การพัฒนาวิธีทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ดิบ ด้วยวิธี Multiplex Direct Real-Time PCR

พิเชษฐ์ กุมภาว์* สุภาพร วงศ์ศรีไชย ณัฐพล บุศยรัตน์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Multiplex direct real time PCR ในตัวอย่างเนื้อไก่ดิบโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด และเพื่อให้ทราบผลทดสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิดพร้อมกันในการทดสอบเพียงครั้งเดียว โดยการศึกษาครั้งนี้ ใช้ลำดับเบสของ primer และ probe ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า วิธีทดสอบที่พัฒนาได้สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้พร้อมกันในการทดสอบเพียงครั้งเดียว โดยอุณหภูมิที่ primer และ probe จับกับ DNA เป้าหมายที่เหมาะสมที่สุดคือ 60 องศาเซลเซียส ค่า LOD ของวิธีทดสอบเท่ากับ 10^1 copies/reaction เท่ากันทั้ง 3 เชื้อ ค่า Inclusivity เท่ากับ 100% แสดงว่า วิธีทดสอบที่พัฒนาได้มีความน่าเชื่อถือสูงในการตรวจจับเชื้อเป้าหมายที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ค่า Exclusivity เท่ากับ 100% แสดงว่า วิธีทดสอบมีความจำเพาะสูง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย ผลการเปรียบเทียบผลทดสอบกับวิธีมาตรฐานอ้างอิงพบว่า วิธีที่พัฒนาได้ให้ผลทดสอบสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานอ้างอิงทั้ง 3 วิธี ค่า Analytical sensitivity และ Analytical specificity ของวิธีทดสอบที่พัฒนาได้ เท่ากับ 100% แสดงว่า วิธีทดสอบมีความไว สามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้โดยไม่มีผลลบปลอม มีความจำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายทั้ง 3 ชนิดและไม่มีผลบวกปลอม ดังนั้น วิธี Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้ สามารถนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกในการทดสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิด ในเนื้อไก่ดิบได้ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่ดิบ ช่วยลดระยะเวลาและขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมจาก 5-7 วัน เหลือเพียง 1-2 วัน

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีทดสอบ, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, Multiplex direct real-time PCR

เลขทะเบียนวิชาการ : 68(2)-0304-045

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

* ผู้รับผิดชอบ หมายเลขโทรศัพท์/โทรสาร 0-2967-9700 ต่อ 1121 E-mail: chenthailand@yahoo.com

Development of a multiplex direct real-time PCR method for detecting *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat

Pichet Koompa* Supaporn Wongsrichai Nattaphon Busayarat

ABSTRACT

This study aimed to develop a multiplex direct real-time PCR assay to simultaneously detect *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in raw chicken samples. This assay was designed to eliminate the need for DNA extraction steps, thus accelerating the diagnostic process. Using specific primers and probes targeting the genes of the three pathogens, the developed method successfully detected their DNA in a single test, with an optimal annealing temperature of 60°C. The limit of detection (LOD) was determined to be 10^1 copies/reaction. The assay demonstrated exceptional reliability, with both inclusivity and exclusivity values of 100%. This indicates its high reliability in detecting diverse genetic variants of target pathogens and its specificity with no cross-reaction with non-target pathogens. Furthermore, the developed method's analytical sensitivity and specificity were both 100%, confirming its ability to detect all three pathogens without false negative or false positive results. The test results were consistent with those from standard reference methods. This multiplex direct real-time PCR method serves as a viable and efficient alternative, reducing the analysis time for these foodborne pathogens from the traditional 5-7 days to just 1-2 days, thereby significantly increasing the efficiency and speed of pathogen detection in raw chicken meat.

Keywords: Development of test methods, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes,* Multiplex direct real-time PCR

Registered No: 68(2)-0304-045

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

Correspondence author, Tel/Fax 0 2967 9700 #1121, E-mail: chenthailand@yahoo.com

บทนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกเนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์รายใหญ่ของโลก โดยมีจุดแข็งที่สำคัญคือ มาตรฐานการผลิตที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล ต้นทุนการผลิตที่แข่งขันได้ และการควบคุมโรคระบาดที่มีประสิทธิภาพ โดยประเทศผู้นำเข้าประกอบด้วย ญี่ปุ่น จีน สหภาพยุโรป ประเทศในตะวันออกกลาง สิงคโปร์ ฮ่องกงและเกาหลีใต้ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ โดยเน้นผลิตภัณฑ์แปรรูปมากขึ้น การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ทันสมัย และการผลิตตามความต้องการเฉพาะของแต่ละตลาด แต่อย่างไรก็ตาม การส่งออกในอนาคตยังมีความท้าทายมากขึ้น เนื่องจากต้องมีการแข่งขันกับประเทศคู่แข่งเพิ่มสูงขึ้น มาตรการกีดกันทางการค้าที่ไม่ใช่ภาษี ต้นทุนวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่สูงขึ้น รวมถึงการดำเนินการตามข้อกำหนดด้านคุณภาพความปลอดภัยที่เข้มงวดมากขึ้น ซึ่งประเทศไทยจะต้องดำเนินการให้เป็นไปตามข้อกำหนดที่เข้มงวดของประเทศคู่ค้า เช่น สหภาพยุโรป ซึ่งได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานด้านเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารไว้โดยเฉพาะ และเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ เช่น *Salmonella* spp., *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น (Commission Regulation (EC) No 2073, 2005)

เชื้อ *Salmonella* เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค Salmonellosis ในมนุษย์ ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน ทำให้ติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารและเกิดอาการท้องร่วงคลื่นไส้ (Bogyo *et. al*., 2022) ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (The Center for Disease Control and Prevention, CDC) ในสหรัฐอเมริกา คาดการณ์ว่ามีรายงานผู้ติดเชื้อประมาณ 1.35 ล้านราย และเสียชีวิต 420 รายต่อปี โดย *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (*S.* Enteritidis) และ *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (*S.* Typhimurium) ในกลุ่ม Non-Typhoidal *Salmonella* group (NTS) ก่อให้เกิดอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบ (Mohammad and Saydur, 2024)

เชื้อ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น *Escherichia coli* สายพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่เป็นอันตราย อย่างไรก็ตาม บางสายพันธุ์ เช่น *Escherichia coli* ที่ผลิตสารพิษ (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) ส่วนใหญ่สามารถแพร่เชื้อไปยังมนุษย์ผ่านการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน เช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์บดดิบหรือปรุงไม่สุก นมดิบ ผักดิบและถั่วงอกที่ปนเปื้อน (WHO, 2018) STEC ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ สายพันธุ์ O157:H7 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อก่อโรคที่ติดต่อทางอาหาร อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์นี้มีตั้งแต่ท้องเสียเป็นน้ำหรือเป็นเลือดไปจนถึงภาวะที่รุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต เช่น ลำไส้ใหญ่มีเลือดออก กลุ่มอาการยูรีเมียจากเม็ดเลือดแดงแตกและภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากลิ่มเลือด *Escherichia coli* O157:H7 กลายมาเป็นเชื้อก่อโรคที่ติดต่อทางอาหารที่สำคัญในมนุษย์ ซึ่งก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลก (Nigatu *et al*., 2017) แพร่กระจายไปยังเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ผ่านสภาพแวดล้อมที่ไม่ถูกสุขอนามัย กระบวนการฆ่าที่ไม่เหมาะสม และการใช้อุปกรณ์ที่ปนเปื้อน ส่งผลให้พบการระบาดของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ในหลายภูมิภาคของโลก (Raheel *et., al* 2022)

การติดเชื้อ *Escherichia coli* ก่อโรคในสัตว์ปีกหรือ Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ การติดเชื้อ APEC มักควบคุมได้ด้วยยาปฏิชีวนะ แต่ส่งผลให้เชื้อ *Escherichia coli* ดื้อยา มีอัตราการแพร่กระจายสูงขึ้น (Christensen *et al*., 2021) มีความกังวลว่าการถ่ายทอดเชื้อ *Escherichia coli* ดื้อยาผ่านห่วงโซ่อาหาร อาจส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการ

ติดเชื้อภายนอกลำไส้ (extra-intestinal infection) ในมนุษย์ ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดจากสัตว์สู่คน และเพิ่มความยากลำบากในการรักษาการติดเชื้อในมนุษย์ (Henrik *et al*., 2021)

Listeria monocytogenes เป็นสาเหตุของโรค Listeriosis ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน ทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดและโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ อาการต่างๆ อาจเกิดขึ้นได้หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเซลล์ 100 ถึง 1,000 เซลล์ (Adeoye and Anthony, 2022) โดยส่วนใหญ่มักพบในผู้สูงอายุ ทารกแรกเกิด สตรีมีครรภ์ และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Mohammad and Saydur, 2024) อาหารที่ปนเปื้อนเป็นแหล่งสำคัญของการแพร่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ มีรายงานการปนเปื้อนในอาหารต่างๆ เช่น นมดิบและหรือนมพาสเจอร์ไรส์ ชีส เนื้อไก่ ปลา และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์แปรรูป (Henrik *et al*., 2021) ประเทศผู้นำเข้า เช่น สหภาพยุโรป ได้กำหนดเกณฑ์ความปลอดภัยอาหารสำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารพร้อมรับประทานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 เป็นต้นมา ตามระเบียบคณะกรรมาธิการยุโรปฉบับที่ 2073/2005 (Commission Regulation (EC) No 2073/2005) (Antonia *et al*., 2018)

การปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในเนื้อไก่ดิบยังคงเป็นปัญหาสำคัญด้านความปลอดภัยอาหาร โดยเฉพาะเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* (Parisa *et al*., 2020) สามารถเกิดขึ้นตลอดห่วงโซ่การผลิต ตั้งแต่ฟาร์มเลี้ยงไก่ โรงฆ่าสัตว์ การขนส่ง จนถึงการจำหน่าย (Chase *et al*., 2021) การบริโภคเนื้อสัตว์ปีกของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ มักให้ความสำคัญในด้านคุณภาพความปลอดภัยเป็นลำดับแรก ประเทศคู่ค้าที่นำเข้าเนื้อสัตว์ปีกจากประเทศไทย เช่น สหภาพยุโรป ได้กำหนดมาตรการตรวจสอบอย่างเข้มงวดในการควบคุมป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ทั้งในกลุ่ม food safety criteria เช่น *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* และในกลุ่ม process hygiene criteria เช่น *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* (Commission Regulation (EC) No 2073, 2005) ซึ่งประเทศผู้ส่งออกจะต้องสุ่มเก็บตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์เฝ้าระวังการปนเปื้อนในทุก lot การผลิต

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทางห้องปฏิบัติการ ใช้วิธีอ้างอิงมาตรฐานแบบดั้งเดิม (conventional method) ที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลสำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในอาหาร แต่มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานาน (3-7 วัน) ใช้งบประมาณค่อนข้างสูงในการจัดซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี ใช้บุคลากรจำนวนมากในการปฏิบัติการทดสอบ ต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผลและไม่สามารถตรวจหาเชื้อหลายชนิดพร้อมกันได้ (Gabrielle *et al*., 2023) และเนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อยังคงมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของประชาชนและเศรษฐกิจอย่างต่อเนื่อง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีการตรวจจับขั้นสูงที่สามารถระบุเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วก่อนที่จะถึงมือผู้บริโภค ในปัจจุบันจึงมีความต้องการใช้วิธีทดสอบที่สามารถรายงานผลได้รวดเร็ว และให้ผลการวิเคราะห์เทียบเท่าหรือดีกว่าวิธีดั้งเดิม ซึ่งจะส่งผลให้ระบบการตรวจวิเคราะห์เพื่อการควบคุมหรือเฝ้าระวังคุณภาพความปลอดภัยสินค้ามีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ทำให้การสืบค้นหาสาเหตุของการปนเปื้อนรวดเร็ว และการแก้ไขปัญหาทำได้อย่างทันท่วงที ช่วยลดความเสียหายได้มาก วิธีทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค Real-time PCR เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย สามารถตอบสนองความต้องการนี้ได้ โดยนักวิจัยได้พัฒนาวิธีดังกล่าวมาอย่างต่อเนื่อง เทคนิค Real-time PCR มีข้อดีคือ มีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เร็วกว่าวิธีดั้งเดิมมาก สามารถรายงานผลได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง เมื่อรวมขั้นตอน

pre-enrichment ลดระยะเวลาการตรวจยืนยันผลจาก 5-7 วัน เหลือเพียง 1-2 วัน มีความไวและความจำเพาะสูง (Artika *et al*., 2022) สามารถตรวจพบเชื้อในปริมาณน้อยมาก (10-100 CFU/mL) มีความจำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายสูง เนื่องจากใช้ยีนจำเพาะในการตรวจหา ลดผลบวกปลอมและผลลบปลอมจากการรบกวนของเชื้ออื่น ประหยัดเวลาและทรัพยากรในการตรวจวิเคราะห์ ลดขั้นตอนการทำงานและความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น ลดความเสี่ยงในการสัมผัสเชื้อก่อโรคโดยตรง ลดระยะเวลาในการปฏิบัติงาน และลดการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี จึงได้รับการยอมรับและถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตาม Real-time PCR ก็มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้วิธีการสกัดสารพันธุกรรมก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งในขั้นตอนการสกัด ต้องมีอุปกรณ์และสารเคมี และต้องอาศัยความชำนาญในการปฏิบัติ หากขาดความชำนาญจะส่งผลให้สกัดไม่ได้สารพันธุกรรม หรือเกิดการปนเปื้อนจากขั้นตอนการสกัดได้ ดังนั้น หากมีการพัฒนาวิธีทดสอบที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด และสามารถทดสอบหลายเชื้อในการทดสอบเพียงครั้งเดียวได้ จะส่งผลให้การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ มีความรวดเร็วมากขึ้นและสะดวกต่อการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งในปัจจุบันการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในอาหารมีแนวโน้มมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มความไวในการตรวจจับ การลดเวลาและขั้นตอนการวิเคราะห์ การพัฒนาวิธีให้ใช้งานง่าย เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทั่วไปและการใช้งานในภาคสนาม (Chen *et al*., 2021)

เทคนิค Multiplex real-time PCR เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ช่วยให้สามารถตรวจหาเชื้อหลายชนิดในปฏิกิริยาเดียว ลดเวลาและค่าใช้จ่าย (Zhang *et al*., 2022) แต่ก็มีความท้าทายหลายประการ เช่น การออกแบบ primer และ probe ที่มีความจำเพาะและทำงานร่วมกันได้ดี การจัดการกับสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ในตัวอย่างอาหาร การปรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อทุกชนิด และการพัฒนาวิธีสกัด DNA ที่มีประสิทธิภาพ (Huseyin *et al*., 2022) เทคนิค Multiplex direct real-time PCR เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่รวมเอาเทคโนโลยี 3 อย่างเข้าด้วยกัน ดังนี้ 1) Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาเชื้อหลายชนิดในหลอดเดียวกัน ใช้ primer หลายคู่ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของเชื้อแต่ละชนิด ใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงต่างสีกัน เพื่อแยกแยะสัญญาณจากเชื้อแต่ละชนิด 2) Direct PCR เป็นวิธีการใหม่ที่ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ทดสอบ PCR โดยตรงจากตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment) มีรายงานการใช้วิธี direct PCR ในการตรวจเชื้อ *Salmonella* enterica ในตัวอย่างอาหารพบว่า สามารถตรวจพบเชื้อในระดับต่ำประมาณ 2 CFU/mL (Aaydha *et al*., 2018) ช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ลงอย่างมาก จากหลายวันเหลือเพียงไม่กี่ชั่วโมง ต้องใช้วิธีสกัด DNA ที่มีประสิทธิภาพสูงและกำจัดสารรบกวนได้ดี และ 3) Real-time PCR ติดตามการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายได้แบบทันที (real-time) วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นตามจำนวน DNA สามารถระบุปริมาณเชื้อเริ่มต้นได้โดยเทียบกับ standard curve ข้อดีของ Multiplex direct real-time PCR คือ รวดเร็ว (ใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง) ตรวจหาเชื้อได้หลายชนิดพร้อมกัน มีความไวและความจำเพาะสูง ให้ผลเชิงปริมาณได้ และลดการปนเปื้อนเนื่องจากเป็นระบบปิด

การเลือก primer และ probe สำหรับใช้พัฒนาวิธีทดสอบ Multiplex direct Real-Time PCR จะต้องมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายของเชื้อที่ต้องการตรวจและต้องทำงานร่วมกันได้ดี จากการศึกษาของ Cheng *et al*., (2015) ได้ออกแบบ primer sequence ประกอบด้วย forward primer ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-AACGTGTTTCCGTGCGTAAT-3', reverse primer ที่มีลำดับ sequence คือ5'-TCCATCAAATTAGCGG AGGC-3' และ probe ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-FAM-TGGAAGCGCTCGCATTGTG G-BHQ-3' ที่จำเพาะต่อ

ยีนเป้าหมายของเชื้อ *Salmonella* spp. ทดสอบด้วยเทคนิค Real-Time PCR ในตัวอย่างอาหารพบว่า sensitivity และ specificity ของวิธีทดสอบเท่ากับ 100% จากการศึกษาของ Li *et al.,* (2017) ได้ศึกษา primer และ probe ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย Z3276 ของ *Escherichia coli* O157:H7 (อ้างอิงจาก Li and Chen, 2012) forward primer ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-TATTCCGCGATGCTTGTTTTT-3', reverse primer ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-ATTATCTCA CCAGCAAACTGGCGG-3' และ probe ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-FAM-CCCGCAAATCTTTCCMGBNFQ-3' ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย stx1 และ stx2 ทดสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-Time PCR ผลการศึกษาพบว่า primer และ probe ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย Z3276 สามารถตรวจจับ DNA ของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 จำนวน 135 สายพันธุ์ได้ 100% และแยกแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมายจำนวน 32 สายพันธุ์ได้ 100% และ Chen *et al.,* (2017) ได้รวบรวม primer และ probe ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Listeria monocytogenes* ด้วยเทคนิค PCR จากผลการศึกษาหลายฉบับพบว่า primer sequence ประกอบด้วย forward primer ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-TGCAAGTCCTAAGACGCCA-3', reverse primer ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-ATCCGCGTGTTTCTTTTCGA-3' และ probe ที่มีลำดับ sequence คือ 5'-TEXRED-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-BHQ2-3' (อ้างอิงจาก Nogva *et al*., 2000) ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ทดสอบด้วยวิธี Real-Time PCR ได้ค่า specificity และ exclusive ของวิธีทดสอบเท่ากับ 100% นอกจากนี้ อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา PCR ก็มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการทดสอบ โดยเฉพาะช่วงอุณหภูมิที่ primer จะจับกับสาย DNA เป้าหมาย (Annealing temperature) มีความสำคัญอย่างยิ่ง ต้องเฉพาะเจาะจงเพื่อให้ primer จับกับ DNA ของเชื้อเป้าหมายแต่ละเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาต้องมากพอที่จะตรวจพบเชื้อที่มีปริมาณน้อย แต่ไม่มากเกินไปจนเกิดสัญญาณรบกวน

จากคุณลักษณะและข้อดีของเทคนิค Multiplex direct real-time PCR กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ จึงมีความประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ดิบ ด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเป็นการนำเทคนิคชีวโมเลกุลมาพัฒนาศักยภาพด้านการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ของห้องปฏิบัติการ วิธี Multiplex direct real-time PCR จะทำให้สามารถบริหารจัดการควบคุมการปนเปื้อนได้รวดเร็วยิ่งขึ้น การพัฒนาวิธีตรวจที่มีความไวสูง รวดเร็ว และจำเพาะเจาะจง จะช่วยเพิ่มความปลอดภัยในห่วงโซ่อาหาร ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ และสนับสนุนมาตรฐานการผลิตอาหารที่มีคุณภาพ ส่งเสริมการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* โดยตรงในตัวอย่างเนื้อไก่ดิบโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด และเพื่อให้ทราบผลทดสอบของทั้ง 3 เชื้อพร้อมกันในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องมือหลัก

เครื่อง Real-time PCR ยี่ห้อ Roche รุ่น LightCycler480 Spectrophotometer สำหรับวัดความเข้มข้น DNA ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet class II) ตู้ Lamina air flow Centrifuge แบบตั้งโต๊ะ Microcentrifuge Vortex mixer pH meter Microwave Stomacher Water batch Hot air oven Autoclave ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ตู้เย็น 4°C ตู้แช่แข็ง -20°C และ -80°C เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง Micropipette (ขนาด 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL) Multichannel pipette และ Spin down

1.2 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง แท่งแก้วคนสาร ขวดดูแรน และจานเพาะเชื้อ

1.3 อุปกรณ์พลาสติก

PCR tubes 0.2 mL, Microcentrifuge tubes 1.5 mL, Pipette tips (filter tips), Stomacher bags, Petri dishes, Micro well plates, Cryogenic tubes, Inoculating loops และ Sample containers

1.4 วัสดุสิ้นเปลือง

PCR master mix น้ำยาสำหรับการทดสอบ Multiplex direct real-time PCR และอุปกรณ์อื่นๆ น้ำยา KAPA PROBE FORCE qPCR Master Mix สำหรับการทดสอบ Multiplex direct real-time PCR, Primer/Probe

อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) และ Brilliant Green Agar (modified) สำหรับ *Salmonella* spp. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) with BCIG และ Cephalexin-Tellurite Sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) สำหรับ *Escherichia coli* O157:H7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Half FRASER Broth, Fraser Listeria Selective Supplement, Agar Listeria acc. to Ottaviani and Agosti (ALOA) และ Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol (PALCAM) สำหรับ *Listeria monocytogenes*

สารเคมีสำหรับเตรียมบัฟเฟอร์ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ Internal amplification control น้ำยาฆ่าเชื้อและกระดาษทำความสะอาด

2. เชื้อมาตรฐานอ้างอิง

2.1 เชื้อมาตรฐานอ้างอิง *Salmonella* spp. ได้แก่ *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella bongori* ATCC 43975, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* ATCC 13314, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* ATCC 12325, *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 49223, *Salmonella*

enterica ser. Typhimurium ATCC 29629, *Salmonella* Paratyphi A ATCC 9150, *Salmonella* Paratyphi B ATCC 8759 และ *Salmonella* Pullorum ATCC 13036

2.2 เชื้อมาตรฐานอ้างอิง *Escherichia coli* O157:H7 ได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743

2.3 เชื้อมาตรฐานอ้างอิง *Listeria monocytogenes* ได้แก่ *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Listeria monocytogenes* DMST 17303, *Listeria monocytogenes* DMST 20093, *Listeria monocytogenes* DMST 20423 และ *Listeria monocytogenes* DMST 20425

3. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างเนื้อไก่ดิบที่ส่งตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ งานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ที่ให้ผลทดสอบไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp., จำนวน 10 ตัวอย่าง *Escherichia coli* O157:H7 จำนวน 1 ตัวอย่าง *Listeria monocytogenes* จำนวน 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อไก่ดิบที่ไม่ทราบผลวิเคราะห์ (unknown sample) จำนวน 60 ตัวอย่าง (เชื้อ *Salmonella* spp. ทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ISO6579-1 (2017) /Amd.1 : 2020 เชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ISO 16654 (2001) และเชื้อ *Listeria monocytogenes* ทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ISO11290-1)

4. วิธีการศึกษา

4.1 การพัฒนาวิธีทดสอบ

4.1.1 ชุด primer และ probe ที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ ใช้ลำดับเบสของ primer และ probe ของนักวิจัยที่ได้ออกแบบและทดสอบไว้แล้ว สำหรับการทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp. อ้างอิงตามการศึกษาของ Cheng *et al*., (2015), *Escherichia coli* O157:H7 ตามการศึกษาของ Li *et al*., (2017) และ *Listeria monocytogenes* ตามการศึกษาของ Chen *et al*., (2017) (ตารางที่ 1) เนื่องจากลำดับเบสมีความจำเพาะสูง ค่า sensitivity, specificity, inclusivity และ exclusivity เท่ากับ 100%

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primer และ probe สำหรับทดสอบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Salmonella* spp. *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes*

Microorganisms	Primer/Probe	The sequence of genetic material 5'-3'	อ้างอิง
Salmonella spp.	Sal forward primer	AACGTGTTTCCGTGCGTAAT	Cheng *et al.,* (2015)
	Sal reverse primer	TCCATCAAATTAGCGGAGGC	
	Sal probe	FAM-TGGAAGCGCTCGCATTGTGG-BHQ1	
Escherichia coli O157:H7	Z3276 forward primer	TATTCCGCGATGCTTGTTTTT	Li *et al.,* (2017)
	Z3276 reverse primer	ATTATCTCACCAGCAAACTGGCGG	
	Z3276 probe	HEX-CCCGCAAATCTTTCC-BHQ1	
Listeria monocytogenes	*L. mono* forward primer	TGCAAGTCCTAAGACGCCA	Chen *et al.,* (2017)
	L. mono reverse primer	ATCCGCGTGTTTCTTTTCGA	
	L. mono Probe	TEXRED-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-BHQ2	

4.1.2 การติดฉลากสี probe ของเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และเชื้อ *Listeria monocytogenes* เพื่อทำ Multiplex probe

probe สำหรับการศึกษาครั้งนี้ มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* โดย probe สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่ตำแหน่ง 5’ region จะถูกติดด้วยฉลากสี FAM, HEX และ TEXRED ตามลำดับ เพื่อใช้เป็น Multiplex probe สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR

4.1.3 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Multiplex direct real time PCR

ดำเนินการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Direct real-time PCR (ทดสอบแบบ single plex) ก่อน โดยแยกทั้ง 3 ชุด primer และ probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* นำมาทดสอบกับเชื้อมาตรฐานอ้างอิง *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743 และ *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 ตามลำดับ ในสภาวะ annealing temperature ที่แตกต่างกัน 6 ระดับอุณหภูมิ คือ 57, 58, 59, 60, 61 และ 62 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาตรของชุดน้ำยาทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ยี่ห้อ KAPA PROBE FORCE qPCR Master Mix (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ชุดน้ำยาทดสอบและปริมาตรสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี direct real-time PCR

Test reagent set	**Volume** (µL)
KAPA PROBE FORCE qPCR Master Mix (2X)	10
Forward primer (10 µM)	0.4
Reverse primer (10 µM)	0.4
Probe (10 µM)	0.4
Nuclease free Water	6.8
DNA Template	2
Total	20

กำหนดสภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี direct real-time PCR ได้แก่ อุณหภูมิและระยะเวลาในการทดสอบปฏิกิริยา PCR แต่ละรอบ (ตารางที่ 3) ทดสอบด้วยเครื่อง Real-time PCR แล้วประเมินสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละชุด primer และ probe ที่ให้ผลการทดสอบดีที่สุด

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี direct real-time PCR

Step	No. of cycles	Temperature	Time
Pre-denaturation	1	95ºC	10 minutes
Amplification	40	95ºC	15 Seconds
		57-62ºC	45 Seconds
Cooling	1	40ºC	30 Seconds

หลังจากนั้น ดำเนินการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Multiplex direct real time PCR (ทดสอบแบบ Multiplex) โดยใช้ primer และ probe แบบรวมทั้ง 3 ชุด ที่จำเพาะต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่พัฒนาขึ้นใหม่ ด้วยเครื่อง Real-time PCR โดยทดสอบกับเชื้อมาตรฐานอ้างอิง *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743 และ *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 ตามลำดับ โดยอาจปรับปริมาตรของชุดน้ำยาทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ให้มีความเหมาะสม และกำหนดสภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR เช่นเดียวกับสภาวะที่ใช้ทดสอบแบบ single plex (ตารางที่ 3) โดยเลือก annealing temperature ที่เหมาะสมที่สุด ตามผลที่ได้จากการทดสอบข้างต้น (ทดสอบแบบ single plex) แล้วนำมาประเมินผลทดสอบที่ได้เมื่อทำร่วมกันแบบ Multiplex direct real time PCR

4.2 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้ (Performance evaluation of detection)

4.2.1 ทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุดของวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection, LOD) โดยดำเนินการ ดังนี้

1) นำตัวอย่างเชื้อมาตรฐานอ้างอิง 3 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743 และ *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมตามวิธี มาตรฐานของแต่ละเชื้อ หาปริมาณเชื้อมาตรฐานอ้างอิงด้วยวิธี plate count หลังจากนั้น เตรียมตัวอย่างเชื้อมาตรฐานอ้างอิงทั้ง 3 ชนิด ในระดับความเข้มข้น 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0 และ 10^{-1} copies/reaction ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อดังกล่าว
2) ทดสอบเชื้อมาตรฐานอ้างอิงทั้ง 3 ชนิดในแต่ละความเข้มข้น ด้วยวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้ โดยทดสอบซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำ (replicates) บันทึกค่า Quantification cycle (Cq) ของแต่ละความเข้มข้น
3) หาค่า LOD โดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อได้จากการทดสอบซ้ำทั้ง 3 ซ้ำตามข้อ 2)
4) ทดสอบยืนยันค่า LOD โดยทดสอบซ้ำที่ระดับความเข้มข้นที่คาดว่าจะเป็นค่า LOD จำนวน 30 ซ้ำ เพื่อยืนยันว่าวิธีทดสอบสามารถตรวจพบเชื้อได้ 100% ของการทดสอบทั้งหมด

4.2.2 คำนวณหาค่า Inclusivity และ Exclusivity ของวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้

ทดสอบความสามารถของวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้ในการตรวจพบเชื้อเป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวนหลายๆ สายพันธุ์ (Inclusivity) (เชื้อเป้าหมายประกอบด้วย *Salmonella* spp. จำนวน 10 สายพันธุ์ *Escherichia coli* O157:H7 จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Listeria monocytogenes* จำนวน 5 สายพันธุ์) และทดสอบวิธีที่พัฒนาได้กับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวนหลายๆ สายพันธุ์ (Exclusivity) (เชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับทดสอบ *Salmonella* spp. จำนวน 14 สายพันธุ์ *Escherichia coli* O157:H7 จำนวน 23 สายพันธุ์ และ *Listeria monocytogenes* จำนวน 19 สายพันธุ์) โดยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อมาตรฐานอ้างอิงสายพันธุ์ต่างๆ (ภาคผนวก 1)

การทดสอบหาค่า Inclusivity เชื้อเป้าหมาย คือ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ซึ่ง probe ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละเชื้อจะถูกติดฉลากสี FAM, HEX และ TEXRED ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายคือ เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์อื่นๆ จะใช้สำหรับทดสอบหาค่า Exclusivity ตามสูตรการคำนวณ ดังนี้

Inclusivity = (จำนวนสายพันธุ์เป้าหมายที่ตรวจพบได้อย่างถูกต้อง/จำนวนสายพันธุ์เป้าหมายทั้งหมดที่ทดสอบ) × 100%

Exclusivity = (จำนวนสายพันธุ์ที่ไม่ใช่เป้าหมายที่ให้ผลลบถูกต้อง/จำนวนสายพันธุ์ที่ไม่ใช่เป้าหมายทั้งหมดที่ทดสอบ) × 100%

4.3 การทดสอบเปรียบเทียบวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้กับวิธีมาตรฐานในตัวอย่างเชื้อมาตรฐานอ้างอิง เนื้อไก่ดิบที่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง และตัวอย่างเนื้อไก่ดิบ unknown sample ที่อยู่ใน enrichment media และบ่มเชื้อตามวิธีมาตรฐาน

4.3.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อมาตรฐานอ้างอิง เริ่มเตรียมจาก Reference stock, เตรียม stock culture, working culture และ starter culture เจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (serial dilution) ตรวจสอบความเข้มข้นของเชื้อ ทดสอบยืนยันเชื้อ เก็บรักษา และเตรียมพร้อมใช้ที่อุณหภูมิ 2-8°C

4.3.2 กลุ่มตัวอย่างทดสอบ

แบ่งกลุ่มตัวอย่างทดสอบเป็น 9 กลุ่ม ประกอบด้วย

1) กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตัวอย่างเชื้อมาตรฐานอ้างอิง *Salmonella* spp. (จำนวน 10 สายพันธุ์) *Escherichia coli* O157:H7 (จำนวน 1 สายพันธุ์) และ *Listeria monocytogenes* (จำนวน 5 สายพันธุ์) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Enrichment media ตามลำดับ
2) กลุ่มที่ 4 ตัวอย่างเนื้อไก่ดิบไม่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (ตัวอย่างควบคุม)
3) กลุ่มที่ 5, 6 และ 7 ตัวอย่างเนื้อไก่ดิบที่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง *Salmonella* spp. (จำนวน 10 สายพันธุ์), *Escherichia coli* O157:H7 (จำนวน 1 สายพันธุ์) และ *Listeria monocytogenes* (จำนวน 5 สายพันธุ์) ตามลำดับ

4) กลุ่มที่ 8 ตัวอย่างเนื้อไก่ดิบที่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743 และ *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

5) กลุ่มที่ 9 ตัวอย่างเนื้อไก่ดิบ (unknown sample) 60 ตัวอย่าง

4.3.3 การทดสอบตัวอย่าง

ตัวอย่างทั้ง 9 กลุ่มตามข้อ 4.3.2 นำมาทดสอบด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้ เปรียบเทียบกับวิธีทดสอบมาตรฐานอ้างอิง โดยตัวอย่างที่เติมเชื้อ *Salmonella* spp. ทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ISO6579-1 (2017) /Amd.1 : 2020 ตัวอย่างที่เติมเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ISO 16654 (2001) ตัวอย่างที่เติมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ISO11290-1 และสำหรับตัวอย่างที่เติมเชื้อทั้ง 3 ชนิด (ตัวอย่างกลุ่มที่ 8) ทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานทั้ง 3 วิธี และตัวอย่าง unknown sample (ตัวอย่างกลุ่มที่ 9) ทดสอบทั้ง 3 วิธี เปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้กับวิธีมาตรฐานอ้างอิง

4.4 การคำนวณหาค่าความไว (Analytical sensitivity) และความจำเพาะ (Analytical specificity) ของวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้

นำผลทดสอบตัวอย่างด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR และผลทดสอบตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐานอ้างอิงในข้อ 4.3.3 มาคำนวณหาค่า sensitivity และ specificity ตามสูตรคำนวณ ดังนี้

Sensitivity, SS (True Positive Rate, TP) = [*tp* / (*tp* + *fn*)] x 100%

tp คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง

fn คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม

Specificity, SP (True Negative Rate, TN) = [*tn* / (*tn* + *fp*)] x 100%

tn คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง

fp คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการพัฒนาวิธีทดสอบ

1.1 ผลทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม

ผลทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Direct real-time PCR (ทดสอบแบบ single plex) พบว่า Annealing temperature ที่ให้ผลการทดสอบดีที่สุดของทั้ง 3 เชื้อ คือ 60 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า Cq ต่ำที่สุด (ตารางที่ 4) ดังนั้น Annealing temperature ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Direct real-time PCR คือ 60 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการศึกษาของ Emine *et al*., (2024) ที่ทดสอบเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ด้วยวิธี Real-time PCR

ตารางที่ 4 Quantification cycle (Cq) ของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Direct real-time PCR (ทดสอบแบบ single plex)

Microorganisms	Quantification cycle (Cq)					
	Annealing temperature					
	57°C	58°C	59°C	60°C	61°C	62°C
Salmonella spp.	26.53	26.60	25.73	25.00	25.62	26.36
Escherichia coli O157:H7	25.96	24.95	24.76	24.65	25.68	26.78
Listeria monocytogenes	27.28	27.04	26.51	25.59	26.38	26.11

ในส่วนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้ ได้ปรับปริมาตรของชุดน้ำยาทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ให้มีความเหมาะสม (ตารางที่ 5) และกำหนดสภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR เช่นเดียวกับสภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี direct real-time PCR ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า วิธีที่พัฒนาได้สามารถตรวจพบ DNA ของทั้ง 3 เชื้อได้ในการทดสอบครั้งเดียวกัน โดย Annealing temperature เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ให้ค่า Cq ต่ำที่สุด (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ชุดน้ำยาและปริมาตรสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR (ทดสอบแบบ Multiplex)

Test reagent set	Volume (µl)
KAPA PROBE FORCE qPCR Master Mix (2X)	10
Salmonella forward primer	0.4
Salmonella reverse primer	0.4
Salmonella probe	0.4
Z3276 forward primer (*Escherichia coli* O157:H7)	0.4
Z3276 reverse primer (*Escherichia coli* O157:H7)	0.4
Z3276 Probe (*Escherichia coli* O157:H7)	0.4
Listeria monocytogenes forward primer	0.4
Listeria monocytogenes reverse primer	0.4
Listeria monocytogenes Probe	0.4
Nuclease free Water	4.4
DNA Template	2
Total	20

ตารางที่ 6 ค่า Cq (Quantification cycle) ของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR (ทดสอบแบบ Multiplex)

Microorganisms	Quantification cycle (Cq)					
	Annealing temperature					
	57°C	58°C	59°C	60°C	61°C	62°C
Salmonella spp.	26.13	26.43	25.96	25.94	25.98	25.96
Escherichia coli O157:H7	25.27	25.35	24.68	24.65	24.70	25.18
Listeria monocytogenes	26.58	26.68	26.51	26.49	26.58	26.98

ผลการศึกษานี้ ได้ค่า Annealing temperature สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Susumu *et al*., (2005) ทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* O157:H7 ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Multiplex PCR และ Emine *et al*., (2024) ทดสอบเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ ด้วยวิธี Real-time PCR และ Motalib *et al*., (2018) Annealing temperature 55-65 องศาเซลเซียส แต่แตกต่างจากผลการศึกษาของ Kristina *et al*., (2022) ซึ่งทำการทดสอบในตัวอย่างปลาทูน่าด้วยวิธี Multiplex PCR ที่ Annealing temperature 58 องศาเซลเซียส และ Yao *et al*., (2023) ทดสอบเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 และ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างน้ำนม ด้วยวิธี Multiplex PCR ที่ Annealing temperature 57 องศาเซลเซียส อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของชุด primer ประเภทของตัวอย่างและเครื่องมือที่ใช้ ดังนั้น Annealing temperature ที่ 60 องศาเซลเซียส สำหรับวิธีทดสอบ multiplex direct real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อทั้ง 3 ชนิด เป็นจุดที่เหมาะสม สอดคล้องกับงานวิจัยส่วนใหญ่ที่แนะนำให้ใช้อุณหภูมิในช่วง 58-62°C โดยเฉพาะเมื่อต้องตรวจเชื้อหลายชนิดพร้อมกัน อย่างไรก็ตาม การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดควรทำการทดสอบและปรับให้เหมาะกับชุด primer ประเภทของตัวอย่างและเครื่องมือที่ใช้

2. ผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้ (Performance evaluation of detection)

2.1 ผลทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุดที่วิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR สามารถตรวจพบได้ (LOD)

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุดที่วิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR สามารถตรวจพบได้ (LOD) คือ ที่ระดับความเข้มข้น 10^1 cells (copies)/reaction โดยให้ค่า Cq ในการทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* เฉลี่ยที่ 35.28, 35.25 และ 35.63 ตามลำดับ (ภาคผนวก 2)

2.2 ผลทดสอบยืนยันค่า LOD ของวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่สามารถตรวจพบได้

ทดสอบยืนยันค่า LOD ที่ระดับ 10^1 copies/reaction ทดสอบซ้ำจำนวน 30 ซ้ำ พบว่า ให้ผลทดสอบตรวจพบทั้ง 30 ซ้ำ ค่า Cq ของการทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp. อยู่ระหว่าง 34.57-37.20

ค่าเฉลี่ย 35.58, *Escherichia coli* O157:H7 อยู่ระหว่าง 34.31-37.11 ค่าเฉลี่ย 35.66 และ *Listeria monocytogenes* อยู่ระหว่าง 34.43-36.99 ค่าเฉลี่ย 35.66

2.3 ผลการคำนวณหาค่า Inclusivity และ Exclusivity ของวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้

2.3.1 ผลทดสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อเป้าหมายและเชื้อไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย

เชื้อเป้าหมาย ได้แก่ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* จำนวน 10, 1 และ 5 สายพันธุ์ ตามลำดับ พบว่า ให้ผลบวกต่อเชื้อเป้าหมายทุกสายพันธุ์ และผลทดสอบกับเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมายสำหรับเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* จำนวน 14, 23 และ 19 สายพันธุ์ ตามลำดับ พบว่า ให้ผลลบต่อเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายทุกสายพันธุ์

2.3.2 ผลการคำนวณหาค่า Inclusivity และค่า Exclusivity

ค่า Inclusivity ได้เท่ากับ 100% (ตารางที่ 7) แสดงว่า วิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้ มีความน่าเชื่อถือสูงในการตรวจจับเชื้อเป้าหมายที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญสำหรับวิธีทดสอบ และค่า Exclusivity ได้เท่ากับ 100% (ตารางที่ 7) แสดงว่า วิธีทดสอบมีความจำเพาะสูง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย (cross-reactivity) ซึ่งช่วยลดผลบวกปลอม (false positive) และเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลทดสอบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Edel *et al*., (2008) Edel ที่ทดสอบเชื้อ *Salmonella* serotypes ในเนื้อไก่ และการศึกษาของ Chanokchon *et al.,* (2022) ที่ทดสอบเชื้อ Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. เนื้อดิบ

ตารางที่ 7 ค่า Inclusivity และ Exclusivity ของวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR

Microorganisms	Number of the target strain		Number of non-target strain	
	Total	True positive results	Total	True negative results
Salmonella spp.	10	10	14	14
Inclusivity	(10/10) x 100=100%			
Exclusivity			(14/14) x 100=100%	
Escherichia coli O157:H7	1	1	23	23
Inclusivity	(1/1) x 100=100%			
Exclusivity			(23/23) x 100=100%	
Listeria monocytogenes	5	5	19	19
Inclusivity	(5/5) x 100%=100%			
Exclusivity			(19/19) x 100=100%	

ผลการประเมินค่า Inclusivity และ Exclusivity จากตารางที่ 7 ยืนยันว่าวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น มีประสิทธิภาพที่ยอดเยี่ยมทั้งในด้านความครอบคลุมในการตรวจจับเชื้อเป้าหมายและความจำเพาะเจาะจงในการแยกแยะเชื้อเป้าหมาย

ออกจากเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย การที่ได้ค่า Inclusivity และ Exclusivity 100% สำหรับทั้งสามเชื้อ (*Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, และ *Listeria monocytogenes*) ชี้ให้เห็นว่าลำดับสารพันธุกรรมของ primer และ probe ที่ใช้ทดสอบและเงื่อนไขการทำปฏิกิริยาได้รับการคัดเลือกและปรับให้เหมาะสมเป็นอย่างดี ทำให้วิธีนี้มีความน่าเชื่อถือสูงสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งสามชนิดนี้ได้อย่างแม่นยำและจำเพาะ

3. ผลการทดสอบเปรียบเทียบวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้กับวิธีมาตรฐาน

ผลการทดสอบเปรียบเทียบวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้กับวิธีมาตรฐานในตัวอย่างทดสอบทั้ง 9 กลุ่ม จำนวนรวม 94 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างกลุ่มที่ 1-8 จำนวนรวม 34 ตัวอย่าง ให้ผลทดสอบสอดคล้องตรงกันทุกตัวอย่างทั้งผลบวกและผลลบ และตัวอย่างกลุ่มที่ 9 จำนวน 60 ตัวอย่าง ให้ผลทดสอบสอดคล้องตรงกันทุกตัวอย่างทั้งผลบวกและผลลบเช่นกัน โดยให้ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ตรงกันจำนวน 4 ตัวอย่าง (ค่า Cq เท่ากับ 37.74, 33.74, 33.88 และ 34.32) ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* ตรงกันจำนวน 1 ตัวอย่าง (ค่า Cq เท่ากับ 30.98) และให้ผลลบตรงกัน จำนวน 55 ตัวอย่าง (ภาคผนวก 3) แสดงให้เห็นว่าวิธี Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือและแม่นยำสูง (high reliability and accuracy) เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยค่า Cq ที่ได้จากวิธีทดสอบนี้บ่งชี้ถึงปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อเริ่มต้นในตัวอย่าง ค่า Cq ที่ต่ำแสดงถึงปริมาณเชื้อที่สูง ในทางกลับกันค่า Cq ที่สูง (เช่น ค่า Cq 37.74 ของ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างที่ให้ผลบวก) บ่งชี้ว่ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำในตัวอย่างนั้น ความสอดคล้องของผลลัพธ์ในทุกตัวอย่างบ่งชี้ว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างกลุ่มที่ 9 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดเชื้อที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ (unknown samples) ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกตรงกัน 5 ตัวอย่าง (4 ตัวอย่างสำหรับ *Salmonella* spp. และ 1 ตัวอย่างสำหรับ *Listeria monocytogenes*) และให้ผลลบตรงกัน 55 ตัวอย่าง ยิ่งแสดงถึงความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ แม้ว่าวิธีจะมีประสิทธิภาพสูง แต่เทคนิค PCR ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ไม่สามารถแยกแยะระหว่างเซลล์ที่ยังมีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วได้ เนื่องจากตรวจจับสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อโรคได้ทั้งคู่ (Zeng et al., 2016) นอกจากนี้ ความไวสูงของวิธีนี้อาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) จากการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมได้ง่าย จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการอย่างเข้มงวด (Kumar et al., 2022)

4. ผลการคำนวณหาค่าความไว (Analytical sensitivity) และความจำเพาะ (Analytical specificity) ของวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้

นำผลทดสอบตัวอย่างด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR และผลทดสอบตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐานอ้างอิงจากผลการทดสอบในข้อ 3 มาคำนวณหาค่า Sensitivity และ Specificity

จากผลการทดสอบเปรียบเทียบวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้กับวิธีมาตรฐานในตัวอย่างทดสอบทั้ง 9 กลุ่ม ตามข้อ 3 พบว่า ผลทดสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิด ให้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง คำนวณหาค่าความไวของวิธีทดสอบ (Analytical sensitivity) ได้เท่ากับ 100% และค่าความจำเพาะของวิธีทดสอบ (Analytical specificity) ได้เท่ากับ 100% (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ค่า Analytical sensitivity และ Analytical specificity ของการทดสอบเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR และวิธีมาตรฐานอ้างอิง

***Salmonella* spp.**		**Reference standard method (ISO 6579-1:2017)**		
		Positive	Negative	Total
Multiplex direct real-time PCR	Positive	25	0	25
	Negative	0	69	69
Total		25	69	94
Analytical sensitivity = 25/(25+0) x 100=100%				
Analytical specificity = 69/(69+0) x 100=100%				

***Escherichia coli* O157:H7**		**Reference standard method ISO 16654 (2001)**		
		Positive	Negative	Total
Multiplex direct real-time PCR	Positive	3	0	3
	Negative	0	91	91
Total		3	91	94
Analytical sensitivity = 3/(3+0) x 100=100%				
Analytical specificity = 91/(91+0) x 100=100%				

Listeria monocytogenes		**Reference standard method (ISO 11290-1)**		
		Positive	Negative	Total
Multiplex direct real-time PCR	Positive	12	0	12
	Negative	0	82	82
Total		12	82	94
Analytical sensitivity = 12/(12+0) x 100=100%				
Analytical specificity = 82/(82+0) x 100=100%				

ผลทดสอบของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ให้ผลตรงกันกับวิธีทดสอบมาตรฐานอ้างอิงทุกตัวอย่าง แสดงว่า วิธี Multiplex direct real-time PCR มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* พร้อมกันในครั้งเดียว

สรุปผลการทดลอง

วิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ดิบ เป็นการทดสอบแบบ Multiplex โดยรวมชุด primer และ probe ทั้ง 3 ชุด สามารถตรวจพบ DNA ของทั้ง 3 เชื้อ ได้พร้อมกันในการทดสอบเพียงครั้งเดียว โดยอุณหภูมิที่ primer จับกับสาย DNA เป้าหมาย (Annealing temperature) ที่เหมาะสมที่สุดคือ 60 องศาเซลเซียส ผลการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของวิธีทดสอบ (Performance evaluation of detection) ได้แก่ 1) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุดของวิธีทดสอบที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 10^1 copies/reaction เท่ากันทั้ง 3 เชื้อ 2) Inclusivity เท่ากับ 100% แสดงว่า วิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้ มีความน่าเชื่อถือสูงในการตรวจจับเชื้อเป้าหมายที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญสำหรับวิธีทดสอบ และ 3) Exclusivity เท่ากับ 100% แสดงว่า วิธีทดสอบมีความจำเพาะสูง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย (cross-reactivity) ซึ่งช่วยลดผลบวกปลอม (false positive) และเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลทดสอบ ผลการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างวิธีทดสอบที่พัฒนาได้กับวิธีมาตรฐานอ้างอิงพบว่า วิธีที่พัฒนาได้ให้ผลทดสอบสอดคล้องตรงกับวิธีมาตรฐานอ้างอิงทั้งผลบวกและผลลบ การเลือกใช้ primer และ probe ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายของแต่ละเชื้อ พร้อมติดสารเรืองแสงต่างชนิดกัน จึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง ทำให้สามารถแยกแยะเชื้อได้อย่างแม่นยำ และช่วยลดโอกาสเกิดผลบวกปลอมจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีปนเปื้อนอยู่ในเนื้อไก่ ค่า Analytical sensitivity และ Analytical specificity เท่ากับ 100% แสดงว่าวิธีทดสอบมีความไว สามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้ในกรณีที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่จริง โดยไม่มีผลลบปลอม (false negative) และมีความจำเพาะต่อการทดสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิด เท่านั้น ไม่มีผลบวกปลอม (false positive) ตามลำดับ ดังนั้น วิธี Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้ มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานอ้างอิง สามารถนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกในการทดสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิด ในเนื้อไก่ดิบได้ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ปีก โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการผลที่รวดเร็วหรือต้องวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก วิธีที่พัฒนาได้จะช่วยลดระยะเวลาและขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม จาก 5-7 วัน เหลือเพียง 1-2 วัน

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

แม้ว่าวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR ที่พัฒนาได้ จะมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ยังจำเป็นต้องดำเนินการทดสอบซ้ำในหลายๆ ห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory) เพื่อยืนยันว่าวิธีนี้สามารถทำซ้ำได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) เพื่อประเมินสมรรถนะของวิธีพัฒนาได้อย่างสม่ำเสมอ เปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับวิธีมาตรฐานอ้างอิง (standard reference methods) ที่ได้รับการรับรองจากองค์กรระดับชาติและนานาชาติ เช่น ISO, FDA, BAM ในปริมาณตัวอย่างที่มากขึ้น ทดสอบกับตัวอย่างจริงในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ทั้งจากฟาร์ม โรงฆ่าสัตว์ และโรงงานแปรรูป หากในอนาคตจำเป็นต้องทดสอบหลากหลายชนิดตัวอย่าง จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยรบกวน (interference studies) ต่างๆ เช่น ทดสอบผลกระทบจากสารปรุงแต่งในเนื้อไก่ เช่น สารกันเสีย เกลือ และสารปรุงรส ศึกษาการรบกวนจากเชื้ออื่นๆ

ที่พบการปนเปื้อนได้ในเนื้อไก่ (background microflora) และประเมินผลกระทบจากกระบวนการแช่เย็น แช่แข็ง หรือการแปรรูป เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาวิจัย นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ รวมถึงบุคลากรของงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Aaydha, C., Vinayaka, T.A.N., Krishna, K., Pia, E., Vivek, P., Dave, M.A.S., Anders, W., Dang, D.B., 2018. Rapid detection of *Salmonella* enterica in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. Biosensors and Bioelectronics Volume 129, 15 March 2019, Pages 224-230. [online]. Available: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566318307759?via%3Dihub. Accessed December 12, 2023.

Adeoye, J.K. and Anthony, I.O. 2022. Assessment of the molecular epidemiology and genetic multiplicity of *Listeria monocytogenes* recovered from ready-to-eat foods following the South African listeriosis outbreak. Scientific Reports volume 12, Article number: 20129 (2022). [online]. Available: https://www.nature.com/articles/s41598-022-20175-x. Accessed December 2, 2023.

Antonia R., Ana, A., Declan, B., Marianne, C., Robert, D., Pablo, S.F.E., Rosina, G., Lieve, H., and Roland, L. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA J. 2018 Jan 24;16(1):e05134. [online]. Available: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/ articles/PMC7391409/. Accessed December 5, 2023.

Artika I.M., Dewi, Y.P., Nainggolan I.M., Siregar J.E. and Antonjaya, U. 2022. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. [online]. Available: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9778061/. Accessed December 5, 2023.

Bogyo, J., Soyeon, P., Eunsuk, K., Hyunjin, Y. and Tae-Wook, H. 2022. *Salmonella* Typhimurium lacking phoBR as a live vaccine candidate against poultry infection. Vet. Microbiol. 2022 Mar:266:109342. [online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35063827/. Accessed December 5, 2023.

Chanokchon, J., Wannakarn, S., Damkerng, B., Pathima, U., Anunchai, A. and Sudsai, T. 2022. In-House Validation of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in Raw Meats. Foods 2022, 11, 1557. [online]. Available: https://www.mdpi.com/2304-8158/11/11/1557. Accessed November 15, 2023.

Chase, E.G., Michael, J.R. and Abhinav, M. 2021. Mapping foodborne pathogen contamination throughout the conventional and alternative poultry supply chains. Poult Sci. 2021 Mar 27;100(7):101157. [online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8182426/. Accessed December 5, 2023.

Chen, Y., Wang, Z., Shi, Q., Huang, S., Yu, T., Zhang, L. and Yang, H. 2021. Multiplex PCR method for simultaneous detection of five pathogenic bacteria closely related to foodborne diseases. 3 Biotech. 2021 Apr 16;11(5):219. [online]. Available: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8052391/ Accessed July 15, 2024.

Chen, J.Q., Stephanie, H., Patrick, R., Pongpan, L. and Zonglin, H. 2017. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. Food Science and Human Wellness 6(2017)39–59. [online]. Available: https://pdf.sciencedirectassets.com/283172/1-s2.0-S2213453017X00037/1-s2.0-S2213453017300125/. Accessed July 16, 2024.

Cheng C.M., Doran, T., Lin, W., Chen, K.S., Williams-Hill, D., Pamboukian, R. 2015. Interlaboratory Validation for a Real-Time PCR *Salmonella* Detection Method Using the ABI 7500 FAST Real-Time PCR System. J Food Prot. 2015 Jun;78(6):1119-24. [online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26038901/. Accessed July 17, 2024.

Christensen, H., Josef, B. and Magne, B. 2021. New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Avian Pathol. 2021 Oct;50(5):370-381. [online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ 33146543/. Accessed June 10, 2024.

Commission Regulation (EC) No 2073/2005. 2005. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 2005. European Union law Document 02005R2073-20140601. [online]. Available: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/2014-06-01. Accessed December 10, 2023.

Edel, O.R., Evonne, M., Catherine, B., Sheila, M., Thomas, B., Geraldine, D., Paul, W. and Séamus, F. 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. BMC Microbiol. 2008 Sep 21;8:156. [online]. Available: https://pmc.ncbi.nlm.nih. gov/articles/PMC2564954/. Accessed December 15, 2023.

Emine, B., Mehmet, A.O., Mustafa, O.B., Gulsah, A. and Ahmet, A. 2024. J Pure Appl Microbiol. 2024;18(4):2645-2650. [online]. Available: https://microbiologyjournal.org/rapid-detection-of-*Listeria-monocytogenes*-in-chicken-meat-by-real-time-pcr-without-culture-enrichment/ Accessed November 9, 2023.

Gabrielle, B.L., Silva, F.V.C., Marco, C.C.G., Jairo, P.O. 2023. Recent Developments in Lateral Flow Assays for *Salmonella* Detection in Food Products: A Review. Pathogens. 2023 Dec 13;12(12):1441. [online]. Available: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/ articles/PMC10747123/ Accessed January 10, 2023.

Henrik, C., Josef, B. and Magne, B. 2021. New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Avian Pathol. 2021 Oct;50(5):370-381. [online]. Available: https:// pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33146543/. Accessed December 2, 2023.

Huseyin, T., Hussein, S., Hamoud, Al-Kh., Juma, H. K., Moneerah, A., Najat, A.S. and Ebtesam, A.S. 2022. Multiplex real-time RT-PCR method for the diagnosis of SARS-CoV-2 by targeting viral N, RdRP and human RP genes. Scientific Reports (2022) 12:2853. [online]. Available: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8857243/pdf/41598_2022_Article_6977.pdf. Accessed December 12, 2023.

Kristina, N., Mariana, W. and Tjie, K. 2022. Detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in Tuna by Multiplex PCR. Journal of Aquaculture and Fish Health Vol. 11(3) - September 2022. [online]. Available: https://e-journal.unair.ac.id/JAFH/article/ view/36509. Accessed December 20, 2023.

Li, B., Liu, H. and Wang, W. 2017. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening. BMC Microbiology (2017) 17:215. [online]. Available: https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1123-2. Accessed January 12, 2024.

Mohammad, M.B. and Saydur, R. 2024. *Salmonella* in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. Journal of Hazardous Materials Advances. Volume 13, February 2024, 100407. [online]. Available: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772416624000081. Accessed December 15, 2023.

Motalib, H.M.A., Muhammad, K.U.S., Sharmin, Q.B., Mohd, R.J. and Eaqub, A. M. 2019. Development of Multiplex PCR Assay for Meat Products Authentication: Targeting Double Gene. International Journal of Science and Technology Volume 5 Issue 2, pp. 149-158. [online]. Available:https://www.researchgate.net/publication/. Accessed January 12, 2024.

Nigatu, D., Berhanu, S., Shimelis, M., Yimer, M. and Dinaol, B. 2017. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *E. coli* O157:H7 Isolated from Traditionally Marketed Raw Cow

Milk in and around Asosa Town, Western Ethiopia. Veterinary Medicine International Volume 2017, Article ID 7581531, 7 pages [online]. Available: https://onlinelibrary. wiley.com. Accessed October 2, 2023.

Parisa F., Hassan, H., Mohammad, S.S., Majid, A. and Zahra, A. 2020. Prevalence, genotyping and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in fresh beef and chicken meats marketed in Zanjan, Iran. Iran J Microbiol. 2020 Dec;12(6):537–546. [online]. Available: https://pmc.ncbi.nlm. nih.gov/articles/PMC7884267/ Accessed October 5, 2023.

Raheel S., Sabahat Z., Alma, D., Alarcon, R. and Maimoona, S. 2022. *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry: Transmission, Consequences on Human Health and Impact of Non-thermal Decontamination Technologies: A review. Agricultural Sciences Journal Vol(2022)4-(1):52-62. [online]. Available: https://asj.mnsuam.edu.pk/index.php/asj/article/ view/134. Accessed October 10, 2023.

Susumu, K., Naoko, H., Yukio, O.K.D., Kazuko, T., Takashi, S. and Shinichi, K.M. 2005. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat Samples. [online]. Available: https:// pdf.sciencedirect assets.com/ 782803/1-s2.0-S0362028X05X66005/1-s2.0-S0362028X22009590/. Accessed October 15, 2023.

Yao, L., Caijiao, W., Hui, W., Sarengaowa, Xiaoping, L., Tao, J., Yuhe, D., Xihong, Z. and Tian, Z. 2023. Preliminary Study on Rapid and Simultaneous Detection of Viable *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* by PMA-mPCR in Food. Molecules 2023, 28, 5835. [online]. Available: https://www.mdpi.com/ 1420-3049/28/15/5835. Accessed October 16, 2023.

Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F. and Li, B. 2016. Advances and Challenges in Viability Detection of Foodborne Pathogens. Front. Microbiol., 22 November 2016. [online]. Available: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.01833/full. Accessed October 16, 2023.

Zhang, J., Wang, W., Yang, M., Lin, J., Xue, F., Zhu, Y. and Yin, X. 2022. Development of a One-Step Multiplex Real-Time PCR Assay for the Detection of Viral Pathogens Associated with the Bovine Respiratory Disease Complex. Frontiers in Veterinary Science. Volume 9 Article 825257. [online]. Available: https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/ articles/10.3389/fvets.2022.825257/full. Accessed October 11, 2024.

World Health Organization (WHO). 2018. *E. coli*. [online]. Available: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/ detail/e-coli. Accessed May 06, 2025.

ภาคผนวก 1
เชื้อมาตรฐานอ้างอิงสายพันธุ์ต่างๆ
สำหรับใช้ทดสอบหาค่า Inclusivity และ Exclusivity ของวิธีทดสอบ

Reference standard microorganisms	Strain	Reference standard microorganisms	Strain
1. *Salmonella enterica* ser. Enteritidis	ATCC 13076	17. *Pseudomonas aeruginosa*	DMST4739
2. *Salmonella enterica* ser. Typhimurium	ATCC 14028	18. *Staphylococcus aureus*	PHE
3. *Salmonella bongori*	ATCC 43975	19. *Campylobacter coli*	ATCC43478
4. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*	ATCC 13314	20. *Enterococcus faecalis*	ATCC29212
5. *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*	ATCC 12325	21. *Klebsiella pneumoniae*	DMST8216
6. *Salmonella enterica* ser. Enteritidis	ATCC 49223	22. *Bacillus cereus*	DMST5040
7. *Salmonella enterica* ser. Typhimurium	ATCC 29629	23. *Proteus mirabilis*	DMST8212
8. *Salmonella* Paratyphi A	ATCC 9150	24. *Vibrio parahaemolyticus*	ATCC17802
9. *Salmonella* Paratyphi B	ATCC 8759	**เชื้อเป้าหมายสำหรับทดสอบ Inclusivity**	
10. *Salmonella* Pullorum	ATCC 13036	1. *Salmonella* spp. ลำดับที่ 1-10	
11. *Escherichia coli* O157:H7	DMST 12743	2. *Escherichia coli* O157:H7 ลำดับที่ 11	
12. *Listeria monocytogenes*	NCTC 11994	3. *Listeria monocytogenes* ลำดับที่ 12-16	
13. *Listeria monocytogenes*	DMST 17303	**เชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับทดสอบ Exclusivity**	
14. *Listeria monocytogenes*	DMST 20093	1. สำหรับ *Salmonella* spp. ลำดับที่ 11-24	
15. *Listeria monocytogenes*	DMST 20423	2. สำหรับ *Escherichia coli* O157:H7 ลำดับที่ 1-10, 12-24	
16. *Listeria monocytogenes*	DMST 20425	3. สำหรับ *Listeria monocytogenes* ลำดับที่ 1-11, 17-24	

ภาคผนวก 2

ค่า Cq และ Cq mean ของการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม ที่ระดับความเข้มข้น 10^{5}-10^{-1} copies/reaction ด้วยวิธีทดสอบ Multiplex direct real-time PCR

Number of copies/ reaction	Replicate	*Salmonella* spp.		*Escherichia coli* O157:H7		*Listeria monocytogenes*	
		Cq	Cq mean	Cq	Cq Mean	Cq	Cq Mean
10^{5}	1	21.43	21.46	22.23	22.35	22.67	22.62
	2	21.53		22.45		22.55	
	3	21.41		22.38		22.65	
10^{4}	1	24.58	24.59	25.48	25.39	25.35	25.66
	2	24.81		25.29		25.87	
	3	24.38		25.40		25.76	
10^{3}	1	27.77	27.89	28.79	28.51	28.34	28.38
	2	27.89		28.47		28.35	
	3	28.01		28.28		28.45	
10^{2}	1	30.57	31.31	32.05	32.36	30.95	31.07
	2	31.69		32.71		31.07	
	3	31.67		32.31		31.19	
10^{1}	1	34.97	**35.28**	35.30	**35.25**	35.23	**35.63**
	2	**35.59**		**35.22**		**35.57**	
	3	35.28		35.23		36.08	
10^{0}	1	34.48	-	No Cq	-	No Cq	-
	2	36.28		37.23		37.98	
	3	No Cq		No Cq		36.96	
10^{-1}	1	No Cq	-	No Cq	-	No Cq	-
	2	No Cq		No Cq		No Cq	
	3	No Cq		No Cq		No Cq	

ภาคผนวก 3

ผลทดสอบเปรียบเทียบวิธีทดสอบ Multiplex direct real time PCR ที่พัฒนาได้กับวิธีมาตรฐานอ้างอิง

Sample Test	Multiplex direct real time PCR (Cq)			ผลทดสอบวิธีมาตรฐาน		
	Salmonella spp.	*Escherichia coli* O157:H7	*Listeria monocytogenes*	*Salmonella* spp.	*Escherichia coli* O157:H7	*Listeria monocytogenes*
Enrichment media ที่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง						
S. Enteritidis ATCC 13076	18.05	-	-	Detected	ND	ND
S. Typhimurium ATCC 14028	16.45	-	-	Detected	ND	ND
S. bongori ATCC 43975	19.12	-	-	Detected	ND	ND
S. subsp. arizonae ATCC 13314	22.23	-	-	Detected	ND	ND
S. subsp. diaarizonae ATCC12325	17.83	-	-	Detected	ND	ND
S. Enteritidis ATCC 49223	15.46	-	-	Detected	ND	ND
S. Typhimurium ATCC 29629	20.87	-	-	Detected	ND	ND
S. Paratyphi A ATCC 9150	24.09	-	-	Detected	ND	ND
S. Paratyphi B ATCC 8759	29.22	-	-	Detected	ND	ND
S. Pullorum ATCC 13036	24.87	-	-	Detected	ND	ND
E. coli O157:H7 DMST 12743	-	26.34	-	ND	Detected	ND
L. monocytogenes NCTC 11994	-	-	28.23	ND	ND	Detected
L. monocytogenes DMST 17303	-	-	27.12	ND	ND	Detected
L. monocytogenes DMST 20093	-	-	30.23	ND	ND	Detected
L. monocytogenes DMST 20423	-	-	23.86	ND	ND	Detected
L. monocytogenes DMST 20425	-	-	31.15	ND	ND	Detected
เนื้อไก่ดิบไม่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (ตัวอย่างควบคุม)	-	-	-	ND	ND	ND
เนื้อไก่ดิบที่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง						
S. Enteritidis ATCC 13076	24.76	-	-	Detected	ND	ND
S. Typhimurium ATCC 14028	21.54	-	-	Detected	ND	ND
S. bongori ATCC 43975	26.54	-	-	Detected	ND	ND
S. subsp. arizonae ATCC 13314	28.32	-	-	Detected	ND	ND
S. subsp. diaarizonae ATCC12325	23.85	-	-	Detected	ND	ND
S. Enteritidis ATCC 49223	19.86	-	-	Detected	ND	ND
S. Typhimurium ATCC 29629	24.65	-	-	Detected	ND	ND
S. Paratyphi A ATCC 9150	29.4	-	-	Detected	ND	ND
S. Paratyphi B ATCC 8759	32.19	-	-	Detected	ND	ND
S. Pullorum ATCC 13036	30.43	-	-	Detected	ND	ND
E. coli O157:H7 DMST 12743	-	31.78	-	ND	Detected	ND
L. monocytogenes NCTC 11994	-	-	32.21	ND	ND	Detected
L. monocytogenes DMST 17303	-	-	31.22	ND	ND	Detected
L. monocytogenes DMST 20093	-	-	34.28	ND	ND	Detected

Sample Test	Multiplex direct real time PCR (Cq)			ผลทดสอบวิธีมาตรฐาน		
	Salmonella spp.	*Escherichia coli* O157:H7	*Listeria monocytogenes*	*Salmonella* spp.	*Escherichia coli* O157:H7	*Listeria monocytogenes*
L. monocytogenes DMST 20423	-	-	33.43	ND	ND	Detected
L. monocytogenes DMST 20425	-	-	34.51	ND	ND	Detected
ตัวอย่างเนื้อไก่ดิบที่เติมเชื้อมาตรฐานอ้างอิงทั้ง 3 ชนิด *S.* Typhimurium ATCC 14028 *E. coli* O157:H7 DMST 12743 *L.* monocytogenes NCTC 11994	22.54	32.26	33.42	Detected	Detected	Detected
เนื้อไก่ดิบ (unknown sample) จำนวน 60 Samples						
1) ตัวอย่างให้ผลบวก 5 ตัวอย่าง						
ผลบวกต่อเชื้อ *L. monocytogenes*	-	-	30.98	ND	ND	Detected
ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* spp.	37.74	-	-	Detected	ND	ND
ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* spp.	33.74	-	-	Detected	ND	ND
ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* spp.	33.88	-	-	Detected	ND	ND
ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* spp.	34.32	-	-	Detected	ND	ND
2) ตัวอย่างให้ผลลบ 55 ตัวอย่าง						
ผลลบต่อเชื้อ *Salmonella* spp., *E. coli O157:H7,* และ *L. monocytogenes*	ND	ND	ND	ND	ND	ND