การตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัส ออเรียสที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู

นายพงศ์ธร พุ่มแตงอ่อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIN ENCODING GENES OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM THAI-STYLE FERMENTED PORK SAUSAGE (NHAM-MHOO)

Mr. Pongthorn Pumtang-on

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเอนเทอโรท็อคซิน ของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัส ออเรียสที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู
โดย	นายพงศ์ธร พุ่มแตงอ่อน
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงศ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. นิภา โชคสัจจะวาที)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พงศ์ธร พุ่มแตงอ่อน : การตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัส ออเรียสที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู (IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIN ENCODING GENES OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM THAI-STYLE FERMENTED PORK SAUSAGE (NHAM-MHOO)) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น, 77 หน้า

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณแบบ MPN จากแหนมหมูจำนวน 90 แท่ง จากการศึกษาพบว่า มีความชุกของการปนเปื้อน *S. aureus* ช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม 2549 สูงถึงร้อยละ 45.56 และมีปริมาณการปนเปื้อนอยู่ตั้งแต่ 2 จนถึงมากกว่า 16,000 MPN ต่อกรัมแหนมหมู ศึกษาการปรากฏของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู จำนวน 155 isolates ด้วยเทคนิค multiplex PCR พบการปรากฏของยีน classical enterotoxin encoding genes จำนวน 29 ตัวอย่าง (ร้อยละ18.71) ซึ่งพบยีนเหล่านี้ได้ทั้งยีนเดียว (ร้อยละ 13.55) หรือ 2 ยีน (ร้อยละ 5.16) เท่านั้น โดยพบยีน *sec* มากที่สุด (ร้อยละ 11.61) รองลงมาคือ ยีน *sea* ร่วมกับยีน *sec* (ร้อยละ 5.16), ยีน *sea* (ร้อยละ 1.29)และยีน *seb* (ร้อยละ 0.65) ตามลำดับ แต่ไม่พบของยีน *sed* และยีน *see* เลย จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า *S. aureus* ที่มีการปรากฏของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs มีความสัมพันธ์กับการสร้าง classical SEs อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) นอกจากนี้ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมูด้วยเทคนิค rep - PCR พบว่าจัดกลุ่มได้ 27 กลุ่ม ที่ค่า similarity 90% และมีการกระจายของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษใน 13 กลุ่ม ซึ่ง classical SEs encoding genes นี้มีความเป็นไปได้ที่จะถ่ายทอดสู่ *S. aureus* อื่นได้ ดังนั้นผู้บริโภคที่บริโภคแหนมหมูนั้นมีโอกาสที่จะได้รับ *S. aureus* ที่มีการปรากฏของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นี้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้เนื่องจากมีโอกาสสร้าง SEs ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ซึ่งอาจจะสร้าง SEs ปนเปื้อนในแหนมหมูได้

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##: 4975952831 : VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD: *Staphylococcus aureus* / FOOD INTOXICATION / ENTEROTOXIN ENCODING GENES / PCR TECHNIQUE / REP-PCR

PONGTHORN PUMTANG-ON: IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIN ENCODING GENES OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM THAI-STYLE FERMENTED PORK SAUSAGE (NHAM-MHOO). THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASST. PROF. SUPHACHAI NUANUALSUWAN, THESIS COADVISOR: ASST. PROF. RUNGTIP CHUANCHUEN, 77 pp.

The aims of this study were to describe proportion of classical SEs encoding gene of *S. aureus*, to correlate between classical SEs encoding gene of *S. aureus* and SEs productions, and to determine genetic diversity of *S. aureus* isolated from Nham-mhoo. The number of Nham-mhoo in this study was 90 samples. The prevalence of *S. aureus* in Nham-mhoo during June - August 2006 was 45.56% and concentrations were between 2 and more than 16,000 MPN per gram. The result of this study showed that percentage of classical SEs encoding genes 18.71 (29/155). From this study, *sec* was the dominant gene (11.61%) which was followed by *sea* and *sec* (5.16%), *sea* (1.29%) and *seb* (0.65%), respectively. The presence of classical SEs encoding gene significantly correlated with classical SEs production ($p < 0.01$). In addition, genetic diversity of *S. aureus* isolated from Nham-mhoo was categorized into 27 clusters. While classical SEs encoding gene was categorized into 13 clusters. Higher concentration of *S. aureus* in Nham-mhoo was associated with higher genetic diversity in terms of pattern cluster. These results indicated that *S. aureus* isolated from Nham-mhoo harbored classical SEs encoding genes and these isolated are likely to be enterotoxigenic.

Department Veterinary Public Health — Student's Signature Pongthorn Pumtang-on

Field of Study Veterinary Public Health — Principal advisor's signature S. Nuanualsuwan

Academic Year 2007 — Co-advisor's Signature Rungtip Chuanchuen

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายได้ด้วยการสนับสนุนและช่วยเหลือจาก ผศ. น.สพ.ดร. ศุภชัยเนื้อนวลสุวรรณ ผู้ซึ่งได้ให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสได้รับทุนวิจัยจากโครงการการประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณของเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus* และสารประกอบไนโตรซามีนในแหนมหมูของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยมี ดร. รุจ วัลยะเสวี เป็นหัวหน้าโครงการ

ขอขอบพระคุณ ดร. นิภา โชคสัจจะวาที, คุณ ศริญญา พรเอี่ยม, คุณกิตติมา กองทอง, คุณสนิตย์ คำดี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในหน่วยปฏิบัติการทางอาหารทุกท่านที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำแล็ปจนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ส.พญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น, นายชานนท์ เอกภพโยธิน, น.ส.เวชสิริ วรรณประสาท, น.ส.ศิรินทิพย์ เข็มทอง, น.ส. ปรัชญา อยู่เอี่ยมยุทธ์, คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล ตลอดจนบุคลากรทั้งในภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข และนอกภาควิชา สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

สารบัญตัวย่อ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

การผลิตแหนมหมู..... 6

ลักษณะทั่วไปของ *S. aureus*..... 8

สารพิษของ *S. aureus* และการก่อโรคอาหารเป็นพิษ..... 9

การวินิจฉัยและการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ..... 10

ความหลากหลายทางพันธุกรรม 12

ความชุกและการระบาด..... 13

บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย..... 16

ระยะที่ 1 การเพาะแยกและพิสูจน์ *S. aureus* จากแหนมหมู..... 17

ระยะที่ 2 การพิสูจน์เพื่อยืนยันเชื้อและตรวจยีน *sea-see* 19

ระยะที่ 3 ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยการตรวจ classical SEs..... 23

ระยะที่ 4 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* 25

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 26

การวิเคราะห์ข้อมูล..... 27

บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 28

การเพาะแยกและพิสูจน์ *S. aureus* จากแหนมหมู..... 28

การพิสูจน์เพื่อยืนยันเชื้อและตรวจยีน *sea - see* ด้วย multiplex PCR..... 29

ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยการตรวจ classical SEs..... 33

บทที่ **หน้า**

ความสัมพันธ์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs กับการสร้าง SEs…….. 38
ผลศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม..... 39
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……..……..…… 46
รายการอ้างอิง…… 57
ภาคผนวก…….. 65
ภาคผนวก ก…….. 66
ภาคผนวก ข…….. 70
ภาคผนวก ค…….. 72
ภาคผนวก ง…….. 75
ภาคผนวก จ…….. 76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……..… 77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 เกณฑ์ระดับการแข็งตัวของ coagulase test..... 18
ตารางที่ 2 แสดง multiplex PCR condition 20
ตารางที่ 3 primers จำเพาะต่อชนิดของ *S. aureus Sa442* และ ยีน *sea-see* 21
ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนผสมของ primers และสารเคมีเพื่อทำ multiplex PCR..... 22
ตารางที่ 5 แสดง *S. aureus* มาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุม..... 22
ตารางที่ 6 แสดงอัตราส่วนผสมของ primers และสารเคมีเพื่อทำ rep-PCR..... 25
ตารางที่ 7 แสดง rep-PCR condition..... 26
ตารางที่ 8 แสดงปริมาณการปนเปื้อน *S. aureus* ในแหนมหมู..... 28
ตารางที่ 9 แสดงจำนวน isolate ที่มีการตรวจพบ classical SEs- encoding gene 29
ตารางที่ 10 แสดงจำนวน isolate ที่พบยีน *Sa 442* และclassical SEs encoding genes.... 30
ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และการตรวจ classical SEs จาก *S. aureus* ทุก isolate ด้วย Transia Plate Plus kit ELISA.. 33
ตารางที่ 12 แสดงค่า OD จาก *S. aureus* isolate, positive control (PC) และ BHI ที่วัดได้ รวมทั้งค่า Threshold ของ culture supernatant ที่คำนวณได้..... 35
ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และการตรวจพบ classical SEs ด้วย Transia ID kit ELISA..... 36
ตารางที่ 14 แสดงค่า OD จาก *S. aureus* isolate ที่วัดได้ และค่า Threshold ของ culture supernatant ที่คำนวณได้..... 37
ตารางที่ 15 สรุปผลความหลากหลายทางพันธุกรรม..... 41
ตารางที่ 16 สรุปผลการศึกษาทั้งหมด..... 42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ **หน้า**

แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการวิจัยโดยสังเขป..... 16
รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษโดยใช้ *S. aureus* มาตรฐาน และ *S. aureus* isolate ที่เพาะแยกจากแหนมหมู..... 31
รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษจาก *S. auerus* isolates..... 32
รูปที่ 3 แสดงการตรวจการสร้าง classical SEs ด้วย Transia Plate Plus kit ELISA..... 34
รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจการสร้าง SEs ด้วย Transia ID kit ELISA 36
รูปที่ 5 สรุปผล clustering analysis ของ *S. aurues* isolate 40
รูปที่ 6 แสดงผลการจัดกลุ่ม isolates ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ที่ similarity value ร้อยละ 90..... 45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตัวย่อ

BHI	Brain Heart Infusion Broth
bp	base pair
BP	Baird-Parker Agar
et al.	Et alii, and others
kDa	kilo daltons
MPN	Most Probability Number method
PTSAg	Pyrogenic Toxin Superantigens
rep - PCR	repetitive sequence-based PCR
SEs	Staphylococcal enterotoxins
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
TBE	Tris-Buffer-EDTA
TSB	Tryptic Soy Broth
U	unit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แหนมหมูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์หมักพื้นบ้านของไทย ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคของประชากรภายในประเทศอย่างแพร่หลาย และด้วยเหตุจากการที่มีความต้องการในการบริโภคเพิ่มสูงขึ้น จึงมีการพัฒนาการผลิตแหนมหมูจากในระดับครัวเรือนขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรม ทำให้ผู้บริโภคสามารถหาซื้อได้ง่าย ตามท้องตลาด หรือห้างสรรพสินค้าทั่วไป ซึ่งมีค่อนข้างหลากหลายและแตกต่างกันไปทั้งด้านรสชาติและคุณภาพตามแต่ละผู้ผลิต ในปัจจุบันการผลิตแหนมหมูมีปัญหาด้านการควบคุมคุณภาพ โดยเฉพาะความไม่สะอาดและความไม่ปลอดภัยของวัตถุดิบ เนื่องจากกระบวนการผลิตแหนมหมูยังคงอาศัยกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่ใช้เป็นส่วนผสม ซึ่งผู้ผลิตไม่สามารถควบคุมชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงมีโอกาสปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคมากับวัตถุดิบได้ อีกทั้งผู้ผลิตบางรายขาดความรู้ความเข้าใจในการควบคุมกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์แหนมหมูให้ได้มาตรฐาน ส่งผลให้เกิดปัญหาในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมหมู และที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ เนื่องจากผู้บริโภคนิยมบริโภคแหนมหมูโดยไม่ผ่านการปรุงด้วยความร้อน ทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคแหนมหมูที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคสูงขึ้น โดยจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบได้บ่อยในแหนมหมูคือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและบนร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีโอกาสที่จะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์แหนมหมูได้ อีกทั้ง *S. aureus* ยังสามารถสร้างสารพิษที่สามารถทนความร้อนทำให้แม้ว่าการปรุงอาหารผ่านความร้อนแล้วสารพิษยังก่อให้เกิดอันตรายได้ นอกจากนี้ *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษสูงเป็นอันดับที่ 3 ของโลก (Tirado and Schimdt, 2001) รวมทั้งในประเทศไทยด้วยเช่นกัน (วรรณา และคณะ, 2548)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในแหนมหมูสูงถึงร้อยละ 15 (Paukatong and Kunawasen, 2001) พรศิริ และ อนิรุธ (2548) ได้รายงานพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในเนื้อหมูจากตลาดสดในภาคเหนือที่เกิน 100 CFU ต่อกรัม คิดเป็นร้อยละ 14.0 ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมูที่ปนเปื้อน *S. aureus* ค่อนข้างสูง ในขณะที่มาตรฐานแหนมและเนื้อสัตว์โดยสำนักงาน

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2546) ได้กำหนดว่าจะต้องไม่พบ *S. aureus* ในแหนม 100 มิลลิกรัม

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* ไม่ได้เกิดจากการบริโภคตัวจุลินทรีย์โดยตรง แต่เป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษที่ *S.aureus* บางสายพันธุ์สร้างขึ้น เรียกว่า Staphylococcal enterotoxins (SEs) ซึ่งสามารถทนความร้อนได้ เมื่อบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน SEs นี้จะทำให้มีไข้ มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรง และเกิดปัญหาทางระบบทางเดินอาหาร อาการเด่นคือ อาเจียน และมีระยะเวลาแสดงอาการป่วยอย่างรวดเร็ว (Dinges et al., 2000) ปัจจุบันมีการค้นพบ SEs มากกว่า 20 ชนิด (Atanassova et al., 2001; Jorgensen et al., 2005; Thomas et al., 2006) และ SEs ที่พบว่าก่อปัญหาในการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษบ่อยที่สุดคือสารพิษชนิด A, B, C, D และ E (Balaban and Rasooly, 2000)

โดยทั่วไปในการวิเคราะห์โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* ทางระบาดวิทยา และการควบคุมกระบวนผลิตอาหาร ยังคงใช้วิธีการตรวจปริมาณการปนเปื้อนของ *S. aureus* ซึ่งอาศัยวิธีการเพาะแยกเชื้อแบบดั้งเดิม (conventional method) ซึ่งจัดเป็นวิธีมาตรฐาน enumeration method ได้แก่ Direct Plate Count method และ Most Probable Number method (AOAC, 1995) โดยถ้าพบ *S. aureus* ในปริมาณที่มากกว่า 100,000 CFU ต่อกรัม คาดว่าจะสามารถสร้างสารพิษและก่อโรคได้ (U.S. FDA/CFSAN, 1992) ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ความไม่จำเพาะทางชีวเคมีของ *S. aureus* ใช้ระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์นาน และต้องใช้แรงงานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์มาก และที่สำคัญคือ ถึงแม้ว่าผลที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชิงปริมาณนี้ อาจพบ *S. aureus* ในปริมาณสูง แต่ก็อาจยังไม่สามารถระบุว่า *S. aureus* ที่แยกได้นั้นเป็นสาเหตุที่แท้จริงของโรคอาหารเป็นพิษนั้น เนื่องจากมี *S. aureus* เพียงบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง SEs และก่อโรคได้

ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์การปนเปื้อนของ SEs ที่ปนเปื้อนในอาหารและตัวอย่างทางคลินิก โดยพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป เช่น TECRA® EIA kit และ TRANSIA® EIA kit ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพิษโดยอาศัยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นต้น แม้ว่าชุดทดสอบเหล่านี้มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ก็ยังมีข้อจำกัดคือ สามารถตรวจหาสารพิษได้ชนิด A – E เท่านั้น อีกทั้งในการตรวจหาสารพิษในอาหารนั้นจำเป็นต้องสกัดสารพิษจากอาหารให้มีความบริสุทธิ์ก่อน ซึ่งวิธีสกัด SEs จะขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของอาหาร จำเป็นต้องมีการ optimize วิธีสกัด SEs จากตัวอย่างอาหารชนิดนั้นๆ เพื่อหลีกเลี่ยง false positive และ false negative ทำให้เสียเวลาในการเตรียมตัวอย่างและถ้าตัวอย่างไม่บริสุทธิ์เพียงพอ

ก็มีผลทำให้ผลการตรวจคลาดเคลื่อนได้ (Park et al., 1992) และปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ชุดทดสอบเหล่านี้มีราคาแพงจึงไม่เหมาะกับการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก

ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีนักวิจัยหลายคณะได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* ที่มีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง มีความไวและความแม่นยำสูง สามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก แนวทางหนึ่งของการพัฒนาดังกล่าวคือ การนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาประยุกต์ใช้ โดยศึกษาจาก *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างอาหาร หรือตัวอย่างทางคลินิก ซึ่งสามารถช่วยพิสูจน์ให้ทราบว่าเป็น *S. aureus* และมียีนควบคุมการสร้างสารพิษหรือไม่ในเวลาเดียวกัน รวมทั้งทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งจะมีประโยชน์ในแง่การวิเคราะห์หาแหล่งการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในต่างประเทศมีการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังและวิเคราะห์โรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* รวมทั้งการควบคุมคุณภาพการผลิตอาหารกันอย่างแพร่หลาย โดยทำการศึกษาใน *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ เช่น เนื้อหมูและเนื้อไก่ดิบ (Hwang et al.,2007) และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Normano et al., 2005 and Atanassova et al.,2001) เป็นต้น รวมถึง *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* (Nema et al., 2007, Ikeda et al., 2005, Kitai et al.,2005 and Martin et al., 2004)

แต่ในประเทศไทยมีข้อมูลของ *S. aureus* ในแง่การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ การปนเปื้อนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเฉพาะแหนมหมูมีอยู่อย่างจำกัด ประกอบกับยังไม่มีข้อมูลทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่มีของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษปนเปื้อนในแหนมหมู และยีนเหล่านั้นมีความสัมพันธ์กับการสร้าง SEs หรือไม่ อีกทั้งยังไม่ทราบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในแหนมหมูมาก่อน

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเพาะแยก *S. aureus* เพื่อศึกษาตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมูเบื้องต้น โดยศึกษาใน *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างแหนมหมูด้วยวิธี conventional method ร่วมกับการพิสูจน์เชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี จากนั้นตรวจพิสูจน์ยีนยันชนิด *S. aureus* และการตรวจพิสูจน์พบยีน *sea*, ยีน *seb*, ยีน *sec*, ยีน *sed* และยีน *see* ด้วยเทคนิค multiplex PCR ศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs กับการสร้าง classical SEs ด้วยเทคนิค ELISA เพื่อยืนยันการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ รวมทั้งทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์โดยใช้ลายพิมพ์ DNA

ที่สร้างจากจากเทคนิค repetitive sequence-based PCR (rep - PCR) ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ความสัมพันธ์ของยีนควบคุมการสร้างสารพิษกับการสร้างสารพิษ รวมทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในแหนมหมู ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์และเฝ้าระวังการระบาดโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ต่อไป และใช้เป็นส่วนหนึ่งในการระบุอันตรายของ *S. aureus* ในแง่ของการประเมินความเสี่ยงของผู้บริโภคแหนมหมูได้ รวมทั้งเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ หรือพัฒนาเทคนิคเพื่อการวิเคราะห์ *S. aureus* และ SEs ต่อไปในงานวิจัยในอนาคตได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการปรากฏของยีนควบคุมการสร้างสารพิษและความสัมพันธ์ของยีนควบคุมการสร้างสารพิษกับการสร้าง classical SEs ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (descriptive study) มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และความสัมพันธ์ของยีนควบคุมการสร้างสารพิษกับการสร้างสารพิษ ตลอดจนความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมู เพื่อให้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงได้ดำเนินการแบ่งเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1.เพาะแยก *S. aureus* จากตัวอย่างแหนมหมูร่วมกับการพิสูจน์เชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.พิสูจน์ยืนยันเชื้อและการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs

3.ศึกษาการสร้างสารพิษของเชื้อที่มียีนควบคุมการสร้าง classical SEs

4.ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในแหนมหมู

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

สตาฟฟิโลคอคคัส ออเรียส, โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากบริโภคสารพิษ, ยีนควบคุมการสร้างสารพิษ, เทคนิค PCR, เรพ พีซีอาร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านองค์ความรู้ใหม่

1.1 เป็นข้อมูลเบื้องต้นของข้อมูลพันธุกรรมของยีนควบคุมการสร้างสารพิษของ *S. aureus* ที่แยกได้จากแหนมหมู

1.2 เป็นข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่แยกได้จากแหนมหมู

1.3 เป็นข้อมูลที่ใช้ในการระบุอันตรายของ *S. aureus* และ SEs ที่ปนเปื้อนในแหนมหมู

2.ด้านการนำไปใช้

2.1 สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปพัฒนาเทคนิคในตรวจพิสูจน์วิเคราะห์ *S. aureus* และ SEs ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

2.2 สามารถใช้เป็นข้อมูลส่วนหนึ่งประกอบการเฝ้าระวัง *S. aureus* และสารพิษที่ปนเปื้อนในแหนมหมู

2.3 ใช้เป็นแนวทางในการนำระบบ การจัดการความเสี่ยงมาควบคุม การปนเปื้อนของ *S. aureus* ในกระบวนการผลิตแหนมในระดับอุตสาหกรรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

แหนมหมูเป็นอาหารประเภทเนื้อสัตว์หมักพื้นบ้าน และเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งในการผลิตแหนมหมูนั้นต้องอาศัยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบอาหาร จึงมีโอกาสปนเปื้อน *S. aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดย *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและบนร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีโอกาสที่จะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์แหนมหมูได้ อีกทั้ง *S. aureus* ยังสามารถสร้างสารพิษซึ่งทนความร้อนได้และก่อให้เกิดปัญหาโรคอาหารเป็นพิษตามมา ในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษตลอดจนความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในแหนมหมูมาก่อน อีกทั้งยังไม่ทราบว่าการพบยีนเหล่านั้นจะมีความสัมพันธ์กับการสร้างสารพิษหรือไม่ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมูด้วยเทคนิค multiplex PCR ร่วมกับการตรวจการสร้าง classical SEs เนื่องจากการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษนี้ไม่ได้ยืนยันว่า *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในแหนมหมูนั้นมีความสามารถในการสร้างสารพิษได้ ดังนั้นจึงต้องตรวจการแสดงออกของยีนเหล่านั้นด้วย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการตรวจสารพิษที่ *S. aureus* ที่มียีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเหล่านั้นสร้างขึ้น ด้วยเทคนิค ELISA และหาความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบยีนเหล่านั้นและการสร้างสารพิษ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในแหนมหมูว่ามีความหลากหลายอย่างไรบ้าง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในแง่การศึกษาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนต่อไป และเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวจึงต้องมีการรวบรวมข้อมูลต่างๆ ดังนี้

1. การผลิตแหนมหมู

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์หมักพื้นบ้านที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันมีการผลิตเป็นอุตสาหกรรมใหญ่ การผลิตแหนมสามารถทำได้โดยใช้เทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อน วัตถุดิบที่ใช้นำมาประกอบผสมเป็นแหนมหมู ได้แก่ เนื้อหมู หนังหมู กระเทียม พริก ข้าว เกลือ น้ำตาล

สารประกอบไนเตรท ไนไตรท์ และส่วนผสมอื่นๆ นำมาผสมกันบรรจุใส่ถุงอัดแน่น จากนั้นบ่มให้เกิดกระบวนหมักเป็นเวลา 3-4 วัน จึงสามารถนำมาบริโภคได้ กระบวนการหมักแหนมหมูส่วนใหญ่อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่ปะปนมาในธรรมชาติที่ปะปนมากับวัตถุดิบที่ใช้ทำแหนมหมู โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อกระบวนการหมักแหนมหมูมีหลายกลุ่มแต่กลุ่มที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ จุลินทรีย์พวกแบคทีเรียแลคติค (lactic acid bacteria) ซึ่งชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญในระหว่างการหมักแหนมคือกลุ่ม lactobacilli ได้แก่ *L. plantarum* *L. pentosus* และ *L. sakei* และกลุ่ม pediococci ได้แก่ *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* (Thanasupawat และ Daengsubha 1983; Thanasupawat al., 1992) แบคทีเรียแลคติคเหล่านี้จะทำหน้าที่ผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ lactic acid, volatile organic acid, hydrogen peroxide และ bacteriocin เป็นต้น โดยกรดอินทรีย์ได้จากย่อยสลายสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบส่งผลให้ความเป็นกรดด่างของแหนมลดลงแหนมจึงมีรสเปรี้ยว และเกิดการก่อตัวเป็นแหนม นอกจากนี้สภาวะการเป็นกรดยังช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดอีกด้วย นอกจากแบคทีเรียแลคติคที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีจุลินทรีย์พวก Micrococci และ Staphylococci ที่มีบทบาทต่อกระบวนการหมักแหนมหมู กล่าวคือจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความสามารถในการรีดิวส์สารประกอบไนเตรทเป็นไนไตรท์ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีแดงในแหนม อีกทั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวยังเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนและไขมัน ทำให้เกิดกลิ่นรสต่อผลิตภัณฑ์แหนม

นอกจากจุลินทรีย์ที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ยังพบจุลินทรีย์อื่นๆที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้เช่น *S. aureus, Clostridium perfingens, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni/coli, Escherichia coli* และ *Salmonella spp*. เป็นต้น การปนเปื้อนเหล่านี้สามารถเกิดได้ทั้งในวัตถุดิบ กระบวนการผลิต ตลอดจน การปรุงและบริโภค พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria), *Clostridium perfringens, Salmonella* spp. และ *S. aureus* ในตัวอย่างแหนมหมูที่เก็บตัวอย่างจาก ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคอีสานของประเทศไทย (Wongsommart et al., 1994) จากการศึกษาของ Vichienroj and Kunawasen (1998) พบว่ามีการปนเปื้อนของ *S. aureus* , *Salmonella* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในแหนม

2. ลักษณะทั่วไปของ *S. aureus*

S. aureus เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม อากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหาร นม อาหารบรรจุเสร็จ รวมทั้งมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ (Schleifer, 1986) ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึงร้อยละ 50 (Arbuthnott et al.,1990) ดังนั้น *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารจึงมีความแตกต่างกันไปตาม ชนิดอาหาร วิธีการผลิต และสิ่งแวดล้อม จากการรวบรวมข้อมูลพบว่า ส่วนใหญ่มักพบ *S. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภค (ready-to-eat) และอาหารที่ผ่านกระบวนการเตรียมที่ต้องใช้มือสัมผัส (food handling) เช่น สลัด เนยแข็ง ผัก นม เนื้อ เครื่องดื่ม ไข่และ ผลิตภัณฑ์จากไข่เป็นต้น

S. aureus เป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน family *Micrococcaceae* ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) มีลักษณะกลม (coccus) ไม่เคลื่อนที่ (non- motile) เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างจะพบ การเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (grape-like clusters) หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือสามารถเจริญเติบโตได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 7-48.5°C (mesophilic bacteria) ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตคือ 30-37°C (Schmitt et al., 1990) การสร้างสารพิษของ *S. aureus* สามารถสร้างได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 10-48°C และช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับสร้างสารพิษอยู่ในช่วง 40-45 องศาเซลเซียส (ICMSF, 1996) ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity) ต่ำสุดในอาหารที่ *S. aureus* ต้องการใช้ในการเจริญเติบโต คือ 0.86 (ในสภาวะที่มีอากาศ) และ 0.90 (ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ *S. aureus* สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 4.2-9.3 แต่ช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโต คือ 7-7.5 (Bergdoll, 1989) สามารถทนความเค็มได้ในช่วงร้อยละ 7-15 สามารถสร้างเอนไซม์ catalase เพราะสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เป็นน้ำและออกซิเจนได้ อีกทั้ง *S. aureus* ยังสามารถสร้างเอนไซม์ coagulase ได้ในขณะที่เชื้อ *Staphylococcus* species อื่นๆ ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ (Ryan and Ray,2004) นอกจากนี้ เมื่อเพาะเลี้ยง *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปพบว่าโคโลนี จะมีสีเหลืองทอง ผิวเรียบ เมื่อเพาะเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar จะพบว่ามีการโซนใสรอบโคโลนี (ß-haemolysis) (Ryan and Ray, 2004) ผนังเซลล์ของ *S. aureus* ยังสามารถต้านทานต่อเอนไซม์ lysozymeได้ แต่ไวต่อ lysostaphin (Le Lior et al., 2003) ปัจจุบัน *S. aureus* สามารถแบ่งได้เป็น 6 biotype ตามต้นกำเนิดจากคนหรือสัตว์ ได้แก่ human, non-ß-haemolytic human, avian, bovine, ovine และ non specific (Hennekinne et al.,2003) โดยใช้

คุณสมบัติทางชีวเคมีในการจำแนก นอกจากนี้จากการศึกษาทางพันธุกรรมพบว่า *S. aureus* มีประมาณ 2,600 ยีน และมี DNA ยาวขนาด 2.8 ล้านคู่เบสแพร์ ในโครโมโซม และมี plasmid ซึ่งอาจเป็นส่วนหนึ่งของ genome ได้

3. **สารพิษของ *S. aureus* และการก่อโรคอาหารเป็นพิษ**

การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ไม่ได้เกิดจากการรับประทานตัวเซลล์ *S. aureus* เข้าสู่ร่างกายโดยตรง เนื่องจาก *S. aureus* จะถูกทำลายโดยกระบวนการย่อยการอาหารภายในร่างกาย (Dabrowaki and Medrala, 2005) แต่ปัญหาโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* นั้นเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษที่ผลิตจาก *S. aureus* บางสายพันธุ์ เรียกว่า staphylococcal enterotoxins (SEs) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ทำให้ลักษณะของอาหารเปลี่ยนไป (Bergdoll, 1990) สามารถละลายน้ำและทนความร้อนได้

SEs เป็น Polypeptide สายเดี่ยว ขนาด 26-31 kDa ทนต่อ proteolytic enzymes เช่น pepsin และทนในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง เช่น สภาวะในกระเพาะอาหาร SEs จัดอยู่ในกลุ่ม Pyrogenic Toxin Superantigens (PTSAg) (Dinges et al., 2000) มีคุณสมบัติทำให้เกิดไข้ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างรุนแรง และทำให้เกิดปัญหาทางระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย เนื่องจาก SEs กระตุ้นปลายประสาทบริเวณกระเพาะซึ่งควบคุมด้วย emetic responses แต่ในกรณีที่เกิดสภาวะกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรง อาจทำให้ช็อก หรือเสียชีวิตได้ เรียกอาการโรคอาหารเป็นพิษนี้ว่า Staphylococcal Foodborne Poisoning (SFP) โดยทั่วไปจะแสดงอาการป่วย 1-6 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ (Tranter, 1990) โดยกลไกการก่อโรคของ SEs นั้นยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัด สำหรับคุณสมบัติของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรงนั้น มีสมมุติฐานของการก่อโรคคือ เมื่อผู้บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษเข้าไป สารพิษจะถูกดูดซึมผ่านทางลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นสารพิษจะจับกับ major histocompatibility class II ที่อยู่บนภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ และกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes ให้เข้ามาจับ SEs สามารถกระตุ้น T lymphocytes ได้อย่างรุนแรง ผู้ป่วยสามารถหายจากอาการโรคได้เอง ภายใน 2-3 วัน ความรุนแรงของโรคขึ้นกับปริมาณสารพิษที่ได้รับ และการตอบสนองของร่างกาย โดยพบว่าการบริโภคอาหารที่มี SEs ปนเปื้อนน้อยกว่า 1.0 ไมโครกรัม สามารถก่อให้เกิดอาการป่วยได้ (U.S. FDA/CFSAN,1992)

นอกจากนี้ SEs มีคุณสมบัติทางชีววิทยาและโครงสร้างคล้ายกัน แต่แตกต่างกันที่ antigenicity ทำให้ปัจจุบันมีการค้นพบ SEs หลายชนิด ตั้งแต่ ชนิด SEA ถึง SEH ปัจจุบันมีการพบสารพิษชนิดใหม่ๆ มากขึ้น เช่น SEI, SEG, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEU และ SEV (Orwin et al.,2001,2003; Letertre et al.,2003; Le Loir et al., 2003; Thomas et al., 2006) สัดส่วนเชิงปริมาณของ *S. aureus* ที่สามารถสร้าง SEs ได้นั้นแตกต่างกันไปแล้วแต่ประเภทของอาหาร และสภาวะแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษ เช่นในรายงานของ Le Loir (2003) ได้สรุปการศึกษาการระบาดของอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ไว้ว่า มีการพบร้อยละของ *S. aureus* ที่สามารถสร้าง SEs ได้ระหว่าง 15.9-72.8 จากตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆ (Bergdoll 1989; Rosec et al., 1997; Cardoso et al., 1999; Akineden et al., 2001) ในการศึกษาเหล่านี้ได้รายงานปริมาณและชนิด SEs ที่แตกต่างกันด้วย แต่ SEs ที่พบได้บ่อยในการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ คือ SEA, SEB, SEC, SED และ SEE (Balaban and Rasooly, 2000)

4. การวินิจฉัยสาเหตุโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* และการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ

วิธีที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยสาเหตุโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* คือ การตรวจหาการปนเปื้อนของ SEs ในอาหาร ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปเพื่อตรวจหา SEs ที่ปนเปื้อนในอาหาร ตัวอย่างทางคลินิก โดยชุดตรวจสำเร็จรูปอาศัยหลักการของปฏิกิริยาระหว่างสารพิษที่เป็นโปรตีนและภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ ซึ่งมีอยู่หลายวิธี เช่น เทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) เทคนิค radioimmunoassay (RIA) เทคนิค enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA) และเทคนิค reverse passive latex agglutination assay (RPLA)เป็นต้น ชุดทดสอบสำเร็จรูป แม้ว่าจะมีความไวและความจำเพาะสูง แต่ก็ยังมีข้อจำกัดคือ สามารถตรวจหาสารพิษได้เฉพาะ classical SEs เท่านั้น สำหรับการตรวจหาสารพิษในอาหารนั้นต้องเสียเวลาในการเตรียมตัวอย่าง เพื่อสกัดสารพิษจากอาหารให้มีความบริสุทธิ์ก่อน และถ้าตัวอย่างไม่บริสุทธิ์เพียงพอ ก็ทำให้ผลการตรวจคลาดเคลื่อนได้ (Park et al., 1992) และปัญหาสำคัญคือ ชุดทดสอบเหล่านี้มีราคาแพงจึงไม่เหมาะกับการตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมาก

โดยทั่วไปในการปฏิบัติจริง จึงยังคงใช้วิธีการตรวจปริมาณการปนเปื้อนของ *S. aureus* อยู่ โดยการพบ *S. aureus* ในปริมาณที่มากกว่า 100,000 CFU ต่อกรัม คาดว่าจะสามารถสร้างสารพิษและก่อโรคได้ (U.S. FDA/CFSAN,1992) อย่างไรก็ตาม วิธีในการตรวจยังคงเป็นแบบดั้งเดิม (conventional method) และวิธีที่ใช้กันมากคือ วิธีมาตรฐาน enumeration method ได้แก่ Direct Plate Count Method และ Most Probable Number method (MPN) (AOAC, 1995) วิธีเหล่านี้ก็ยังมีข้อจำกัดคือ ต้องใช้แรงงานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์มาก ความไม่จำเพาะทางชีวเคมีของ *S. aureus* ใช้ระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์นาน อีกทั้งผลที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชิงปริมาณนี้อาจยังไม่สามารถระบุชัดว่า *S. aureus* ที่แยกได้นั้นเป็นสาเหตุที่แท้จริงของโรคอาหารเป็นพิษนั้น เนื่องจากมี *S. aureus* เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้าง SEs ได้

ด้วยเหตุนี้จึงมีนักวิจัยหลายคณะได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* การเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* รวมถึงการควบคุมคุณภาพการผลิตอาหารในแง่การปนเปื้อน *S. aureus* ที่มีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง มีความไวและความแม่นยำสูง ซึ่งในการพัฒนาเทคนิคดังกล่าว จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษที่พบใน *S. aureus* การสร้าง SEs ของ *S. aureus* ที่พบยีนเหล่านั้น รวมทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ซึ่งแนวทางหนึ่งของการพัฒนาดังกล่าวคือ การใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อตรวจพิสูจน์ *S. aureus* พร้อมกับตรวจการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ซึ่งสามารถช่วยให้ทราบว่าเป็น *S. aureus* และมียีนควบคุมการสร้างสารพิษหรือไม่ในเวลาเดียวกัน รวมทั้งทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งมีประโยชน์ในแง่การศึกษาทางระบาดวิทยา ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก และค่าใช้จ่ายไม่สูง

การนำเทคนิค PCR มาใช้ในการพิสูจน์ *S. aureus* และตรวจพิสูจน์ยีนควบคุมการสร้างสารพิษ นั้นต้องเลือกใช้ primers ที่มีความจำเพาะ จากการรวบรวมข้อมูลพบว่ามีหลายยีนที่นิยมใช้ในการพิสูจน์ *S. aureus* เช่น 16s RNA (Monday and Bohach, 1999), *nucA* (Brakstad et al., 1992), *Sa442* (Ishii et al., 2006) และ *femA* (Hwang et al., 2007) เป็นต้น อีกทั้งในกรณีการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ ต้องใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อรหัสพันธุกรรมที่

ควบคุมการสร้างสารพิษแต่ละชนิด ซึ่งปัจจุบันสามารถตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษได้หลายชนิดตั้งแต่ยีน *sea* ถึง *seu* (Dabrowski and Medrala, 2005; Mehrotra et al., 2000)

5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* โดยใช้ลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint)

ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยอาศัยการศึกษาลายพิมพ์ของสารพันธุกรรม (DNA fingerprint) เพื่อการจำแนกสายพันธุ์และชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งนิยมนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์ทางระบาดวิทยาเพื่อสืบหาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยอาศัยลักษณะจำเพาะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียแต่ละชนิดและแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน ซึ่งปัจจุบันมีหลายเทคนิคที่ใช้ศึกษา เช่น เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ให้ผลรวดเร็วแต่ยังไม่จำเพาะ (Naffa et al., 2006), เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) รวดเร็ว ต้องอาศัยความชำนาญ และค่าใช้จ่ายสูง (Atanassova et al.,2001), Pulse Field Gel electrophoresis (PFGE) เป็นวิธีที่ใช้กันเป็นมาตรฐาน ให้ผลแน่นอนสูง (Weller, 2000) แต่ใช้ระยะเวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง มีข้อจำกัดคือไม่สามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้, เทคนิค repetitive sequence-based PCR fingerprinting (rep - PCR) เป็นวิธีที่สร้างลายพิมพ์โดยใช้ลำดับเบสซ้ำ (ZEE et al .,1999; Nascimento et al., 2005; Rantsiou et al., 2005; Vivoni and Moreira, 2005; Casey et al., 2006), เทคนิค Ribosome spacer PCR (RS-PCR) (Oliveira and Ramos, 2002) เป็นวิธีที่สร้างลายพิมพ์ ในส่วนของ 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences และเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) (Muyer et al., 1993) เป็นต้น ซึ่งในแต่ละวิธีเหล่านี้มีทั้งข้อดีและข้อเสีย ส่วนการนำไปใช้นั้นขึ้นกับรูปแบบและวัตถุประสงค์การวิจัยของผู้วิจัย เทคนิค rep - PCR เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ศึกษารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมเบื้องต้นของจุลินทรีย์ โดยสร้างลายพิมพ์จากลำดับเบสซ้ำ (Casey et al., 2006; Rantsiou et al., 2005) เทคนิคนี้ช่วยให้สามารถจำแนกจุลินทรีย์ที่ศึกษาออกจากจุลินทรีย์อื่นได้อย่างรวดเร็วทั้งในระดับชนิดและสายพันธุ์เบื้องต้น สามารถให้ผลภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง ใช้แรงงาน และวัสดุอุปกรณ์น้อยกว่าเทคนิคอื่น (Svec et al., 2005) โดยลักษณะและจำนวนของแถบ DNA ที่เกิดขึ้นจะเป็นลักษณะจำเพาะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากจำนวนและระยะห่างระหว่างเบสที่ซ้ำกันในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *S. aureus* ได้ ซึ่ง

จะมีประโยชน์ด้านการวิเคราะห์ทางระบาดวิทยา โดยใช้เป็นข้อมูลวิเคราะห์หาแหล่งการปนเปื้อนของเชื้อ เพื่อวางแนวทางการป้องกันและเฝ้าระวังโรคระบาด รวมทั้งการควบคุมคุณภาพการผลิตอาหารต่อไป

6. ความชุกและการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus*

การวิเคราะห์ความชุกและการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ในต่างประเทศมักจะเป็นการศึกษาความชุกทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยใช้วิธีแบบดั้งเดิมร่วมกับการตรวจพิสูจน์หายีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษด้วยเทคนิค PCR ตลอดจนการตรวจหา SEs ที่ปนเปื้อนในอาหารและ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากอาหาร

จากการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับความชุกของการปนเปื้อน *S. aureus* ในอาหารชนิดต่างๆ พบว่ามีรายงานการสำรวจพบ *S. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภคถึงร้อยละ 9.4 และมีปริมาณที่ *S. aureus* อยู่ระหว่าง 2.2-4.3 log CFUต่อกรัมในโรงอาหารของกองทัพในเมือง Ankara ประเทศตุรกี (Aycicek et al., 2005) จากการรายงานของ Soriano และคณะ (2002) พบ *S. aureus* ร้อยละ 17.3, 18.9 และ 16.9 ในตัวอย่างอาหาร Russian Salad, สลัดผัก และแฮมเบอร์เกอร์ ตามลำดับ Atanassova และคณะ (2001) ได้รายงานพบ *S. aureus* ปนเปื้อนในเนื้อหมูดิบและแฮมร้อยละ 25.9 โดยวิธีการเพาะแยกเชื้อเชิงคุณภาพ และพบ *S. aureus* ปนเปื้อนร้อยละ 51.1 โดยใช้เทคนิค PCR ตามลำดับ Borelli และคณะ (2006) พบว่ามีการปนเปื้อนของ *S. aureus* ปริมาณ 2-4.9 log CFUต่อมิลลิลิตร และมี SEBและ SEC ปนเปื้อนในน้ำนม นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษา *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในเนื้อดิบ ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อหมู เนื้อวัว ซึ่งพบการปนเปื้อนถึงร้อยละ 23.9 โดยใช้เทคนิค PCR (Pesavento et al., 2007)

จากการรวบรวมข้อมูลการระบาด พบว่า *S. aureus* เป็นสาเหตุการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษสูงเป็นอันดับที่ 3 ของโลก (Tirado and Schimdt, 2001) ปี 1991 มีรายงานการระบาดโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* มากกว่า 265 ครั้งในอาหารจำพวกเนยและชีส (Steinhart et al., 1996) ประเทศบราซิล มีรายงานการระบาด 5 ครั้งที่เกิดจากการปนเปื้อน *S. aureus* (Cerqueira-Campos et al., 1993) และ พบผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 42 ราย จากการตรวจสอบ พบว่าเกิดจากโรคอาหารเป็นพิษจากที่มีการปนเปื้อนสารพิษของ *S. aureus* นอกจากนี้มีรายงานการพบ

สารพิษ SEA ปนเปื้อนในน้ำนมรสช็อกโกแลต ทำให้เด็กเกิดอาการอาหารเป็นพิษ (Evenson et al., 1988) ประเทศญี่ปุ่นปี 2000 พบการระบาดโรคอาหารเป็นพิษจากสารพิษ SEA และ SEH ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์นม โดยใช้เทคนิค PCR มาทำการวิเคราะห์ (Ikeda et al., 2005) นอกจากนี้ Carmo และคณะ (2003) ได้รายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากสารพิษ SEA, SEB และ SED ปนเปื้อนในแพนเค้กไก่ และมี *S. aureus* ที่ปนเปื้อนจำนวนมากกว่า 8.3 log CFUต่อกรัม

การวิเคราะห์หาสาเหตุและการเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นการตรวจหาการปนเปื้อน *S. aureus* ในอาหารเชิงคุณภาพ และข้อมูลเกี่ยวกับการปนเปื้อน SEs ในอาหารมีอยู่อย่างจำกัด แต่ยังไม่มีข้อมูลด้านพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่มีกาการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเลย

จากการรวบรวมข้อมูล พบว่าได้มีการสำรวจการปนเปื้อน *S. aureus* ในเนื้อหมูของจังหวัดเชียงใหม่โดย นงคราญ (2544) พบว่าเนื้อหมูดิบมีการปนเปื้อนของ *S. aureus* ร้อยละ 44.4 และจากการศึกษาของ พรศิริ และอนิรุธ (2548) พบการปนเปื้อน *S. aureus* ในเนื้อสัตว์และเนื้อหมูจากตลาดสดในภาคเหนือที่เกิน 100 CFUต่อกรัม คิดเป็นร้อยละ 11.7 และร้อยละ 14.0 ตามลำดับ จากการรวบรวมข้อมูลการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในแหนม พบว่ามีการปนเปื้อน *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *Listeria monocytogenes* (Paukatong and Kunawasen, 2001) และพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria), *Clostridium perfringens, Salmonella* spp. และ *S. aureus* ในตัวอย่างแหนมหมูที่เก็บตัวอย่างจาก ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคอีสานของประเทศไทย (Wongsommart et al., 1994) จากการศึกษาของ Vichienroj and Kunawasen (1998) พบว่ามีการปนเปื้อนของ *S. aureus* , *Salmonella* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในแหนมด้วยเช่นกัน

ส่วนรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ในประเทศไทยจะใช้วิธีการวิเคราะห์เป็นวิธีแบบดั้งเดิมเพียงอย่างเดียว จากการรวบรวมข้อมูลพบว่า วรรณา และคณะ (2548) ได้รายงานว่า *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดปัญหาโรคอาหารเป็นพิษสูงเป็นอันดับที่ 3 รองจาก *Vibrio parahaemolyticus* และ *Salmonella* spp. ตามลำดับ สมคิด และคณะ (2544) ได้รายงานการสอบสวนการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ ในสถานสงเคราะห์เด็กในจังหวัดขอนแก่น พบว่ามีการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารว่างที่ผู้ป่วยรับประทาน อมรา (2548) ได้รายงานการระบาด

โรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* ในจังหวัดฉะเชิงเทราโดยพบว่า *S. aureus* ปนเปื้อนในลูกชุบ ส่งผลให้มีผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 50 คน นอกจากนี้จากการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษในตำบลหนองตอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยสุรเชษฐ และคณะ (2549) พบการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* โดยปนเปื้อนมากับหลู้และลาบหมู

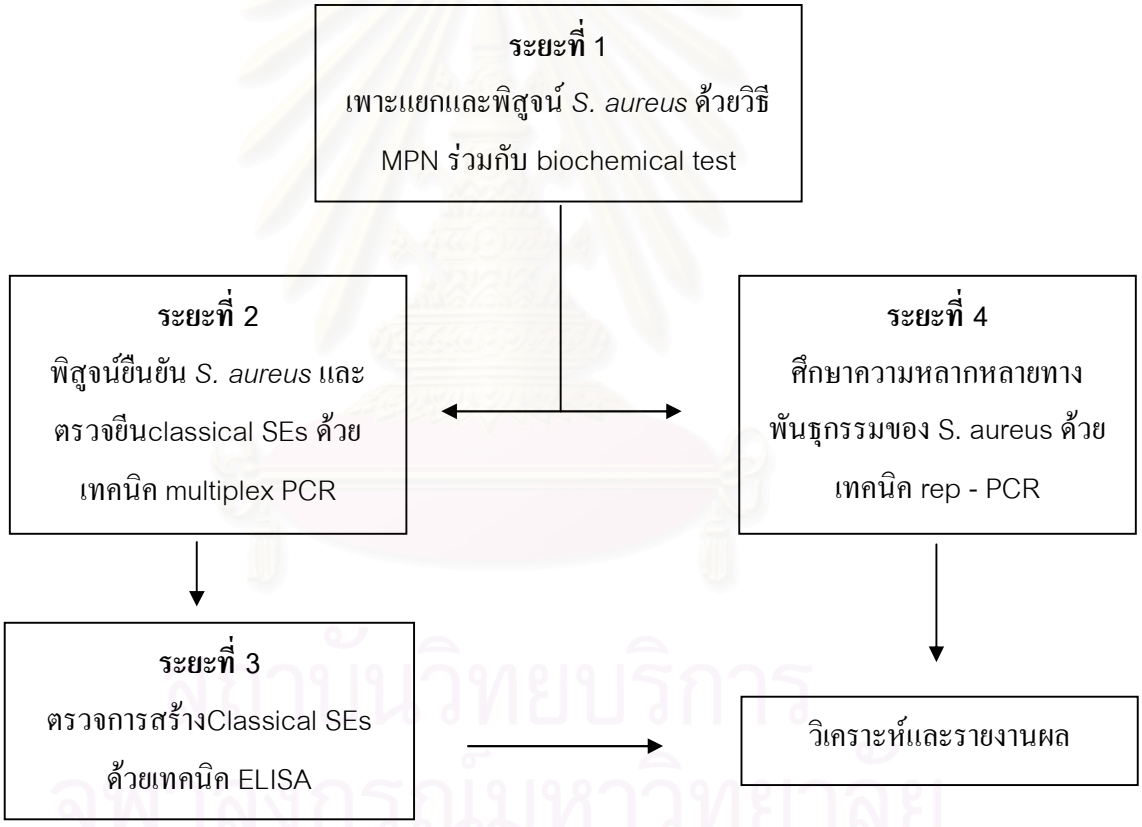
ข้อมูลการวิเคราะห์โรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* รวมถึงข้อมูลทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากการวิเคราะห์การระบาดโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* ส่วนใหญ่เป็นเพียงสังเกตจากอาการป่วย ระยะเวลาแสดงอาการป่วย ร่วมกับการเพาะแยกเชื้อ *S. aureus* จากอาหาร และตัวอย่างทางคลินิกเท่านั้น ซึ่งจากการวิเคราะห์ดังกล่าวยังไม่สามารถระบุยืนยันได้ว่าการระบาดที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากยังไม่ได้ศึกษาถึงการตรวจพบ SEs ที่ปนเปื้อนในอาหารหรือตัวอย่างทางคลินิก ตลอดจนการตรวจพิสูจน์ของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเลย อีกทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่พบยีนที่ควบคุมการสร้าง SEs และความสัมพันธ์กับการสร้าง SEs ในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้ยังไม่ทราบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกจากอาหารมาก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหนมหมู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ ความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู ตลอดจนความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบยีน *sea-see* และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นโดยดการตรวจสารพิษที่สร้างขึ้น โดยขั้นตอนการวิจัยจะแบ่งเป็น 4 ระยะดังแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการวิจัยโดยสังเขป



ระยะที่ 1 การเพาะแยกและพิสูจน์ *S. aureus* ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี

ในศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพาะแยก *S. aureus* จากตัวอย่างแหนมหมู จำนวนทั้งหมด 90 แท่ง ใช้ระยะเวลาศึกษา 3 เดือน (มิ.ย. – ส.ค. 2549) โดยตัวอย่างแหนมหมูที่เลือกศึกษานั้นได้จากการสุ่มตัวอย่างที่จำหน่ายอยู่ในตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล โดยแหนมหมูแต่ละเครื่องหมายการค้าจะทำการทดสอบ 3 แท่งที่เป็นรหัสการผลิตเดียวกัน แต่เนื่องจากการกระจายตัวของจุลินทรีย์อาจมีลักษณะเป็นจุด ไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งแท่ง จึงต้องนวดผสมแหนมทั้งแท่งให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำไปเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณ (enumeration)

<u>การตรวจ *S. aureus* เชิงปริมาณ</u>

ตัวอย่างแหนมหมูแต่ละแท่งออกจากพลาสติกหุ้มโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ นวดผสมด้วยเครื่อง Stomacher Model 400 ที่ความเร็ว 200 rpm จนกว่าแหนมทั้งตัวอย่างจะผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งแหนมแต่ละแท่งลงถุงพลาสติกปลอดเชื้อถุงละ 25 กรัม จากนั้นทำการวิเคราะห์หา *S. aureus* เชิงปริมาณจากตัวอย่างแหนมหมู โดยใช้วิธี conventional method ด้วยเทคนิค MPN ชนิด 5-tube ตามที่อธิบายไว้ใน U.S.FDA/CFSAN (2001) ดังนี้

1. นำตัวอย่างแหนม 25 กรัม เติมสารละลาย peptone 0.1 % จำนวน 225 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเครื่อง Stomacher Model 400 ที่ความเร็ว 200 rpm นาน 1 นาที

2. ทำสารละลายให้เจือจางลงครั้งละ 10 เท่า โดยใช้สารละลาย peptone 0.1 % อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น

3. ปิเปตสารละลายที่ความเจือจางต่างๆ มา ใส่ใน Trypticase Soy Broth (TSB) ที่ผสม NaCl ร้อยละ 10 และ sodium pyruvate ร้อยละ 1 ความเจือจางละ 5 หลอดๆละ 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในตู้บ่มเชื้อ

4. นำทุกหลอดทุกความเจือจางที่พบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มาอ่านผล แล้วใช้ Loop แตะเชื้อจากหลอด TSB มา steak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird - Parker Agar (BP) เพื่อให้ได้ โคโลนีเดี่ยวบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อ

5. อ่านผล โดยโคโลนีของ *S. aureus* บน BP จะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร สีเทาหรือดำรอบๆ โคโลนีมีโซนทึบแสงที่ล้อมรอบด้วยโซนใส

การพิสูจน์ยืนยันโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* ด้วยวิธีทางชีวเคมี

1. ใช้ loop แตะเอาโคโลนีเดี่ยวที่สงสัยจะเป็น *S. aureus* มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยปฏิกิริยา coagulase test โดยเลี้ยงใน Brain Heart Infusion broth (BHI) 5 มิลลิลิตร บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเพาะแบบเขย่า โดยเขย่าใช้ความเร็ว 200 rpm

2. นำหลอดที่บ่มจนครบ 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายมา 0. 5 มิลลิลิตร เติม rabbit plasma-EDTA 0.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะต่อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจดูการแข็งตัว (clot) ของ plasma ทุกๆ ชั่วโมง โดยการแข็งตัวระดับ 3+ หรือ 4+ ภายใน 4-6 ชั่วโมง จึงจะถือว่าให้ผลบวก สำหรับหลอดที่ให้ผลลบจะตรวจผลอีกครั้งหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากมีการแข็งตัวของ rabbit plasma ถือว่าให้ผลบวก ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์ระดับการแข็งตัวของ coagulase test

ระดับของการจับตัว	**ลักษณะการแข็งตัว** (clot)
0	ไม่เกิดการแข็งตัว
1+	แข็งตัวเป็นก้อนน้อย ไม่รวมกลุ่ม
2+	แข็งตัวเป็นก้อนน้อย รวมกลุ่ม
3+	แข็งตัวเป็นก้อนใหญ่
4+	แข็งตัวเป็นก้อนทั้งหมด และไม่ขยับเมื่อคว่ำหลอด

3. สุ่มเก็บ *S. aureus* ที่แยกได้จากแหนมหมูเครื่องหมายการค้าละ 5 isolates ผสมกับ Nutrient Broth และกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส

รายงานผลโดยนับจำนวนหลอดของแต่ละความเจือจางที่พบ นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง 5 tube MPN รายงานผล *S . aureus* ในตัวอย่าง โดยมีหน่วยเป็น MPN ต่อกรัมตัวอย่างแหนมหมู

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 2 การพิสูจน์เพื่อยืนยัน *S. aureus* และการตรวจพิสูจน์ยีน *sea-see* ด้วยเทคนิค multiplex PCR

นำ *S. aureus* ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 155 isolates มาทำการพิสูจน์ยืนยันเชื้อและการตรวจพิสูจน์ยีน *sea-see* โดยสกัด DNA ด้วยชุดสกัด DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Nanodrop®) ทำการเจือจาง DNA ให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6) ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดสอบยืนยันเชื้อและตรวจพิสูจน์ยีน *sea-see* โดยการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค multiplex PCR ใช้ชุดทดสอบ PCR (TAKARA Biomedicals, Otsu, Japan) ซึ่งประกอบด้วย 10X Buffer (15 mM $MgCl_2$), dNTPs (2.5 mM), Taq (5U/ul) การพิสูจน์ยืนยันว่าเป็น *S. aureus* ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ primer *Sa442* (Martineau et al., 1998) ดังตารางที่ 2 *Sa442* ที่ใช้มีลำดับเบสดังตารางที่ 3 สำหรับการตรวจพิสูจน์ยีน *sea - see* primers ที่เลือกใช้เป็น primers ที่มีความจำเพาะของสารพันธุกรรมที่สร้างสารพิษยีน *sea - see* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ดัดแปลงวิธีการทำ multiplex PCR condition ของ Becker และคณะ (1998) โดยมีการเพิ่ม primer ที่มีความจำเพาะต่อชนิด *S. aureus* (primer *Sa 442*) ลงไปในปฏิกิริยาด้วยเพื่อยืนยัน *S. aureus* ร่วมกับการตรวจพิสูจน์ยีน *sea – see* ในวลาเดียวกัน ดังตารางที่ 3 ทำการผสม master mix สำหรับ PCR ดังตารางที่ 4 นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ใช้ *S. aureus* มาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมการทดลองดังตารางที่ 5

วิเคราะห์ PCR products ด้วย 2.75% agarose Gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า 100 V ใน minigel chamber (Toyobo® ,Gelmate2000) เป็นเวลา 60 นาที ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromine (EtBr) (0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation Model Syngene Gene Genious (Syngene, Maryland ,USA) ยืนยัน PCR products โดยการสุ่มตรวจรหัส DNA (sequencing) ของชิ้นส่วน DNA ที่ได้ บันทึกผลการศึกษา

ตารางที่ 2 แสดง multiplex PCR condition ในการทดสอบยืนยัน *S. aureus* และการการตรวจพิสูจน์ยีน *sea-see*

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
95	2	1
95	1	30
55	1	
72	2	
72	5	1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 primers จำเพาะต่อชนิดของ S. aureus Sa442 และ ยีน sea-see ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	PCR product (bp)	Reference
Sa442	Sa442-1	AATCTTTGTCGGTACACG ATATTCTTCACG	108	Martineau et al., 1998
	Sa442-2	CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA		
sea	SEA-1	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	127	Becker et al., 1998
	SEA-2	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC		
seb	SEB-1	TCGCATCAAACTGACAAACG	477	Becker et al., 1998
	SEB-2	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC		
sec	SEC-1	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	271	Becker et al., 1998
	SEC-2	TCAAAATCGGATTAACATTATCC		
sed	SED-1	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	319	Becker et al., 1998
	SED-2	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC		
see	SEE-1	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	178	Becker et al., 1998
	SEE-2	TAACTTACCGTGGACCCTTC		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนผสมของ primers และสารเคมีเพื่อทำ multiplex PCR

สารเคมี	**ปริมาตรที่ใช้ (µl)**
DNase free water	25.75
10xBuffer (with 15 mM $MgCl_2$)	5
dNTPs (2.5 mM)	4
sea-1 (20 µM)	1
sea-2 (20 µM)	1
seb-1 (20 µM)	1
seb-2 (20 µM)	1
sec-1 (20 µM)	1
sec-2 (20 µM)	1
sed-1 (20 µM)	2
sed-2 (20 µM)	2
see-1 (20 µM)	1
see-2 (20 µM)	1
Sa 442-1 (20 µM)	1
Sa 442-2 (20 µM)	1
Taq (5U/ul)	0.25
DNA (50 ng/ul)	1
Total	50

ตารางที่ 5 แสดง *S. aureus* มาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุม

สายพันธุ์	**ตัวควบคุม**
S. aureus ATCC6538, ATCC29213	positive control
S. aureus SA 169*	*sea* และ *sec*
S. aureus ATCC25923	*sea*
S. aureus ATCC14458	*seb*
S. aureus ATCC19095	*sec*
S. aureus ATCC23235	*sed*
S. aureus ATCC27664	*see*
*Staphylococcus xylosus***	Negative control

* *S. aureus* ที่ยืนยันการสร้างสารพิษแล้วจากกองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

** เป็นเชื้อที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการของศูนย์พันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ระยะที่ 3 ศึกษาการแสดงออกของยีน *sea-see* ด้วยการตรวจ SEs

นำ *S. aureus* ทุก isolates ที่ผ่านการตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อและตรวจพบยีน *sea - see* ในระยะที่ 2 แล้ว จำนวน 29 isolates ศึกษาการแสดงออกของยีน *sea-see* ในระดับ translation ด้วยการตรวจการสร้างสารพิษ SEA, SEB, SEC, SED และ SEE โดยใช้ชุดตรวจสารพิษ Transia® ID kit และ Transia® Plate plus kit ELISA (Lyon,France) ซึ่งต้องเตรียมตัวอย่างและทำการทดสอบตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้

การเตรียมตัวอย่าง

นำ *S. aureus* ที่เก็บใน - 80 องศาเซลเซียส มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI 5 ml โดยใช้หลอดพลาสติกปลอดเชื้อ ขนาด 50 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อออกที่ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการกรองผ่าน filter ปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมครอน เอาส่วนสารละลายมาทำการเจือจาง 50 เท่าใน BHI ปรับ pH ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 7.0 – 7.5 แล้วทำมาทดสอบ ELISA plate โดยใช้ BHI เป็น negtative control

การตรวจหาสารพิษโดยใช้ Transia® ID kit และ Transia® Plate plus kit ELISA

Transia® Plate Plus kit เป็นชุดตรวจ ELISA ที่มีคุณสมบัติในการตรวจจับ SEs โดยใช้ antibodies ต่อ SEA-SEE โดยในแต่ละหลุมจะ coat ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อ SEA-SEE รวมกัน ส่วนTransia® ID kit plate เป็น plate 96 หลุม (8 แถว 12 คอลัมน์) โดยจะแบ่งเป็น แถว A-H และคอลัมน์ที่ 1-12 โดยแถว A, B, C, D และ E จะ coat ด้วย antibody ที่จำเพาะ ต่อสารพิษ SEA, SEB, SEC, SED และ SEE แยกชนิดกันตามลำดับ แถว F และ G ใช้สำหรับ negative control แถว H ใช้สำหรับ positive control ส่วนคอลัมน์จะใช้ 1 ตัวอย่างสารละลายต่อ 1 คอลัมน์ ขั้นตอนการทดสอบหาสารพิษด้วยวิธี ELISA มีดังนี้

1. ดูดสารละลาย diluted positive control 100 µl ลงหลุมแถว H
2. ดูดสารละลาย HBI negative control 100 µl ลงหลุมแถว F และ G
3. ดูดสารละลายตัวอย่าง 100 µl ลงหลุม แถว A-E
4. บ่ม plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
5. เทสารละลาย แล้วล้าง plate ด้วยใช้ washing buffer แล้วคว่ำลงบนกระดาษหลายๆ ครั้ง ทำอย่างน้อย 5 ครั้ง
6. ใส่สารละลาย conjugate 100 µl ลงในแต่ละหลุม
7. บ่ม plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

8. เทสารละลาย แล้วล้าง plate ด้วยใช้ washing buffer แล้วคว่ำลงบนกระดาษหลายๆ ครั้ง ทำอย่างน้อย 5 ครั้ง

9. ใส่ substrate 50 µl และ chromogen 50 µl ลงในแต่ละหลุม

10. บ่ม plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที (สำหรับ Transia® ID kit) หรือ 30 นาที (สำหรับ Transia® Plate plus kit)

11. ใส่ stop solution 50 µl นำไป วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD) โดยใช้เครื่อง VERSAmax microplate reader วัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่นแสง 450 nm คำนวณแปลผลค่า OD ที่วัดได้นั้นเป็น positive หรือไม่

<u>กรณี</u> Transia Plate Plus kit

$$\text{Threshold ของculture (T)} = \text{OD(NC)} + 0.1$$

โดย OD(NC) คือ ค่าดูดกลืนแสงของ negative control (BHI)

Positive control ต้องมีค่า OD $\geq$ 0.50

Negative control ต้องมีค่า OD $\leq$ 0.30

หากตัวอย่างมีค่า OD มากกว่า T จะถือว่าเป็น positive หรือแสดงว่าตรวจพบสารพิษ ค่า OD ที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า T จะถือว่าเป็น negative หรือแสดงว่าตรวจไม่พบสารพิษ

<u>กรณี</u> Transia® ID kit จะมีการคำนวณ ค่า Positive Threshold (PT)

$$\text{Positive Threshold (PT)} = \frac{\text{OD(NC1)} + \text{OD(NC2)} + 0.1}{2}$$

โดย OD(NC1) และOD(NC2) คือ ค่า OD ของ negative control หลุมแถว F และ G

Positive control ต้องมีค่า OD $\geq$ 0.50

Negative control ต้องมีค่า OD $\leq$ 0.20

หากตัวอย่างมีค่า OD มากกว่า PT จะถือว่าเป็น positive หรือแสดงว่าตรวจพบสารพิษ ค่า OD ที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า PT จะถือว่าเป็น negative หรือแสดงว่าตรวจไม่พบสารพิษ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 4 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus*

นำ *S. aureus* ที่ได้ผ่านการพิสูจน์ในระยะที่ 2 แล้วทั้งหมดจำนวน 155 isolates มาทำการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ *S. aureus* ด้วยเทคนิค rep - PCR เริ่มจากเตรียม DNA template ด้วยชุดสกัด Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของ genomic DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Nanodrop®) ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครมิลลิลิตร ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ primers $(GTG)_5$ (IDT, Coraville, IA, USA) ซึ่งเป็น universal primers โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Gevers และคณะ (2001) ซึ่งได้รายงานว่าให้ผลในการช่วยจำแนกความหลากหลายของพันธุกรรมของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี และมีความจำเพาะสูง (Casey et al., 2006; Elli et al., 2006; Marilley et al., 2004; Svec et al., 2005) สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค rep - PCR นี้ จะได้ชุดทดสอบ PCR (TAKARA Biomedicals, Otsu, Japan) ซึ่งประกอบด้วย 10X Buffer (15 mM $MgCl_2$), dNTPs (2.5 mM), Taq (5U/µl) ทำการผสม master mix สำหรับทำ rep - PCR ดังตารางที่ 6 และ rep - PCR condition ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6 แสดงอัตราส่วนผสมของ primers และสารเคมีเพื่อทำ rep - PCR

สารเคมี	**ปริมาตรที่ใช้** (µl)
DNase free water	18.375
10xBuffer (with15 mM $MgCl_2$)	2.5
dNTPs (2.5 mM)	2
pGTG5 (20 µM)	1
Taq (5U/µl)	0.125
Total	25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดง rep - PCR condition ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
95	5 นาที	1
94	45 วินาที	30
40	1 นาที	
65	10 นาที	
65	20 นาที	1

วิเคราะห์ PCR products ที่ได้ด้วย Gel electrophoresis โดยใช้ 1% LE agarose Seakem® (Rockland, ME USA) ใน 0.5X TBE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้า 135 V ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย EtBr (5 นาโนกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 5 นาที de-stain ด้วยน้ำประปานาน 20 นาที ทำการสแกนและอ่านผลเจลด้วยเครื่อง Typhoon scanner (Amershame Biosciences Ltd, USA) นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสแกนมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gel Compar® II version 4.5 (Applied Maths Inc., USA) แล้วนำข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* จากทุก isolate ที่เพาะแยกได้ จัดกลุ่มโดยการเทียบเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน (similarity value) โดยค่าเส้นตัด (cut off) จะมาจากการใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ DNA-size marker และ *S. aureus* ATCC19095 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เป็นมาตรฐานในการหา cut off ของค่าเปอร์เซนต์ความเหมือน

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ในงานวิจัยนี้แบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ

1. **<u>การเพาะแยกเชื้อทางจุลชีววิทยา</u>**

เครื่องมือและอุปกรณ์

ขวดดูแรน
เครื่องตีตัวอย่างและถุงใส่ตัวอย่าง
หลอดทดลอง และ Rack
กรรไกรตัดตัวอย่างและปากคีบผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ
ไมโครปิเปตและปิเปตทิป
ตู้บ่มเชื้อ
ลูป (loop) เขี่ยเชื้อ
เครื่องชั่งอ่านค่าได้ 2 ตำแหน่ง
เครื่องเขย่า (vortex®)

ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า

หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง VERSAmax microplate reader

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

peptone Trypticase Soy Broth

NaCl Sodium pyruvate

Baird-parker agar Egg Yolk tellurite

Brain Heart Infusion Broth (BHI) Rabbit plasma EDTA

2. <u>การวิเคราะห์อณูชีววิทยา</u>

เครื่องมือและอุปกรณ์

Thermomixer (Eppendorf®,Germany) หลอดทดลองสำหรับ PCR

Gel electrophoresis set Centrifuge, Microcentrifuge

อุปกรณ์เครื่องแก้ววิทยาศาสตร์ Micropipete และ Micropipete tips

เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nanodrop®) เครื่องสแกนเจล(Typhoon®)

ตู้แช่แข็ง – 80 องศาเซลเซียส โปรแกรม Gel compare®

เครื่องถ่ายภาพ Gel doc and Densitometer Block heater (Stuart®, England)

เครื่องชั่งสาร เครื่อง PCR

Typhoon scanner Gel doc machine

Gel compare II software

สารเคมี

0.5X TBE buffer สารเคมีสำหรับสกัดสารพันธุกรรม

Agarose gel อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI

Ethidium Bromide ชุดสารเคมีสำหรับทำ PCR

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลของการศึกษาครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบถึง ปริมาณและความชุกของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างแหนมหมูที่ทำการศึกษา และใช้ Chi – square หาความสัมพันธ์ของการพบยีน *sea-see* และการแสดงออกของยีน *sea-see* โดยการตรวจสารพิษ ด้วยเทคนิค ELISA

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การตรวจการปนเปื้อน *S. aureus* เชิงปริมาณ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษา *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในแหนมหมูเชิงปริมาณ ด้วยวิธี MPN แบบ 5 tube พบว่า ตัวอย่างแหนมหมูที่ทำการศึกษาจำนวน 90 แท่ง พบการปนเปื้อน *S. aureus* จำนวน 41 แท่ง (ร้อยละ 45.56) มีปริมาณ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 2 จนถึง มากกว่า 16,000 MPN ต่อกรัมแหนมหมู (0.30 จนถึง มากกว่า 4.20 log MPN ต่อกรัมแหนมหมู) โดยสรุปแท่งที่พบการปนเปื้อน *S. aureus* ได้ดังตารางที่ 8 และในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง *S. aureus* ที่ให้ผลบวกต่อ coagulase test ได้จำนวนทั้งหมด 155 isolates

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณการปนเปื้อน *S. aureus* ในตัวอย่างแหนมหมู

รหัสแท่ง	***S. aureus*** **(MPN/g)**	**รหัสแท่ง**	***S. aureus*** **(MPN/g)**
13	350	55	200
14	350	56	580
15	140	57	210
16	17	59	2
17	12	61	13
18	14	62	7.8
19	12	65	2
20	130	66	9.3
21	7.8	69	2
25	220	79	49
26	34	80	23
27	110	81	33
31	210	82	7.8
32	17	83	23
33	3500	85	92
46	2	86	>16,000
47	6.8	87	24
48	13	88	20
52	4.5	89	40
53	4	90	20
54	8.3		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์ยืนยันเชื้อและการตรวจพิสูจน์ยีนควบคุมการสร้าง classical SEs

S. aureus ที่เพาะแยกจากแหนมหมูได้จำนวนทั้งหมด 155 isolates ทำการพิสูจน์ยืนยันเชื้อด้วยการตรวจพิสูจน์ยีน *Sa442* และการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs (SEA-SEE) โดยใช้เทคนิค multiplex PCR พบว่าทุก isolates ที่ทำการศึกษาครั้งนี้พบสามารถตรวจพบยีน *Sa442* (ร้อยละ 100) และมี isolates ที่ให้ผลปรากฏของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs จำนวน 29 isolates (ร้อยละ 18.71) โดยมี *S. aureus* isolates ที่ตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs อยู่เพียงยีนเดียว คือ ยีน *sea* หรือยีน *seb* หรือยีน *sec* อย่างเดียวเท่านั้น จำนวน 21 isolates ดังตารางที่ 10 จาก isolates เมื่อพิจารณาเฉพาะการตรวจพิสูจน์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs พบว่า สามารถตรวจพบยีน *sec* มากที่สุด จำนวน 18 isolates รองลงมาคือพบยีน sea ร่วมกับ *sec* จำนวน 8 isolates ยีน *sea* จำนวน 2 isolates และยีน *seb* จำนวน 1 isolate ตามลำดับ และมี *S. aureus* isolates ที่ตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs 2 ยีน คือ ยีน *sea* และยีน *sec* มีจำนวน 8 isolates อีกทั้งจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ isolate ใดเลยที่มียีน *sed* และยีน *see* ดังตารางที่ 9 นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการควบคุมการทดลอง โดยใช้ *S. aureus* มาตรฐานและ DNase free water เป็น positive และ negative control ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 และ 2 ผลการสุ่มตัวอย่างถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อยืนยันยีน *Sa442*, ยีน *sea*, ยีน *seb* และยีน *sec* พบว่าทุกตัวอย่างมีลำดับเบสที่เป็นส่วนประกอบของยีนเหล่านั้นจริง แต่สำหรับยีน *sec* นั้นพบว่ามีลำดับเบสที่เป็นส่วนยีนที่ควบคุมการสร้าง SEC หรือ SEC3 อย่างใดอย่างหนึ่ง

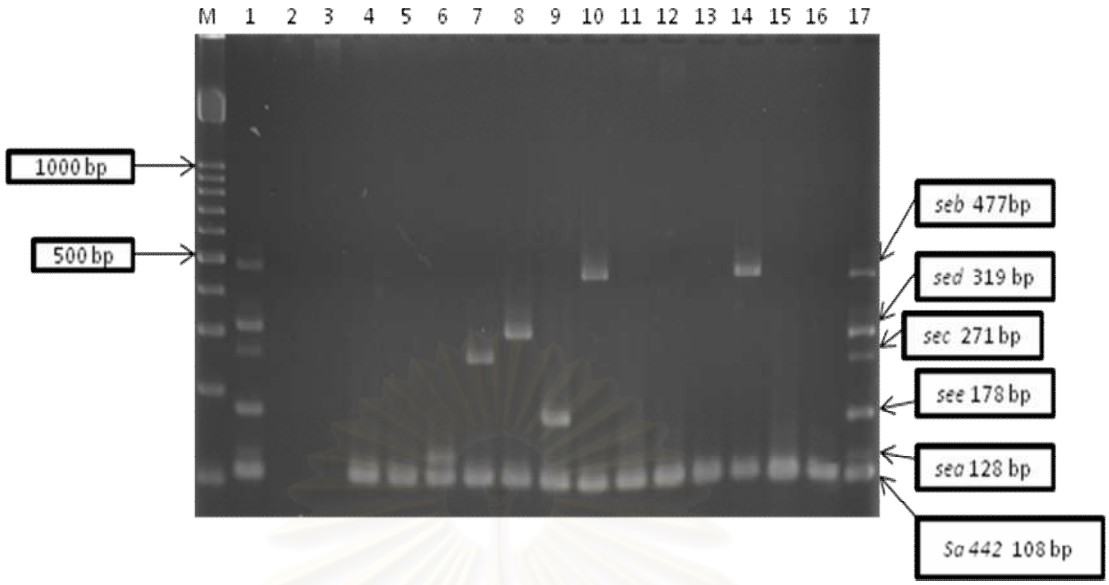
ตารางที่ 9 แสดงจำนวน isolates ที่ตรวจพบ classical SEs- encoding gene

Classical SE encoding gene	**จำนวน isolate ที่พบ** classical SEs- encoding gene (%)
sea	2 (1.29)
seb	1 (0.65)
sec	18 (11.61)
sed	0
see	0
sea ร่วมกับ *sec*	8 (5.16)
Total	29 (18.71)

ตารางที่ 10 แสดงจำนวน isolates ที่ตรวจพิสูจน์พบยีน *Sa 442* และยีน classical SEs encoding genes

Sample	*Sa442* detected	SE-encoding genes detected
SA14	+	*sec*
SA31	+	*sec*
SA32	+	*sec*
SA44	+	*sec*
SA45	+	*sec*
SA46	+	*sec*
SA54	+	*sec*
SA61	+	*sec*
SA63	+	*sea*
SA64	+	*sea*
SA65	+	*sec*
SA67	+	*sec*
SA77	+	*sec*
SA90	+	*sec*
SA97	+	*sec*
SA99	+	*sec*
SA101	+	*sec*
SA104	+	*sec*
SA114	+	*sec*
SA127	+	*sea, sec*
SA128	+	*sea, sec*
SA129	+	*sea, sec*
SA130	+	*sea, sec*
SA135	+	*sec*
SA139	+	*sea, sec*
SA141	+	*sea, sec*
SA142	+	*sea, sec*
SA143	+	*sea, sec*
SA182	+	*seb*

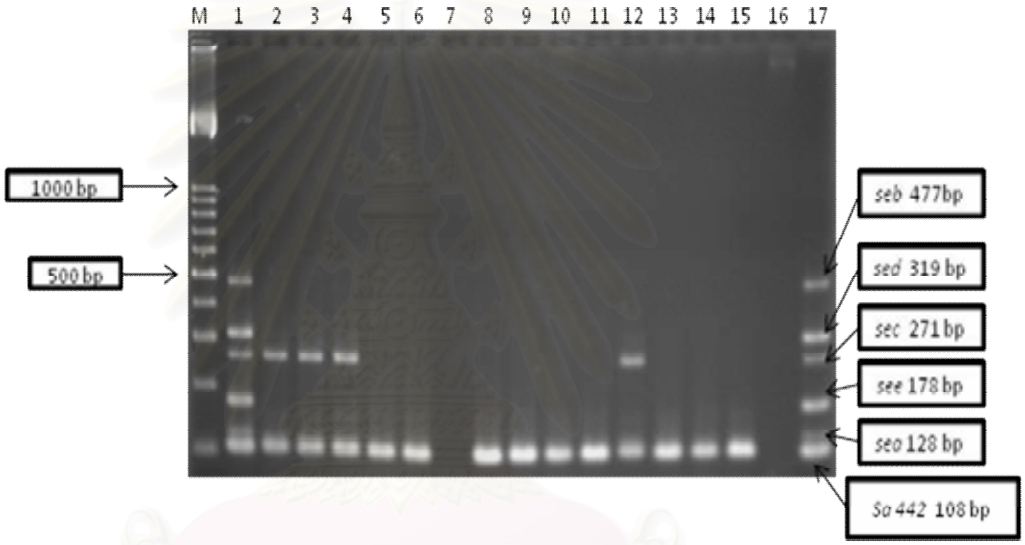
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษโดยใช้ *S. aureus* มาตรฐาน และ *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมู Lane M; marker ขนาดแบนด์ละ 100 bp, Lane 1,17 *Sa 442*-size, classical SEs-size markers, Lane 2; SA170, Lane 3; *S. xylosus*, Lane 4; *S. aureus* ATCC6538, Lane 5; *S. aureus* ATCC29213 , Lane 6; *S. aureus* ATCC 25923 , Lane 7; *S. aureus* ATCC 19095 , Lane 8; *S. aureus* ATCC 23235 , Lane 9; *S. aureus* ATCC 27664 , Lane 10; *S. aureus* ATCC 14458, และ Lane 11-16; *S. aureus* isolates

จากรูปที่ 1 เป็นการพิสูจน์ยืนยัน *S. aureus* โดยการตรวจพิสูจน์ยีน *Sa442* และการตรวจพิสูจน์ยีน *sea-see* ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ *S. aureus* ที่เป็นเชื้อมาตรฐานและจากตัวอย่างแหนมหมู รวมทั้ง isolate ที่ไม่ใช่ *S. aureus* ซึ่งผ่านการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้ว จากการศึกษา พบว่า Lane 2 คือ SA 170 ซึ่งเป็น isolate ที่สงสัยว่าอาจจะเป็น *S. aureus* เนื่องจากมีลักษณะโคโลนีคล้าย *S. aureus* เมื่อเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ BP แต่ให้ผลลบต่อ coagulase test ซึ่งถือว่าไม่ใช่ *S. aureus* และ Lane 3 คือ *S. xylosus* มาตรฐาน ทั้งสองตัวอย่างใช้เป็น negative control สำหรับการไม่ปรากฏของยีน *Sa442* และผลจากการศึกษาทั้งสองตัวอย่างที่ตรวจไม่พบยีน *Sa442* และยีน *sea-see* เลย Lane 4-10 คือ S.aureus มาตรฐานที่ใช้เป็น positive control ต่อการตรวจพิสูจน์ยีน *Sa442* โดยLane 4 คือ *S. aureus* ATCC6538 และLane 5 คือ *S. aureus* ATCC29213 พบยีน *Sa442* ซึ่งมีขนาดแบนด์ 108 bp แต่ไม่พบยีน *sea-see* ในขณะที่ Lane 6-10 คือ *S. aureus* ATCC25923, *S. aureus* ATCC19095, *S. aureus* ATCC23235, *S. aureus* ATCC27664 และ *S. aureus* ATCC14458 ใช้เป็น *S. aureus* มาตรฐาน และในการศึกษาครั้งนี้ใช้เป็นตัวควบคุมการตรสจ

พิสูจน์ยีน *sea*, ยีน *sec*, ยีน *sed*,ยีน *see* และยีน *seb* ตามลำดับ จากการศึกษาตรวจพบยีน *Sa442* มีขนาดแบนด์ 108 bp ร่วมกับตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs โดย Lane 6 ตรวจพบยีน *sea* มีขนาดแบนด์ 128 bp, Lane 7 ตรวจพบยีน *sec* มีขนาดแบนด์ 271 bp, Lane 8 ตรวจพบยีน *sed* มีขนาดแบนด์ 319 bp, Lane 9 ตรวจพบยีน *see* มีขนาดแบนด์ 178 bp และ Lane 10 ตรวจพบยีน *seb* มีขนาดแบนด์ 447 bp เมื่อเทียบกับขนาดของ *sea-see* marker นอกจากนี้ใน Lane 11-16 คือ *S. aureus* isolates ที่แยกจากตัวอย่างแหนมหมู ตรวจพบยีน *Sa442* ทุก isolates แต่ตรวจพบยีน *seb* เพียง isolate เดียว คือ ใน Lane 14 ซึ่งเป็นตัวอย่าง SA 182



รูปที่ 2 แสดงการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษจาก *S. auerus* isolate Lane M; DNA-size marker ขนาด 100 bp, Lane 1,17; *Sa 442*-size, Classical SEs-size markers, Lane 7; SA 124, Lane 2-6, 8-15; *S. aureus* isolates และ Lane 16; DNase free water

จากรูปที่ 2 เป็นการพิสูจน์ยืนยัน *S. aureus* โดยการตรวจพิสูจน์ยีน *Sa442* และการตรวจพิสูจน์ยีน *sea-see* ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในตัวอย่าง isolate จากแหนมหมู ซึ่งประกอบด้วย isolate ที่เป็น *S. aureus* และ isolate ที่ไม่ใช่ *S. aureus* ที่ผ่านการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้ว จากการศึกษา พบว่า Lane 7 คือ SA 124 ซึ่งเป็น isolate ที่มีสงสัยว่าอาจจะเป็น *S. aureus* เนื่องจากมีลักษณะโคโลนีคล้าย *S. aureus* แต่เมื่อเพาะแยกบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ BP ให้ผลลบต่อ coagulase test จากการศึกษา ตรวจไม่พบยีน *Sa442* และยีน *sea-see* ในขณะที่ Lane 2-6 และ 8-15 ซึ่งเป็น *S. aureus* isolates จากแหนมหมูที่ให้ผลบวกต่อ coagulase test ตรวจพบยีน *Sa442* มีขนาดแบนด์ 108 bp ทุก isolates และตรวจพบ

ยีน *sec* จำนวน 4 isolates คือ Lane 2-4 และ 12 โดยแบนด์ที่พบมีขนาด 271 bp เมื่อเมื่อเทียบกับขนาดแบนด์ของ *sec* marker นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ DNase free water เป็นตัวควบคุมของปฏิกิริยา PCR

การตรวจการสร้างสารพิษของ *S. aureus* ที่มียีนควบคุมการสร้าง classical SEs

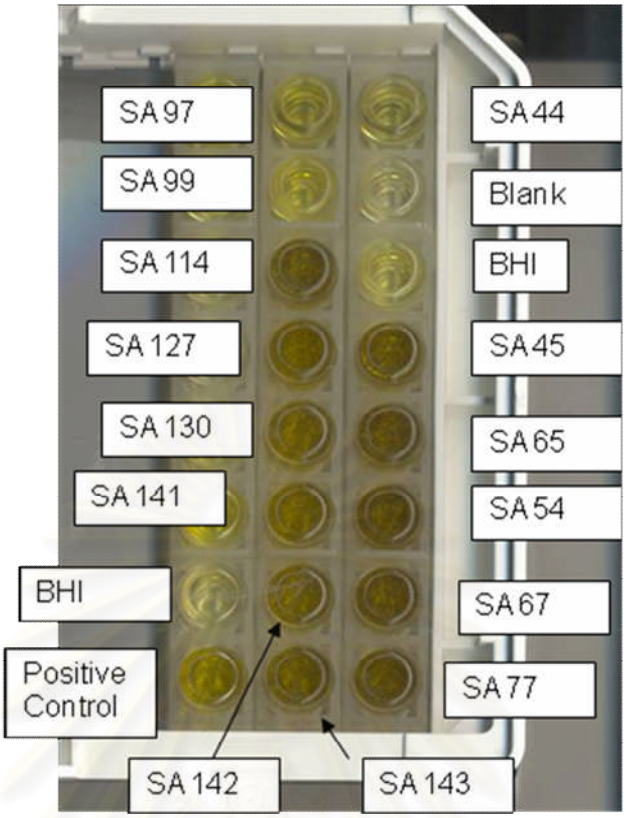
ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs โดยตรวจในระดับโปรตีน หรือตรวจหา classical SEs ที่ *S. aureus* สร้างขึ้น โดยใช้ Transia® Plate Plus kit ELISA ซึ่งเป็นชุดตรวจหาสารพิษ classical SEs รวม 5 ชนิด คือ SEA-SEE และใช้ Transia® ID kit ELISA ซึ่งเป็นชุดตรวจหาสารพิษ classical SEs แบบแยกชนิด SEA-SEE

จากการศึกษาการตรวจการสร้าง classical SEs ด้วย Transia® Plate Plus kit ELISA โดยการวัดค่า Optical Density (OD) ของสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากหยดสารละลายหยุดปฏิกิริยาแล้วกับค่า threshold ที่คำนวณจาก OD ของ positive control และ negative control พบว่า *S. aureus* ทุก isolate นั้นสามารถตรวจพบ classical SEs ซึ่งสรุปได้ดังตารางที่ 11 และตัวอย่างรูปที่ 3

ตารางที่ 11 สรุปผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และการตรวจพบ classical SEs จาก *S. aureus* ทุก isolate ด้วย Transia® Plate Plus kit ELISA

classical SEs encoding gene detection	**จำนวน isolate ที่พบ**	classical SEs detection (isolate)
sea	2	2
seb	1	1
sec	18	18
sea ร่วมกับ *sec*	8	8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แสดงการตรวจการสร้าง classical SEs ด้วย Transia® Plate Plus kit ELISA

รูปที่ 3 เป็นการตรวจการสร้าง classical SEs โดยใช้ Transia® Plate Plus kit ELISA เมื่อมองด้วยตาเปล่า พบว่า ทุกหลุมที่เป็นตัวอย่าง *S. aureus* isolates มีการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม เมื่อเทียบกับสีของหลุมที่เป็น Brain Heart Infusion (BHI) ซึ่งใช้เป็น negative control และสีของหลุมที่เป็น positive control (PC) เมื่อนำไปวัดค่า OD พบว่า ทุกหลุมของตัวอย่าง *S. aureus* isolates มีค่า OD มากกว่าค่า threshold ของ culture supernatant ดังตารางที่ 12 สามารถแปลผลได้ว่า ทุก *S. aureus* isolates ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมูและตรวจพิสูน์ยีน *sea-see* ในรูป มีการสร้าง classical SEs แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า classical SEs ที่ตรวจพบเป็น SEs ชนิดใด เนื่องจาก Transia® Plate Plus kit ELISA นี้เป็นชุดตรวจสำเร็จรูปที่ตรวจ classical SEs โดยไม่แยกชนิด

ตารางที่ 12 แสดงค่า OD จาก *S. aureus* isolate, positive control (PC) และ BHI ที่วัดได้ รวมทั้งค่า Threshold ของ culture supernatant ที่คำนวณได้ ในการตรวจหา classical SEs ด้วย Transia® Plate Plus kit ELISA

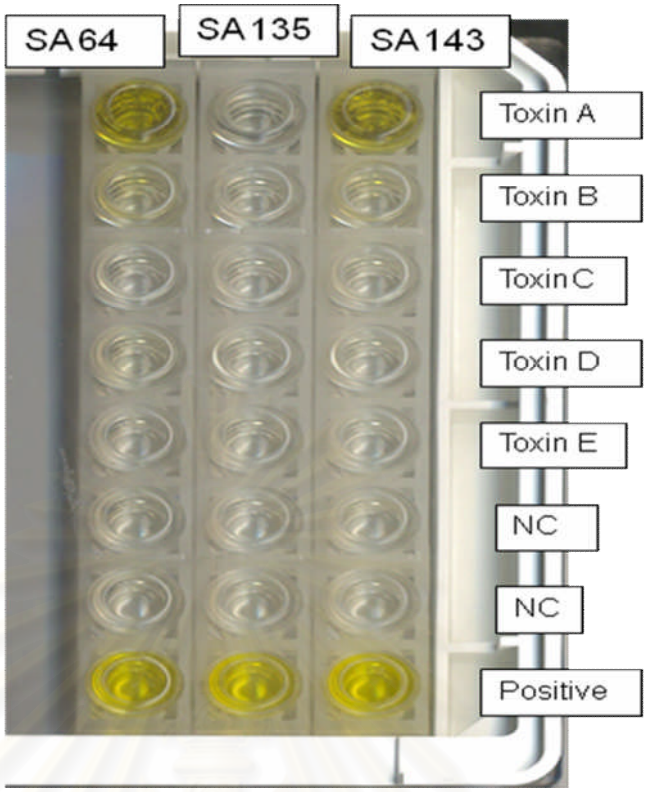
Isolate	OD	Isolate	OD
SA44	0.44	SA114	4
SA45	3.68	SA127	4
SA65	4	SA130	4
SA54	4	SA141	4
SA67	4	SA142	4
SA77	4	SA143	4
SA97	0.74	BHI	0.32
SA99	0.65	PC	3.54
Threshold ของ culture supernatant (T) = 0.4181			

เมื่อทำการตรวจการสร้าง classical SEs ด้วย Transia® ID kit ELISA ซึ่งเป็นชุดตรวจ classical SEs ที่สามารถแยกชนิด SEA-SEE ได้ โดยการวัดค่า OD ของสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากหยดสารละลายหยุดปฏิกิริยาแล้วกับค่า threshold ที่คำนวณจาก OD ของ positive และ negative control เช่นกัน ผลจากการตรวจการสร้าง SEA-SEE พบว่า *S. aureus* isolate ที่ตรวจพบยีน *sea*, *seb* เพียงอย่างเดียว สามารถตรวจพบ SEA และ SEB ทุกตัวอย่าง ตามลำดับ ในขณะที่ *S. aureus* isolate ที่ตรวจพบยีน sec เพียงอย่างเดียวสามารถตรวจพบ SEC เพียง 2 isolate เท่านั้น (ร้อยละ 11.11) แต่ *S. aureus* isolate ที่ตรวจพบยีน *sea* ร่วมกับยีน *sec* นั้น จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบ SEA เพียงอย่างเดียวเท่านั้น สามารถสรุปผลการตรวจ SEs ได้ดังตารางที่ 13 และตัวอย่างดังรูปที่ 4

ตารางที่ 13 แสดงการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และการตรวจพบ classical SEs ด้วย Transia® ID kit ELISA

classical SEs encoding gene detection	**จำนวน isolate ที่พบ**	classical SEs detection (isolate)
sea	2	SEA (2)
seb	1	SEB (1)
sec	18	SEC (2)
sea ร่วมกับ *sec*	8	SEA (8) , SEC (0)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจการสร้าง SEs ด้วย Transia® ID kit ELISA โดยใช้ตัวอย่าง isolate SA64, SA 135 และ SA143 ซึ่งมีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sea*, ยีน *sec* และยีน *sea* ร่วมกับยีน *sec* ตามลำดับ เพื่อตรวจการ classical SEs แบบแยกชนิด SEA - SEE

จากรูปที่ 4 เป็นการตรวจการสร้าง classical SEs แบบแยกชนิด SEA-SEE โดยใช้ Transia® ID kit ELISA เมื่อมองด้วยตาเปล่า พบว่า หลุมที่มีการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายเมื่อหยด stop solution คือ หลุมที่ coat ด้วยantibody ต่อ SEA ของ SA64 และ SA143 เท่านั้น เมื่อเทียบกับสีของหลุมที่เป็น BHI ซึ่งใช้เป็น negative control และสีเกิดขึ้นของหลุมที่เป็น positive control เมื่อนำไปวัดค่า OD พบว่าหลุมที่มี antibody ต่อ SEA ของตัวอย่าง SA64 และ SA143 มีค่า OD มากกว่าค่า Threshold ของ culture supernatant ดังตารางที่ 14 แสดงว่าสามารถตรวจพบการสร้าง SEA จาก SA64 และSA143 ในขณะที่ SA135 ตรวจไม่พบสร้าง SEs เลย

เมื่อพิจารณาร่วมกับตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs จะเห็นได้ว่าคอลัมน์ที่เป็นตัวอย่าง SA 64 มีการตรวจพบ SEA สอดคล้องกับผลการตรวจพบยีน *sea* คอลัมน์ที่เป็นตัวอย่าง SA 135 ตรวจไม่พบ SEs แม้ว่าจะมีการตรวจพบยีน *sec* ก็ตาม ในขณะที่คอลัมน์ที่เป็น

ตัวอย่าง SA143 มีการตรวจพบ SEA แต่ผลการตรวจพิสูจน์พบของยีน *sea* ร่วมกับ *sec* ซึ่งผลการตรวจดังกล่าวมีความแตกต่างกับการตรวจหา classical SEs ด้วย Transia® Plate Plus kit ELISA

ตารางที่ 14 แสดงค่า OD จาก *S. aureus* isolate ที่วัดได้ และค่า Threshold ของ culture supernatant ที่คำนวณได้

ตัวอย่าง	**OD หลุม A**	**OD หลุม C**
SA 64	3.12	0.05
SA 135	0.06	0.04
SA 143	3.41	0.05
BHI1	0.06	0.06
BHI2	0.06	0.06
PC	1.19	1.18
Threshold ของ culture supernatant (T) = 0.16		

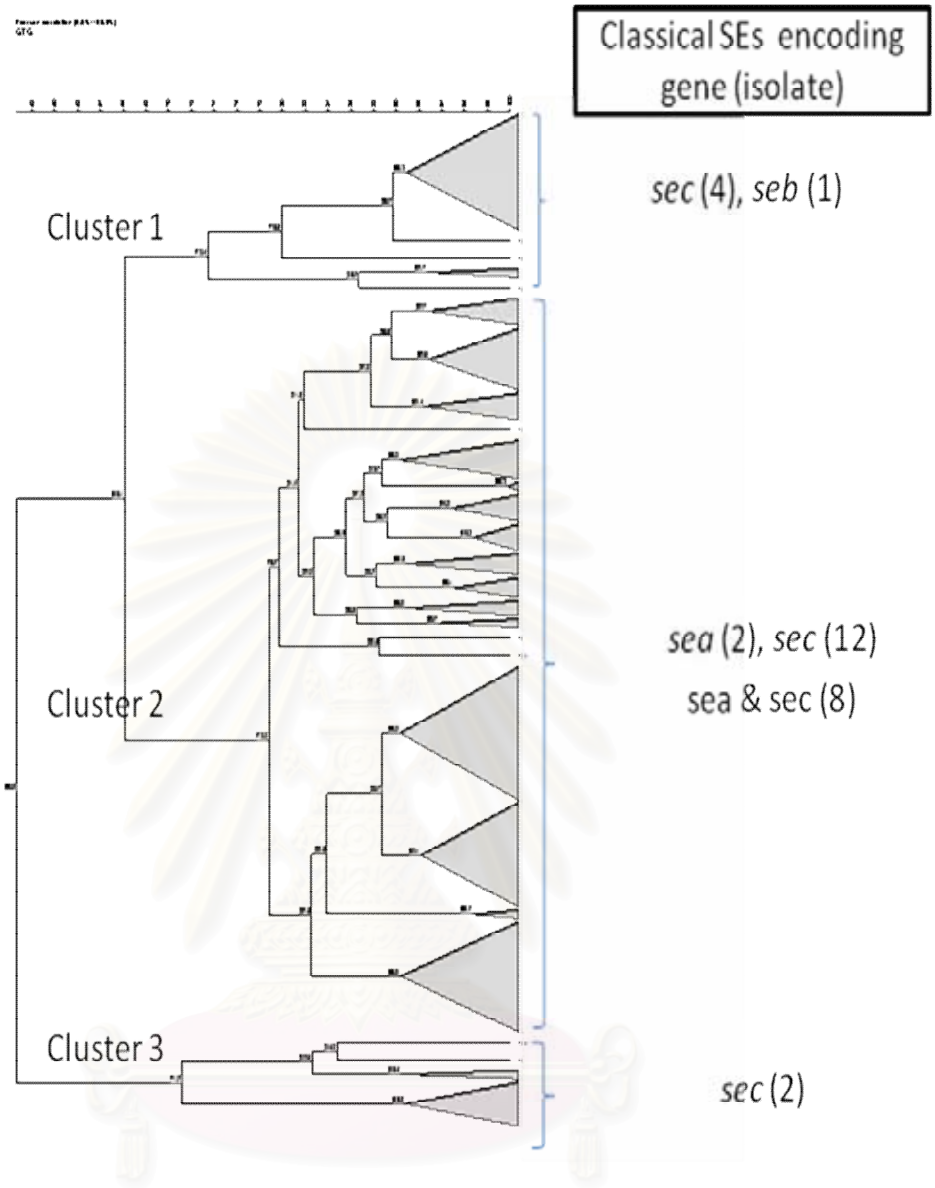
การหาความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs กับการสร้าง classical SEs

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และการสร้าง SEs ด้วย Transia® Plate Plus kit ELISA ทางสถิติเชิงคุณภาพ โดยใช้ chi-square ด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 พบว่า *S. aureus* ทุก isolate ที่ตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs มีความสัมพันธ์กับการสร้าง SEsอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) สรุปได้ว่า *S. aureus* isolate ที่มีการตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs มีความสัมพันธ์กับการสร้าง classical SEs

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู

S. aureus ที่เพาะแยกและพิสูจน์จากแหนมหมูจำนวน 155 isolates นำมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep – PCR เมื่อนำ pattern ที่ได้จากการวิเคราะห์ PCR product ด้วย gel electrophoresis มาเข้าโปรแกรม Gel Compar® II version 4.5 (Applied Maths Inc., USA) เพื่อเปรียบเทียบความความหลากหลายของสายพันธุ์ในแต่ละ isolate จากการศึกษาพบว่า *S. aureus* ทุก isolates สามารถจัดกลุ่ม patterns ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะมี subcluster ย่อย และภายในกลุ่ม cluster นั้นมีความคล้ายกันของ pattern มากกว่าต่างกลุ่ม cluster โดยกลุ่ม cluster 1 มี 5 subclusters และตรวจพบยีน *sec* และยีน *seb* จำนวน 4 และ 1 isolate ตามลำดับ กลุ่ม cluster 2 มี 18 subclusters และตรวจพบยีน *sea* ยีน *sec* และยีน *sea* ร่วมกับยีน *sec* จำนวน 2, 12 และ 8 isolates ตามลำดับ กลุ่ม cluster 3 มี 5 subclusters และตรวจพบยีน *sec* จำนวน 2 isolates ตามลำดับ ดังรูปที่ 5 เมื่อพิจารณาที่ค่าความเหมือน (similarity value) มากกว่าร้อยละ 90 จะจัดกลุ่ม isolates ออกเป็นจำนวน 27 กลุ่ม ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะมี *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบและไม่พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs กระจายอยู่ในกลุ่ม ดังที่ได้สรุปไว้ในตารางที่15 และในภาคนวก ค ในการศึกษาครั้งนี้ similarity value พิจารณาจากค่า similarity value ของ DNA - size marker และ *S. aureus* ATCC19095 ซึ่งใช้เป็นตัวเทียบในการหาค่า cut off ที่เหมาะสม ซึ่งผลจากการศึกษา พบว่า มีค่า similarity value เท่ากับร้อยละ 93.8 และร้อยละ 91.9 ตามลำดับ ดังภาคผนวก ง และ จ

การกระจายของ classical SEs encoding genes นั้นมีกระจายอยู่ใน 13 patterns ดังรูปที่ 6 โดยพบว่า isolates ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sec* อย่างเดียวกระจายอยู่ในกลุ่ม pattern 9 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่ม D, J, H, J, K, L, S, T ,U ,X และ Z มาจากแหนมรหัสแท่ง 14, 16, 17, 18, 27, 32, 61, 69, 82, 85 และ 89 isolates ที่ตรวจพบยีน *sea* ร่วมกับยีน *sec* พบกระจายอยู่ใน 2 กลุ่ม patterns คือ กลุ่ม J และ L มาจากแหนมหมูรหัสแท่ง 52, 53, 54, 79 และ 80 isolates ที่มีการตรวจพิสูจนพบยีน *sea* อย่างเดียวกระจายอยู่ในกลุ่ม pattern 1 กลุ่ม คือ กลุ่ม N มาจากแหนมหมูรหัสแท่ง 85 และ isolates ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *seb* อย่างเดียวกระจายอยู่ในกลุ่ม pattern 1 กลุ่ม คือ กลุ่ม A มาจากแหนมหมูรหัสแท่ง 89 ดังสรุปไว้ในตารางที่ 16



รูปที่ 5 สรุปผล clustering analysis ของ *S. aurues* isolates

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 สรุปผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* isolates ที่แยกได้จากแหนมหมู

Pattern group	**จำนวน** isolate	Classical SEs encoding genes (no. of isolate)
A	20	*sea* (3) และ *seb* (1)
B	1	-
C	1	-
D	2	*sec* (1)
E	1	-
F	5	-
G	11	sec (2)
H	5	*sec* (1)
I	1	-
J	7	*sec* (2) และ *sea* ร่วมกับ *sec*
K	2	*sec* (2)
L	5	*sec* (1) และ *sea* ร่วมกับ *sec*
M	5	-
N	4	*sea* (2)
O	4	-
P	3	-
Q	2	-
R	1	-
S	1	*sec* (1)
T	23	*sec* (1)
U	18	*sec* (2)
V	2	-
W	19	-
X	1	*sec* (1)
Y	1	-
Z	2	*sec* (1)
α	8	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 สรุปผลการศึกษา *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมู การเก็บตัวอย่าง isolates ผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และผลการศึกษาความหลากลายทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค rep - PCR

รหัสแหนมหมู	***S. aureus*** **(MPN/g)**	**จำนวน isolate (รหัส)**	**classical SEs encoding gene(รหัส)**	**rep - PCR pattern(รหัส)**
13	350	5 (SA38/39/40/41/42)	-	T(SA38/39/41) และ W(SA40/42)
14	350	5 (SA43/44/45/46/47)	*sec* (SA44/45/46)	A (SA45/46), B(SA43) และ T(SA44/47)
15	140	4 (SA48/50/51/ 52)	-	T(SA48/50/51/52)
16	17	5 (SA90/91/92/93/94)	*sec* (SA90)	G(SA90) และ U(SA91/92/93/94)
17	12	5 (SA95/96/97/98/99)	*sec* (SA97/99)	A(SA98) และ U(SA95/96/97/99)
18	14	5 (SA100/101/102/103/104)	*sec* (SA101/104)	A(SA102), J(SA100/101), G(SA104) และ U(SA103)
19	12	5 (SA78/79/80/81/82)	-	F(SA81), G(SA80/82), Y(SA78) และ Z(SA79)
20	130	5 (SA83/84/85/86/87)	-	G(SA83/84/85/87) และ U(SA86)
21	7.8	2 (SA88/89)	-	G (SA88/89)
25	220	5 (SA1/2/3/4/5)	-	H(SA5), M(SA4), P (SA3)และ T(SA1/2)
26	34	5 (SA6/7/8/9/10)	-	A(SA9), M(SA6/7) และ T(SA8/10)
27	110	5 (SA11/12/13/14/15)	*sec* (SA14)	L(SA14), M(SA11/15) และ T(SA12/13)
31	210	5 (SA105/106/107/108/109)	-	A(SA108), F(SA107), Q(SA105) และ U(SA106/109)
32	17	5 (SA110/111/112/113/114)	*sec* (SA114)	R(SA112), S(SA114), U(SA110/111) และ V(SA113)
33	3500	5 (SA115/116/117/118/119)	-	A(SA116/117/119), Q(SA118) และ V(SA115)
46	2	1 (SA120)	-	F(SA120)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 (ต่อ) สรุปผลการศึกษา *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมู การเก็บตัวอย่าง isolates ผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และผลการศึกษาความหลากลายทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค rep - PCR

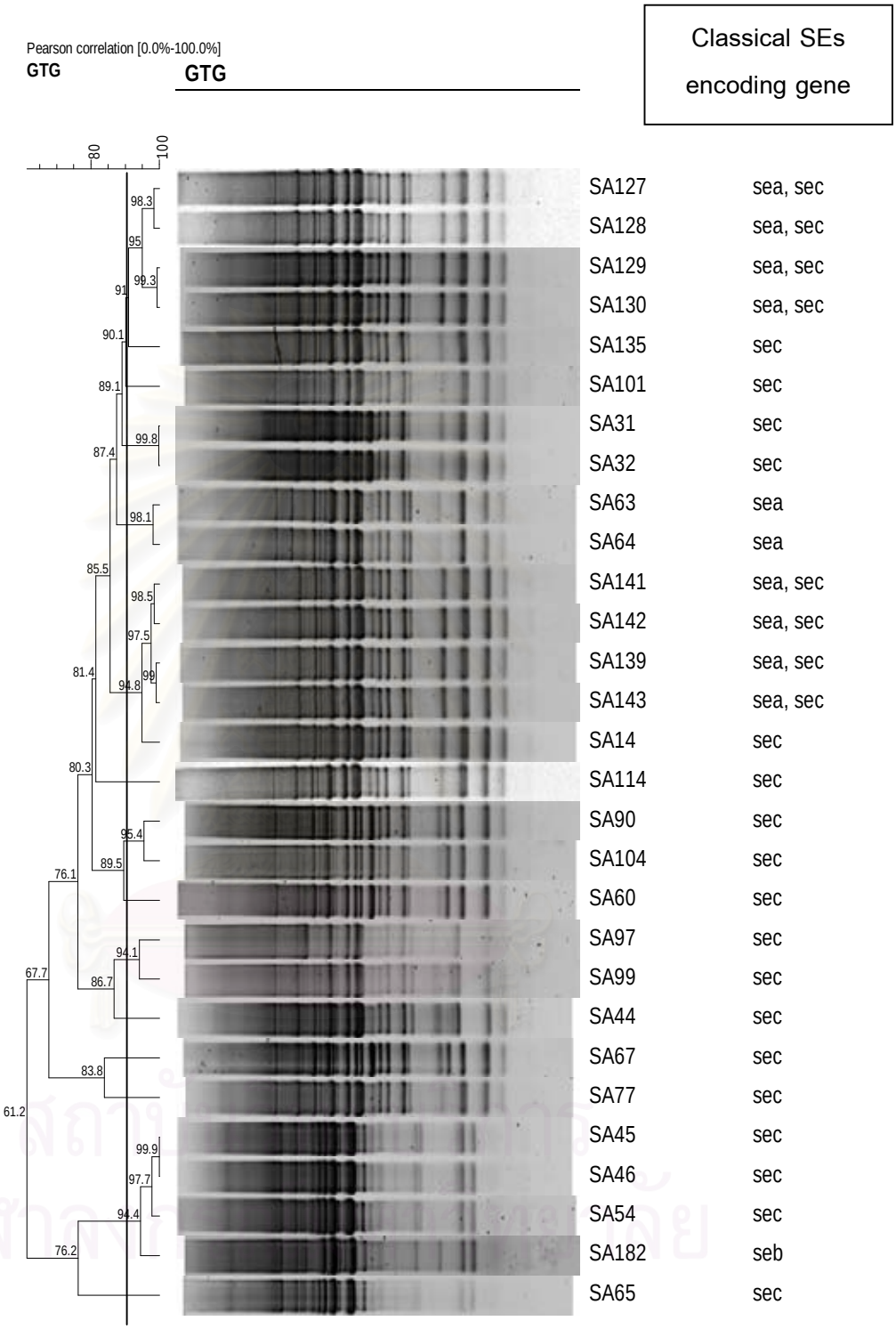
รหัสแหนมหมู	***S. aureus*** **(MPN/g)**	**จำนวน isolate (รหัส)**	**classical SEs encoding gene(รหัส)**	**rep - PCR pattern(รหัส)**
47	6.8	1 (SA121)	-	Z(SA121)
48	13	2 (SA122/123)	-	M(SA122/123)
52	4.5	2 (SA139/140)	*sea* ร่วมกับ *sec* (SA139)	L(SA139) และ T(SA140)
53	4	2 (SA141/142)	*sea* ร่วมกับ *sec* (SA141/42)	L(SA141/142)
54	8.3	4 (SA143/144/145/146)	*sea* ร่วมกับ *sec* (SA143)	L(SASA143) และ U(SA144/145/146)
55	20	5 (SA147/148/149/150/151)	-	W(SA147/148/149/150/151)
56	58	5 (SA152-156)	-	F(SA152), T(SA155) และ W(SA153/154/156)
57	21	5 (SA157/158/159/160/161)	-	U(SA158) และ W(SA157/159/160/161)
59	2	1 (SA76)	-	D(SA76)
61	13	4 (SA31/32/33/34)	*sec* (SA31/32)	A(SA33), K(SA31/32) และ W(SA34)
62	7.8	3 (SA35/36/37)	-	A(SA36), T(SA35) และ W(SA37)
65	2	1 (SA162)	-	I (SA162)
66	9.3	4 (SA163/164/165/166)	-	A(SA163/164) และ H(SA165/166)
69	2	1 (SA77)	*sec* (SA77)	X (SA77)
79	49	4 (SA125/126/127/128)	*sea* ร่วมกับ *sec* (SA127/128)	J(SA127/128) และ O(SA125/126)
80	23	5 (SA129/130/131/132/133)	*sea* ร่วมกับ *sec* (SA129/130)	A(SA132), C(SA131), J(SA129/130) และ O(SA133)
81	33	5 (SA134/135/136/137/138)	-	A(SA137), G(SA134), J(135), O(SA138) และ W(SA136)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 (ต่อ) สรุปผลการศึกษา *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมู การเก็บตัวอย่าง isolates ผลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และผลการศึกษาความหลากลายทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค rep - PCR

รหัสแหนมหมู	***S. aureus*** **(MPN/g)**	**จำนวน isolate (รหัส)**	**classical SEs encoding gene(รหัส)**	**rep - PCR pattern(รหัส)**
82	7.8	3 (SA53/54/55)	*sec* (SA54)	A(SA54) และ W(SA53/55)
83	23	5 (SA56/57/58/59/60)	-	H(SA60) และ T(SA56/57/58/59)
85	92	5 (SA61/62/63/64/65)	*sec* (SA61/65), *sea* (SA63/64)	D(SA65), H(SA62), N(SA63/64) และ T(SA61)
86	>16,000	5 (SA66/67/68/69/70)	*sec* (SA67)	Z(SA67) และ α(SA66/68/69/70)
87	24	5 (SA71/72/73/74/75)	-	E(SA75) และ α(SA71/72/73/74)
88	20	2 (SA179/180)	-	A(SA179/180)
89	40	2 (SA181/182)	*seb* (SA182)	A(SA181/182)
90	20	2 (SA183/184)	-	P(SA183/184)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงผลการจัดกลุ่ม isolates ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ที่ similarity value ร้อยละ 90

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

S. aureus เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษที่มีการระบาดกระจายไปทั่วโลก โดยการก่อโรคอาหารเป็นพิษเกิดจากการบริโภค SEs ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร โดย SEs ที่มีการระบาดมากที่สุดคือ classical SEs (SEA-SEE) ปัจจุบันได้มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง SEs เป็นจำนวนมากไม่ว่าจะเป็น classical SEs หรือ SEs ชนิดใหม่ๆ โดยการศึกษาส่วนใหญ่นั้นจะเป็นในแง่การระบาดและการเฝ้าระวัง ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* โดยเฉพาะในแหนมหมูมาก่อน

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณจากแหนมหมูจำนวน 90 แท่ง โดยแหนมหมูนั้นได้จากการสุ่มตัวอย่างจากแหนมหมู 27 เครื่องหมายการค้าที่มีจำหน่ายอยู่ในตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ในการศึกษาจะเริ่มจากนำแหนมหมู 25 กรัมมาเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณด้วยวิธี MPN จากนั้นทำการเพาะแยก *S. aureus* อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ BP ซึ่งสามารถแยก *S. aurues* ออกจาก *Staphylococcus* species ได้ เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* ทดสอบ coagulase test ซึ่งเป็นการทดสอบที่สามารถแบ่งแยก *S. aureus* ออกจาก *Staphylococcus* species อื่นๆ ได้ เนื่องจาก *Staphylococcus* species ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ (Ryan and Ray,2004) ทำการเก็บตัวอย่าง *S. aureus* ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ coagulase test ใน – 80 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่า มีความชุกของการปนเปื้อน *S. aureus* สูงถึงร้อยละ 45.56 และมีปริมาณการปนเปื้อนของ *S. aureus* อยู่ระหว่าง 2 จนถึงมากกว่า 16,000 MPN ต่อกรัมแหนมหมู ความชุกของการปนเปื้อนดังกล่าวนี้มีความแตกต่างจากความชุกของการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในแหนมหมู Paukatong and Kunawasen (2001) ได้รายงานไว้ คือ พบการปนเปื้อนเพียงร้อยละ 15 เหตุที่มีการรายงานผลที่แตกต่างกันเนื่องจากวิธีการเพาะแยกเชื้อที่ต่างกัน โดย Paukatong and Kunawasen (2001) ใช้เทคนิค Direct Plate Count ซึ่งเป็นการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อโดยตรง สามารถตรวจการปนเปื้อนเชื้อในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณการปนเปื้อนสูงๆ ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค MPN ซึ่งเป็นการตรวจเพาะแยกเชื้อเชิงปริมาณ สามารถตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อน้อยๆในตัวอย่างได้ ทำให้โอกาสพบ *S. aureus* ปนเปื้อนแหนมหมูได้มากกว่า ดังนั้นผลจากการศึกษาความชุกของการปนเปื้อนครั้งนี้จึงมีความชุกมากกว่า เมื่อพิจารณาข้อมูลปริมาณของ

การปนเปื้อน *S. aureus* ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีปริมาณการปนเปื้อน *S. aureus* สูงเกินมาตรฐานที่กำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2546) ซึ่งได้กำหนดมาตรฐานแหนมและเนื้อสัตว์ไว้ว่าจะต้องไม่พบ *S. aureus* ในแหนม 100 มิลลิกรัม เมื่อพิจารณาเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานแหนมหมูที่กำหนดโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2550) ว่าจะต้องไปพบ S. aureus ไม่เกิน 100 ต่อกรัม จากการศึกษา พบว่า มีแหนมหมูเพียง 12 แท่งที่มีปริมาณการปนเปื้อน *S. aureus* สูงเกินมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 13.33 จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าคุณภาพแหนมหมูที่ได้สุ่มเลือกมาทำการศึกษานั้นยังไม่ได้มาตรฐาน และทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงที่จะบริโภคแหนมหมูที่มีการปนเปื้อน *S. aureus* ที่สูงเกินมาตรฐาน

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการใช้ primers หลายชนิดที่มีความจำเพาะในการพิสูจน์ยืนยันเชื้อ ได้แก่ *femA*, *16s RNA, nucA* และ *Sa442* ซึ่งเป็น primers ที่มีผู้วิจัยหลายคณะนิยมใช้กันในปัจจุบัน (Brakstad et al., 1992; Monday and Bohach, 1999; Ishii et al., 2006; Hwang et al., 2007) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า primer *Sa442* ให้ผลข้างแม่นยำที่สุดสำหรับใน PCR condition ที่ศึกษาครั้งนี้ โดยยีน *Sa442* เป็นยีนส่วนของโครโมโซมที่พบได้เฉพาะใน *S. aureus* เท่านั้น ได้จากการตัดแบบสุ่มด้วยเอนไซม์ Sau3AI แล้วพบว่าที่ขนาด 442 bp สามารถพบได้ใน S. aureus เท่านั้น และหาลำดับเบสที่ตำแหน่งดังกล่าวมา ออกแบบเป็น primer (Martineau,1998) ปัจจุบันจึงได้มีนักวิจัยหลายคณะได้ใช้ primer *Sa 442* เพื่อใช้ในการพิสูจน์ชนิด *S. aureus* แต่ Klaassen และคณะ (2003) ได้รายงานว่า primer *Sa442* ไม่สามารถใช้ยืนยันชนิด *S. aureus* ที่เป็น isolate จากตัวอย่างทางคลินิก S. aureus 550226 ทำให้มีโอกาสที่ *S. aureus* บางสายพันธุ์อาจไม่สามารถใช้ primer นี้ได้ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการผิดพลาดในการพิสูจน์เชื้อเมื่อใช้ในเทคนิค PCR อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพาะแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อ *S. aureus* ร่วมกับการพิสูจน์คุณสมบัติทางชีวเคมีแล้ว ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานั้นแสดงว่าเป็น *S. aureus* ที่แน่นอน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้ primer *Sa 442* เพื่อการพิสูจน์เชื้อร่วมกับการตรวจพิสูจน์หายีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ด้วยเทคนิค multiplex PCR ผลจากการศึกษา พบว่า *S. aureus* ที่เลือกทำการศึกษาทั้งหมดจำนวน 155 isolates พบว่า ทุก isolates มีการตรวจพบยีน *Sa442* และให้ผลบวกต่อ coagulase test เมื่อตรวจพิสูจน์การพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs หรือ การตรวจพิสูจน์พบยีน *sea*, ยีน *seb*, ยีน *sec*, ยีน *sed* และยีน *see* พบว่า *S. aureus* ที่ศึกษาสามารถตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ถึง 29 isolates (ร้อยละ 18.71) โดยพบว่า *S. aureus* isolate ที่ตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs จะมีการยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเพียงชนิดเดียว จำนวน 21 isolates และ 2 ยีน จำนวน 8 isolates เมื่อพิจารณาชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษที่ปรากฏ พบ

ตรวจพิสูจน์พบยีน *sec* ซึ่งยีนที่ควบคุมการสร้าง SEC มากที่สุด รองลงมาคือพบยีน *sea* และ *seb* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง SEA และ SEB ตามลำดับ และในการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบยีน *sed* และ *see* เลย ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัด DNA ในส่วนของโครโมโซมเท่านั้นไม่ได้รวมถึงพลาสมิด ดังนั้นอาจจะต้องทำการศึกษาการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ในพลาสมิดต่อไป

การศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่า *S. aureus* นั้นมีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs จริง แต่ยังไม่สามารถบอกยืนยันได้ว่าการตรวจพิสูจน์พบยีนเหล่านั้นมีการแสดงออกของยีนหรือไม่ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านั้น ด้วยการตรวจการสร้าง classical SEs ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งเป็นการตรวจการแสดงออกของยีนในระดับการสร้างโปรตีน หรือ translation level ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้โดยตรง โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทำการตรวจหา Classical SEs ด้วย ชุดทดสอบ 2 ชุด ได้แก่ Transia® Plate Plus kit ELISA และ Transia® ID kit ELISA

การตรวจการสร้าง classical SEs แบบไม่แยกชนิด ด้วย Transia® Plate Plus kit ELISA ซึ่งเป็น European reference method พบว่า *S. aureus* ทุก isolates ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นั้นสามารถตรวจพบ classical SEs แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนในระดับ translation เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs กับการสร้าง classical SEs นั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) อาจกล่าวได้ว่า *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน classical SEs ที่ปนเปื้อนในแหนมหมูมีโอกาสที่สร้าง classical SEs ได้ และอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคแหนมหมูได้

การตรวจการสร้าง classical SEs แบบแยกชนิด SEA, SEB, SEC, SED และ SEE ด้วย Transia® ID kit ELISA พบว่า *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sea* เพียงอย่างเดียวตรวจพบ SEA ได้ทุก isolate และ isolate ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *seb* เพียงอย่างเดียวตรวจพบ SEB ทุก isolate เช่นกัน ในขณะที่ *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sec* เพียงอย่างเดียวตรวจพบ SEC เพียง 2 isolate และ *S. aureus* isolates ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sea* ร่วมกับยีน *sec* ตรวจพบเพียง SEA เท่านั้น การที่ไม่สามารถตรวจพบ SEC ได้ในชุดตรวจชุดนี้ อาจจะเกิดจากข้อจำกัดของชุดตรวจนี้ กล่าวคือ ชุดตรวจ Transia® ID kit ELISA จะใช้ antibody ต่อ SEC1 และ SEC2 เท่านั้น หรืออาจจะเกิดจากความหลากหลายชนิดของ SEC ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการตรวจ

การสร้าง SEC โดยใช้ *S. aureus* ATCC 19095 ซึ่งเป็น *S. aureus* มาตรฐานสามารถสร้าง SEC ได้ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบข้อจำกัดของชุดตรวจดังกล่าว พบว่าสามารถตรวจหา SEC ได้ แสดงว่าข้อจำกัดน่าจะเกิดจากความหลากหลายของ SEC เอง โดยในปัจจุบันมีการค้นพบว่า SEC มี 3 subtypes คือ SEC1, SEC2 และ SEC3 ซึ่งมี epitope ที่แตกต่างกัน ทำให้โอกาสที่ antibody ของ SEC ที่ติดกับหลุม ELISA จะจับกับ SEC1, SEC2 และ SEC3 มีความแตกต่างกันได้ ขึ้นกับข้อจำกัดและคุณสมบัติของแต่ละชุดตรวจหา classical SEs ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อไปว่าการตรวจพิสูจน์พบยีน *sec* นั้นเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง SEC1, SEC2 หรือ SEC3 ต่อไป ซึ่งผลจากการสุ่มตัวอย่างส่งตรวจ DNA sequencing พบว่า isolates ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sec* แต่ตรวจไม่พบ SEC มีลำดับเบสเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง SEC3 ในขณะที่ isolates มียีน *sec* และตรวจพบ SEC นั้นมีลำดับเบสที่เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง SEC ในกรณี *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sea* ร่วมกับ *sec* ซึ่งตรวจพบ SEA เพียงอย่างเดียว และไม่พบ SEC นั้นอาจจะเกิดจากปัจจัยดังที่ได้กล่าวมาแล้ว หรือยีน *sec* อาจไม่มีการแสดงออกของยีนเลยก็เป็นได้ เนื่องจากการตรวจหา SEs ด้วยTransia Plate Plus kit ELISA สามารถบอกได้เพียงว่า isolates ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs มีการสร้าง classical SEs ได้ ดังนั้นผลในการตรวจพบ classical SEs ใน *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sea* ร่วมกับ *sec* จึงไม่สามารถบอกว่าได้ ยีน *sea* หรือยีน *sec* มีการแสดงออกของยีน แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการตรวจ SEs ด้วย Transia® ID kit ELISA ซึ่งพบ SEA เท่านั้น จึงอาจมีความเป็นไปได้ว่ามีการแสดงออกของยีน *sea* เท่านั้นก็ได้ หรือเกิดจากข้อจำกัดของชุดตรวจ หรือความหลากหลายของ SEC ก็ได้ ซึ่งผล DNA sequencing พบว่าเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง SEC3 จากข้อมูลทั้งหมดอาจกล่าวได้ว่า ชุดตรวจ Transia® ID kit ELISA ไม่สามารถตรวจหา SEC3 ได้ นอกจากนี้นื่องจากการตรวจพบ SEs ด้วยชุดตรวจ SEs ทั้ง 2 ชุดนี้เป็นการตรวจ โปรตีน SEs ซึ่งเป็นการตรวจการแสดงออกของยีนในระดับ translation ซึ่งยีน *sec* อาจมีการแสดงออกของยีนในระดับ transcription แต่มีความเป็นไปได้ที่ไม่มีการแสดงออกในระดับ translation ซึ่งต้องศึกษาต่อไป

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs กับการสร้าง classical SEs นั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยพิจารณาผลจากชุดตรวจ Transia® Plate Plus kit ELISA เท่านั้น ไม่สามารถคำนวณผลจาก Transia® ID kit ELISA ได้ เพราะจำนวนตัวอย่างที่ทำการทดสอบยังไม่เพียงพอมาสามารถนำมาคำนวณได้

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมู จำนวน 155 isolates โดยการศึกษาลายพิมพ์ DNA ที่สร้างด้วยเทคนิค rep–PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถจำแนกจุลินทรีย์ในระดับสายพันธุ์ได้ (Casey et al., 2006; Elli et al., 2006; Marilley et al., 2004; Svec et al., 2005) จากการศึกษาพบว่าสามารถจัดกลุ่ม *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมูทั้งหมดได้ 27 กลุ่ม ที่ค่าความเหมือน (similarity value) ร้อยละ 90 โดบพบ isolate ที่จัดอยู่ในกลุ่ม pattern T มากที่สุด ซึ่งอาจจัดกลุ่มได้ว่าเป็น *S. aureus* สายพันธุ์เดียวกัน อีกทั้งพบการกระจายตัวของการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ใน 13 กลุ่ม pattern จากข้อมูลนี้อาจกล่าวได้ว่า *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมูมี *S. aureus* จำนวน 27 สายพันธุ์ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์แหนมหมู และในจำนวนนี้มี 13 สายพันธุ์ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs

เมื่อพิจารณาในแต่ละกลุ่ม pattern ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs พบว่าในแต่ละกลุ่มแม้ว่ามีลักษณะของ pattern ที่เหมือนกัน ไม่จำเป็นต้องมีการตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs เสมอไป เช่น กลุ่ม pattern H มี 5 isolates ที่ similarity value ร้อยละ 92.8 เพาะแยกจากแหนมหมู 3 แห่งคนละเครื่องหมายการค้ากัน ซึ่งเป็นไปได้ว่า *S. aureus* สายพันธุ์นี้มีการปนเปื้อนในแหล่งร่วมที่ใช้ในการผลิตแหนมหมูของ 3 เครื่องหมายการค้านี้ แต่มีการพบยีนที่ควบคุมการสร้าง SEC จำนวน 1 isolate เท่านั้น ในขณะที่ isolates อื่นๆ ตรวจไม่พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs เลย ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับ Naffa และคณะ (2007) ที่รายงานไว้ว่าการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษไม่มีความสัมพันธ์กับ genotype อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจาก rep – PCR เป็นการสร้างลายพิมพ์ DNA จาก genome ไม่รวมถึง genetic mobile elements อีกทั้งในการสกัด DNA ครั้งนี้เป็นการสกัด genomic DNA ในส่วนของโครโมโซม ไม่รวมถึง พลาสมิด และจากการศึกษาพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ได้ในบาง isolates ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ายีนดังกล่าวอาจจะสามารถอยู่ได้ทั้งในโครโมโซมและนอกโครโมโซม ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไปว่ามีการพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ใน genetic mobile elements อื่นๆ หรือไม่ของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมูต่อไป แต่จากการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการพบยีน classical SEs พบว่า จากการรายงานของ Loir และคณะ (2003) ที่ได้รายงานว่า SEs encoding gene มีหลาย genetic support ซึ่งส่วนใหญ่เป็น mobile gene elements เช่น ยีน *sea* สามารถถ่ายทอดไปยัง *S. aureus* ตัวอื่นโดย temperate phages (Coleman et al., 1989), ยีน *seb* พบอยู่ในโครโมโซมของ *S. aureus* ที่เป็น clinical isolates (Shafer and Iandolo, 1978) แต่อาจพบอยู่ใน 750 - kb พลาสมิด ของ *S. aureus* บางสายพันธุ์ได้ (Shalita et al., 1977), ยีน *sec* พบใน

pathogenicity island (Fitzgerald et al., 2001), ยีน *sed* อยู่ใน 27.5 kb พลาสมิด โดยพบในสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา penicillin และ แคดเมี่ยม ร่วมอยู่ด้วย (Dabrowski and Medrala, 2005) และยีน see สามารถถ่ายทอดไปยัง *S. aureus* ตัวอื่นได้โดย defective phage (Couch et al., 1988) อีกทั้ง ยีน *sea* และ *see* สามารถถ่ายทอดได้โดย lysogenic phage (Betley and Mekalanos, 1985) นอกจากนี้ Dabrowski and Medrala (2005) ได้รายงานเพิ่มเติมว่า ยีน *seb* และยีน *sec* สามารถถ่ายทอดโดยพลาสมิดที่มียีนที่ดื้อยาต่อ penicillin ด้วย จากข้อมูลดังกล่าวนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่ายีนที่ควบคุมการสร้าง Classical SEs นี้ อาจอยู่ในโครโมโซม หรือ mobile genetic elements ก็ได้ และอาจสามารถถ่ายทอดจาก *S. aureus* ตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่งได้ โดยไม่ส่งผลต่อลายพิมพ์ DNA เมื่อทำการตรวจด้วยเทคนิค rep - PCR

เมื่อพิจารณาในความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมูในแต่ละเครื่องหมายการค้า ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs พบว่า ในแหนมหมูแต่ละเครื่องหมายการค้ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ขึ้นกับปริมาณการปนเปื้อน แหนมหมูที่มีการปนเปื้อนน้อย อาจพบความหลากหลายของสายพันธุ์น้อย หรือมาจากการปนเปื้อนน้อยแหล่ง ในขณะที่แหนมหมูที่มีการปนเปื้อนมาก อาจพบความหลากหลายของสายพันธุ์มาก หรือมาจากการปนเปื้อนมากแหล่ง เช่น การที่พบ *S. aureus* เพียง 1 กลุ่ม pattern ในแหนมหมูเครื่องหมายการค้าเดียวกัน อาจสามารถบอกได้ว่าแหนมหมูแท่งนั้นมีการปนเปื้อนเพียง *S. aureus* สายพันธุ์เดียว หรือมีแหล่งการปนเปื้อน *S. aureus* มาจากแหล่งเดียวกัน การที่พบ *S. aureus* 4 กลุ่ม pattern ในแหนมที่มีเครื่องหมายการค้าเดียวกัน อาจสามารถบอกได้ว่าแหนมแท่งเครื่องหมายการค้านั้นๆ มีการปนเปื้อน *S. aureus* 4 สายพันธุ์ หรือมีแหล่งการปนเปื้อน *S. aureus* มาจากอย่างน้อย 4 แหล่ง เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้พบว่าแหนมหมูที่ทำการศึกษามีปริมาณการปนเปื้อนของ S. aureus ที่เกินมาตรฐานอยู่ อีกทั้ง *S. aureus* บาง isolates ที่เพาะแยกมาจากแหนมหมูนี้มีตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และสามารถสร้าง classical SEs ที่ทนความร้อนได้ แม้ว่าจะมีปริมาณการปนเปื้อน *S.aureus* ในแหนมหมูน้อยกว่ามาตรฐานก็ตาม อาจกล่าวได้ว่าผู้บริโภคแหนมหมูนั้นมีโอกาสที่จะบริโภคแหนมหมูที่ปนเปื้อน classical SEs ที่ *S. aureus* เหล่านี้สร้างขึ้นได้ แม้ว่าจะปรุงอาหารผ่านความร้อนแล้ว หรือมีโอกาสที่จะบริโภคแหนมหมูที่ปนเปื้อน *S. aureus* ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษได้ แม้ว่าจะมีการปนเปื้อน *S. aureus* เพียงเล็กน้อยก็ตาม อาจเป็นเหตุให้ผู้บริโภคมีโอกาสที่จะเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นมาตรฐานแหนมหมูที่กำหนดอาจจะยังไม่สามารถป้องกันอันตรายจะอาจเกิดขึ้นจากการบริโภคแหนมหมูที่ปนเปื้อน *S. aureus*

ได้ เมื่อพิจารณาจากข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ในแหนมหมูที่มีพบการปนเปื้อน *S. aureus* นั้น มีการปนเปื้อน *S. aureus* จากแหล่งปนเปื้อนมากกว่า 1 แหล่ง สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 27 กลุ่ม และมีการกระจายของการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษใน *S. aureus* ในสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 13 กลุ่ม ซึ่งในสายพันธุ์เดียวกันอาจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs หรือไม่ก็ได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เป็นการสกัดโครโมโซมไม่รวมถึงพลาสมิด แต่ผลที่ได้คือมีการพบยีนในโครโมโซมซึ่งเชื้อที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันอาจจะไม่พบยีนก็ได้ จากข้อมูลนี้อาจแสดงให้เห็นว่ายีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นี้อาจอยู่ได้ทั้งในโครโมโซมหรือนอกโครโมโซมก็ได้ รวมทั้งจากรายงานการศึกษาการพบยีนดังกล่าวพบว่า สามารถพบยีนที่ควบคุมการสร้าง SEs ได้ใน genetic mobile elements ได้ ซึ่งจากข้อมูลนี้อาจเป็นไปได้ว่า *S. aureus* ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นี้อาจมีคุณสมบัติสามารถเคลื่อนย้ายไปสู่ *S. aureus* สายพันธุ์อื่นๆ ได้ ดังนั้นแหนมหมูที่มีการปนเปื้อน *S. aureus* ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นั้นมีโอกาสถ่ายทอดยีนไปสู่ *S. aureus* ตัวอื่นได้ ต้องต้องศึกษาต่อไป ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาหาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนทั้งหมด โดยเฉพาะแหล่งที่มี *S. aureus* ที่มียีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ และควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรากฏของยีนควบคุมการสร้างสารพิษและความสัมพันธ์ของการตรวจพิสูจน์พบยีนควบคุมการสร้างสารพิษและการสร้างสารพิษของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู อีกทั้งเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู โดยแหนมหมูที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวน 90 แท่ง จากการศึกษาพบว่า

1. ความชุกของการปนเปื้อน *S. aureus* สูงถึงร้อยละ 45.56 (จำนวน 41 แท่ง) มีปริมาณการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 2 จนถึงมากกว่า 16,000 MPN ต่อกรัมแหนมหมู และมี 17 แท่งที่พบ *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs (ร้อยละ 18.9)

2. การศึกษาการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ของ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมู จำนวน 155 isolates ด้วยเทคนิค multiplex PCR ตรวจพบยีน classical SEs encoding genes จำนวน 29 isolates (ร้อยละ 18.71) โดยตรวจพบยีน *sec* มากที่สุด (ร้อยละ 11.61) รองลงมาคือ ยีน *sea* ร่วมกับยีน *sec* (ร้อยละ 5.16), ยีน *sea* (ร้อยละ 1.29) และ *seb* (ร้อยละ 0.65) ตามลำดับ และไม่พบยีน *sed* และยีน *see* เลย

3. *S. aureus* ทั้งหมดจำนวน 29 isolates ที่ตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs พบว่า ส่วนใหญ่จะมียีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเพียงชนิดเดียว จำนวน 21 isolates (ร้อยละ 13.55) อีกทั้งยังพบ *S. aureus* ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง สารพิษ 2 ยีน จำนวน 8 isolates (ร้อยละ 5.16)

4. การตรวจการสร้าง classical SEs ของ *S. aureus* isolates ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นั้นด้วย Transia Plate Plus kit ELISA พบว่า ทุก isolates นั้นมีการตรวจพบ classical SEs เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติพบว่า *S. aureus* ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นั้นมีความสัมพันธ์กับการสร้าง classical SEs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แสดงว่าทุก isolates ที่มีการพบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษเหล่านี้มีโอกาสก่อให้เกิดอันตรายเมื่อปนเปื้อนในแหนมหมูได้

5. เมื่อทำการตรวจการสร้าง SEA-SEE แบบแยกชนิด ด้วย Transia ID kit ELISA พบว่า *S. aureus* isolates ที่มียีน *sea* และยีน *seb* มีการตรวจพบการสร้าง SEA และ SEB ทุก isolates ในขณะที่ isolates ที่มียีน *sec* ตรวจพบ SEC เพียง 2 isolates และ *S. aureus* isolates ที่มียีน *sea* ร่วมกับ *sec* ตรวจพบ SEA เท่านั้น ทุก isolates ซึ่งเกิดจากข้อจำกัดของชุดตรวจที่ไม่สามารถตรวจ SEC3 ได้

6. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* isolates ที่เพาะแยกจากแหนมหมูด้วยเทคนิค rep -PCR พบว่า มีทั้งหมดจำนวน 27 patterns และมีการกระจายของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs อยู่ในกลุ่ม pattern เหล่านี้ จำนวน 13 กลุ่ม ที่จัดกลุ่มกันที่ similarity value ร้อยละ 90 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมูในการศึกษาครั้งนี้มีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 27 สายพันธุ์ และมี 13 สายพันธุ์ที่มีตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ

7. *S. aureus* สายพันธุ์เดียวกันอาจมีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษหรือไม่ก็ได้ เนื่องจากการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นี้ พบเพียง *S. aureus* บาง isolate ที่อยู่ในกลุ่ม pattern เดียวกัน

จากที่กล่าวมาทั้งหมดสรุปได้ว่าผู้บริโภคแหนมหมูมีโอกาสบริโภคแหนมหมูที่มีปริมาณ *S. aureus* ปนเปื้อนเกินมาตรฐานถึงร้อยละ 45.56 และมีโอกาสที่บริโภคแหนมหมูที่มี *S. aureus* ที่สามารถสร้างสารพิษได้ถึง 18.9% โดย *S. aureus* isolate ที่เพาะแยกได้จากแหนมหมูในการศึกษาครั้งนี้มีความหลายหลายทางพันธุกรรมถึง 27 สายพันธุ์ และมี 13 สายพันธุ์ที่มีกการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ โดย isolates เหล่านี้มีการตรวจพิสูจน์พบยีน *sec* มากที่สุด รองลงมาคือ ยีน *sea* และยีน *seb* ตามลำดับ ซึ่งการตรวจพิสูจน์พบยีนเหล่านั้นมีความสัมพันธ์กับการสร้างสารพิษอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.01) นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษนั้นไม่จำเพาะต่อสายพันธุ์ ดังนั้นผู้บริโภคที่บริโภคแหนมหมูนั้นมีโอกาสที่จะได้รับ SEs ที่ปนเปื้อนในแหนมหมูได้ เนื่องจากมีการพบ *S. aureus* ที่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ที่สามารถสร้าง SEs ได้ ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้น ที่ศึกษาถึงพันธุกรรมในส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* isolate ซึ่งมีข้อจำกัดและข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้เป็นการสุ่มตัวอย่างโคโลนี เพียง 1-5 isolatesจากตัวอย่างแหนมหมูแต่ละแท่ง (สูงสุด 15 isolates จาก 1 เครื่องหมายการค้า) ดังนั้นความเป็นไปได้ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมยังไม่เพียงพอ ซึ่งอาจต้องเก็บ isolates เพิ่มมากขึ้น

2. การตรวจการสร้างสารพิษนั้นมีความแตกต่างกันของผลการตรวจเมื่อใช้ชุดตรวจที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากความหลากหลายของสารพิษ หรืออาจเกิดจากข้อจำกัดของชุดตรวจเองได้ จึงต้องมีการพิสูจน์เพิ่มเติม

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรม ยังไม่สามารถบอกได้ถึงความหลากหลายในแง่ความเป็นตัวแทนของแหนมหมูในแต่ละเครื่องหมายการค้าได้ทั้งหมด แต่สามารถบอกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* isolate ของการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลนำร่อง เพื่องานวิจัยในอนาคต

4. *S. aureus* isolates ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาเพียงแค่ classical SEs encoding genes (ยีน *sea-see*) เท่านั้น ซึ่งยังสามารถศึกษาพันธุกรรม *S. aureus* ในด้านอื่นๆได้เช่น ยีนดื้อยา *mecA*, SEs encoding genes อื่นๆ และ Toxic shock syndrome gene เป็นต้น

5. ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ Chi-square มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติของการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs กับการสร้าง classical SEs ซึ่งยังคงมีอคติจากการวิเคราะห์เนื่องจากไม่ได้ทำการศึกษาการสร้าง classical SEs ใน *S. aureus* ที่ไม่มีการตรวจพิสูจน์พบยีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาการสร้าง classical SEs ใน *S. aureus* ดังกล่าวด้วย หรืออาจต้องหาวิธีการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติชนิดอื่น

6. ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep - PCR เป็นการสร้างลายพิมพ์ DNA ส่วน genomic DNA เท่านั้น ไม่ได้รวมถึง plasmid ซึ่งในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้าง classical SEs นั้น อาจจะต้องทำการสกัด plasmid ร่วมด้วย เนื่องจาก classical SEs encoding genes สามารถอยู่ใน plasmid หรือ genetic mobile elements อื่นๆ ได้

7. จากการศึกษาครั้งนี้การทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *S. aureus* ที่เพาะแยกจากแหนมหมูนั้น จะเป็นข้อมูลช่วยการจัดการลดความเสี่ยงของการปนเปื้อน *S. aureus* ในกระบวนการผลิตได้ โดยจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในกระบวนการผลิตแหนมหมูในโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อหาแหล่งการปนเปื้อน

8. ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการสกัด DNA ส่วนที่เป็นโครโมโซมเท่านั้นไม่รวมพลาสมิด ซึ่งยีนที่ควบคุมการสร้าง SEs อาจอยู่ในพลาสมิดก็ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการสกัดพลาสมิด เพื่อศึกษายีนเหล่านี้ในพลาสมิดด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นงคราญ เรืองประพันธ์. 2544. คุณลักษณะทางสุขศาสตร์ของเนื้อหมูและตับหมูของจังหวัดเชียงใหม่. วารสารวิชาการสาธารณสุข. 10(3): 548-552.

พรศิริ พรหมกิ่งแก้ว และ อนิรุธ เนื่องเม็ก. 2548. การศึกษาการปนเปื้อนของ Salmonella และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดในภาคเหนือ. วารสารวิชาการสาธารณสุข. 13(1): 35-42.

วรรณา หาญเชาว์วรกุล ดารินทร์ อารีย์โชคชัย สุชาดา จันทสิริยากร กมลชนก เทพสิทธา วรวรรณ ดิเรกโภค สุทธนันท์ สุทธชนะ อุบลรัตน์ นฤพนธ์จิรกุล อมรา ทองหงษ์ ชญาภา สาดสูงเนิน และ สำเริง ภู่ระหงษ์. 2548. ตัวอย่างรายงานการสอบสวนโรค 1. รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ ประจำปี พ.ศ.2548. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. นนทบุรี: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. 5-20.

สมคิด จันที เกสร แถวโนนงิ้ว รัชนี มาตย์ภูธร สันทัด ผางโคกสูง และ พวงเพชร เฟื่องฟูเกียรติคุณ. 2544. “การสอบสวนการระบาดโรคอาหารเป็นพิษ ในสถานสงเคราะห์เด็กแห่งหนึ่ง จ. ขอนแก่น ตุลาคม 2544” [Online]. Available: http://dpc6.ddc.moph. go.th / epidem/investigate/การระบาดโรคอาหารเป็นพิษในสถานสงเคราะห์เด็ก%20จ_ขอนแก่น.pdf

สุรเชษฐ ญาณะโค สุภัทรา หอมมณี สมคิด กาคำเครือ ญานี ธรรมปัญญา และรัตนากรณ์ แสนบรรหาร . 2549. “รายงานการสอบสวนโรค ตำบลหนองตอง อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่.” [Online]. Available: http://epid.moph.go.th/epinorth/PDF_invest/อาหารเป็นพิษหางดงเชียงใหม่.pdf

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2550. “เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาการพร้องบริโภค เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารทั่วไปที่มิใช่อาหารควบคุมเฉพาะ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ” [Online]. Available: http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/file/useful.htm

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2546. ”มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน_แหนม.” [Online]. Available: http://tisi.go.th/otop/pdf_file/tcps145_46.pdf

อมรา ทองหงษ์. 2548. การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ จังหวัดนครสวรรค์. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. 36(20): 338.

ภาษาอังกฤษ

Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C., Wolter, W.and Zschock, M. 2001. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immun. 8(5): 959-964.

Atanassova, V., Meindl, A.and Ring, C. 2001. Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. Int. J. Food. Microbiol. 68(2): 105-113.

Arbuthnott, J.P., Coleman, D.C. and de Azavedo, J.S. 1990. Staphylococcal toxins in human disease. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19(1): 101-107.

AOAC. 1995. *Staphylococcus aureus* in foods: Most probable number method for isolation. Sec. 17.5.01, Method 987.09. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. P.A. Cunniff (Ed.) Maryland: Gaithersburg. 32-33.

Aycicek, H., Cakiroglu, S. and Stevenson, T.H. 2005. Incidence of Staphylococcus aureus in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara,Turkey. Food. Control. 16(6): 531-534.

Balaban, N. and Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food. Microbiol. 61(1): 1-10.

Becker, K., R. Roth, and G. Peters. 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J. Clin. Microbiol. 36(10): 2548–2553.

Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. M.P. Doyle (Ed.) New York: Marcel Dekker, Inc. 463-523.

Bergdoll, M.S. 1990. Analytical methods for Staphylococcus aureus. Int. J. Food. Microbiol. 10(2): 91-99.

Betley, M.J. and Mekalanos, J.J. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. Science. 229(2): 185-191.

Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Santos, D.A., Carmo, L.S., Dias, R.S., Silva, M.C.C. and Rosa, C.A. 2006. Enteroxigenic *Staphylococcus* spp. and Other

Microbial Contaminants During Production of Canastra cheese, Brazil. Braz. J. Microbiol. 37(3): 545-550.

Brakstad, O.G., Aasbakk, K. and maeland, J.A. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene. J. Clin. Microbiol. 30(1): 1654-1660.

Cardoso, H.F.T., Silva, N., Sena, M.J., and Carmo, L.S., 1999. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Brazil. Lett. Appl. Microbiol. 29(2): 345-349.

Carmo, L.S., Dias, R.S., Linardi, V.R., de Sena, M.J. and dos Santos, D.A. 2003. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, Mg, Brasil. Braz. Arch. Biol. Tech. 46(4): 581-586.

Casey, M.G., Gruskovnjak, J., Schaeren, W. and Wechsker, D. 2006. Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyere PDO cheese. EDP Sciences. 86(2): 407-414.

Cerqueira-Campos, M.L., Furlanetto, S.M.P., Iaria, S.T.and Bergdoll, M.S. 1993. Staphylococcal food poisoning outbreaks in Sou Paulo (Brazil). Rev. Microbiol. 24(2): 251-264.

Coleman, D.C., Sullivan, D.J., Russel, R.J., Arbuthnott, J.P., Carey, B.F. and Pomeroy, H.M. 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of §-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: Molecular mechanism of triple conversion. J. Gen. Microbiol. 135(9): 1679-1697.

Couch, J.L., Soltis, M.T. and Betley, M.J. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. J. Bacteriol. 170(19): 2954-2960.

Dabrowski, W. and Medrala, D. 2005. Bacterial Toxins. In: Toxins in Food. W.M. Dabrowski (Ed.) Washinton: CRC PRESS. 193-214 .

Dinges, M.M., Theelen, J.P.G. and Shlievert, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 113(1): 16-34.

Evenson, M.L., Hinds, M.W., Berstein, R.S. and Bergdoll, M.S. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak in staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. Food. Microbiol. 7(3): 311-316.

Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J. and Smith, C.J. 2001. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J. Bacteriol. 183(1): 63-70.

Gevers, D., Huys, G. and Swings, J. 2001. Applicability of rep - PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. FEMS Microbiol. Lett. 205(1): 31–36.

Hwang, S.Y., Kim, S.H., Jang, E.J., Kwon, N.H., Park, Y.K., Koo, H.C., Jung, W.K., Kim, J.M. and Park, Y.H. 2007. Novel multiplex PCR for the detection of the Staphylococcus aureus superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. Int. J. Food. Microbiol. 117(1): 99-105.

Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K. and Makino, S. 2005. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. Appl. Environ. Microbiol. 71(5): 2793-2795.

International Comission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF). 1996. Characteristics of Microbial pathogens In: Microorganisms in foods Vol 5. ICMSF (Ed.) London: Blackie Academic & Professional. 126-140.

Ishii, Y., Alba, J., Maehara, C., Murakami, H., Matsumoto, T., Tateda, K., Furuya, N., Iwata, M. and Yamaguchi, K. 2006. Identification of biochemically atypical *Staphylococcus aureus* clinical isolates with three automated identification systems. J. Med. Microbiol. 55(4): 387-392.

Jorgensen, H.J., Mork, T., Hogasen, H.R. and Rorvik, L.M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol. 99(1): 158-166.

Klaassen, H.W., Valk, H.A. and Horrevorts, A.M. 2003. Clinical *Staphylococcus aureus* Isolate Negative for the Sa442 Fragment. J. Clin. Micorbiol. 41(9): 4493.

Kitai S., Shimizu, A., Wano, J.K., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R. and Inamoto, T. 2005. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Retail Raw Chicken meat Throughout Japan. J. Vet. Med. Sci. 67(3): 269-274.

Le Lior, Y.L., Baron, F.and Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2(1): 63-76.

Martin, M.C., Fueyo, J.M., Gonzalez-Hevia, M.A., Mendoza, M.C. 2004. Genetic procedures for identificaition of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. Int. J. Food. Microbiol. 94(2): 279-286.

Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. 1998. Species-Specific and Ubiquitious-DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36(3): 618-623.

Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W.M. 2000. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. J. Clin. Microbiol. 38(3): 1032-1035.

Monday, S.R. and Bohach, G.A. 1999. Use of Multiplex PCR To Detect Classiical and Newly Described Pyrogenic Toxin Genes in Staphylococcal Isolates. J. Clin. Microbiol. 37(10): 3411-3414.

Muyer, G., Waal, E.C., Ultterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerse chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59(3):695-700.

Nascimento, J.S., Marval, M.G., Oliveira, S.S., Ceotto, H., Santos, K.R.N., Bastos , K.C. 2005. Genomic fingerprinting of bacteriocin-producer strains of *Staphylococcus aureus.* Res. Microbiol. 156(4): 837–842.

Nema, V., Agrawal, R., Kamboj, D.V., Goel, A.K., Singh, L. 2007. Isolation and Characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. Int. J. Food. Microbiol. 117(1): 29-35.

Normano, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Giannatale, E.D., Salinetti, A.P., Salandra, G.L., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C. and Celano, G.V. 2005. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Int. J. Food. Microbiol. 98(1): 73-79.

Oliveira, A.M. and Ramos, M.C. 2002. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. Braz. J. Med. Res. 35(2): 175-180.

Orwin, P.M., Fitzgerald, J.R., Leung, D.Y., Gutierrez, J.A., Bohach, G.A.andSchlievert, P.M. 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infect. Immun. 71(10): 2916-2919.

Orwin, P.M., Leung, D.Y., Donahue, H.L., Novick, R.P.andSchlievert, P.M. 2001. Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. Infect. Immun. 41(35): 14033-14040.

Park, C.E., Akhtar, M. and Rayman, M.K. 1992. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Micobiol. 58(8): 2509-2512.

Paukatong, K.V. and Kunawasen, S. 2001. The Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) generic model for the production of Thai fermented pork sausage (Nham). Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 114(9): 327-330.

Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N. and Nostro, A.L. 2007. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food. Control. 18(2): 196-200.

Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantono, C., Comi, G. and Cocolin, L. 2005. Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. Int. J. Food. Microbiol. 97(2): 277-284.

Rosec, J. P. and Gigaud, O. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. Int. J. Food. Microbiol. 77(1-2): 61-70.

Ryan, K.J. and Ray, C.G. 2004. An introduction to infectious disease. In: Sherris Medical Microbiology. C.G. Ray (Ed.) New York: McGraw Hill. 876-879.

Schleifer, K.H. 1986. Gram-Positive Cocci. In: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. J.G. Holt (Ed.) Baltimore: Williams and Wilkins. USA. 999-1033.

Schmitt, M., Schuler-Schmid, U. and Scmidt-Lorenz, W. 1990. Temperature limits of growth,TNase, and enterotoxin production of Staphylococcus aureus strains isolated from foods. Int. J. Food Microbiol. 11(1): 1-19.

Shafter, W.M. and Iandolo, J.J. 1978. Chromosome locus for staphylococcal enterotoxin B. Infect. Immun. 20(2): 273-278.

Shalita, Z., Hertman, I. and Sand, S. 1977. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 129 (2): 317-325.

Soriano, J.M., Blesa, J., Rico, H., Molto, J.C. and MAÑES, J. 2002. Incidence of *Staphylococcus aureus* in meals from cafeterias. J. Food. Safety. 22(2): 135-140.

Steinhart, C.E., Doyle, M.E. and Cochrane, B.A. 1996. Foodborne Bacterial Intoxications and Infections. In: Food Safety 1996. Food Research Institute (Ed.) Newyork: Marcel Dekker. 400-404.

Svec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedlacek, I. and Swings, J. 2005. Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. FEMS Microbiol. Lett. 247(1): 59-63.

Tanasupawat, S. and Daengsubha, W. 1983. *Pediococcus* species and related bacteria found in fermented foods ad related materials in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 29(3): 487-506.

Tanasupawat, S., Ezaki, T., Suzuki, K., Okada, S., Komagata, K. & Kozaki, M. (1992). Characterization and Identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 38(1): 121-134.

Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G. and Vandenesch, F. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect. Immun. 74(8): 4724-4734.

Tirado, C. and Schimdt, K. 2001. WHO surveillance programme for control of food-borne infection and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. J. Infect. 43(1): 80-84.

Tranter, H.S. 1990. Foodborne staphylococcal illness. Lancet. 336(22): 1044-1046.

U.S. Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition (U.S. FDA/CFSAN). 1992. “Chapter 3 *Staphylococcus aureus*. Foodborne Pathogenic

Microorganisms and Natural Toxins Handbook." [Online]. Available: http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html

U.S. Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition (U.S. FDA/CFSAN). 2001. "Chapter 12 Staphylococcus aureus. Bacteriological Analytical Manual ." [Online]. Available: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html

Vichienroj, K. and Kunawasen, S. 1998. Physical chemical and microbioloical Characteristics of Thai fermented sausage of Nham. Proceedind of the 4th Asia Pacific food analysis Nham Conference, 16-19 November. Chiangmai. Thailand.

Vivoni, A.M.andMoreira, B.M. 2005. Application of molecular techniques in the study of Staphylococcus aureus clonal evolution-a review. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 100(7): 693-698.

Weller, T.M. 2000. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: Which should be the international standard? J. Clin. Microbiol. 44 (2): 160-172.

Wongsommart, D., Ruengprapun, N., Boonyawongvirot, J., Thongskulpanich, N.and Rongrodejanarak, C. 1994. Parasites and food poissoning bacteria in Nham. Bull. Dept. Med. Sci. 36(3): 163-171.

Zee, A., Verbakel, H., Zon, J.C., Frenay, I., Belkum, A., Peeters, M., Buiting, A. and Bergmans, A. 1999.Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains: Comparison of Repetitive Element Sequence-Based PCR with Various Typing Methods and Isolation of a Novel Epidemicity Marker. J. Clin. Microbiol. 37(2): 342-349.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สรุปผลข้อมูลการเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณจากแหนมหมู

แท่งแหนมหมูที่	Sample ID	Temp. (°C)	pH	Aw	S. *aureus* (MPN/g)
1	3RT702121	4	4.67	0.97	<1.8
2	3RT702122	4	4.73	0.97	<1.8
3	3RT702123	4	4.69	0.97	<1.8
4	ARR702141	4	4.6	0.97	<1.8
5	ARR702142	4	4.57	0.97	<1.8
6	ARR702143	4	4.53	0.97	<1.8
7	CMH612181	6.6	4.55	0.96	<1.8
8	CMH612182	6.6	4.43	0.96	<1.8
9	CMH612183	6.6	4.43	0.96	<1.8
10	DJD702041	4	4.28	0.96	<1.8
11	DJD702042	4	4.21	0.96	<1.8
12	DJD702043	4	4.26	0.96	<1.8
13	DJS612181	2.8	4.96	0.95	350
14	DJS612182	2.8	5.13	0.95	350
15	DJS612183	2.8	4.97	0.95	140
16	DNP701171	25	5.99	0.97	17
17	DNP701172	25	5.83	0.97	12
18	DNP701173	25	5.98	0.97	14
19	INT701171	25	4.84	0.97	12
20	INT701172	25	4.81	0.97	130
21	INT701173	25	4.82	0.97	7.8
22	JRS702041	4	4.38	0.97	<1.8
23	JRS702042	4	4.36	0.98	<1.8
24	JRS702043	4	4.36	0.97	<1.8
25	K26611201	4	5.05	0.96	220
26	K26611202	4	4.96	0.95	34
27	K26611203	4	4.98	0.95	110

ภาคผนวก ก (ต่อ)

สรุปผลข้อมูลการเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณจากแหนมหมู

แท่งแหนมหมูที่	Sample ID	Temp. (°C)	pH	Aw	S. *aureus* (MPN/g)
29	MKK701172	25	4.85	0.96	<1.8
30	MKK701173	25	4.36	0.96	<1.8
31	MSV701171	25	4.85	0.97	210
32	MSV701172	25	4.91	0.97	17
33	MSV701173	25	4.74	0.97	3500
34	NBP702041	4	4.47	0.97	<1.8
35	NBP702042	4	4.46	0.97	<1.8
36	NBP702043	4	4.46	0.97	<1.8
37	NLP702121	4	4.41	0.97	<1.8
38	NLP702122	4	4.48	0.98	<1.8
39	NLP702123	4	4.41	0.97	<1.8
40	NMD701081	4	4.63	0.96	<1.8
41	NMD701082	4	4.54	0.96	<1.8
42	NMD701083	4	4.46	0.96	<1.8
43	NTC702041	4	4.46	0.97	<1.8
44	NTC702042	4	4.48	0.97	<1.8
45	NTC702043	4	4.45	0.97	<1.8
46	NTY701171	25	4.81	0.97	2
47	NTY701172	25	4.79	0.97	6.8
48	NTY701173	25	4.85	0.97	13
49	NVN702211	4	4.43	0.97	<1.8
50	NVN702212	4	4.45	0.97	<1.8
51	NVN702213	4	4.4	0.97	<1.8
52	ORS702121	4	5.05	0.97	4.5
53	ORS702122	4	4.9	0.97	4
54	ORS702123	4	4.75	0.97	8.3

ภาคผนวก ก (ต่อ)

สรุปผลข้อมูลการเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณจากแหนมหมู

แท่งแหนมหมูที่	Sample ID	Temp. (°C)	pH	Aw	S. *aureus* (MPN/g)
55	PVP702121	4	5.05	0.98	200
56	PVP702122	4	5.18	0.98	580
57	PVP702123	4	5.03	0.98	210
58	PYB701081	4	4.65	0.96	<1.8
59	PYB701082	4	4.58	0.96	2
60	PYB701083	4	4.6	0.96	<1.8
61	SKK612181	2	4.7	0.96	13
62	SKK612182	2	4.71	0.96	7.8
63	SKK612183	2	4.66	0.96	<1.8
64	SNS702211	4	4.57	0.98	<1.8
65	SNS702212	4	4.59	0.98	2
66	SNS702213	4	4.6	0.98	9.3
67	SPG701081	4	4.46	0.97	<1.8
68	SPG701082	4	4.48	0.96	<1.8
69	SPG701083	4	4.57	0.96	2
70	STL701081	4	4.62	0.95	<1.8
71	STL701082	4	4.68	0.95	<1.8
72	STL701083	4	4.62	0.95	<1.8
73	TOP702141	4	4.47	0.97	<1.8
74	TOP702142	4	4.47	0.97	<1.8
75	TOP702143	4	4.42	0.97	<1.8
76	VNB701081	4	4.46	0.96	<1.8
77	VNB701082	4	4.58	0.96	<1.8
78	VNB701083	4	4.49	0.96	<1.8

ภาคผนวก ก (ต่อ)

สรุปผลข้อมูลการเพาะแยก *S. aureus* เชิงปริมาณจากแหนมหมู

แท่งแหนมหมูที่	Sample ID	Temp. (°C)	pH	Aw	S. *aureus* (MPN/g)
79	VSN702041	30	4.89	0.97	49
80	VSN702042	30	4.98	0.97	23
81	VSN702043	30	4.91	0.97	33
82	NDJ107011	4	4.62	0.96	7.8
83	NDJ107012	4	4.68	0.96	23
84	NDJ107013	4	4.62	0.95	<1.8
85	DM2607011	4	5.12	0.96	92
86	DM2607012	4	5.06	0.97	>16,000
87	DM2607013	4	4.88	0.95	24
88	GSN 1	4	4.75	0.97	20
89	GSN 2	4	4.66	0.98	40
90	GSN 3	4	4.7	0.98	20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารละลาย Peptone 0.1%

ผสมอัตราส่วน peptone 1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Brain Heart Infusion (BHI)

ประกอบด้วย	Brain extract	12.5 กรัม
	Heart extract	5.0 กรัม
	Proteose peptone	10.0 กรัม
	Dextose	2.0 กรัม
	Sodium chloride	5.0 กรัม
	Disodium phosphate	2.5 กรัม
	Thiamine hydrochloride	0.1 มิลลิกรัม

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนำส่วนผสม Brain Heart Infusion (BHI) 37 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Trypticase Soy Broth (TSB) with NaCl 10%, pyruvate 1%

ชั่ง TSB 30 กรัม NaCl 100 กรัม และ pyruvate 10 กรัม ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Baird Parker Agar (BP)

ประกอบด้วย	Tryptone	10.0 กรัม
	Meat Extract	5.0 กรัม
	Yeast Extract	1.0 กรัม
	Lithium Chloride	5.0 กรัม
	Agar	20 กรัม

ชั่งสาร Baird Parker 58 กรัม ผสมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลง 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย egg yolk tellurite emulsion 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Glycine 20%	6.3 มิลลิลิตร
Potassium tellurite 1%	1.0 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข (ต่อ)

Sodium pyruvate 20%	5.0 มิลลิลิตร
Egg Yolk emulsion	5.0 มิลลิลิตร

การสกัด DNA ด้วย Wizard® Genomic DNA Purification Kit (ดัดแปลงจาก วิธีPromega)

นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มเชื้อไว้แล้ว ใส่ในหลอด microcentrifuge

ปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์และเทสารละลายทิ้ง

เติม EDTA เข้มข้น 50 mM จำนวน 480 µl

เติม lysosyme เข้มข้น 10 mg/ml จำนวน 60 µl, mutanolysin เข้มข้น 5,000-10,000 units/ml จำนวน 20 µl ปิเปตขึ้นลงอย่างช้าๆ

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

ปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์และเทสารละลายทิ้ง

เติม Nuclei lysis Solution จำนวน 600 µl ปิเปตขึ้นลงอย่างช้าๆ

บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที เพื่อย่อยเซลล์

เติม RNAse เข้มข้น 4 mg/ml จำนวน 10 µl แล้วผสมโดยคล่ำหลอด อย่างน้อย 25 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง

เติม Protein Precipitation Solution จำนวน 200 µl แล้ว vortex ที่ความเร็วสูงเป็นเวลาอย่างน้อย 20 วินาที

วางหลอดบนน้ำแข็ง อย่างน้อย 5 นาที ปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g เป็นเวลา 5 นาที

เทสารละลายที่มี DNA ลงในหลอด microcentrifuge ปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g เป็นเวลา 5 นาที

เทสารละลายที่มี DNA ลงในหลอด microcentrifuge เติม isopropanol จำนวน 600 µl แล้วคว่ำ – หงายหลอด จะเห็นเส้น DNA สีขาว

ปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g เป็นเวลา 2 นาที เทสาระลายออก เติม 70% alcohol จำนวน 600 µl แล้วคว่ำ – หงายหลอด หลายครั้ง เพื่อให้ DNA สะอาด

ปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g เป็นเวลา 2 นาที เทสาระลายออก

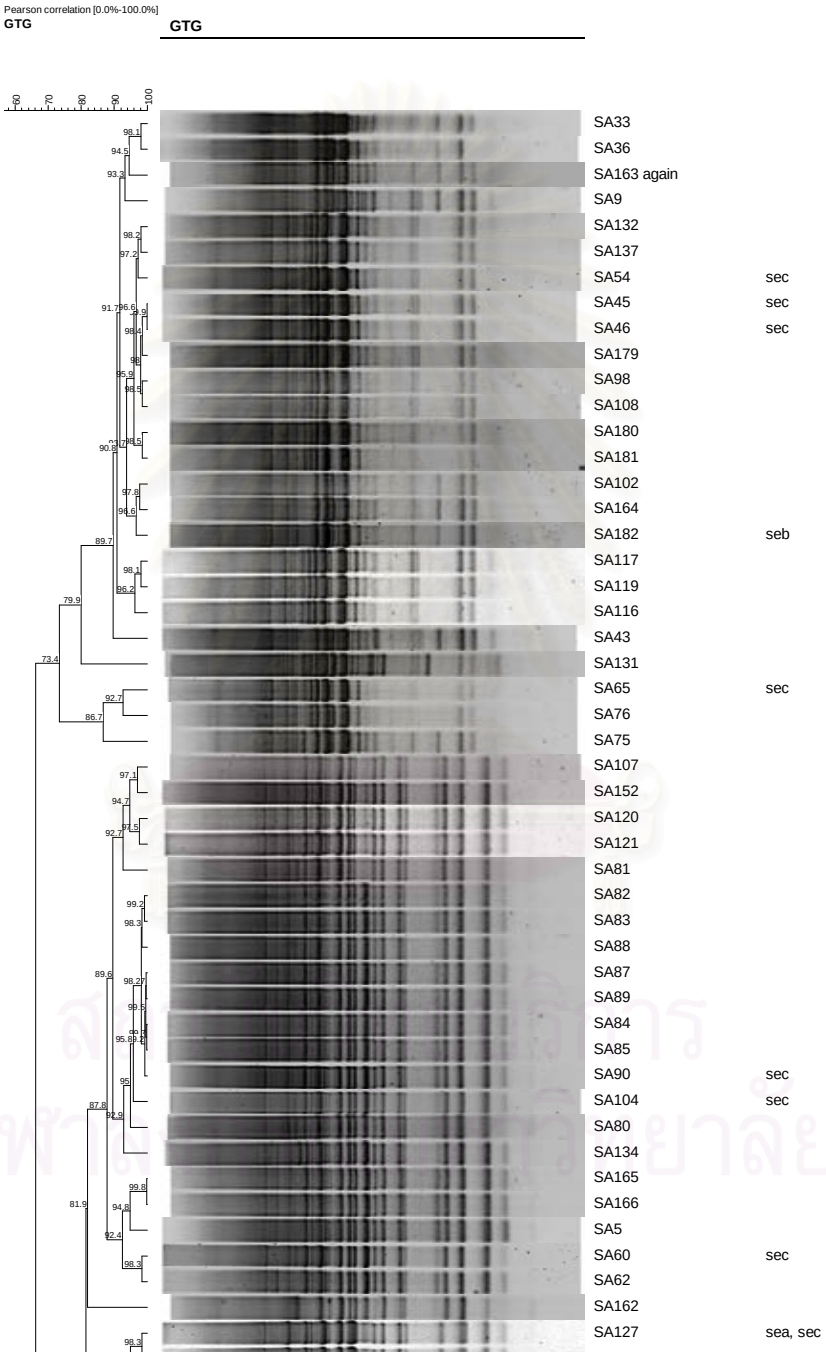
Air – dry เป็นเวลา 20 นาที เติม DNA rehydration Solution จำนวน 100 µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เก็บสารละลาย DNA ที่ – 20 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

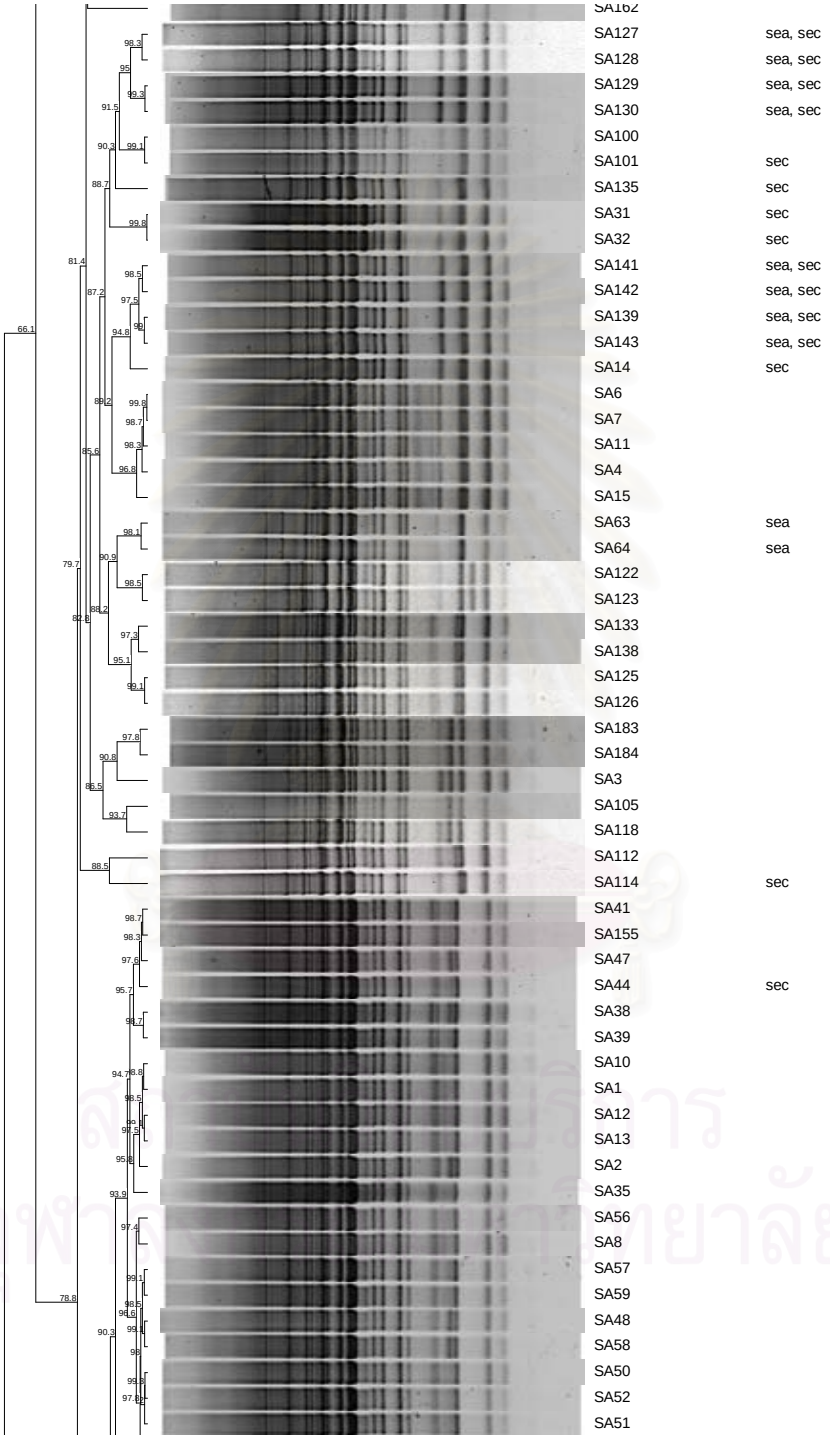
ภาคผนวก ค

แสดงผล clustering analysis **ของ** *S. aureus* **ที่แยกได้จากแหนมหมู ด้วยโปรแกรม** Gel Compare® II version 4.5 (Applied Maths Inc., USA)



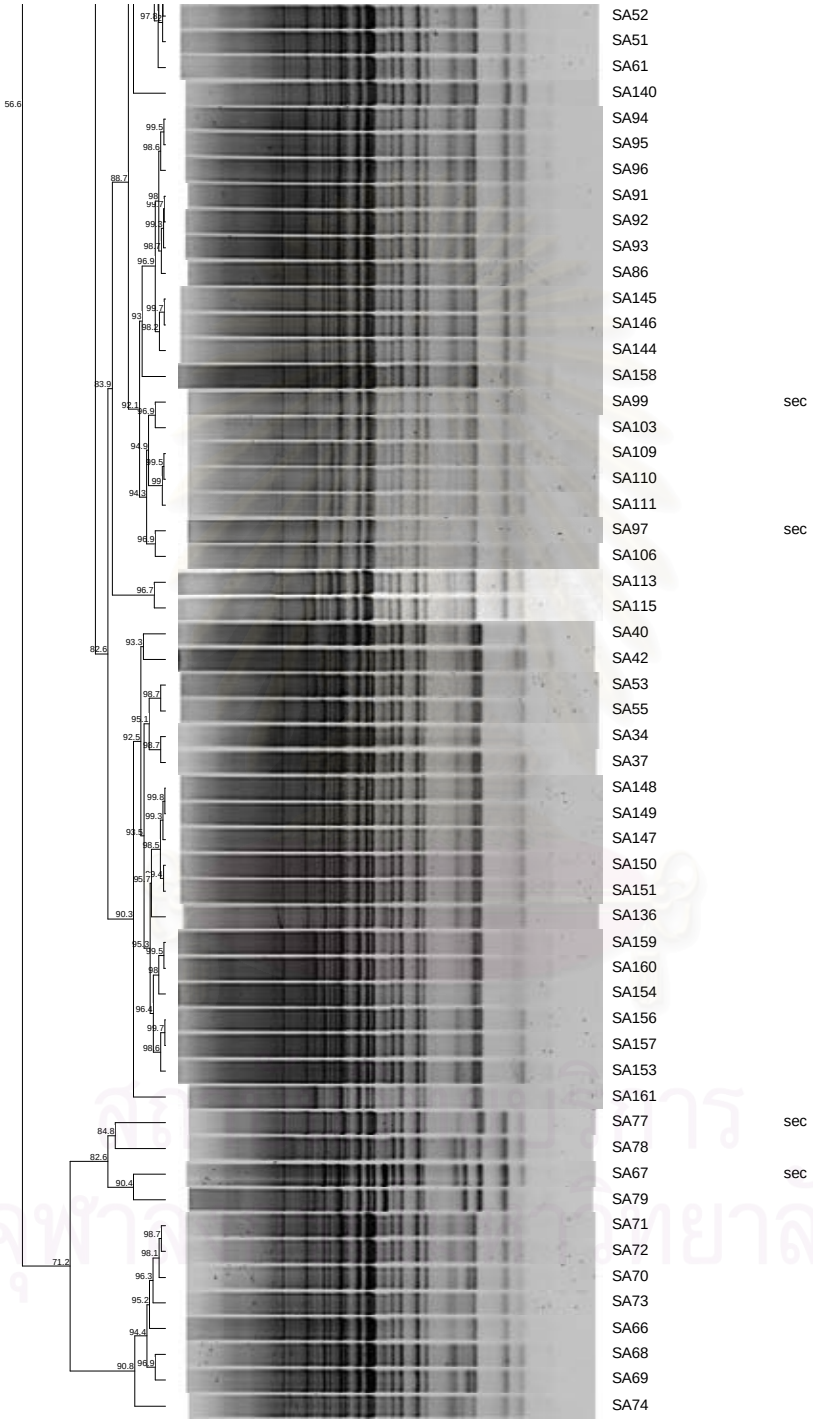
ภาคผนวก ค (ต่อ)

แสดงผล clustering analysis **ของ** *S. aureus* **ที่แยกได้จากแหนมหมู ด้วยโปรแกรม** Gel Compare® II version 4.5 (Applied Maths Inc., USA)



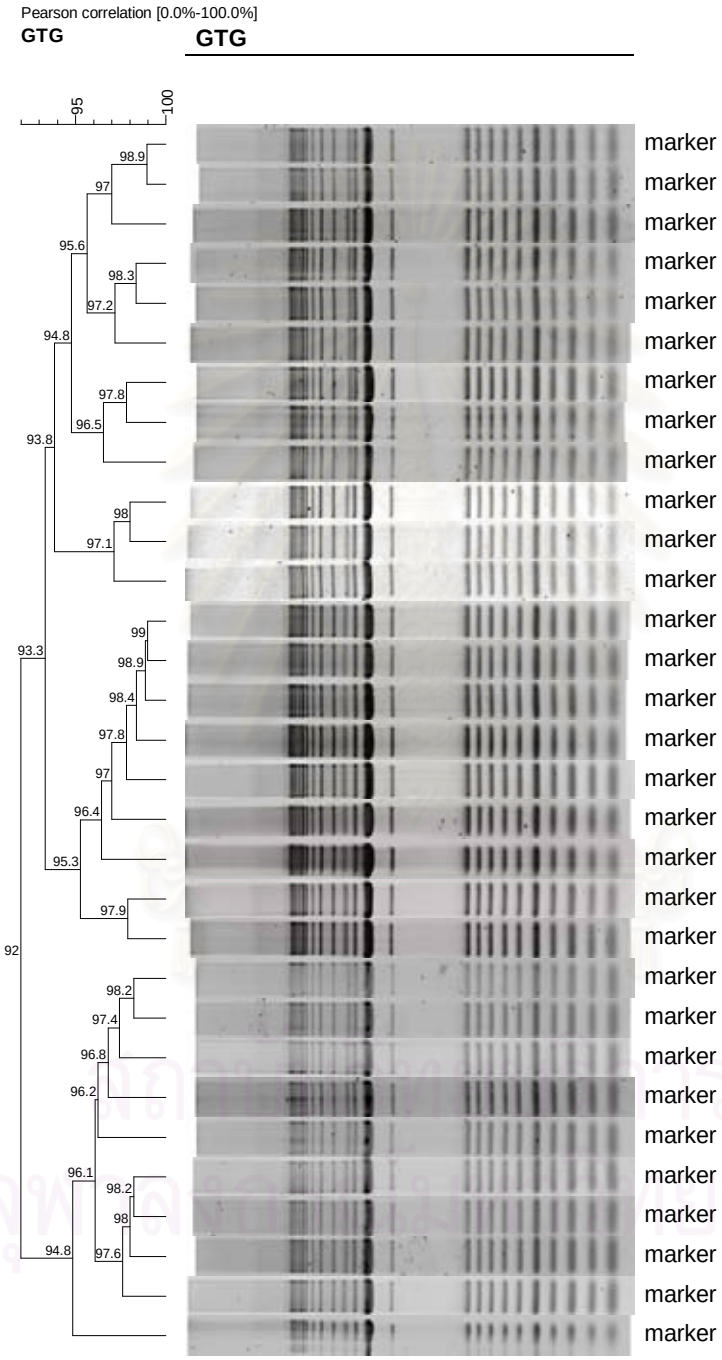
ภาคผนวก ค (ต่อ)

แสดงผล clustering analysis **ของ** *S. aureus* **ที่แยกได้จากแหนมหมู ด้วยโปรแกรม** Gel Compare® II version 4.5 (Applied Maths Inc., USA)



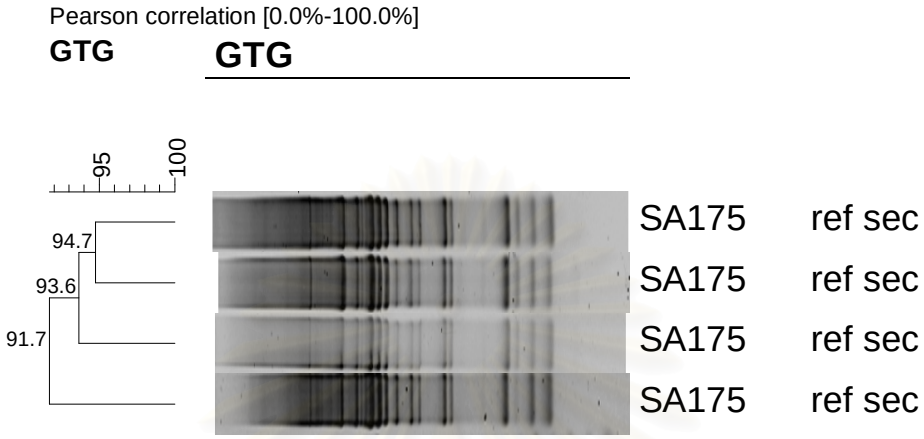
ภาคผนวก ง

แสดงผลการ clustering analysis **ของ** marker **ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม** Gel Compare® II version 4.5 (Applied Maths Inc., USA)



ภาคผนวก จ

แสดงผลการ clustering analysis **ของ** SA175 **ซึ่งใช้เป็น** reference control **ของการทดลองและการวิเคราะห์**



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย พงศ์ธร พุ่มแตงอ่อน เกิดเมื่อวันที่ 7 ธันวาคม พ.ศ. 2524 สำเร็จการศึกษาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2547 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย