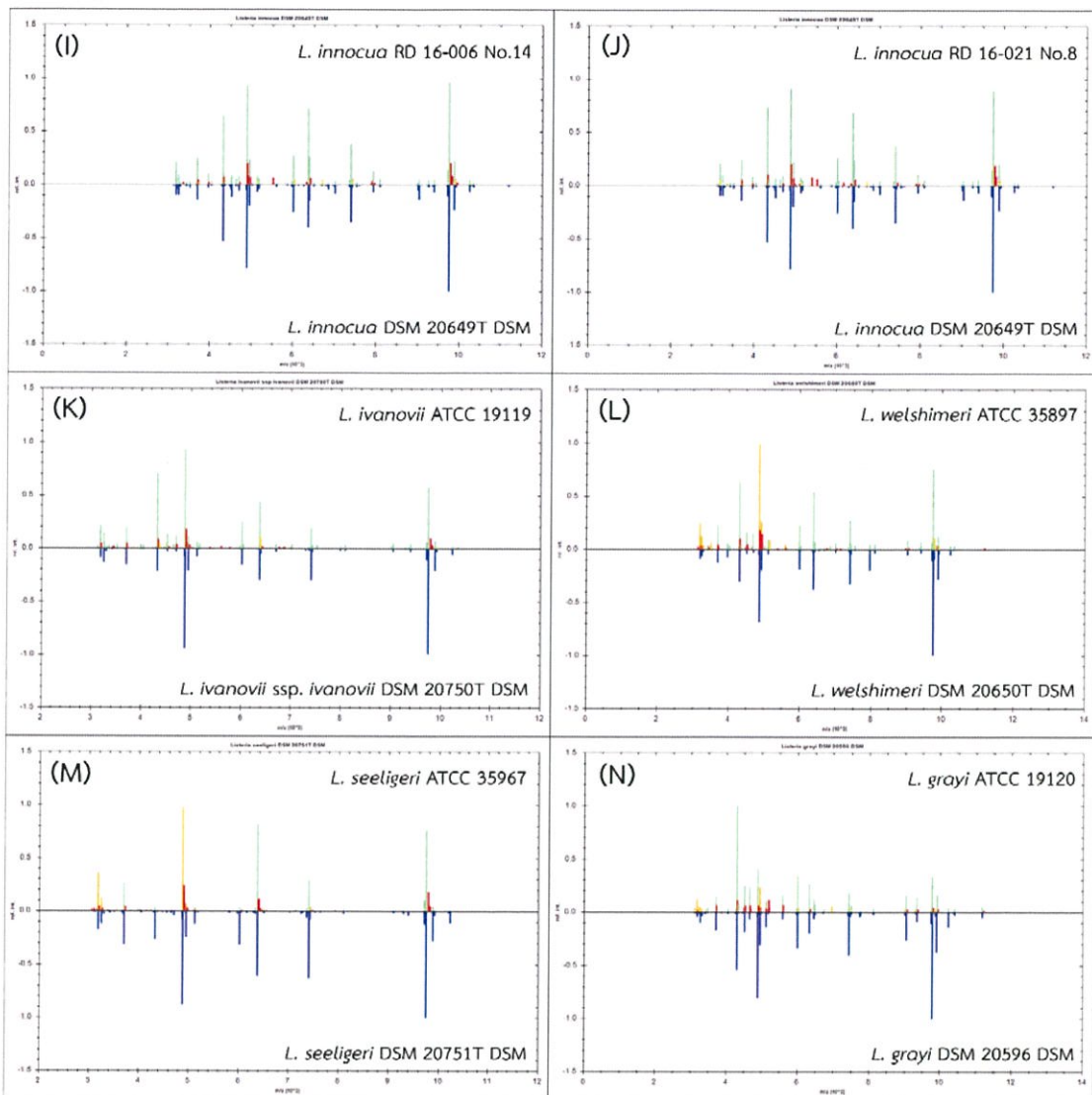


รูปที่ 4.6 MSP Dendrogram เมื่อใช้ MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. จากฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น (In-house database)

ความไวและความจำเพาะเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *L. monocytogenes* เชื้อ *L. innocua* และเชื้อ *L. ivanovii* มีค่าต่ำกว่าความไวและความจำเพาะเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นเนื่องจากการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียไม่ถูกต้องโดยเชื้อ *L. monocytogenes* เป็นเชื้อ *L. innocua* และเชื้อ *L. ivanovii* รวมทั้งเชื้อ *L. ivanovii* เป็นเชื้อ *L. innocua* เนื่องจากสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการศึกษานี้ และภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้สร้างฐานข้อมูลของ Bruker Daltonik อาจแตกต่างกัน โดยในการศึกษานี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่เชื้อ *Listeria* spp. ที่นำมาสร้างเป็นฐานข้อมูลของ Bruker Daltonik ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) agar อาหารเลี้ยงเชื้อ Columbia blood agar หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ Chocolate agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง (Bruker Daltonik, Germany) ถึงแม้จะทำการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction และใช้สารละลายเมทริกซ์ HCCA ในการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน ดังข้อมูลแสดงในตารางภาคผนวกที่ ค-3 ซึ่งภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันจะส่งผลให้สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS แตกต่างกัน (Jadhav และคณะ, 2015) ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบ MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. ของฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น (In-house database) และฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ซึ่งเป็นการจับคู่รูปแบบ (pattern-matching) โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร ได้แก่ ตำแหน่ง Intensity และความถี่ของพีค เพื่อให้การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยสเปกตรัมของตัวอย่างมีความถูกต้อง ความน่าเชื่อถือและความสามารถในการทำซ้ำสูงที่สุด จะเห็นว่า MSP ของทั้งสองฐานข้อมูลมีความแตกต่างกัน โดยสเปกตรัมที่แสดงด้านบนของแต่ละรูปคือ MSP ของฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นและสเปกตรัมที่แสดงด้านล่างของแต่ละรูปคือ MSP ของฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 โดยพีคสีเขียว หมายถึง พีคนั้นๆ มีตำแหน่งตรงกับพีคของสเปกตรัมอ้างอิงหรือ MSP พีคสีเหลือง หมายถึง พีคนั้นๆ มีตำแหน่งใกล้เคียงกับพีคของสเปกตรัมอ้างอิง และพีคสีแดง หมายถึง พีคนั้นๆ มีตำแหน่งไม่ตรงและไม่ใกล้เคียงกับพีคของสเปกตรัมอ้างอิง ซึ่งความแตกต่างของสเปกตรัมที่ใช้ในการวิเคราะห์และสเปกตรัมอ้างอิงจะส่งผลถึงความถูกต้องและความน่าเชื่อถือหรือค่า log score ในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์



รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบ MSP ที่ใช้เป็นสเปกตรัมอ้างอิงในฐานะข้อมูลที่สร้างขึ้นกับ MSP ในฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 โดยสเปกตรัมที่แสดงด้านบนของแต่ละรูปคือ MSP ของฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นและสเปกตรัมที่แสดงด้านล่างของแต่ละรูปคือ MSP ของฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 โดยแสดงการเปรียบเทียบ MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. ดังนี้ เชื้อ *L. monocytogenes* (A ถึง E) เชื้อ *L. innocua* (F ถึง J) เชื้อ *L. ivanovii* (K) เชื้อ *L. welshimeri* (L) เชื้อ *L. seeligeri* (M) และเชื้อ *L. grayi* (N)



รูปที่ 4.7 (ต่อ) การเปรียบเทียบ MSP ที่ใช้เป็นสเปกตรัมอ้างอิงในฐานะข้อมูลที่สร้างขึ้นกับ MSP ในฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 โดยสเปกตรัมที่แสดงด้านบนของแต่ละรูปคือ MSP ของฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นและสเปกตรัมที่แสดงด้านล่างของแต่ละรูปคือ MSP ของฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 โดยแสดงการเปรียบเทียบ MSP ของเชื้อ *Listeria* spp. ดังนี้ เชื้อ *L. monocytogenes* (A ถึง E) เชื้อ *L. innocua* (F ถึง J) เชื้อ *L. ivanovii* (K) เชื้อ *L. welshimeri* (L) เชื้อ *L. seeligeri* (M) และเชื้อ *L. grayi* (N)

การพัฒนาฐานข้อมูลที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยทำการสร้างและเพิ่มจำนวนฐานข้อมูล จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูล พบว่าฐานข้อมูลของเชื้อ *Listeria* spp. ที่สร้างขึ้นในการศึกษานี้มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* มากกว่าฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ของเชื้อ *Listeria* spp. ที่สร้างขึ้นโดย Bruker Daltonik ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตระบบ MALDI Biotyper เนื่องจากมีจำนวน MSP ที่ใช้เป็นฐานข้อมูลมากกว่านอกนั้นยังให้ความไว ความจำเพาะ ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียมากกว่าการใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Ojima-Kato และคณะ (2016) ซึ่งทำการเพิ่มจำนวนฐานข้อมูลที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และทำการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลดังกล่าว ให้ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถระบุชนิดของเชื้อ *Listeria* ได้ในระดับสายพันธุ์

การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาณมากได้ภายในครั้งเดียว ดังนั้นระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างหรือเตรียมโปรตีนจึงมีผลกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าว ซึ่งการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลโดยใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นร่วมกันเพื่อทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนด้วยวิธีที่ต่างกันพบว่าวิธี direct transfer ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตหรือ Bruker Daltonik (Schulthess และคณะ, 2014) มีความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ในระดับสกุล ระดับสปีชีส์ และไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ ร้อยละ 60 ร้อยละ 20 และร้อยละ 20 ตามลำดับ วิธี extended direct transfer ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Singhal และคณะ, 2015) มีความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์โดยมีความน่าจะเป็นในระดับสกุล และระดับสปีชีส์ ร้อยละ 40 และร้อยละ 60 และวิธี ethanol/formic acid extraction ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนเพื่อสร้างฐานข้อมูล มีความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ในระดับสปีชีส์ ร้อยละ 100 ดังข้อมูลในตารางที่ 4.6 แต่อย่างไรก็ตามวิธี ethanol/formic acid extraction ไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างจำนวนมาก และทำอย่างต่อเนื่องเป็นงานประจำ (routine) เนื่องจากมีการใช้สารเคมีหลายชนิด มีขั้นตอนและใช้ระยะเวลามากกว่าวิธีอื่น ดังนั้นการศึกษานี้ควรมีการพัฒนาฐานข้อมูลหรือเพิ่มจำนวนสเปกตรัมอ้างอิงของเชื้อ *Listeria* spp. ให้มีจำนวนมากขึ้น เพื่อให้การบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการเตรียมตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี direct transfer หรือวิธี extended direct transfer มีความถูกต้องและความน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งทำให้ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างลดลง เหมาะสำหรับการนำไปใช้บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ และเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ตารางที่ 4.5 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ ของเชื้อ *L. grayi* ATCC 19120 ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid extraction ในการตรวจสอบฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น

วิธีการเตรียมโปรตีน	ค่า log score	ความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ (ร้อยละ)			บ่งชี้ชนิดไม่ถูกต้อง (ร้อยละ)	ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ (ร้อยละ)
		มีความน่าจะเป็นในระดับสูง	ระดับสูง	ระดับสปีชีส์		
DT (n=5)	0 - 2.337	0	3 (60)	1 (20)	0	1 (20)
eDT (n=5)	1.804 - 2.021	2 (40)	3 (60)	0	0	0
EtOH-FA (n=20)	2.548 - 2.724	0	0	20 (100)	0	0

หมายเหตุ : DT หมายถึง การเตรียมโปรตีนด้วยวิธี direct transfer
 eDT หมายถึง การเตรียมโปรตีนด้วยวิธี extended direct transfer
 EtOH-FA หมายถึง การเตรียมโปรตีนด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ *Listeria* ทั้ง 6 สปีชีส์ ได้แก่ เชื้อ *L. monocytogenes* เชื้อ *L. innocua* เชื้อ *L. ivanovii* เชื้อ *L. welshimeri* เชื้อ *L. seeligeri* และเชื้อ *L. grayi* พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการนำเชื้อแบคทีเรียไปใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากขนาดของโคโลนีเดี่ยวมีขนาดใหญ่เพียงพอต่อการวิเคราะห์และลักษณะโปรตีนหรือเมสสเปกตรัมมีคุณภาพเหมาะสมต่อการนำไปใช้สร้างฐานข้อมูลโปรตีน และเมื่อนำเชื้อ *Listeria* spp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยภาวะดังกล่าวมาทำการเตรียมโปรตีน 3 วิธี ได้แก่ วิธี direct transfer วิธี extended direct transfer และวิธี ethanol/formic acid extraction พบว่าวิธี ethanol/formic acid extraction เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมโปรตีนสำหรับใช้วิเคราะห์ เนื่องจากสเปกตรัมที่ได้มีคุณภาพดีและมีความสามารถในการทำซ้ำ ซึ่งส่งผลต่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาภาวะอื่น ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพและความสามารถในการทำซ้ำของสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูล ทำให้ความถูกต้อง ความน่าเชื่อถือและความรวดเร็วในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เพิ่มมากขึ้น

การสร้างฐานข้อมูลโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ทำให้ MSP หรือสเปกตรัมอ้างอิงที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ในฐานข้อมูลมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเมื่อตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลเมื่อใช้ฐานข้อมูล 3 ประเภท ได้แก่ ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น (In-house database) และเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น พบว่าความไวและความจำเพาะในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* เมื่อใช้ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นมีค่าร้อยละ 100 ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 เพียงอย่างเดียวและเมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นให้ผลเหมือนกับใช้ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle Component Analysis) ของสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูลของเชื้อ *Listeria* spp. พบว่ามีการกระจายกลุ่มของข้อมูล แยกออกจากกันในแต่ละสปีชีส์ทำให้การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* เมื่อใช้ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นมีความถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือในระดับสปีชีส์ ดังนั้นฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นจึงมีประสิทธิภาพต่อการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS อย่างไรก็ตามควรเพิ่มจำนวนสปีชีส์และสายพันธุ์ของเชื้อ *Listeria* spp. รวมถึงการใช้จุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารอื่น ๆ ในการตรวจสอบความไวและความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดจุลินทรีย์ของฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นในการศึกษา ซึ่งจะทำให้ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นมีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมต่อการนำไปใช้บ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* มากยิ่งขึ้น

การตรวจสอบฐานข้อมูลโดยการเตรียมโปรตีนทั้ง 3 วิธี พบว่าวิธี ethanol/formic acid extraction ให้ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* สูงที่สุด อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวใช้ระยะเวลาและมีหลายขั้นตอนจึงไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียในการเตรียมตัวอย่างจำนวนมาก และทำอย่างต่อเนื่องเป็นงานประจำ ดังนั้นควรทำการเพิ่มจำนวนฐานข้อมูลของเชื้อ *Listeria* spp. ให้มากขึ้นเพื่อให้การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* สามารถใช้วิธี direct transfer หรือวิธี extended direct transfer ในการเตรียมโปรตีนซึ่งใช้เวลาน้อยกว่า ทำให้การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* มีความถูกต้อง ความน่าเชื่อถือ และความรวดเร็วมากที่สุด

การสร้างฐานข้อมูลโปรตีนของเชื้อ *Listeria* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS สามารถนำไปพัฒนาเพื่อนำไปใช้บ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ในอุตสาหกรรมอาหารได้เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย มีความรวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณมากได้ภายในครั้งเดียว อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาระยะเวลา ค่าใช้จ่าย รวมทั้งความน่าเชื่อถือที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ในการตรวจสอบและบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคดังกล่าวกับการตรวจสอบและบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยวิธีการดั้งเดิม

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2557. **เชื้อโรคและระดับความเสี่ยง (ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1)**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- รัชฎาพร สุวรรณรัตน์ และดวงดาว วงศ์สมมาตร. 2559. “การสำรวจการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* และ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อสัตว์ดิบที่จำหน่ายในตลาดสด เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล.” *กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 58(3) : 197-207.
- วรารุณี ครูสง. 2558. **การประกันคุณภาพในอุตสาหกรรมอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริพร ประงวิทยา, วชิรญา กลิ่นทอง, มนทิรา จະนันท์ และธนกร ประงวิทยา. 2555. “เทคนิคทาง โปรตีนโอมิคส์เพื่องานวิจัยทางการแพทย์.” *เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด*. 24(2) : 120-127.
- สำนักอาหาร. 2560. **พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 พร้อมกฎกระทรวง และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับปรับปรุงปี 2560)**. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.
- Alatoom, A. A., Cunningham, S. A., Ihde, S. M., Mandrekar, J. and Patel, R. (2011). “Comparison of Direct Colony Method versus Extraction Method for Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry.” *Journal of Clinical Microbiology*. 49(8) : 2868-2873.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E. and Hain, T. (2008). “Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry.” *Applied and Environmental Microbiology*. 74(17) : 5402-5407.
- Bartlett, J. M. D. 2016. *Listeria monocytogenes*. [online]. Available : https://www.unboundmedicine.com/medline/view/Johns_Hopkins_ABX_Guide/540318/all/Listeria_monocytogenes.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2017. *Listeria (Listeriosis)*. [online]. Available : <https://www.cdc.gov/listeria/risk.html>.
- Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G. (2012). “Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.” *FEMS Microbiology Reviews*. 36(2) : 380-407.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). **Disease data from ECDC Surveillance Atlas - listeriosis**. [online]. Available : <http://ecdc.europa.eu/en/listeriosis/surveillance-and-disease-data/Atlas>.
- European Food Safety Authority. (2018). *Listeria*. [online]. Available : <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria>.

- Freiwald, A. and Sauer, S. (2009). "Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry." *Nature Protocols*. 4 : 732.
- Gasanov, U., Hughes, D. and Hansbro, P. M. (2005). "Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review." *FEMS Microbiology Reviews*. 29(5) : 851-875.
- Goldstein, J. E., Zhang, L., Borrer, C. M., Rago, J. V. and Sandrin, T. R. (2013). "Culture conditions and sample preparation methods affect spectrum quality and reproducibility during profiling of *Staphylococcus aureus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Letters in Applied Microbiology*. 57(2) : 144-150.
- Hsueh, P.R., Lee, T.F., Du, S.H., Teng, S.H., Liao, C.H., Sheng, W.H. and Teng, L.J. (2014). "Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species." *Journal of Clinical Microbiology*. 52(7) : 2371-2379.
- Jadhav, S., Gulati, V., Fox, E. M., Karpe, A., Beale, D. J., Sevier, D. and Palombo, E. A. (2015). "Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry." *International Journal of Food Microbiology*. 202 : 1-9.
- McElvania TeKippe, E., Shuey, S., Winkler, D. W., Butler, M. A. and Burnham, C. A. D. (2013). "Optimizing Identification of Clinically Relevant Gram-Positive Organisms by Use of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System." *Journal of Clinical Microbiology*. 51(5) : 1421-1427.
- Ojima-Kato, T., Yamamoto, N., Takahashi, H. and Tamura, H. (2016). "Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*." *PLoS one*. 11(7) : 1-13.
- Orsi, R. H. and Wiedmann, M. (2016). "Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 : 5273-5287.
- Public Health England. (2016). **Identification of *Listeria* species, and other Non-sporing Gram Positive Rods (except *Corynebacterium*)**. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 3 Issue 3.2. [online]. Available : <https://www.gov.uk/uk-standards-formicrobiology-investigations-smi-quality-andconsistency-in-clinical-laboratories>.
- Ryser, E. and Marth, E. 2007. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker.

- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L. and Griffin, P. M. (2011). "Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens." *Emerging Infectious Diseases*. 17(1) : 7-15.
- Schulthess, B., Bloemberg, G. V., Zbinden, R., Böttger, E. C. and Hombach, M. (2014). "Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods—development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory." *Journal of Clinical Microbiology*. 52(4) : 1089-1097.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. and Viridi, J. S. (2015). "MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis." *Frontiers in Microbiology*. 6 : 791.
- Stearns, D. (2015). **All You Need to Know About *Listeria* | Food Poison Journal**. [online]. Available : <http://www.foodpoisonjournal.com/food-poisoning-information/what-you-need-to-know-about-listeria-during-an-outbreak-and-recall/>.
- Temple, M. E. and Nahata, M. C. (2000). "Treatment of Listeriosis." *Annals of Pharmacotherapy*. 34(5) : 656-661.
- Thønnings, S., Knudsen, J. D., Schønheyder, H. C., Søgaaard, M., Arpi, M., Gradel, K. O. and Søgaaard, M. (2016). "Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia." *Clinical Microbiology and Infection*. 22(8) : 725-730.
- Thouvenot, P., Vales, G., Bracq-Dieye, H., Tessaud-Rita, N., Maury, M. M., Moura, A. and Leclercq, A. (2018). "MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study." *Journal of Microbiological Methods*. 144 : 29-32.
- World Health Organization. (2018). **WHO | Listeriosis**. [online]. Available : <http://www.who.int/mediaCentre/factsheets/listeriosis/en/>.
- World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods : interpretative summary**. [online]. Available : <http://www.who.int/iris/handle/10665/42874>.
- Williams, T. L., Andrzejewski, D., Lay, J. O. and Musser, S. M. (2003). "Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI-TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 14(4) : 342-351.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Broth (TSYEB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth (TSB)	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Ultrapure Water	1,000	มิลลิลิตร

1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม และชั่ง Yeast extract 6 กรัม ละลายใน Ultrapure Water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Bacteriological agar	15	กรัม
Ultrapure Water	1,000	มิลลิลิตร

2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม ชั่ง yeast extract 6 กรัม และชั่ง bacteriological agar 15 กรัม ละลายใน ultrapure water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar, Lennox

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth, Lennox	20	กรัม
Bacteriological agar	15	กรัม
Ultrapure Water	1,000	มิลลิลิตร

3.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth, Lennox 20 กรัม และชั่ง bacteriological agar 15 กรัม ละลายใน ultrapure water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. การเตรียมสารละลาย Glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 60

Glycerol	60	มิลลิลิตร
Ultrapure sterile water	40	มิลลิลิตร

ผสม glycerol ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และ ultrapure sterile water 40 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

5. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

สารละลาย glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 60 (ภาคผนวก ก-4)	500	ไมโครลิตร
อาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEB (ภาคผนวก ก-1)	1	มิลลิลิตร

เชื้อ *Listeria* spp.

- 5.1 เลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEB ที่สภาวะเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5.2 ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEB ที่เลี้ยงเชื้อ *Listeria* spp. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน
- 5.3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมสารละลายเมทริกซ์ HCCA (Bruker Daltonik, Germany)

Bruker Matrix HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)	1,000	ไมโครกรัม
Standard solution (50% ACN, 2.5% TFA, 47.5% Water)	100	ไมโครลิตร

ชั่ง Bruker Matrix HCCA 1,000 ไมโครกรัม ละลายใน standard solution 100 ไมโครลิตร

หมายเหตุ : Bruker Matrix HCCA ควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส ควรเตรียมสารละลายเมทริกซ์ HCCA ให้เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ 1 ครั้งและควรเตรียมสารละลายเมทริกซ์ HCCA ใหม่ทุกครั้งในการวิเคราะห์

7. การเตรียมตัวอย่าง Bacterial Test Standard (BTS) (Bruker Daltonik, Germany)

สารละลายเมทริกซ์ HCCA (ภาคผนวก ก-6)	5	ไมโครลิตร
Bacterial Test Standard	1	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายเมทริกซ์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ HCCA Bacterial Test Standard ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ให้เข้ากันด้วย automatic pipette

8. การทำความสะอาด MALDI target plate (Bruker Daltonik, Germany)

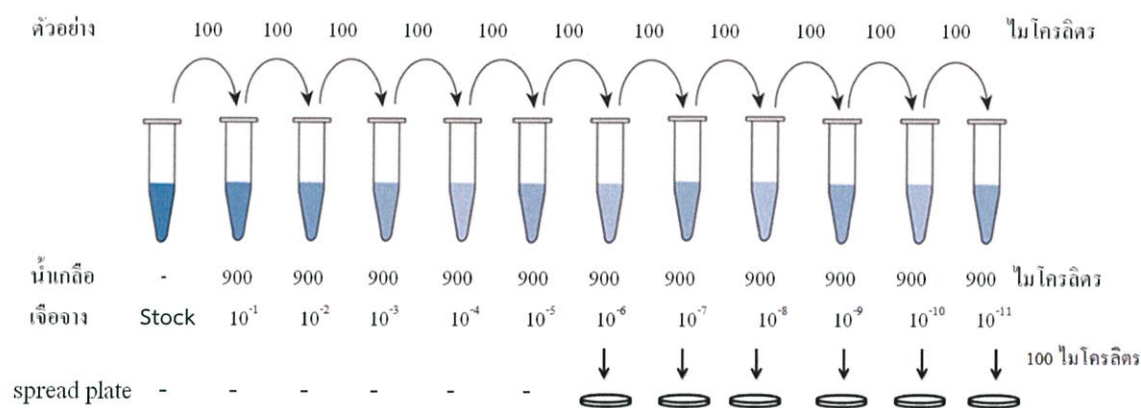
สารละลาย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70
 สารละลายกรด trifluoroacetic ความเข้มข้นร้อยละ 80
 Deionize water (DW)
 Kimwipe paper

- 8.1 นำ MALDI target plate ใส่ลงในภาชนะ แล้วเทสารละลาย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 ให้ท่วม แช่ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วขัดด้วย Kimwipe paper
- 8.2 นำ MALDI target plate ล้างด้วยน้ำประปาแล้วขัดด้วย Kimwipe paper (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) และนำล้างด้วย DW แล้วขัดด้วย Kimwipe paper (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
- 8.4 ปลอ่ยสารละลายกรด trifluoroacetic ความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บน MALDI target plate แล้วขัดด้วย Kimwipe paper
- 8.5 ทำซ้ำตาม 8.2 เช็ดให้สะอาดด้วย Kimwipe paper และปลอ่ยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ของเชื้อ *Listeria* spp. ปริมาณ 1 ห่วง ของเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วงขนาดมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร หรือประมาณ 10 ไมโครกรัม

นำเชื้อที่เก็บใน glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEB มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA โดยนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วงเขี่ยโคโลนีเดียวของเชื้อมาปริมาณ 1 ห่วง ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบลำดับส่วนที่อัตราการเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-11} แสดงดังรูปภาคผนวกที่ ข-1 เมื่อเจือจางแบบลำดับส่วนแล้ว นำเชื้อที่อัตราการเจือจาง 10^{-6} ถึง 10^{-11} มาทำการเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB นำไป ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีเดียว ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข-1



รูปภาคผนวกที่ ข-1 การเจือจางเชื้อ *Listeria* spp. ในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 เป็นแบบลำดับส่วน

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 แสดงค่าการตรวจนับเชื้อ *Listeria* spp.

อัตราการเจือจาง	จำนวนโคโลนี				X อัตราการเจือจาง	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย		
10^{-7}	50	62	55	55.67	55.67×10^7	5.57×10^9

หมายเหตุ : ที่อัตราการเจือจาง 10^{-6} มีจำนวนโคโลนีเดียว มากกว่า 300 โคโลนี
 ที่อัตราการเจือจาง 10^{-8} มีจำนวนโคโลนีเดียว น้อยกว่า 30 โคโลนี
 ที่อัตราการเจือจาง 10^{-9} ถึง 10^{-11} ไม่พบโคโลนีเดียว

ดังนั้นเชื้อ *Listeria* spp. ปริมาณ 1 ห่วง ของเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วงขนาดมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร หรือประมาณ 10 ไมโครกรัม มีจำนวนเซลล์ประมาณ 5.57×10^9 CFU/ml

ภาคผนวก ค

การคำนวณความไวและความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ค่าร้อยละของความไวและความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น คำนวณจากผลบวกจริง ผลบวกเท็จ ผลลบจริง และผลลบเท็จ จากการวิเคราะห์แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค-1

ตัวอย่างการคำนวณค่าร้อยละของความไว

ตัวอย่างการคำนวณค่าร้อยละของความไวของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ซึ่งได้ค่าผลบวกจริงและผลลบเท็จ เท่ากับ 90 และ 10 ตามลำดับ นำค่าผลบวกจริงและผลลบเท็จดังกล่าวมาแทนในสมการ

$$\begin{aligned} \text{ค่าร้อยละของความไว} &= [\text{จำนวนของผลบวกจริง} / (\text{จำนวนของผลบวกจริง} + \text{จำนวนของ} \\ &\quad \text{ผลลบเท็จ})] \times 100 \\ &= [90 / (90 + 10)] \times 100 \\ &= \text{ร้อยละ } 90 \end{aligned}$$

ตัวอย่างการคำนวณค่าร้อยละของความจำเพาะ

ตัวอย่างการคำนวณค่าร้อยละของความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ซึ่งได้ค่าผลลบจริงและผลบวกเท็จ เท่ากับ 180 และ 0 ตามลำดับ นำค่าผลบวกจริงและผลลบเท็จดังกล่าวมาแทนในสมการ

$$\begin{aligned} \text{ค่าร้อยละของความจำเพาะ} &= [\text{จำนวนของผลลบจริง} / (\text{จำนวนของผลลบจริง} + \text{จำนวน} \\ &\quad \text{ของผลบวกเท็จ})] \times 100 \\ &= [180 / (180 + 0)] \times 100 \\ &= \text{ร้อยละ } 100 \end{aligned}$$

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 แสดงค่าความไวและความจำเพาะของการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เมื่อใช้ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น (In-house database)

ตัวอย่าง	ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613						ฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น					
	TP	TN	FP	FN	Sens (%)	Spec (%)	TP	TN	FP	FN	Sens (%)	Spec (%)
<i>L. monocytogenes</i> (n=100)	90	180	0	10	90	100	100	180	0	0	100	100
<i>L. innocua</i> (n=100)	100	171	9	0	100	95	100	180	0	0	100	100
<i>L. ivanovii</i> (n=20)	19	258	2	1	95	99.23	20	260	0	0	100	100
<i>L. seeligeri</i> (n=20)	20	260	0	0	100	100	20	260	0	0	100	100
<i>L. welshimeri</i> (n=20)	20	260	0	0	100	100	20	260	0	0	100	100
<i>L. grayi</i> (n=20)	20	260	0	0	100	100	20	260	0	0	100	100
รวม n=280												

หมายเหตุ : n หมายถึง จำนวนสเปกตรัมที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูล

- TP หมายถึง True positive หรือ ผลบวกจริง
- TN หมายถึง True negative หรือ ผลลบแท้
- FP หมายถึง False positive หรือ ผลลบจริง
- FN หมายถึง False negative หรือ ผลลบแท้
- Sens หมายถึง Sensitivity หรือ ความไว
- Spec หมายถึง Specificity หรือ ความจำเพาะ

ตารางภาคผนวกที่ ค-2 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ของเชื้อ *Listeria* ในการตรวจสอบฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ตัวอย่าง	ค่า log score	ความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ (ร้อยละ)			บ่งชี้ชนิดไม่ถูกต้อง (ร้อยละ)	ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ (ร้อยละ)
		มีความน่าจะเป็นในระดับสกุล	ระดับสกุล	ระดับสปีชีส์		
<i>L. monocytogenes</i> (n=100)	2.039 – 2.584	0	20 (20)	70 (70)	10 (10)	0
<i>L. innocua</i> (n=100)	2.386 – 2.656	0	0	100 (100)	0	0
<i>L. ivanovii</i> (n=20)	2.322 – 2.584	0	0	19 (95)	0	1 (5)
<i>L. seeligeri</i> (n=20)	1.881 – 2.251	2 (10)	18 (90)	0	0	0
<i>L. welshimeri</i> (n=20)	2.345 – 2.525	0	0	20 (100)	0	0
<i>L. grayi</i> (n=20)	2.292 – 2.531	1 (5)	(19) 95	0	0	0
รวม n=280						

หมายเหตุ : สเปกตรัมที่นำมาวิเคราะห์เป็นตัวอย่างที่เตรียมโปรตีนด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction และนำมาใช้ในการสร้างฐานข้อมูลโปรตีน

ตารางภาคผนวกที่ ค-3 แสดงช่วงคะแนน ค่าร้อยละในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ระดับความเชื่อมั่นต่างๆ ค่าร้อยละของตัวอย่างที่บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ไม่ถูกต้อง และค่าร้อยละของตัวอย่างที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ของเชื้อ *Listeria* spp. ในการตรวจสอบฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 ร่วมกับ ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ตัวอย่าง	ค่า log score	ความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ (ร้อยละ)			บ่งชี้ชนิดไม่ถูกต้อง (ร้อยละ)	ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ (ร้อยละ)
		มีความน่าจะเป็นในระดับสกุล	ระดับสกุล	ระดับสปีชีส์		
<i>L. monocytogenes</i> (n=100)	2.367 – 2.754	0	0	100 (100)	0	0
<i>L. innocua</i> (n=100)	2.557 – 2.750	0	0	100 (100)	0	0
<i>L. ivanovii</i> (n=20)	2.504 – 2.767	0	0	20 (100)	0	0
<i>L. seeligeri</i> (n=20)	2.418 – 2.601	0	0	20 (100)	0	0
<i>L. welshimeri</i> (n=20)	2.552 – 2.758	0	0	20 (100)	0	0
<i>L. grayi</i> (n=20)	2.548 – 2.724	0	0	20 (100)	0	0
รวม n=280						

หมายเหตุ : สเปกตรัมที่นำมาวิเคราะห์เป็นตัวอย่างที่เตรียมโปรตีนด้วยวิธี ethanol/formic acid extraction และนำมาใช้ในการสร้างฐานข้อมูลโปรตีน

ภาคผนวก ง

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 แสดงภาวะที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นของเชื้อ *Listeria* spp.

ฐานข้อมูล	เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	ภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย			วิธีการเตรียมโปรตีน	สารละลายเมทริกซ์
			อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)		
	<i>L. monocytogenes</i> Mb19348_1 CHB	N/A	N/A	N/A	N/A	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. monocytogenes</i> DSM 20600T DSM	15313	BHIA หรือ CB agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. monocytogenes</i> ser4B ATCC 19115 THL	19115	BHI agar	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. monocytogenes</i> MB_1601_05 THL	N/A	N/A	N/A	N/A	EtOH-FA	HCCA
Bruker (Biotyper version DB4613)	<i>L. monocytogenes</i> RV412_A1_2010_03 LBK	N/A	Chocolate agar	37	N/A	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. innocua</i> DSM 20649T DSM	33090	BHIA หรือ CB agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. ivanovii</i> ssp. <i>londoniensis</i> DSM 12491T	49954	BHIA หรือ CB agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. ivanovii</i> ssp. <i>ivanovii</i> DSM 20750T DSM	19119	BHIA หรือ CB agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. welshimeri</i> DSM 20650T DSM	35897	BHIA หรือ CB agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. seeligeri</i> DSM 20751T DSM	35967	BHIA หรือ CB agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. grayi</i> DSM 20596 DSM	25401	BHI agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. grayi</i> DSM 20601T DSM	19120	BHIA หรือ CB agar	37	24 ถึง 48	EtOH-FA	HCCA

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ) แสดงภาวะที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูล Biotyper version DB4613 และฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นของเชื้อ *Listeria* spp.

ฐานข้อมูล	เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	ภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย			วิธีการเตรียมโปรตีน	สารละลายเมทริกซ์
			อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)		
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	7644	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. monocytogenes</i> RDC 16-006	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. monocytogenes</i> RD 16-001 No.22	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. monocytogenes</i> RD 16-014 No.20	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. monocytogenes</i> RD 16-022 No.14	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	33090	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
ฐานข้อมูลที่สร้างขึ้น	<i>L. innocua</i> RD 16-001 No.2	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. innocua</i> RD 16-001 No.15	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. innocua</i> RD 16-006 No.14	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. innocua</i> RD 16-021 No.8	N/A	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	19119	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. welshimeri</i> ATCC 35897	35897	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. seeligeri</i> ATCC 35967	35967	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA
	<i>L. grayi</i> ATCC 19120	19120	TSYEA	37	24	EtOH-FA	HCCA

หมายเหตุ : ATCC หมายถึง American Type Culture Collection
 EtOH-FA หมายถึง วิธี ethanol/formic acid extraction
 N/A หมายถึง Not Available หรือ ไม่ปรากฏข้อมูล



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มสหกิจศึกษา

วันที่ 3 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นายธนบดี พยุหะ รหัสประจำตัว 57050695
นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา
ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง
ชื่อภาษาไทย การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Listeria* ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีชนิด MALDI-TOF
ชื่อภาษาอังกฤษ Identification of *Listeria* spp. Using MALDI-TOF Mass Spectrometry
ปีการศึกษา 2560
เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00%

ลงชื่อ.....*ธนบดี พยุหะ*.....
(นายธนบดี พยุหะ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์นิเทศสหกิจศึกษา
ผศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมและผู้นิเทศสหกิจศึกษา
ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมี
เนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....*สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม*.....
(ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ลงชื่อ.....*เพียงจันทร์ สนธยานนท์*.....
(ผศ.ดร.เพียงจันทร์ สนธยานนท์)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม