การตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีทางอิมมูโนวิทยาในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล

Detection of *Salmonella* spp. by Real-time PCR Technique Comparing with Rapid Immunological Test in Halal Food

พจชนาถ พัทบุรี[1*] อภิญญา ศุกลรัตน์[1] และ อุทัย ไทยเจริญ[1]
Pojchanad Pathaburee[1*], Apinya Sukolrat[1] and Utai Thaicharoen[1]

บทคัดย่อ

การตรวจหา DNA ของ เชื้อ *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนในอาหารฮาลาล โดยใช้เทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีอิมมูโนที่ใช้ชุดทดสอบ Singlepath® *Salmonella* (AOAC 060401) โดยเทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจง เมื่อตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. พบว่า ให้ผลบวกเฉพาะเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ให้ผลลบในตัวอย่างที่ได้จากเชื้อชนิดอื่น เช่น เชื้อ *Escherichia coli* ระยะเวลาในการตรวจสอบรวดเร็วกว่าโดยไม่จำเป็นต้องนำตัวอย่างไปบ่มใน Selective media เมื่อศึกษาความไวของปฏิกิริยาสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.001% โดยประสิทธิภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารและวัตถุดิบที่ผลิตอาหารฮาลาลที่ใช้ในการผลิตเปรียบเทียบผลกับการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีอิมมูโนโดยการใช้ชุดทดสอบ Singlepath® *Salmonella* พบว่า ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยทุกครั้งที่ทำการตรวจสอบจะมีตัวอย่างเชื้อควบคุมที่เป็นบวกทำปฏิกิริยาควบคู่เสมอ

คำสำคัญ: อิมมูโนวิทยา อาหารฮาลาล *Salmonella*

Abstract

Detection of *Salmonella* spp. in halal food by using Real-time PCR technique compared with immuno techiques Singlepath® Salmonella (AOAC 060401) was performed. A specificity-species of Real-time PCR was positive only *Salmonella* spp. DNA. For another species such as *Escherichia coli* was shown negative result. The real-time PCR technique presented faster result and without the need to incubated samples in selective media. The sensitivity of real-time PCR gave the best results at ratio of 0.001%. The efficiency of real-time PCR to detecte *Salmonella* spp. in halal food and raw material was not deferent with immuno technique and possitive control reaction was also provided at anytime of detection.

Keywords: Immunological, halal food, *Salmonella*

บทนำ

เชื้อที่ก่อโรค อาหารเป็นพิษที่สำคัญ ได้แก่ *Salmonella* spp. ซึ่งเชื้อดังกล่าวนี้ทำให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภค สัตว์ที่ได้รับเชื้อนี้อาจทำให้เกิดภาวะ septicemia หรือเกิดอาการท้องเสียแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง โรคติดเชื้อทางเดินอาหารเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขและมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจการส่งออกด้านอาหารของประเทศ (Riyaz *et al*., 2004) เชื้อบางชนิดเช่น *Salmonella* spp. สามารถแพร่เชื้อเข้าสู่ไข่ได้ ซึ่งจะก่อโรคต่อผู้บริโภคไข่ได้ (Berends *et al*., 1998) คนทั่วไปสามารถเป็นโรคนี้ได้ทั้งทางตรงจากการสัมผัสกับ

[1] ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110
[1] Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110
*Corresponding author: e-mail: pojchanad.j@psu.ac.th

สัตว์ที่เป็นโรคหรือพาหะที่มีเชื้อและติดต่อโดยทางอ้อมจากการบริโภคอาหารซึ่งเป็นแหล่งแพร่เชื้อ เช่น ไข่ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Boughton *et al*., 2007) การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่ใช้ในปัจจุบัน คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อและทำการทดสอบเชื้อที่เจริญด้วยวิธีทางชีวเคมี โดยการตรวจสอบทางชีวเคมีใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 5 วัน และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทางแบคทีเรียในการแยกเชื้อ (Guard, 2001) โดยราคาในการตรวจสอบเชื้อแต่ละชนิดมีราคาค่อนข้างสูง ต่อมาได้นำวิธีตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี Rapid test คือ การใช้หลักการตรวจสอบทางวิธีอิมมูโนโดยการใช้ชุดทดสอบ Singlepath® *Salmonella* (Merck, Germany) ซึ่งใช้ระยะเวลาทดสอบ 3 วัน (Lindhardt *et al*., 2009) ต่อมาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ในระดับ DNA ได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นเทคนิคทดสอบให้ผลรวดเร็ว ใช้เทคนิค Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์หา DNA ของเชื้อ ซึ่งเทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ DNA ของเชื้อแต่ละชนิดและเป็นปฏิกิริยาที่มีความไวสูง (Huang *et al*., 2007) สามารถตรวจสอบเชื้อที่ต้องการได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยและใช้เวลาในการตรวจสอบที่รวดเร็ว โดยประมาณ 45 นาทีหลังจากสกัด DNA แล้ว (Malorny *et al*., 2003) ดังนั้น ตามคุณประโยชน์ของเทคนิค Real-time PCR จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมจะนำมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบหาเชื้อที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Real-time PCR กับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับวิธีทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งเป็นวิธีตรวจเชื้อที่ใช้ในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp.
2. ศึกษาความไวการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Real-time PCR ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล
3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค Real-time PCR มาใช้ตรวจสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารฮาลาล เปรียบเทียบกับวิธีอิมมูโนโดยการใช้ชุดทดสอบ Singlepath® *Salmonella* ที่ใช้ในปัจจุบัน

ระเบียบวิธีวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์และตัวอย่างอาหาร

1. กลุ่ม positive control เป็นเชื้อ *Salmonella Enteritidis* (ATCC 15676)
2. ตัวอย่างอาหารและอาหารฮาลาลที่ผ่านการแปรรูป จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่ กุ้งส้ม บูดู ทุเรียนกวน (ทุเรียนพื้นบ้าน) รังนกบรรจุขวด ข้าวเกรียบปลาทอด มินิค็อกเทลไก่ ไส้กรอกไทยอีสานไก่ น้ำพริกกุ้ง น้ำพริกมะขามกุ้งแห้ง น้ำพริกกุ้งเสียบทรงเครื่อง แกงไตปลาสำเร็จรูป วุ้นสำเร็จรูป ลูกชิ้นปลาญี่ปุ่น ไข่ปลา ลูกชิ้นปลา ปลาม้วน ปูอัด เต้าหู้ซีฟู้ด และแซนด์วิชปลา ลูกชิ้นปลาแซลมอน โดยตัวอย่างก่อนทำการทดสอบเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัด DNA

2.1 ตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธีอิมมูโนโดยการใช้ชุดทดสอบ Singlepath® *Salmonella* (Merck, Germany) ตามวิธี AOAC 060401 โดยนำเชื้อ *Salmonella* มาตรฐานใส่ใน Buffer Peptone Water (BPW) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 18±20 ชั่วโมง ดูดเชื้อจาก BPW ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth (RVS) บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง ทดสอบต่อด้วย Immunological Rapid Test เชื้อตามวิธี Singlepath® *Salmonella* แล้วอ่านผลที่ได้

2.2 พัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. เตรียม Positive control สำหรับใช้การตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยเพิ่มชิ้น DNA ด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำ PCR product ที่ได้ฝากถ่ายใน TA vector โดยนำเชื้อ *Salmonella* spp. บ่มใน Buffer Peptone Water (BPW) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สกัด DNA โดยปั่นเหวี่ยงละลาย pellet โดยเติม proteinase K และสารละลาย Lysis Buffer หลังจากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน Column ล้างด้วย washing buffer หลังจากนั้นชะ

DNA ออกจาก column ด้วย Elution buffer เพิ่มชิ้น DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเตรียมสารละลายในหลอดทดลองซึ่งประกอบด้วย master mix PCR (125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3.75 mM Mg(OAc)2, 500 µM dNTP), 40 ng ของ DNA, 4.8 µM ของ primer Sal-F และ Sal-R ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ Sal-F 5′GGATCCGGCATTGCCGTTAG3′และ Sal-R 5′ GTCTTTTTTTGCC ATTTCTTGG3′ ปริมาณสารละลายทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง thermal cycle ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอโดยนำมาแยกบน agarose gel แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA) สกัดชิ้น PCR ออกจาก agarose gel เพื่อเตรียมชิ้น DNA สำหรับเป็น positive control เมื่อได้ชิ้น PCR product ต้องยืนยันผลที่ได้โดยนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากล โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่อง DNA Sequencer 377 เพื่อยืนยันชิ้น DNA ที่ได้เป็น PCR product จากเชื้อ *Salmonella* Spp. แล้วนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์สากล นำชิ้นส่วน DNA ฝากถ่ายยีนเข้าสู่ Topo TA Cloning เตรียม recombinant DNA เพื่อใช้เป็น positive control โดยเก็บโคโลนีที่ได้ใน 20% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 ศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วย Real-time PCR หลังจาก pre enrichment เชื้อ ด้วยอาหาร Peptone Water นำ enrichment culture ปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร มาสกัด DNA ด้วย Commercial kit นำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer และ probe ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ Primer Sal-F 5′GGATCCGGCATTGCCGTTAG3′, Sal-R 5′GTCTTTTTTTGCCA TTTCTTGG3′และ probe 5′(FAM)-CTAGCCTGGGAACCTCCATA-(TAMRA)-3′ (Boyd *et al.*,1993) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหลังจากผสมสารละลายต่างๆ primer–F, R 200 nM, TaqMan Master Mix PCR 10 µL, Probe Sal 200 nM, DNA 50-100 ng เข้าเครื่อง Real-time PCR โดยตั้งรอบดังนี้ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียสเวลา 10 นาที 1 รอบ ต่อด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ

2.4 ศึกษาความไวของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Real-time PCR ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *Salmonella* เจือจางเริ่ม 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001% นำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR

2.5 ตรวจสอบการปนเปื้อน*เชื้อ Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างอาหารฮาลาลแปรรูปที่ใช้ในการศึกษา ออกเป็นสองวิธีตรวจสอบ คือ การตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธีอิมมูโนโดยการใช้ชุดทดสอบ Singlepath® *Salmonella* เปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR

ผลการวิจัย

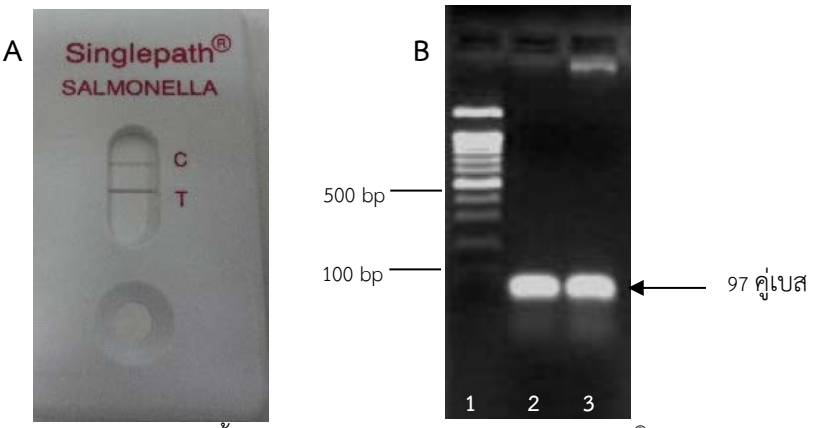
1. การตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบต่อทางอิมมูโนวิทยาใช้ Singlepath® *Salmonella* ตามวิธี AOAC 060401 ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยา คือการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี เมื่ออ่านผลที่ได้ พบว่า เชื้อ *Salmonella* spp. ให้ผลเป็นบวกจะปรากฏแถบตรงตำแหน่ง Test line (T line) และ Control line (C line) ซึ่งบริเวณของ T line จะเป็นบริเวณที่มีโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ขีดอยู่ ถ้าในตัวอย่างมีเชื้อ *Salmonella* spp. หลังจากที่สกัดโปรตีนแล้วนำมาหยดบนชุดทดสอบแล้ว จะเกิดการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีและเกิดเป็นแถบสีปรากฏให้เห็นได้ เนื่องจากแอนติบอดีที่ขีดที่เส้น T line ได้เชื่อมอยู่กับอนุภาคทองคำหรืออนุภาคที่ทำให้เกิดสีได้ (ภาพที่ 1A)

2. พัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. เตรียมตัวอย่างสำหรับใช้เป็น Positive control เชื้อมาตรฐานมาสกัด DNA แล้วเพิ่มชิ้น DNA ในส่วนยีนที่สนใจด้วยเทคนิค PCR ย้อมแถบ DNA ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV เห็นแถบ DNA ขนาดประมาณ 97 คู่เบส (ภาพที่ 1B) การตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้นำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์นำผลที่ได้ BLAST สู่

ฐานข้อมูลสากล เพื่อตรวจสอบชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ว่าเป็นชิ้น DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ผลคือมีความเหมือนคล้ายคลึงกับเชื้อ *Salmonella* spp.

2.1. ศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วย Real-time PCR หลังจาก pre enrichment เชื้อ ด้วยอาหาร peptone water ระยะเวลา 16 ชั่วโมง นำมาสกัด DNA ด้วย Commercial kit แล้วเพิ่มชิ้น DNA ในส่วนยีนที่สนใจด้วยเทคนิค Real–time PCR โดยผลเป็นบวกปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในตัวอย่างที่วิเคราะห์ปนเปื้อน*เชื้อ Salmonella* spp. และให้ผลลบถ้าในตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อน

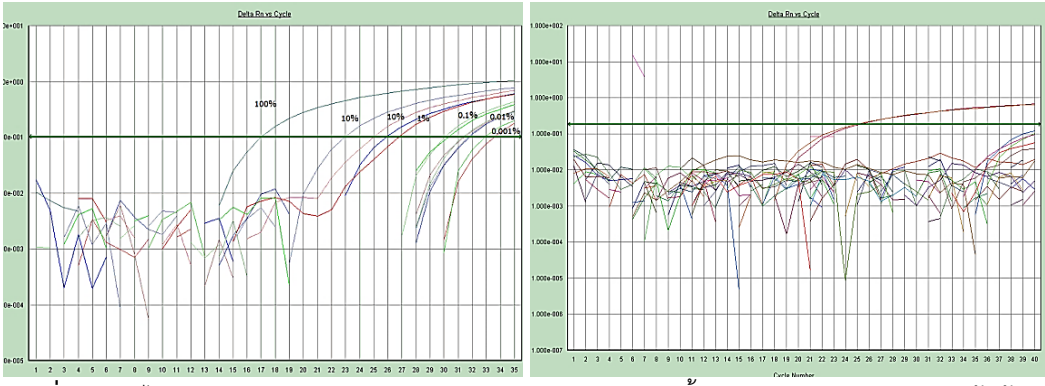
2.2. ศึกษาความไวของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Real-time PCR ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ความเข้มข้นต่างๆ เช่น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001% ตัวควบคุมที่เป็นบวกและตัวควบคุมที่เป็นลบ สกัด DNA และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งให้ผลเป็นบวกถ้ามีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และให้ผลเป็นลบถ้าไม่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหลังจากทำปฏิกิริยาดังภาพที่ 2A



ภาพที่ 1 แสดงภาพผลการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วย Singlepath® *Salmonella* (A), PCR Product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนยีน invA โดย lane 1: 100 bp marker, lane 2: *Salmonella* spp. ครั้งที่ 1, lane 3: *Salmonella* spp. ครั้งที่ 2

2.3 ความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบต่อด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ผลตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร buffer peptone water นำมาเลี้ยงต่อในอาหาร selective medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบต่อตามวิธี Singlepath® *Salmonella* โดยในการทดลองมีตัวควบคุมที่เป็นบวก คือ เชื้อ *Salmonella Enteritidis* (ATCC 15676) จะปรากฏแถบ 2 แถบทั้งตำแหน่ง C และ T ในตัวอย่างอาหารฮาลาล หากไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. จะปรากฏเฉพาะแถบ C เท่านั้น พบว่า จากการตรวจสอบการปนเปื้อนจากอาหารฮาลาล จำนวน 20 ตัวอย่างอาหารทั้งหมด ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อซึ่งจะปรากฏเฉพาะแถบ C เท่านั้น

อาหารส่วนที่สองนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR หลังจากนำตัวอย่างอาหารที่ต้องการตรวจสอบมา pre-enrichment ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 16 ชั่วโมง นำมาสกัด DNA ทดสอบการปนเปื้อนด้วยเทคนิค Real–time PCR จากการตรวจสอบตัวอย่างอาหารจำนวน 20 ตัวอย่างอาหาร ทั้งหมดพบว่า ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. เพราะไม่ปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อวิเคราะห์ผลให้ผลเป็นลบโดยให้ผลเหมือนตัวควบคุมที่เป็นลบซึ่งในการทดลองมีตัวควบคุมที่เป็นบวกจะปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดังภาพที่ 2B นำผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบกับเทคนิคเพาะเลี้ยงและใช้ Singlepath® *Salmonella* ดังตารางที่ 1



ภาพที่ 2 ความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR ตรวจสอบ DNA ของเชื้อ Salmonella spp. ความเข้มข้นต่างๆ 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001% (A), ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิค Real-time PCR (B)

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงและใช้ Singlepath® *Salmonella* เปรียบเทียบกับเทคนิคReal-time PCR

ตัวอย่างที่	ชื่อ	ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงและใช้ Singlepath® *Salmonella*	ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR
1	กุ้งส้ม	-	-
2	บูดู	-	-
3	ทุเรียนกวน	-	-
4	รังนกบรรจุขวด	-	-
5	ข้าวเกรียบปลาทอด	-	-
6	มินิค็อกเทลไก่	-	-
7	ไส้กรอกไทยอีสานไก่	-	-
8	น้ำพริกกุ้ง	-	-
9	น้ำพริกมะขามกุ้งแห้ง	-	-
10	น้ำพริกกุ้งเสียบทรงเครื่อง	-	-
11	แกงไตปลาสำเร็จรูป	-	-
12	วุ้นสำเร็จรูป	-	-
13	ลูกชิ้นปลา ญี่ปุ่น	-	-
14	ไข่ปลา	-	-
15	ลูกชิ้นปลา	-	-
16	ปลาม้วน	-	-
17	ปูอัด	-	-
18	เต้าหู้ซีฟู้ด	-	-
19	แซนด์วิชปลา	-	-
20	ลูกชิ้นปลาแซลมอน	-	-
21	เชื้อ *salmonella* เจือจาง 10%	+	+
22	เชื้อ *salmonella* เจือจาง 1%	+	+
23	เชื้อ *salmonella* เจือจาง 0.1%	+	+
24	เชื้อ *salmonella* เจือจาง 0.01%	+	+
25	เชื้อ *salmonella* เจือจาง 0.001%	+	+

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ การตรวจหายีนของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรง จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยต้องเตรียมตัวควบคุมที่เป็นบวกโดยเป็นชิ้นส่วนของเชื้อเท่านั้นเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อในการทดสอบแต่ละครั้ง โดยจะยืนยันชิ้น DNA ที่ได้ ตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี DNA sequencing และผลที่ได้นำเข้าสู่ฐานข้อมูลสากล พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ในฐานข้อมูลสากล NCBI แล้วฝากถ่ายยีนเข้า TOPO Cloning kit ในการศึกษาครั้งนี้จะตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยเลือกยีน *invA* ซึ่งเป็นยีนที่มีความคงที่และพบได้ในเชื้อ *salmonella* หลายสายพันธุ์ (Boyd *et al.*,1996) ความไวของปฏิกิริยา เมื่อนำ DNA มาเจือจาง พบว่า สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.0001% ซึ่งในการทดลองหาความไวในการตรวจสอบของเชื้อ *Salmonella* spp. ในปี ค.ศ. 2006 Petra และคณะ ได้ศึกษาวิธีการสกัด DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยทำการกรองน้ำเกลือที่ได้จากการชะตัวอย่างที่ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในการทดสอบได้ใช้กระดาษกรองสำหรับกรองเชื้อหลายชนิด เพื่อให้ทราบว่าเมื่อทำการสกัดแล้วกระดาษกรองชนิดใดที่ได้ปริมาณ DNA มากที่สุด ซึ่งพบว่า กระดาษกรองชนิด Cheesecloth พบแบคทีเรียที่สนใจในปริมาณมากที่สุด แล้วใช้เทคนิค Real-time PCR ตรวจสอบเชื้อ พบว่า ปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้อยู่ที่ 2.2 CFU/100 ml (Petra *et al*., 2006) ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลและตรวจสอบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ผลที่ได้พบว่า เมื่อใช้ primer และ probe ที่เลือกใช้ให้ผลสอดคล้องกับเทคนิคการด้วยสอบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาตรวจสอบด้วย Singlepath® *Salmonella* (Merck, Germany) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการรับรอง โดยในการทดลองตรวจสอบอาหารทั้งหมด 20 ชนิดซึ่งไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยในทุกครั้งที่ทำการทดลองจะมีตัวควบคุมที่ให้ผลบวก คือ เชื้อ *Salmonella Enteritidis* (ATCC 15676) ทำควบคู่ไปกับการทดลองทุกครั้งไม่พบผลบวกปลอม ซึ่งเชื้อ *Salmonella spp.* ในธรรมชาติอาจพบได้ยากแต่เนื่องจากเป็นเชื้อควบคุมต้องไม่พบในอาหารที่บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบการปนเปื้อน โดยเทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่ให้ผลเหมือนกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Luke และคณะ ปี ค.ศ. 2002 ใช้เทคนิค Real-time PCR มาตรวจหาเชื้อ *Salmonella spp.* ซึ่งเชื้อระบาดในประเทศอเมริกาและมีผู้ป่วยจำนวนประมาณ 1.4 ล้านคน โดยได้ทำการสกัด DNA ของเชื้อ แล้วนำมาตรวจสอบด้วย hybridization probe ที่ติดฉลากกับ 6-carboxyfluorescein (report dye)และ 6-carboxytetramethyl rhodamine (quencher dye) เพื่อสามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างรวดเร็ว พบว่าเทคนิค Real-time PCR ให้ผลเหมือนกับเทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (Luke *et al*., 2002) เทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่ไวกว่าโดยใช้เวลาในการตรวจสอบ 20 ชั่วโมง นับตั้งแต่การ enrichment เชื้อ โดยใช้เวลา 20 ชั่วโมง สามารถนำมาสกัด DNA และตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารได้ ซึ่งจะให้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบด้วย Singlepath® *Salmonella* (Merck, Germany) ประมาณ 3 วัน ซึ่งเป็นการเพิ่มความมั่นใจและลดระยะเวลาการตรวจสอบการปนปื้อนของเชื้อให้ผู้บริโภคได้ และสามารถสรุปเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงและเทคนิค Real time PCR ได้ดังนี้

หัวข้อ	เทคนิคเพาะเลี้ยงและทดสอบด้วย Rapid test	เทคนิค Real time PCR
ระยะเวลา	50 ชั่วโมง	19 ชั่วโมง
ต้นทุนการทดสอบ	ประมาณ 750	ประมาณ 200
วัสดุและสารเคมี	มีอายุการใช้งานไม่เกิน 1 ปี	มีอายุการใช้งานมากกว่า 1 ปี
ใช้เชื้อ Positive control	ใช้เชื้อที่มีชีวิตเป็น positive control จำเป็นต้องอบทำลายเชื้อก่อนทิ้ง	ใช้ชิ้นส่วนยีนที่ฝากถ่ายเป็น positive control ไม่ต้องอบทำลายเชื้อก่อนทิ้ง

เอกสารอ้างอิง

Berends, B.R., Knapen, F.V., Mossel, D.A., Burt, S.A. and Snijders, J.M. 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. International Journal Food Microbiology. 44: 219-229.

Boughton, C.J., Egan, G.K., Markey, B. and Leonard, N. 2007. Quantitative examination of *Salmonella* spp. in the lairage environment of a pig abattoir. Foodborne Pathogens and Disease. 4: 26-32.

Boyd, E.F., Wang, F.S., Beltran, P., Plock, S.A., Nelson, K. and Selander, R.K. 1993. Salmonella reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. Journal of general microbiology. 139: 1125-1132.

Boyd, E.F., Wang, F.-S., Whittam, T.S. and Selander, R.K. 1996. Molecular Genetic Relationships of the Salmonellae. Applied and Environmental Microbiology. 62: 804–808.

Guard, P. 2001. The chicken, the egg and *salmonella enteritidis*. Environmental Microbiology.7: 421-430.

Huang, B., Eglezos, S., Heron, B.A., Smith, H., Graham, T., Bates, J. and Savill, J. 2007. Comparison of multiplex PCR with conventional biochemical methods for the identification of *Listeria* spp. isolates from food and clinical samples in Queensland, Australia. Journal of Food Protection. 70: 1874-1880.

Lindhardt, C., Schonenbrucher H., Slaghuis J., Bubert A. and Ossmer R. 2009. Singlepath Salmonella. Performance Tested Method 060401. J AOAC Int. 92(6): 1885-9.

Luke, T.D., William, J.B., James, C.M., Margaret, S.N., Lynn, A.C., William, B.H., Linda, G., Riggins, W.S, Sandra, M., Ann. S. and Keton, L. 2002. Real-Time PCR Detection of *Salmonella* in Suspect Foods from a Gastroenteritis Outbreak in Kerr County, Texas. Journal of Clinical Microbiology. 40(8): 3050-3052.

Malorny, B.P., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook N., Wagner, M. and Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int. International journal food microbiology. 83: 39-48.

Petra, F.G., Kari, W. and Mansel, G. R. 2006. Direct Quantitation and Detection of Salmonellae in Biological Samples without Enrichment, Using Two-Step Filtration and Real-Time PCR. Appiled and Environmental Microbiology .72 (6): 3896-3900.

Riyaz, U., Verma, V. and Qazi, G.N. 2004. Rapid detection of salmonella by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 18(333): 39.