

การประเมินเทคนิค PCR ในการตรวจหา *stn* ของ *Salmonella* จากตัวอย่างเนื้อไก่และผักกาดหอม

ณัฐมน นิยมเดชา, เสกสรรค์ สโมรสสุข, วัชร ณะวรรณ, วรดา สโมรสสุข *

Received: March 19, 2015

Revised & Accepted: April 29, 2015

บทคัดย่อ

การรับประทานอาหารที่มีเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนจะนำไปสู่โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญและพบได้ทั้งในประเทศที่พัฒนาและกำลังพัฒนา ซึ่งอาหารประเภทเนื้อไก่และผักกาดหอมนั้นพบมีการรายงานการปนเปื้อนเชื้อได้บ่อย วิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อทำได้โดยการเพาะเชื้อร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมี แต่มีข้อจำกัดด้านระยะเวลาและความไว ผู้วิจัยจึงนำเทคนิค PCR ที่ถูกพัฒนาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพและความจำเพาะสูง มาศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการตรวจหา *Salmonella enterotoxin (stn)* ของเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อไก่และผักกาดหอม โดยมีการทดสอบความสามารถในการตรวจหาเชื้อที่ปริมาณต่ำสุดที่ถูกปนเปื้อนในอาหารด้วยปริมาณเชื้อที่ต่างกันพบว่า อาหารที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเชื้อด้วยการบ่มเพาะในอาหารเหลว Buffered Peptone Water (BPW) สามารถตรวจหาเชื้อได้ในปริมาณ 1 CFU/เนื้อไก่ 25 g และ 100 CFU/ผักกาดหอม 50 g ตามลำดับ และผลการทดสอบกับตัวอย่างเนื้อไก่และผักกาดหอมจากตลาดในกรุงเทพฯ และจังหวัดอื่น ๆ ในเขตภาคกลางจำนวน 120 ตัวอย่างด้วยวิธี PCR และการเพาะเชื้อเพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะพบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 84.6 และ 90.5 ในเนื้อไก่ และร้อยละ 69.2 และ 97.9 ในผักกาดหอม ตามลำดับ วิธี PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารโดยเฉพาะในเนื้อไก่ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก มีความไวที่ดีและความจำเพาะสูง

คำสำคัญ: *Salmonella*, PCR, *stn* , เนื้อไก่, ผักกาดหอม



Evaluation of PCR assay to detect *stn* gene of *Salmonella* in chicken meat and lettuce samples

Nattamon Niyomdech, Seksun Samosornsuk, Nattharee Thanawan, Worada Samosornsuk *

Abstract

Consumption of *Salmonella*-contaminated foods causes foodborne illness, which is a major problem of public health in developed and developing countries. Chicken meat and lettuce have been reported to be contaminated with this pathogen. Although the culture-based method followed by biochemical confirmation is a standard method, there are many limitations particularly time-consuming and low sensitivity. In this research, we used a developed PCR assay from our previous study indicating high sensitivity and specificity to evaluate the efficacy of *Salmonella* detection from chicken meats and lettuces based on *Salmonella* enterotoxin gene (*stn*) target. The limits of detection from artificial contamination of chicken meat and lettuce were studied. With an overnight enrichment step in Buffered Peptone Water (BPW) performed prior to the PCR assay, it could detect *Salmonella*, which was 1 CFU/ 25 g chicken meat and 100 CFU/ 50 g lettuce, respectively. Total of 120 food samples including each of chicken meat and lettuce for 60 samples from local markets in Bangkok and other provinces in central part of Thailand were tested with PCR assay of *stn* gene and culture methods. Using the culture method as gold standard, the sensitivity and specificity for detection of *Salmonella* by the PCR method were 84.6 and 90.5 % in chicken meat and 69.2 and 97.9 % in lettuce, respectively. Thus, our developed PCR assay can be applied for rapid *Salmonella* detection in food samples especially in chicken meats.

Keywords : *Salmonella*, PCR, *stn*, chicken meat, lettuce

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Pathumthani province, Thailand

* Corresponding author: (e-mail: sworada@hotmail.com)

บทนำ

Salmonella เป็นเชื้อสาเหตุหลักของการเกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารในคนและพบมีการระบาดในหลายประเทศทั่วโลก⁽¹⁾ ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขที่จะต้องใช้งบประมาณในการควบคุมดูแลเป็นจำนวนมาก มีการประมาณการถึงร้อยละ 75 ของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อนั้นเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนจำพวกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เนื้อสุกร วัว ไก่ ไข่ไก่ และนม⁽²⁾ ซึ่งประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกจำหน่ายผลิตภัณฑ์เหล่านี้ทั้งในและนอกประเทศเป็นจำนวนมากรองจากข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกเนื้อไก่ที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศมากกว่าปีละสามหมื่นล้านบาท⁽³⁾ ดังนั้นคุณภาพของเนื้อไก่ที่ต้องปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจึงเป็นสิ่งสำคัญ นอกจากเนื้อสัตว์ต่าง ๆ แล้วยังสามารถพบ *Salmonella* ปนเปื้อนในผักและผลไม้ได้⁽⁴⁾ ผักกาดหอมเป็นตัวอย่างหนึ่งที่พบเชื้อปนเปื้อนและมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เนื่องจากคนมักนำมารับประทานในรูปแบบผักสลัดซึ่งนิยมรับประทานแบบสด โดยมีการรายงานในปี ค.ศ. 2004 ที่ประเทศอังกฤษพบเชื้อ *S. Newport* ปนเปื้อนในผักกาดหอมซึ่งทำให้มีผู้ป่วยกว่า 350 ราย⁽⁵⁾ ปี ค.ศ. 2012 สหรัฐอเมริกาได้เรียกคืนผักกาดหอมบรรจุแพ็คเกจจำนวนมากกลับคืนจากหลายรัฐเนื่องจากการคาดการณ์ว่าสินค้ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella*⁽⁶⁾ และในงานวิจัยของ Rodriguez-Lazaro และคณะ⁽⁷⁾ ในปี ค.ศ. 2014 ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนอยู่ในผักกาดหอมถึงร้อยละ 50 ของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ กระบวนการในการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนจากตัวอย่างอาหารที่เป็นมาตรฐานสากลนั้นคือ การเพาะเชื้อร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยาซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานานกว่า 5 วันจึงจะทราบผล ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆขึ้นมาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อโดยวิธี PCR นั้นได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง⁽⁸⁻¹¹⁾ เนื่องจากประสิทธิภาพของเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถลดระยะเวลาการตรวจหาเชื้อลงได้อย่างมาก ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารตามกระบวนการผลิตอาหาร ทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและลดการแพร่ระบาดของเชื้อสู่คน งานวิจัยนี้จึงประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อไก่และผักกาดหอมโดยตรง ซึ่งได้ทำการตรวจหาเชื้อที่ปริมาณต่ำสุด (limit of detection) จากตัวอย่างอาหารที่จำลองการปนเปื้อน

ด้วยเชื้อที่ปริมาณต่างกัน และตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างอาหารที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติจำนวน 120 ตัวอย่าง โดยในการทำปฏิกิริยา PCR ใช้ยีน *Salmonella enterotoxin (stn)* เป็นยีนเป้าหมายซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเหมาะสมที่ถูกพัฒนาจากงานวิจัยของณัฐมน นิยมเดชา และคณะ⁽¹²⁾

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาและการเพาะเชื้อ

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์(เลขที่ 021/2557) *Salmonella* สายพันธุ์ OPD-1 ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติถูกนำมาใช้ในการศึกษาการจำลองการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร (artificial contamination of food samples) ซึ่งการเพาะเชื้อทำโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2. การเพาะเชื้อจากตัวอย่างอาหาร

การเพาะเชื้อเพื่อหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารใช้วิธีมาตรฐาน⁽¹³⁾ ทำโดยใช้เนื้อไก่ปริมาณ 25 g และผักกาดหอมปริมาณ 50 g ใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อและเติมน้ำอาหารเหลว Buffered Peptone Water (BPW) ที่มี novobiocin เป็น supplement ลงไป 225 ml ตีบดด้วยเครื่อง BagMixer (Interscience, France) เป็นเวลา 2 นาที บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง *Salmonella-Shigella (SS) (Oxoid)* ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และ Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) agar (Oxoid) ที่ 42°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และพิสูจน์เชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี

3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร

1 ml ของ homogenized sample ที่ได้จากการตีบดตัวอย่างอาหารกับอาหารเหลว BPW ถูกนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำล้างส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมน้ำละลาย 1x TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 µl ลงไปในตะกอนต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาให้แช่เย็นในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บที่ -20°C

4. ปฏิกริยา PCR

ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *stn* ตามวิธีของ ณัฐมน นิยมเดชา และคณะ⁽¹²⁾ โดยใช้ forward และ reverse primers ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตามลำดับดังนี้ *stnF170* 5'-ATCGCCTCCAGCTGATCC-3' และ *stnR508* 5'-GGTGGTAAGCGAATTGCTCG-3' ควบคุมผลลบโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอของเชื้อ *Escherichia coli* และควบคุมผลบวกโดยใช้ดีเอ็นเอของ *Salmonella* สายพันธุ์ STU-2 ได้ผลผลิตที่มีขนาด 339 bp ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

5. การประเมินความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปริมาณต่ำสุดจากตัวอย่างอาหารจำลอง ด้วยวิธี PCR

เนื้อไก่และผักกาดหอมที่ถูกทดสอบโดยวิธีการเพาะเชื้อตามวิธีมาตรฐาน⁽¹³⁾ ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ถูกใช้ทำการศึกษาในขั้นต่อไป

การจำลองการปนเปื้อนเชื้อในตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ OPD-1 ที่ปริมาณแตกต่างกัน โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่าประมาณ 0.5 McFarland และเจือจางเชื้อลงทีละสิบเท่า (serial ten-fold dilution) จนได้ปริมาณของเชื้อ 10^8 - 10^0 CFU/ml นับจำนวนโคโลนีบน nutrient agar เพื่อยืนยันความถูกต้องของปริมาณเชื้อ โดยเติมเชื้อ 1 ml จากแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลองที่มี 9 ml ของ homogenized sample ที่ได้จากการตีบดเนื้อไก่หรือผักกาดหอมกับอาหารเหลว BPW จากนั้นผสมให้เข้ากัน

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จาก pre-enrichment sample และ post-enrichment sample

การตรวจหาเชื้อจาก pre-enrichment sample ทำโดยดูด 1 ml ของตัวอย่างแต่ละหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR และสำหรับ post-enrichment sample นั้นบ่มเพาะหลอดตัวอย่างที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอและตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 2 ครั้ง

6. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด

ตัวอย่างอาหารทั้งหมด 120 ตัวอย่างประกอบด้วยเนื้อไก่จำนวน 60 ตัวอย่าง และผักกาดหอมจำนวน 60

ตัวอย่าง ซึ่งได้มาจากตลาดสดที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานครและจังหวัดอื่น ๆ ในเขตภาคกลาง ได้แก่ สระบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี อ่างทอง และนนทบุรี ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ และวิธี PCR

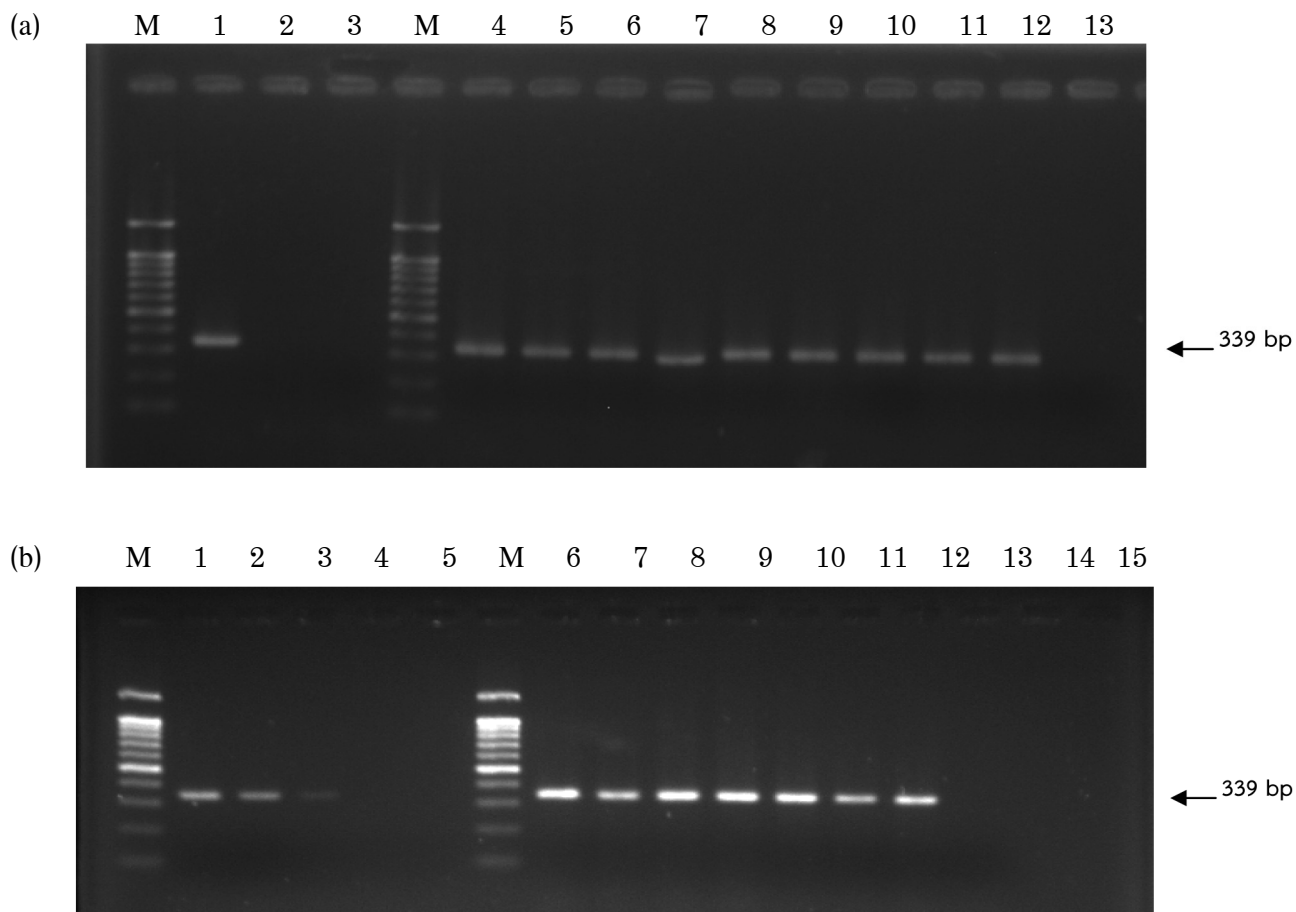
7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้หลักการวิเคราะห์แบบตาราง 2 x 2 เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธี PCR กับการเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และ โดยพารามิเตอร์ที่ใช้วัดประสิทธิภาพของเทคนิค PCR คือ ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยแสดงค่าความเชื่อมั่นในผลการตรวจด้วยค่าช่วงเชื่อมั่น 95 % (95% confidence intervals) และใช้ Kappa index เพื่อประเมินความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจในสองวิธี โดยถ้า $Kappa = 0$ = equal to chance, $0 < Kappa \leq 0.20$ = poor agreement; $0.21 < Kappa \leq 0.40$ = fair agreement; $0.41 < Kappa \leq 0.60$ = moderate agreement; $0.61 < Kappa \leq 0.80$ = good agreement; $0.81 < Kappa \leq 0.99$ = excellent agreement; $Kappa = 1$ = perfect agreement⁽¹⁴⁾

ผลการศึกษา

1. การประเมินความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปริมาณต่ำสุดจากตัวอย่างอาหารจำลองด้วยวิธี PCR

ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเนื้อไก่และผักกาดหอมที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยปริมาณเชื้อที่ต่างกันคือ 10^8 - 10^0 CFU โดยจากการเปรียบเทียบผลระหว่าง pre-และ post-enrichment sample ของเนื้อไก่และผักกาดหอม พบว่ามีความแตกต่างกันโดย post-enrichment sample นั้นสามารถตรวจหาเชื้อที่ปริมาณต่ำได้ดีกว่าจาก pre-enrichment sample ซึ่ง pre-enrichment sample ของเนื้อไก่และผักกาดหอมสามารถตรวจได้ต่ำสุดที่ 10^8 และ 10^6 CFU ตามลำดับ และ post-enrichment sample ของเนื้อไก่และผักกาดหอมสามารถตรวจได้ต่ำสุดที่ 10^0 และ 10^2 CFU ตามลำดับดัง **รูปที่ 1**



รูปที่ 1 ประเมินความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารจำลองประเภทเนื้อไก่ (a) และ ผักกาดหอม (b)

a: Lane M, 1.5 Kb+100 bp ladder; lane 1-3, PCR products จาก pre-enrichment chicken samples ที่ 10^8 - 10^6 CFU; lane 4-12, PCR products จาก post-enrichment chicken samples ที่ 10^8 - 10^0 CFU; lane 13, negative control
b: Lane M, 1.5 Kb+100 bp ladder; lane 1-5, PCR products จาก pre-enrichment lettuce samples ที่ 10^8 - 10^4 CFU; lane 6-14, PCR products จาก post-enrichment lettuce samples ที่ 10^8 - 10^0 CFU; lane 15, negative control

2. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด

ภายหลังการบ่มเพาะอาหารที่ติดกับอาหารเหลว BPW แล้วจึงเพาะเชื้อและทดสอบ PCR นั้นพบว่า เนื้อไก่ จำนวน 39 และ 35 ตัวอย่างจากทั้งหมด 60 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* เมื่อทดสอบด้วยวิธีการเพาะเชื้อ และ PCR ตามลำดับ โดยให้ผลบวกตรงกันทั้งสองวิธีจำนวน 33 ตัวอย่าง มี 6 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธีการเพาะเชื้อเท่านั้น และมี 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี PCR เท่านั้น ซึ่งผลการคำนวณค่าความไวและความจำเพาะในกลุ่มตัวอย่างเนื้อไก่มีค่าเท่ากับร้อยละ 84.6 (95% CI= 73.2-95.9) และ 90.5 (95% CI= 77.9-103.0) ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์

ระหว่างผลการทดสอบทั้งสองอยู่ในระดับดี (Kappa index = 0.72) และในกลุ่มตัวอย่างผักกาดหอมนั้นพบว่า ผักกาดหอมจำนวน 13 และ 10 ตัวอย่างจากทั้งหมด 60 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* เมื่อทดสอบด้วยวิธีการเพาะเชื้อและ PCR ตามลำดับ โดยให้ผลบวกตรงกันทั้งสองวิธีจำนวน 9 ตัวอย่าง มี 4 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการเพาะเชื้อเท่านั้น และมี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี PCR เท่านั้น ซึ่งผลการคำนวณค่าความไวและความจำเพาะในกลุ่มตัวอย่างผักกาดหอมมีค่าเท่ากับร้อยละ 69.2 (95% CI = 44.1-94.3) และ 97.9 (95% CI = 93.7-101.9) ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบทั้งสองอยู่ในระดับดี (Kappa index = 0.73) ดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างเนื้อไก่และผักกาดหอมด้วยวิธีเพาะเชื้อและ PCR

ผล PCR	ผลการเพาะเชื้อ		
	<i>Salmonella</i>	non- <i>Salmonella</i>	Total
เนื้อไก่			
Positive	33	2	35
Negative	6	19	25
Total	39	21	60
ผักกาดหอม			
Positive	9	1	10
Negative	4	46	50
Total	13	47	60

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

เนื้อไก่และผักกาดหอมที่จัดเป็นตัวอย่างอาหารที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ได้บ่อยและสามารถพบได้ทั่วโลก^(2,4,15) ทำให้เกิดการระบาดและก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของคนอย่างกว้างขวางจึงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญและต้องคอยเฝ้าระวัง งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างเนื้อไก่และผักกาดหอม โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ต่อส่วนยีน *stn* ที่มีความไวและความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *Salmonella* ดังที่เคยมีรายงานในงานวิจัยหลายฉบับ^(11,12,16)

ผลการทดสอบความสามารถของเทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อที่ปริมาณต่ำสุดจากตัวอย่างอาหารจำลองที่ถูกทำให้ปนเปื้อนเชื้อในปริมาณต่างกัน โดยเปรียบเทียบระหว่าง pre-enrichment sample และ post-enrichment sample พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อปนเปื้อนในเนื้อไก่และผักกาดหอมได้ถึง 1 CFU ต่อเนื้อไก่ 25 g และ 100 CFU ต่อผักกาดหอม 50 g ซึ่งกระบวนการบ่มเพาะกับอาหารเหลว BPW ข้ามคืนนั้นมีผลช่วยเพิ่มจำนวนเชื้อที่มีชีวิต เจือจางสารยับยั้งที่มีผลต่อปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) ในตัวอย่างอาหาร⁽¹⁷⁾ และช่วยปรับสภาวะ pH ที่เป็นการลดจากการเติบโตของเชื้อ⁽¹⁸⁾ ดังนั้นในการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างเนื้อไก่และผักกาดหอมตามท้องตลาดจึงได้มีการบ่มเพาะอาหารที่ติดกับ BPW ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ ผลการทดสอบด้วยวิธี PCR พบว่า เทคนิค PCR ให้ค่าความไวความจำเพาะมีความสอดคล้องกับวิธีการเพาะเชื้อในระดับดีถึงแม้จะพบบาง

ตัวอย่างที่ให้ผลขัดแย้ง ซึ่งผลลบปลอมในวิธี PCR อาจเกิดจากการสูญเสียดีเอ็นเอในขั้นตอนการสกัด หรือไม่สามารถกำจัด PCR inhibitor ที่ปนเปื้อนในอาหารให้หมดไปได้ โดยในเนื้อสัตว์มีส่วนประกอบของ โปรตีน ไขมัน โกลโคเจน ฯลฯ และในผักมีโพลีแซคคาไรด์ โพลีฟีนอล แพนคติน และไซเลน ที่ทำให้ประสิทธิภาพของ PCR ลดลง⁽¹⁹⁾ และผลบวกปลอมในวิธี PCR อาจมีสาเหตุจากการที่เชื้อตาย หรือเชื้อมีจำนวนน้อยกว่า 10^4 CFU ในตัวอย่างทำให้ไม่สามารถเพาะเชื้อบนอาหารที่เป็น selective media ได้⁽²⁰⁾ เป็นเหตุให้ตรวจพบเชื้อได้โดยวิธี PCR เท่านั้น ซึ่งผลวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับที่พบว่า การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR หลังทำการ enrichment ให้ผลบวกได้มากกว่าการตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อ^(21, 22) โดยค่าความไวในการตรวจหา *Salmonella* จากเนื้อไก่ของงานวิจัยนี้คือร้อยละ 84.6 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Myint และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่ใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ ST11, ST12 ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายที่ต่างกัน พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 85 แต่การตรวจหาเชื้อที่ปริมาณต่ำสุดที่ได้จากงานวิจัยของการศึกษาค้นครั้งนี้ดีกว่างานวิจัยของ Myint และคณะถึง 10 เท่า⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ความไวของการศึกษาค้นครั้งนี้ค่าสูงกว่าในงานวิจัยของ Whyte และคณะซึ่งได้ร้อยละ 53⁽⁹⁾ สำหรับผลการตรวจในตัวอย่างผักกาดหอมยังไม่พบข้อมูลจากงานวิจัยอื่นที่ทดสอบด้วยเทคนิค PCR แต่เป็นการทดสอบด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงกว่า เช่น การศึกษาของ Rodriguez-Lazaro และคณะ⁽⁷⁾ พบผลความไวถึงร้อยละ 100 จึงไม่

สามารถเปรียบเทียบผลในส่วนนี้ได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเทคนิค PCR ในด้านความไว และความจำเพาะที่ดีในการตรวจหา *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารจำลองและจากการปนเปื้อนตามธรรมชาติ โดยกระบวนการ enrichment ช่วยให้ตรวจหาเชื้อที่ปริมาณต่ำได้เป็นอย่างดี จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนจากอาหารร่วมกับวิธีมาตรฐานซึ่งช่วยลดระยะเวลาในการรายงานผลได้มาก ทั้งนี้ผู้วิจัยจะมีการวิจัยต่อยอดโดยทดสอบกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ได้จากผู้ป่วยเพื่อประเมินประสิทธิภาพในลำดับถัดไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Gomez TM, Motarjemi Y, Miyagawa S, Kaferstein FK, Stohr K. Foodborne salmonellosis. World Health Stat 1997;50:81-9.
2. Galton MM, Morris GK, Martin WT. *Salmonellae* in foods and feeds: review of isolation methods and recommended procedures. US Department of Health, Education, and Welfare 1968.
3. Padungtod P, Kadohira M, Hill G. Livestock production and foodborne diseases from food animals in Thailand. J Vet Med Sci 2008;70:873-9.
4. Pui C, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Ponniah J, Anyi U, et al. *Salmonella*: a foodborne pathogen. Int Food Res J 2011;18:465-73.
5. Montville TJ, Matthew KR, editors. Food microbiology: an introduction. 2nd. ed. Washington: ASM Press, 2008.
6. Food Safety News [database on the Internet]. Lettuce recalled for potential *Salmonella* contamination Available from <http://www.foodsafetynews.com/2012/04/lettuce-recalled-for-potential-salmonella-contamination/>. [cited 2015 March 8].
7. Rodriguez-Lazaro D, Gonzalez-Garcia P, Delibato E, Medici DD, Garcia-Gimeno MR, Valero A, et al. Next day *Salmonella* spp. detection method based on real-time PCR for meat, dairy and vegetable food products. Int J Food Microbiol 2014; 184:113-20.
8. Moreira AN, Conceicao FR, Conceicao Rde C, Ramos RJ, Carvalhal JB, Dellagostin OA, et al. Detection of *Salmonella* Typhimurium in raw meats using in-house prepared monoclonal antibody coated magnetic beads and PCR assay of the *fimA* gene. J Immunoass Immunoch 2008;29:58-69.
9. Whyte P, Mc Gill K, Collins J, Gormley E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. Vet Microbiol 2002;89:53-60.
10. Myint M, Johnson Y, Tablante N, Heckert R. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. Food Microbiol 2006;23:599-604.
11. Makino S-I, Kurazono H, Chongsanguam M, Hayashi H, Cheun H-I, Suzuki S, et al. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. J Vet Med Sci 1999; 61: 1245-7.
12. Niyomdech N, Samosornsuk S, Mungkornkaew N, Samosornsuk W. Development of SYBR Green real-time PCR for *Salmonella* detection. J Med Tech Phy Ther 2014;26:256-63.
13. Andrew HW, Jacobson A, Hammack T [database on the Internet]. Bacteriological Analytical Manual Chapter 5: *Salmonella* Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>. [cited 2015 March 2].
14. Olmos A [homepage on the Internet]. Available from: <https://www.antonio-olmos.com/diagnosis/>

- kappa/online/calculator.html. [Cited 2014 Dec 5]
15. Lertworapreecha M, Sutthimusik S, Tontikapong K. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from pork, chicken, and vegetables in Southern Thailand. Jundishapur J Microbiol 2013;6:36-41.
 16. Ziemer CJ, Steadham SR. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Lett Appl Microbiol 2003;37: 463-9.
 17. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int J Food Microbiol 1992;17:37-45.
 18. Chiu TH, Chen TR, Hwang WZ, Tsen HY. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. Int J Food Microbiol 2005;97:259-65.
 19. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol 2012;113:1014-26.
 20. Beckers H, Heide J, Fenigsen-Narucka U, Peters R. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. J Appl Bacteriol 1987;62:97-104.
 21. Schrank I, Mores M, Costa J, Frazzon A, Soncini R, Schrank A, et al. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. Vet Microbiol 2001;82:45-53.
 22. Lofstrom C, Knutsson R, Axelsson CE, Radstrom P. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. Appl Environ Microbiol 2004;70:69-75.