อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเทียบเคียงเชื้อ *C. botulinum* จากหน่อไม้อัดปี๊บโดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE for the identification of *C. botulinum* from fermented bamboo shoots

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 20 พ.ค. 2554
เลขทะเบียน 155462 A96 c.3
เลขเรียกหนังสือ จ TP
LG1L
.B3
T1755
2553

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.รสริน ว่องวิไลรัตน์ และคณะ

เดือนธันวาคม 2553

สัญญาเลขที่ MS-AR-059/2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเทียบเคียงเชื้อ *C. botulinum* จากหน่อไม้อัดปี๊บโดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE for the identification of *C. botulinum* from fermented bamboo shoots

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. รสริน ว่องวิไลรัตน์, ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. นริศรา บุญเกิศ

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

3. อนุศักดิ์ เกิดสิน ,สุรางค์ เดชศิริเลิศ ,ลีลาวดี แสงสุก

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดินปี 2551 มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การระบุเชื้อ *Clostridium botulinum* type A, type B , type A ผสม B ในหน่อไม้อัดปี๊บโดยวิธี DGGE

หน่อไม้อัดปี๊บมีการปนเปื้อนเชื้อ *Clostridium botulinum* type A, type B , type A ผสม B สร้างสารพิษที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท เป็นสาเหตุทำให้ผู้บริโภคตาย วิธีการระบุเชื้อ *Clostridium botulinum* type A, type B , type A ผสม B แบบดั้งเดิมใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจยืนยันโดยใช้วิธีทางชีวเคมี สิ้นเปลือง ใช้เวลานาน ดังนั้นงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค DGGE ในการระบุเชื้อ *Clostridium botulinum* type A, type B , type A ผสม B DNA ถูกสกัด จากเชื้อบริสุทธิ์ และจากหน่อไม้อัดปี๊บที่มีการใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป นำไปเพิ่มปริมาณยีนส์บูทูลินัม ขนาด 160 bp. ในสภาวะที่เหมาะสม ยีนส์บูทูลินัมที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของเชื้อ *Clostridium botulinum* ในสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธี DGGE ผลการวิจัยพบว่า วิธี DGGE สามารถระบุชนิดของเชื้อ *Clostridium botulinum* type A และ type B ทั้งในสภาวะเชื้อบริสุทธิ์ และในสภาวะที่มีเชื้อแต่ละชนิดอยู่ในหน่อไม้อัดปี๊บ แต่ไม่สามารถที่จะระบุ แยกเชื้อแต่ละชนิดในสภาวะ ที่มีทั้งเชื้อ *Clostridium botulinum* type A และ type B ผสมรวมกันทั้งในสภาวะเชื้อบริสุทธิ์ และในสภาวะที่หน่อไม้อัดปี๊บมีเชื้อ *Clostridium botulinum* type A และ type B ผสมรวมกัน ดังนั้น วิธี DGGE สามารถใช้ระบุเชื้อ *Clostridium botulinum* type A และ type B ที่ปนมาในหน่อไม้ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว

Abstract

Identification of *Clostridium botulinum* type A , type B, mixed toxinotype A and B in Fermented Bamboo Shoots by DGGE

Fermented bamboo shoots probably contain *Clostridium botulinum* type A ,type B , mixed toxinotype A and B that cause human to paralyze and die . Culture dependent methods have been used to identify *C. botulinum* type A ,type B, mixed toxinotype A and B , however they are expensive and time consuming. Here, we investigate the application of DGGE for identification *C. botulinum* type A ,type B,mixed toxinotype A and B in fermented bamboo shoots.

DNA from Inoculated samples with *C. botulinum* type A , type B, mixed toxinotype A and B and pure cultures with *C. botulinum* type A ,type B, mixed toxinotype A and B were amplified with primers spanning the botulinum toxin gene under the specific conditions. PCR products (160 bp) were subjected to analyze by DGGE under the specific conditions.

Our data showed that the DGGE could be identify *C. botulinum* type A and type B in pure culture and fermented bamboo shoots and could not be identify mixed toxinotype A and B in both pure culture and fermented bamboo shoots which could be due to competition with each *C. botulinum* toxinotypes A and B . Therefore, DGGE could be reliable for the identification of each *C. botulinum* toxinotypes A and B in fermented bamboo shoots.

แบบสรุปผู้บริหาร

(Executive Summary)

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย/แผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) การเทียบเคียงเชื้อ *C. botulinum* จากหน่อไม้อัดปี๊บโดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

(ภาษาอังกฤษ) DGGE for the identification of *C. botulinum* from fermented bamboo shoots

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

[1]นาง รสริน ว่องวิไลรัตน์ Ph.D. in Microbiology รองศาตราจารย์ 9
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-261000 ต่อ 4601 โทรสาร 055-261197 มือถือ: 089-1948312
[2]นางสาวนิศรา บุญเกิด วท.ม. จุลชีววิทยา อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
มหาวิทยาลัยพะเยา จ. พะเยา 56000 โทรศัพท์ 054466666 โทรสาร 054466690
[3] นายอนุศักดิ์ เกิดสิน วท.ม. ชีวเคมี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายแบคทีเรียทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
โทรศัพท์ 9510000 ต่อ 99404, 99409, 99415 โทรสาร 5915449, 5899867
[4]นายธวัชชัย สุ่มประดิษฐ Ph.D. in Microbiology ผู้ช่วยศาตรจารย์ 7
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-261000 ต่อ 4623, 4668 โทรสาร 055-261197
e-mail: tsumpradit@yahoo.com
[5]นางสุรางค์ เดชศิริเลิศ
ฝ่ายแบคทีเรียทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
โทรศัพท์ 9510000 ต่อ 99404, 99409, 99415 โทรสาร 5915449, 5899867
[6]นางลีลาวดี แสงสุก
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อายุรศาสตร์เขตร้อน) ฝ่ายแบคทีเรียไร้อากาศ
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ถนนติวานนท์ อำเภอเมืองจังหวัดนนทบุรี 11000
โทรศัพท์ 02-5899850-8 ต่อ 99403 โทรสาร 02-5915449

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551

งบประมาณที่ได้รับ 270,000 บาท

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 มกราคม 2551 ถึง 31 ธันวาคม 2551

2. สรุปโครงการวิจัย

วิธี DGGE สกัด DNA จากหน่อไม้โดยตรง เพิ่มจำนวนยีนส์ botulinum สามารถตรวจพบ *Clostridium botulinum* type A หรือ type B ปนอยู่ในปริมาณอย่างต่ำ 10^6 cfu/g ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 2 วัน สามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรอง การปนเปื้อนของเชื้อ *Clostridium botulinum* type A หรือ type B อย่างเร็วในหน่อไม้อัดปี๊บ

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อตรวจเชื้อ *Clostridium botulinum* type A และ type B ในหน่อไม้อัดปี๊บโดยวิธี DGGE

ระเบียบวิธีวิจัย

สกัด DNA จากเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B หาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกริยา PCR โดยการเพิ่มจำนวนยีนส์ที่จำเพาะ botulinum โดยใช้ forward primer และ reverse primer P260 และ Pr265* ใช้ PCR product ในการทำ **PCR-DGGE** โดยหา ความเข้มข้นของ denaturant ในช่วง gradient ที่เหมาะ สมในการระบุยีน **botulinum(BoNT)** จาก *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B พร้อมทั้ง สกัด DNA จากเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ที่ใส่ในหน่อไม้ อัดปี๊บที่ มีปริมาณเชื้อ 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 cfu/ml หาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกริยา PCR โดยการเพิ่มจำนวนยีนส์ที่จำเพาะ botulinum โดยใช้ forward primer และ reverse primer P260 และ Pr265* ใช้ PCR product ในการทำ **PCR-DGGE** โดยใช้ความเข้มข้นของ denaturant ในช่วง gradient ที่เหมาะ ในการระบุยีน **botulinum(BoNT)**จาก *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B

ผลการวิจัย

ได้ DNA เชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B โดยได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ PCR reaction mix ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 1 uM primer each และ 0.04U Taq DNA polymerase และ DNA template 2-5 µl. ทำการ amplification ด้วยโปรแกรม pre-denaturation 95^{0}C 3นาที, 45 รอบ ของ denaturation 95^{0}C 1 นาที annealing 45^{0}C 40 วินาที extension 72^{0}C 5 นาที และ final extension 72^{0}C 5 นาที ได้ผล PCR product ขนาด 150 bp ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B PCR-DGGE ของยีน botulinum(BoNT)จาก *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B

จากการทดลองใช้ความเข้มข้นของ denaturant ในแต่ละช่วง gradient ได้แก่ 40-60%, 45-60%, 45-65%, 50-65%, และ 50-70% พบว่าที่ความเข้มข้นของ denaturant ในช่วง gradient 40-60%,45-60%, 45-65%, 50-65%, และ 50-70% สามารถแยกความแตกต่างของ toxinotype B ออกจาก A และที่ช่วง gradient 45-65% มีความเหมาะสมที่สุดในการแยกความแตกต่างดังกล่าว คือ ความแตกต่างของ toxinotype B ออกจาก A เนื่องจากหน่อไม้อัดปี๊บมีการปนเปื้อนเชื้อเดียว ดังนั้น PCR product จึงเป็นของ toxinotype เดียว ความแตกต่างทาง genotype ของเชื้อทั้ง 2 toxinotye จะให้ค่า T_m ที่แตกต่างกัน จึง สามารถหยุดการเคลื่อนที่ที่จุดที่มีความเข้มข้นที่ต่างกันบนเจล DGGE อย่างไรก็ตามวิธี PCR-DGGE นี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง toxinotype A ผสม B ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อมี 2 toxinotypes ปนกันสภาพของ PCR product จะมี homoduplex ของทั้งสอง toxinotype ถ้าทั้งสอง toxinotype มีการต่างของเบสคู่สม จาก A-T เป็น T-A หรือ G-C เป็น C-G จะทำให้ค่า T_m แตกต่างกันน้อยมาก ณ T_m ที่แยกได้จากหน่อไม้อัดปี๊บที่มีเชื้อ toxinotype เดียว จะไม่สามารถแยกได้ในเชื้อสอง toxinotypeที่มีความใกล้เคียงกัน ปนกันได้

ได้ DNA เชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในหน่อไม้อัดปี๊บที่ มีปริมาณเชื้อ 10^8 , 10^7, 10^6, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml

DNA เชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในหน่อไม้อัดปี๊บที่ มีปริมาณเชื้อ 10^8 , 10^7, 10^6, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml

ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ PCR reaction mix ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 1 uM primer each และ 0.04U Taq DNA polymerase และ DNA template 2-5 µl. ทำการ amplification ด้วยโปรแกรม pre-denaturation 95^0C 3นาที, 45 รอบ ของ denaturation 95^0C 1 นาที annealing 45^0C 40 วินาที extension 72^0C 5 นาที และ final extension 72^0C 5 นาที

ได้ผล PCR product ขนาด 150 bp ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B

นำ PCR products ที่ได้จากหน่อไม้อัดปี๊บ ที่ มีปริมาณเชื้อ 10^8 , 10^7, 10^6, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml มาทำ PCR-DGGE พบว่า PCR-DGGE สามารถแยกความแตกต่างของ toxinotype B ออกจาก A และที่ช่วง gradient 45-65% มีความเหมาะสมที่สุดในการแยกความแตกต่างดังกล่าว อย่างไรก็ตามวิธี PCR-DGGE นี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง toxinotype A ผสม B ได้ ทั้งอาจเป็นเพราะเมื่อมี 2 toxinotypes ปนกันสภาพของ PCR product จะมี homoduplex ของทั้งสอง toxinotype ถ้าทั้งสอง toxinotype มีการต่างของเบสคู่สม จาก A-T เป็น T-A หรือ G-C เป็น C-G จะทำให้ค่า T_m แตกต่างกันน้อยมาก ณ T_m ที่แยกได้จากหน่อไม้อัดปี๊บที่มีเชื้อ toxinotype เดียว จะไม่สามารถแยกได้ในเชื้อสอง toxinotypeที่มีความใกล้เคียงกัน ปนกันได้ และสามารถตรวจพบเชื้อ *C. botulinum* type A, B และ *C. botulinum* A ผสม B ที่ปลูกเชื้อลงในหน่อไม้ดอง ได้ในความเข้มข้น 10^8 CFU/ml เท่านั้น ซึ่งเท่ากับปริมาณเซลล์ 4 x10^6 cfu/ml

ข้อเสนอแนะงานวิจัย

เป้าหมายของผลผลิต (Output) และตัวชี้วัด

ผลผลิต	ตัวชี้วัด	
	คุณภาพ	ปริมาณ
วิธี DGGE สามารถใช้ในการระบุเชื้อ *C.botulinum* type A หรือ type B โดยตรงในหน่อไม้อัดปี๊บ	สามารถระบุเชื้อแบคทีเรีย*C.botulinum* type A หรือ type B โดยตรงในหน่อไม้อัดปี๊บใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ใช้เวลาที่รวดเร็ว 2 วันมีความไวต่ำ 10^6cfu/g	สามารถตรวจตัวอย่างระบุเชื้อแบคทีเรีย *C.botulinum* type A หรือ type B ในหน่อไม้อัดปี๊บ ตัวอย่างละ 6 ชั่วโมง ทำครั้งละ 22 ตัวอย่าง

2. **เป้าหมายของผลลัพธ์ (Outcome) และตัวชี้วัด**

ผลลัพธ์	ตัวชี้วัด	
	คุณภาพ	ปริมาณ
การใช้บริการของโรงงานหน่อไม้อัดปี๊บและให้บริการการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการ ตรวจสอบอย่างไวเพื่อระบุเชื้อ *C.botulinum* type A หรือ type B โดยตรงในหน่อไม้อัดปี๊บ	เจ้าของโรงงานหน่อไม้อัดปี๊บเห็นและตระหนักถึงความรวดเร็ว ระบุเชื้อ *C.botulinum* type A หรือ type B โดยตรงในหน่อไม้อัดปี๊บทำให้เลือกใช้บริการการตรวจสอบผ่านรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร	การให้บริการการตรวจสอบเชื้อ เพื่อระบุเชื้อ *C.botulinum* type A หรือ type B โดยตรงในหน่อไม้อัดปี๊บโดยวิธี DGGE เพิ่มขึ้น

และการย้อมสี (Hielm *et. al.*,1996) การตรวจวิธีนี้ให้ผลเฉพาะเจาะจง ใช้เวลาการตรวจประมาณ 3-7 วัน ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อ *C. botulinum* ในอาหารเพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ในการตรวจพบเชื้อ อย่างไรก็ตามการเฝ้าระวังการผลิตโดยวิธีนี้ ถึงแม้ว่าจะใช้เวลาสั้นแต่ค่าใช้จ่ายสูง จึงยังไม่เหมาะสมในการเฝ้าระวังในการผลิต และยังไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ในเบื้องต้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดหาวิธีที่เหมาะสม เป็นการคัดกรอง ในการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์หน่อไม้อัดปี๊บในเบื้องต้น เพื่อการเฝ้าระวังในการผลิต ใช้เวลาเร็ว เสียค่าใช้จ่ายต่ำ และตรวจติดเชื้อได้ในสายพันธุ์ชนิด A, B เป็นการกระตุ้นให้ผู้ผลิตส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ส่งตรวจ โดยอาศัยหลักการที่ว่า เชื้อ *C. botulinum* ทุกสายพันธ์ A,B จะมีความต่างกันของยีนส์ botulinum gene และจะใช้วิธี DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) ในการแยกเชื้อ*C. botulinum* สายพันธุ์ A,Bและแยกเชื้อ *C. botulinum* สายพันธุ์ A ผสม B ในหน่อไม้อัดปี๊บ หลักการของ DGGE ในการแยกยีนส์ botulinum gene ของแบคทีเรีย*C. botulinum*สายพันธุ์ A,B ออกจากกัน โดยใช้หลักการสลายตัวของ DNA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติการสลายตัว (melting behavior) โดยมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน ทำให้หยุดการเคลื่อนที่ในตำแหน่งที่มีความเข้มข้นของสารสลายตัว (% denaturant) ที่ต่างกันบนเจล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอใช้วิธี DGGE ในการระบุเชื้อ *C. botulinum*สายพันธุ์ A,Bในหน่อไม้อัดปี๊บ เพื่อประโยชน์ต่อผู้ประกอบการผลิตหน่อไม้อัดปี๊บ และผู้บริโภค มีการประกันความเสี่ยงว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *C. botulinum*สายพันธุ์ A,B เป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้มีความปลอดภัยในชีวิต ตรงกับยุทธศาสตร์เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศ การพัฒนาสินค้าและบริการ ความสามารถในการสร้างนวัตกรรม การสร้างสังคมผู้ประกอบการ ยุทธศาสตร์การพัฒนาทุนทางสังคม แก้ไขปัญหาความยากจน ยกระดับคุณภาพชีวิต ศักยภาพและโอกาสของคนจน ระบบคุ้มครองทางสังคม การสาธารณสุขและการประกันคุณภาพ ความปลอดภัยในชีวิต โดยเฉพาะถือเป็นการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการระบุเชื้อ*C.. botulinum*สายพันธุ์ A,B

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. หาวิธีการที่เหมาะสมสกัด DNA เชื้อ *C. botulinum* สายพันธุ์ A *C. boltulinum*สายพันธุ์ B และ *C. botulinum* สายพันธุ์ A ผสม B
2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน ยีนส์ botulinum ที่จำเพาะต่อเชื้อ สายพันธุ์ A *C.botulinum*สายพันธุ์ B และ *C. botulinum* สายพันธุ์ A ผสม B ในเชื้อบริสุทธิ์
3. หาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ DGGEในการระบุ เพื่อแยก ยีนส์ botulinum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. botulinum* สายพันธุ์ A *C. botulinum*สายพันธุ์ B และ *C. botulinum* สายพันธุ์ A ผสม B ในเชื้อบริสุทธิ์
4. หาวิธีการที่เหมาะสมสกัด DNA จากหน่อไม้อัดปี๊บที่มีการใส่เชื้อ เชื้อ *C. botulinum* สายพันธุ์ A *C. botulinum*สายพันธุ์ B และ *C. botulinum* สายพันธุ์ A ผสม B โดยหน่อไม้อัดปี๊บที่นำมาทดสอบจะต้องไม่มีเชื้อ *C. botulinum*

5. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน ยีนส์ botulinum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. botulinum* สายพันธุ์ A *C. botulinum*สายพันธุ์ B และ *C. botulinum* สายพันธุ์ A ผสม B ในหน่อไม้อัดปี๊บ

6. หาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ DGGEในการระบุ เพื่อแยกยีนส์ botulinum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. botulinum* สายพันธุ์ A *C. botulinum*สายพันธุ์ B และ *C. botulinum* สายพันธุ์ A ผสม B ในหน่อไม้อัดปี๊บ

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

หน่อไม้อัดปี๊บ และวิธีการผลิตหน่อไม้อัดปี๊บที่ได้มาตรฐาน

หน่อไม้อัดปี๊บเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้หน่อไม้ไผ่ตง ไผ่รวก เป็นต้น นำมาปอกเปลือกแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือด เพื่อขจัดความขมในหน่อไม้ หน่อไม้แต่ละชนิดจะใช้เวลาขจัดความขมที่แตกต่างกันประมาณ 40-120 นาที หลังจากต้มแล้วต้องนำมาแช่น้ำเย็นทันทีทั้งนี้เป็นการขจัดสารความขมที่สลายตัวที่มักจะจับกันเป็นสารสีเหลืองลอยอยู่ที่ผิว นอกจากนี้ยังเป็นการลดปริมาณสาร lysine และ tyrosine เป็นสารฝ้าขาวเกาะอยู่ตามหน่อ การแช่น้ำเย็นควรใช้เวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำหน่อไม้มาตัดแต่ง และคัดขนาด แล้วมาบรรจุในปี๊บในขนาดที่ตั้งไว้มาตรฐานประมาณร้อยละ 55-60 ของน้ำหนักสุทธิ เติมน้ำร้อนซึ่งอาจมีเกลือหรือกรดซิตริกที่มีความเข้มข้น 0.65 % วัดความเป็นกรดน้อยกว่า 4.6 นำไปไล่อากาศโดยนำไปใส่ภาชนะที่มีน้ำต้มเดือด นานไม่น้อยกว่า 10 นาที เพื่อให้ความร้อนกระจายทั่วถึงจะทำให้สามารถทำลายแบคทีเรียได้ ห้ามนำปี๊บไปตั้งบนเตาไฟที่สัมผัสกับเปลวไฟโดยตรงเพราะความร้อนจะกระจายไม่ทั่วปี๊บ การทำลายเชื้อแบคทีเรียจะไม่มีประสิทธิภาพ แล้วนำมาปิดฝาทันที การทำโดยวิธีที่ถูกต้องสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Clostridium botulinum* ที่เจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้ในสภาวะไร้อากาศ (ณรงค์,2531; มยุราและสุนันท์,2549)

ผู้ผลิตจะสามารถผลิตหน่อไม้อัดปี๊บให้มีคุณภาพตามมาตรฐาน จึงต้องอาศัยหลักเกณฑ์สำหรับพืชทั่วไปตามขั้นตอนการผลิตเกษตรดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice, GAP) ซึ่งเป็นแนวทางในการทำการเกษตรเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีตรงตามมาตรฐานที่กำหนด ผลผลิตสูงคุ้มค่าต่อการลงทุน นอกจากนี้ ขบวนการผลิตจะต้องปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค มีการใช้ทรัพยากรที่เกิดประโยชน์สูงสุดเกิดความยั่งยืนทางการเกษตร และไม่ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ตามคู่มือของกรมวิชาการเกษตรได้จัดทำขึ้น (สมพร, 2542; Schweiggert *et..al.*, 2007)

สรุปได้ว่า การลดการปนเปื้อนสารพิษและจุลินทรีย์เพื่อให้หน่อไม้อัดปี๊บมีคุณภาพตามมาตรฐาน ต้องเริ่มตั้งแต่การควบคุมกระบวนการเพาะปลูก การป้องกันหน่อไม้จากแหล่งที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อน และควรเริ่มต้นทันทีเมื่อหน่อไม้เข้าสู่กระบวนการผลิต กระบวนการผลิตขั้นต้นที่ดีจึงขึ้นกับวิธีการทำความสะอาดหน่อไม้ที่เหมาะสม เพื่อลดการปนเปื้อนที่ผิวให้ได้มากที่สุด รวมถึง การตรวจสอบหน่อไม้ การปลอกเปลือก การคัดเลือกเอาส่วนเสียออก จนกระทั่งการเปลี่ยน

ถ่ายภาชนะบรรจุหน่อไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการขนส่ง ลงสู่ภาชนะบรรจุที่สะอาด นอกจากนี้ ยังต้องควบคุมในเรื่องของความสะอาดในระหว่างกระบวน ทำหน่อไม้อัดปี๊บ การขนส่ง รวมไปถึงร้านค้าที่จำหน่าย เพื่อให้หน่อไม้อัดปี๊บยังคงคุณภาพและความปลอดภัยสำหรับการบริโภคและอุปโภค (Burnett and Beuchat, 2001)

การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในหน่อไม้อัดปี๊บ

นอกจากหน่อไม้อัดปี๊บจะมีการปนเปื้อนของสารพิษ อันเนื่องมาจาก การใช้ยาฆ่าแมลง ยากำจัดวัชพืช หรือสารเคมีต่างๆ แล้วยังมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ที่เกิดจากขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์หน่อไม้ที่ไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้น หากมีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเริ่มต้นในหน่อไม้มีจำนวนมาก ก็จะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์หน่อไม้สุดท้ายที่นำไปจำหน่ายมีคุณภาพที่ด้อยลง และมีอายุการเก็บที่สั้นกว่าปกติ (Donia, 2008 ; Schweiggert *et.al.*, 2007)

จุลินทรีย์ที่พบได้ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.,*Gibberella* sp. เป็นต้น (Morakotkarn *et.al.*,2006) เชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) เหล่านี้ นอกจากนี้ยังมีเชื้อยีสต์ พวก *Saccharomyces* sp. *Canida* sp.(Maneesri and Masniyom,2007)สามารถปนเปื้อนได้ตั้งแต่ขั้นตอนการขุดหน่อไม้ และโดยเฉพาะขั้นตอนการเก็บรักษา ซึ่งการปนเปื้อนเกิดจากการมีเชื้อราลอยอยู่ในอากาศ หรือเกาะอยู่กับฝาผนังในบริเวณที่ใช้ในการผลิต โดยเฉพาะห้องที่ใช้เก็บ (storage room) หากภายในห้องเก็บมีความชื้น จะส่งเสริมให้เชื้อราเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นมาเกิดการสร้างสารพิษเพิ่มมากขึ้น สารพิษที่สร้างจากเชื้อรามีหลายชนิดที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ได้แก่ สารพิษแอฟลาทอกซิน (aflatoxin) จัดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ตับ สารที่ก่อให้เกิดความบกพร่องของทารกในครรภ์ (teratogen) และยังมีผลต่อการกดระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานบกพร่องอีกด้วย สารพิษฟูโมนิซิน (fumonisins) ก่อโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ได้แก่ ปวดท้องและท้องร่วง และจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (Aziz *et. al.*, 1998, Donia, 2008; Zinedine and Mañes, 2009,) ส่วนการปนเปื้อนแบคทีเรียในหน่อไม้เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะปลูกหน่อไม้จนถึงขั้นตอนการแปรรูปที่มีการใช้กรรมวิธีต่างๆ โดยมักพบแบคทีเรียที่มาจากดิน น้ำและปุ๋ยในขั้นตอนการเพาะปลูกเป็นหลัก เช่น แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform), *Bacillus* spp., *Lactobaciilus* sp. *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. และยังสามารถพบ *Staphylococcus aureus* ในหน่อไม้ ที่เกิดจากผู้ปฏิบัติงานไม่มีสุขอนามัยที่ถูกต้อง ทำให้มีการปนเปื้อนเชื้อจากตัวผู้ปฏิบัติงานสู่หน่อไม้ นอกจากนี้ แบคทีเรียเหล่านี้ยังสามารถปนเปื้อนในเครื่องมือ และภาชนะที่ไม่ทำความสะอาดให้ถูกวิธี ทำให้เพิ่มจำนวนการปนเปื้อนแบคทีเรียในหน่อไม้มากขึ้น แบคทีเรียก่อโรคที่ตรวจพบได้บ่อยที่สุดในหน่อไม้คือ *Bacillus* spp., *Lactobaciilus* sp. *Clostridium* spp. *Saccharomyces* sp. *Canida* sp. นอกจากจะทำให้เกิดการสูญเสียสารสำคัญในหน่อไม้ได้ง่ายทำให้ผู้บริโภคไม่ได้รับประโยชน์แล้ว ยังมีอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทั้งในระยะสั้นและระยะยาวด้วย (Aguilera *et al.*, 2005,; Aksu *et.al.*, 2000; Banerjee and Sarkar 2003)

เมื่อนำหน่อไม้มาผ่านกระบวนการผลิตหน่อไม้อัดปี๊บ ซึ่งส่วนใหญ่ผู้ผลิตยังผลิตผลิตภัณฑ์หน่อไม้อัดปี๊บที่ยังไม่ผ่านมาตรฐาน ดังนั้นสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม จึงได้กำหนดมาตรฐานหน่อไม้ในภาชนะบรรจุ (มอก. 920/2533) เป็นเกณฑ์มาตรฐานเพื่อประโยชน์ในการค้าระหว่างประเทศ ได้กำหนดเกณฑ์หน่อไม้ในภาชนะบรรจุดังนี้

ตารางแสดงเกณฑ์มาตรฐานหน่อไม้ในภาชนะบรรจุ

1. ขอบข่าย/นิยาม	มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ไม่ครอบครุมถึงหน่อไม้เปรี้ยว เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากหน่อของต้นไผ่ที่บริโภคได้ เช่นไผ่ตง ผาบง ไผ่รวก ที่ตัดแต่งแล้ว อาจมีวัตถุเจือปนอาหารรวมอยู่ในภาชนะบรรจุ ผ่านกระบวนการใช้ความร้อนเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
2. ภาชนะบรรจุ	กระป๋อง ปี๊บ ขวดแก้ว หรือภาชนะบรรจุอื่นที่สามารถปิดสนิทกันอากาศผ่านเข้าออกได้
3. แบบ	แบ่งตามลักษณะชิ้นของหน่อไม้ได้เป็น 8 แบบ คือ แบบหน่อ แบบครึ่งหน่อ แบบยอด แบบเนื้อ แบบแผ่นบาง แบบลูกเต๋า แบบเส้น แบบชิ้นคละ
4. ลักษณะทั่วไป	หน่อไม้ในภาชนะบรรจุเดียวกัน ต้องเป็นหน่อไม้จากต้นไผ่ชนิดเดียวกันและมีแบบที่บรรจุไว้ในฉลากเป็นหน่อไม้อ่อน ไม่มีเส้นใยแข็ง ไม่เปื่อยยุ่ยมีสีเหลืองอ่อนหรือสีเหลืองตามธรรมชาติ มีกลิ่นรสเฉพาะหน่อไม้ที่ผ่านกรรมวิธีและปราศจากกลิ่นรสอื่นที่พึงประสงค์ เช่นกลิ่นหมักรสเปรี้ยวที่ไม่ได้เกิดจากกระบวนการทำ สารที่ใช้บรรจุต้องใสปราศจากตะกอน
5. สิ่งแปลกปลอม	ต้องปราศจากสิ่งแปลกปลอม
6. ความเป็นกรด ด่าง	ต้องไม่ต่ำกว่า 4.0
7.วัตถุเจือปนอาหาร	ให้ใช้สารปรับความเป็นกรด ด่าง ได้ในปริมาณที่เหมาะสมตามกรรมวิธีการทำที่ถูกต้อง สารปรับความเป็นกรด ด่าง ได้แก่ กรดซิตริก กรดแอซิตริก กรดมาริก กรดทาทาริก กรดฟูมาริก กรดแลกติก

8. สารปนเปื้อน	ดีบุก (เฉพาะกรณีที่ภาชนะบรรจุเป็นกระป๋องโลหะเคลือบดีบุก) ไม่เกิน 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตะกั่ว (เฉพาะกรณีที่ภาชนะบรรจุทำด้วยโลหะ) ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
9. คุณลักษณะทางจุลชีววิทยา	เมื่อทดสอบด้วยการอบ (incubation test) ภาชนะบรรจุต้องไม่บวมหรือมีลักษณะอื่นที่แสดงว่ามีก๊าซเกิดขึ้นภายใน สี กลิ่นและลักษณะหน่อไม้ในภาชนะบรรจุนั้นต้องไม่มีลักษณะผิดปกติ ต้องไม่มีจุลินทรีย์แฟลตซาวร์ (flat sour) ชนิดเทอร์โมฟีลิก และชนิดมีโซฟีลิก และเทอร์โมฟีลิกแอนแอโรป(thermophilic anaerobe)

ที่มา : นรัศรา เต็มกุศลวงศ์ ,2533

จากตารางแสดงข้อกำหนดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในหน่อไม้อัดปี๊บสำหรับรับประทาน จะพบว่า การตรวจทางห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้วิธีการเพาะแยกเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) แบคทีเรียเหล่านี้เป็นเชื้อที่เลี้ยงง่าย เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องอาศัยวัสดุอุปกรณ์ หรือเครื่องมือที่พิเศษ ดังนั้น การใช้เทคนิคการเพาะแยกเชื้อในการตรวจจึงมักไม่ค่อยพบปัญหาการตรวจในห้องปฏิบัติการ ยกเว้น เชื้อในกลุ่มที่เจริญได้ดีเฉพาะสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) ได้แก่ *C. botulinum* ซึ่งต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเพาะกับแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ที่สูงกว่าการตรวจแบคทีเรียกลุ่มอื่น และต้องใช้อาหารที่จำเพาะในการเลี้ยง เพื่อให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีและรวดเร็ว รวมถึงระยะเวลาในการทดสอบที่ต้องอาศัยการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อให้สามารถระบุสปีชีส์ได้นั้นต้องใช้ระยะเวลานานเป็นอาทิตย์ นอกจากนี้ ยังมีการรายงานผลที่ผิดพลาดในการตรวจวิเคราะห์ *C. botolinum* ในตัวอย่างหน่อไม้โดยใช้วิธีเพาะแยกเชื้อ ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ *C.botulinum* ออกมามากมายที่ใช้ระยะเวลาสั้น และมีความแม่นยำ มากกว่าวิธีเพาะแยกเชื้อที่อาศัยการระบุสปีชีส์โดยการทดสอบทางชีวเคมี (มยุรา กุสุมภ์ และ สุนันท์ จำรูญ, 2549)

คุณลักษณะพื้นฐานบางประการของ *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ (gram-positive, strictly anaerobic rod bacteria) สร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน (heat-resistant, endospore-forming) ชนิด terminal (รูปวงรีบริเวณส่วนปลาย) หรือ subterminal (ใกล้กับปลายใดปลายหนึ่ง) หรือมีรูปร่างคล้ายกระบอง เคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella และในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง(pH) สูงกว่า 4.6 สปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* เมื่องอกและเจริญเป็นตัวเซลล์ (vegetative cell) เซลล์จะแบ่งตัวไปเรื่อยๆ ขณะแบ่งเซลล์จะสร้างสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาทอย่างรุนแรง (neurotoxin) สารพิษนี้ไม่ทนต่อความร้อน (heat-labile toxins) ความเป็นพิษรุนแรงที่สุดเท่าที่พบในปัจจุบัน โดยประมาณว่าขนาดของสารพิษที่ได้รับเพียง 0.001 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเพียงพอที่จะก่อให้เกิดอันตราย ความรุนแรงของสารพิษทำให้ผู้ป่วยอาจตายภายใน 1 วัน หลังจากมีอาการทางระบบประสาทเนื่องจากการหายล้มเหลว (Bossi *et.al.*,2004) หลักการจัดจำแนกสายพันธุ์ *C.botulinum* สร้างสารพิษเรียกว่า botulinal toxins จำแนกได้เป็น 7 ชนิด ตามความจำเพาะทาง serotype คือ ชนิด A, B, C, D, E, F และ G โดย A, B, E, F และ G ก่อให้เกิดโรคในคน *C. butyricum* สามารถผลิต type E botulinum toxin *C. baratii* สามารถผลิต type F botulinum toxin มีเฉพาะ *C. botulinum* เท่านั้นที่ผลิต botulinum toxin type A, B (Franciosa,2004) ซึ่งชนิด G ยังไม่เคยมีรายงานการเกิดโรค สำหรับชนิด C และ D ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ (Face *et. al.*,1995) *C.botulinum* type A,B,F ผลิต botulinal toxin ยีนส์ควบคุมการผลิตอยู่บน โครโมโซม *C.botulinum* type C,D,E ยีนส์ควบคุมการผลิตอยู่บนแบคเทอร์ลีโอฟาลก์ *C.botulinum* type G ยีนส์ควบคุมการผลิตอยู่บนพลาสมิด (Caya *et.al.*,2004) นอกจากนี้สารพิษยังอาจแบ่งเป็น 2 ประเภท คือประเภทที่ย่อยโปรตีน (proteolytic type) ได้แก่ทุกสายพันธุ์ของชนิด A, G และบางสายพันธุ์ของชนิด B และ F ประเภทที่ไม่ย่อยโปรตีน (non-proteolytic type) ได้แก่ ทุกสายพันธุ์ของชนิด E และบางสายพันธุ์ของชนิด B และ F(มยุรา กุสุมภ์ และ สุนันท์ จำรูญ, 2549; Mclauchlin *et.al.*,2006)

ถ้าจะแบ่ง *C. botulinum* เป็นกลุ่ม ตามลักษณะทางฟีโนทัยป์ (phenotypic group) แบ่งเป็น 4 กลุ่ม (group) ได้แก่ phenotypic group (I-IV) ตามคุณลักษณะทางชีวเคมี group I เป็นประเภทที่ย่อยโปรตีน สร้างสารพิษชนิด A,B,F group II เป็นประเภทที่ไม่ย่อยสลายโปรตีน สร้างสารพิษชนิด B,E,F group III เป็นประเภทที่ย่อยสลายโปรตีนและไม่ย่อยสลายโปรตีน สร้างสารพิษชนิด C,D group IV เป็นกลุ่มที่ย่อยสลายโปรตีน แต่ให้ lipase – สร้างสารพิษชนิด G ปัจจุบันได้ จัดจำแนกและระบุเชื้อใหม่ เป็น *C. argentinense* (Nevas,2006)

ตาราง คุณลักษณะเชื้อ *C. botulinum* groups I-IV

คุณลักษณะ	Group			
	I	II	III	IV
Neurotoxin type	A,B,F	B,E,F	C,D	G
Optimal growth Temperature	35-40°C	18-25°C	40°C	37°C
Proteolysis	+	-	-/+	+
Lipase production	+	+	+	-
Spore heat Resistant	1.23/112°C[a]	0.6-1.25/80°C[a]	0.1-0.9/104°C[a]	0.8-1.12/104°C[a]

a= D-value

(Nevas,2006)

การเกิดโรค Botulism

Botulism มาจากภาษาละตินว่า sausage poisoning เป็นโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษซึ่งสร้างโดย *C. botulinum* มี 3 ชนิด ได้แก่ Foodborne botulism เกิดจากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของ botulinal toxins ซึ่งสร้างจาก *C. botulinum* ชนิด A, B, C, D, E, F และ G Wound botulism เกิดจากการได้รับสปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* ชนิด A, B หรือ F ทางบาดแผลและเชื้อสร้าง toxin บริเวณบาดแผลนั้น ซึ่งอาจตรวจพบเชื้อ *C. botulinum* ได้จากบาดแผล หากตรวจซีรัมจะพบเฉพาะสารพิษของเชื้อแต่ตรวจไม่พบเชื้อ *C. botulinum* Infant and intestinal botulinum เกิดในกรณีที่เด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี ได้รับ *C. botulinum* ชนิด E ที่ปนเปื้อนในอาหาร มีรายงานการพบสปอร์ของ *C. botulinum* ในน้ำผึ้ง ซึ่งเชื้อสามารถเจริญและสร้างสารพิษในลำไส้ของเด็กทารกได้ อาจตรวจพบเชื้อและสารพิษได้จากอุจจาระ นอกจากนี้มีการใช้ botulinal toxins เป็นอาวุธสงครามโดยปล่อยให้แพร่กระจายไปกับอากาศในรูปของละออง ทำให้เกิดโรคโดยการสูดดมสารพิษเข้าไป (aerosol or inhalationalbotulism) (Caya,2004;Bossi *et.al.*,2004))

ระยะฟักตัวและอาการของโรค

ระยะฟักตัว (incubation period) 2 ชั่วโมง ถึง 8 วัน แต่บางรายอาจนานถึง 14 วัน ส่วนใหญ่ 12-36 ชั่วโมง อาการที่เกิดได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน บางครั้งท้องเสีย อ่อนเพลีย หน้ามืด ตาลาย ปวดศีรษะ ภายหลังมีอาการท้องผูก เห็นภาพซ้อน หนังตาตก อ้าปากและพูดลำบาก ผู้ป่วยอาจกระหายน้ำ คอและลิ้นแข็ง ไม่มีไข้หรือมีไข้เพียงเล็กน้อย กล้ามเนื้อนอกอำนาจจิตใจเริ่มเป็นอัมพาต และขยายไปถึงระบบทางเดินหายใจและหัวใจ และตายเนื่องจากหายใจไม่ได้ การรักษาที่ดีที่สุดคือใช้ antitoxin (Shapiro *et.al.*,1998;Bossi et.al.,2004)

การเจริญของเชื้อ *C. botulinum*

C. botulinum สายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic type) พบได้ในดิน โดยทั่วไปจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 12.5 °C แต่พบว่าบางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10°C อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ประมาณ 50 °C สำหับสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยโปรตีน (non proteolytic type) พบในน้ำโดยเฉพาะในน้ำทะเล อุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญได้คือ 3.3 °C อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ประมาณ 45 °C โดยทั่วไปค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำสุดที่เชื้อนี้สามารถเจริญและสร้างสารพิษได้เท่ากับหรือน้อยกว่า 4.6 แต่ถ้าอาหารมีการปนเปื้อนเชื้อราหรือแบคทีเรียอื่น เชื้อที่ปนเปื้อนเหล่านี้จะเจริญและเปลี่ยน pH ของอาหารให้สูงขึ้น เชื้อ *C. botulinum* ก็จะเจริญและสร้างสารพิษได้ ความสามารถในการเจริญของ *C. botulinum* ในอาหารที่มีน้ำอิสระ ในพวกที่ย่อยโปรตีนมีค่าต่ำสุดที่ 0.94 ส่วนพวกที่ไม่ย่อยโปรตีนมีค่าต่ำสุดที่ 0.97 ดังนั้นในอาหารที่มีเกลือ 10% เชื้อที่ย่อยไม่ย่อยโปรตีนจะไม่เจริญ การทนความร้อน พบว่าพวกที่ย่อยโปรตีนจะทนต่อความร้อนมากกว่าพวกที่ไม่ย่อยโปรตีน โดยชนิด A จะทนความร้อนมากที่สุดคือมีค่า D_{110}=2.72-2.89 นาที ส่วนชนิด E จะทนต่อความร้อนน้อยที่สุดคือมีค่า D_{110}=0.80นาที *C. botulinum* สายพันธุ์ย่อยโปรตีนสามารถย่อยเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนม ให้แก๊สไข่เน่า ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยโปรตีนใช้น้ำตาลแมนโนสในการหมัก ซึ่งเป็นคุณสมบัติทางชีวเคมีในการจำแนกเชื้อ (Mclauchlin *et.al.*,2006)

การควบคุม

เนื่องจาก botulinal toxins ไม่ทนต่อความร้อน ดังนั้นการทำลายสารพิษทำได้โดยใช้ความร้อน ที่ 80 °C 10 นาที หรือต้มเดือด 2-3 นาที วิธีการควบคุมเพื่อป้องกันการเกิดโรค อาหารเป็นพิษเนื่องจาก *C. botulinum* มีหลายวิธีได้แก่ ผ่านกระบวนให้ความร้อน (retort) เพื่อทำลายสปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* ให้หมด เติมสารยับยั้งการงอกของสปอร์ ปรับความเป็นกรดด่างหรือ water activity ให้ต่ำ เพื่อไม่ให้เชื้ออาจหลงเหลืออยู่เจริญ สร้างสารพิษ ควบคุมอุณหภูมิ ให้ความร้อนเหมาะสมเพื่อทำลายสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น (CDC report,2000)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคทางเดินอาหาร *Clostridium botulinum*

คุณภาพของจุลินทรีย์ในอาหารประกอบด้วย ความปลอดภัยของผู้บริโภค การยอมรับการเก็บรักษา และความสม่ำเสมอในการผลิต ในการยอมรับคุณภาพอาหารจะใช้เกณฑ์ทางจุลชีววิทยาที่กำหนดขึ้นตามสมัชชานานาชาติว่าด้วยข้อตกลงด้านจุลินทรีย์ในอาหาร โดยแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

เกณฑ์มาตรฐาน

เกณฑ์ข้อกำหนด และเกณฑ์แนวปฏิบัติ จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารได้แก่ จุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ ที่เป็นดัชนีบ่งชี้คือแบคทีเรียโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม และจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ต้องเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

ในการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ไม่ว่าจะใช้เกณฑ์ตามข้อไหนก็ตามจะต้องทำแผนชักตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของอาหารทั้งหมดเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่จะต้องตรวจ

คือ จุลินทรีย์ทั้งหมด ได้แก่ Aerobic plate count, Psychrotrophic count,Thermoduric count, ยีสต์และรา จุลินทรีย์ ดัชนีบ่งชี้ ได้แก่ Coliform และ Faecal coliform จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Sallmonella spp., Staphylococcus aureus, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Clostridium botulinum,* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์อาจจะตรวจในวัตถุดิบ ขั้นตอนกระบวนการผลิต ผลิตภัณฑ์สุดท้าย หรือในขั้นตอนการผลิตที่วิเคราะห์แล้วว่าเป็นจุดวิกฤตในการทำระบบ HACCP รวมทั้งตรวจวิเคราะห์สภาพแวดล้อมในการผลิต เช่น คุณภาพน้ำที่ใช้ทำความสะอาดพื้นผิว และคุณภาพของอากาศในโรงงาน เป็นต้น (อุษามาส,2547)

การชักตัวอย่างอาหาร

แผนการชักตัวอย่างอาหาร(sampling plan) ที่แนะนำโดย The International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) ที่ได้กำหนดให้ใช้เป็นแนวทางในการสุ่มตัวอย่างอาหารแบ่งเป็น 2 แบบ คือ แผนการชักตัวอย่างแบบกำหนดชั้นคุณภาพเป็น 2 ระดับ (2-class plan)

และแผนการชักตัวอย่างแบบกำหนดชั้นคุณภาพเป็น 3 ระดับ (3-class plan)

แผนการชักตัวอย่างแบบกำหนดชั้นคุณภาพเป็น 2 ระดับ (2-class plan) คือ การยอมรับหรือปฏิเสธ โดยการตรวจว่ามีหรือไม่มีเชื้อ ประกอบด้วย 3 พารามิเตอร์ คือ

n = จำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ

m = เกณฑ์จำนวนจุลินทรีย์ที่กำหนดขึ้น ถ้าพบว่าสูงกว่าที่กำหนดถือว่าอาหารมีตำหนิ

c = จำนวนตัวอย่างสูงสุดที่ยอมให้มีตำหนิได้

แผนการชักตัวอย่างแบบกำหนดชั้นคุณภาพเป็น 3 ระดับ (3-class plan) เป็นค่าคุณภาพของจำนวนจุลินทรีย์ระดับหนึ่งที่ถือเป็นตำหนิแต่ยังพอรับได้ โดยการตรวจสอบแบบนับจำนวน ประกอบด้วย 4 พารามิเตอร์ คือ

n = จำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ

c = จำนวนตัวอย่างสูงสุดที่ยอมให้มีตำหนิได้

m = เกณฑ์จำนวนจุลินทรีย์ที่กำหนดขึ้น ถ้าพบว่าสูงกว่าที่กำหนดถือว่าอาหารมีตำหนิแต่ยังพอยอมรับได้ คือน้อยกว่าค่า m และไม่เกินค่า M

M = เกณฑ์จำนวนจุลินทรีย์สูงสุดที่กำหนดขึ้น ถ้าพบว่าสูงกว่าที่กำหนดจะไม่ยอมรับ

ICMSF ได้จัดระดับอันตรายทางจุลชีววิทยาออกเป็น 15 ระดับ(case)ซึ่งระดับที่ 1-9 เป็นแผนการชักตัวอย่างแบบกำหนดชั้นคุณภาพเป็น 3 ระดับ(3-class plan) และระดับที่ 10-15 เป็นแผนการชักตัวอย่างแบบกำหนดชั้นคุณภาพเป็น 2 ระดับ(2-class plan)ตามความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค และตามสภาวะแวดล้อมที่เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนหรือตามสภาวะแวดล้อมในกระบวนการผลิต การเก็บ และการจำหน่ายอาหารที่มีผลต่อจุลินทรีย์ ตามความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคมีอยู่ 5 แบบ ได้แก่

1. เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ มีปนเปื้อนอยู่ทั่วไป เป็นพวกที่ทำให้อาหารเสียมีผลต่ออายุการเก็บอาหาร

2.เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพในระดับต่ำเป็นดัชนีบ่งชี้ในระบบสุขาภิบาล

3. เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพในระดับปานกลาง แพร่กระจายได้จำกัด

4. เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพในระดับปานกลาง แพร่กระจายได้อย่างกว้างขวาง

5. เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพในระดับรุนแรง

ตามสภาวะแวดล้อมที่เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนหรือตามสภาวะแวดล้อมในกระบวนการผลิต การเก็บ และการจำหน่ายอาหารที่มีผลต่อจุลินทรีย์มีอยู่ 3 แบบ

1. สภาวะแวดล้อมที่ลดความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของจุลินทรีย์ เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์

2. สภาวะแวดล้อมที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความรุนแรงของเชื้อ

3. สภาวะแวดล้อมที่เพิ่มความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของจุลินทรีย์ (ICMSF, 1986)

สำหรับเชื้อ *C. botulinum* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพในระดับรุนแรง อยู่ในสภาพแวดล้อม ที่มี pH สูงกว่า 4.6 ที่เพิ่มความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของจุลินทรีย์ ในแผนการชักตัวอย่างใช้ case 15 (ICMSF, 1986) ซึ่งการสุ่มตัวอย่างเป็นแบบ random sampling โดยคำนึงถึงจำนวนและขนาดของตัวอย่างรวมทั้งหลักเกณฑ์ทางสถิติด้วย

การเก็บตัวอย่างและวิธีนำส่งตัวอย่าง

การนำส่งตัวอย่างในห้องปฏิบัติการต้องเป็นไปอย่างรวดเร็ว เพื่อรักษาสภาพของตัวอย่างให้คงเดิม ถ้าไม่สามารถนำส่งตัวอย่างได้ทันที ต้องเก็บไว้ในตู้เย็นหรือตู้แช่แข็ง ในกรณีของเชื้อ *C. botulinum* ต้องเก็บตัวอย่างให้เต็มภาชนะบรรจุเพื่อไม่ให้มีอากาศหรือมีอากาศน้อยที่สุด

การวิเคราะห์เชื้อ *C. botulinum* และสารพิษเชื้อในอาหาร

นำตัวอย่างอาหาร 4-10 กรัม เจือจางด้วย gelation phosphate buffer (pH6.0-6.2) ในอัตราส่วน 1:1 ทั้งนี้เพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมให้เชื้อ *C. botulinum* สามารถเจริญเติบโต นำไปปั่นเพื่อแยกตะกอน นำตะกอนไปแยกเชื้อโดยใส่ในอาหารเหลว ได้แก่ chopped-meat-glucose-starch medium, cook meat medium, reinforced clostridial medium, fastidioud anaerobic broth,Tryptone-Peptone Glucose- Yeast extract broth ที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *C. botulinum* ปรับสภาพให้เหมาะสมในสภาพที่ไม่มีอากาศ เมื่อครบเวลาที่ต้องการ นำไปแยกโคโลนีในอาหารแข็ง ได้แก่ blood agar โคโลนีบน blood agar จะเกิด beta haemolysis ,EYA เป็นอาหารที่สามารถทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ซึ่งเชื้อ *C. botulinum* สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ย่อยสลายไขมันในไข่แดงทำให้เกิดโคโลนีลักษณะจำเพาะ มัน วาว คล้ายไข่มุก แต่ไม่มีขอบขุ่นขาวรอบๆ (opaque zone) แสดงว่า

ให้ผลลบต่อ lecithinase หรือจะใช้อาหารที่มีคุณสมบัติเป็น selective media ได้แก่ EYA ผสม cycloserine, sufamethoxazole, trimethopm สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ปนมาใน

ตัวอย่างนำโคโลนีมายืนยันโดยนำมาทดสอบทางชีวเคมี ดังแสดงในตาราง

Test	*C. botulinum* Type A,B,F	*C. botulinum* Type B,E,F	*C. botulinum* Type C,D	*C. botulinum* Type G
Arabinose	-	w	-	-
Esculin hydrolysis	+	-[+]	-	-
Fructose	-[w]	a[w]	-[a]	-
Glucose	w	a	w[a]	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	-[w]	a[w]	v	-
Manitol	-	-[w]	-	-
Mannose	-	a	w	-
Starch pH	-	v	-[w]	-
Starch hydrolysis	-	+	-	-
Sucrose	-	a[w]	-	-
Xylose	-	-	-[w]	-
Liquefying Gelatin	+	+	+	+
Milk	digest	Curd	digest[c]	digest[c]
Indol	-	-	-[+]	-
Nitrate	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-[+]	-
Lipase	+	+	+	-
Motility	+	+	+	-

+= positive reaction for 90-100% strains

-= negative reaction for90-100% strains

a= strong acid (pH 5.5) for 90-100% strains

w= weak acid (pH 5-6.0) for 90-100% strains

v= variable

-^{w}= most strains negative,some strain week

-^{a} = mst strains negative,some strain acid

a^{w}= most strains acid, some strains weak

ที่มา:มยุรา กุสุมภ์ และ สุนันท์ จำรูญ, 2549

จากการปั่นแยกตะกอนไปตรวจหาเชื้อแล้ว นำส่วนใสมาหาสารพิษของเชื้อในอาหารต้องสงสัย โดยนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ^{0}C 10 นาที ฉีดหนูสังเกตอาการหนู 96 ชั่วโมง หนูจะรอดชีวิต และนำส่วนใสมาใส่เอ็นไซม์ trypsin ฉีดหนูสังเกตอาการหนู 96 ชั่วโมง ถ้าหนูตายก็หาชนิดของสารพิษต่อไป

การทดสอบหาชนิดของสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* โดยใช้สัตว์ทดลอง

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Cooked Meat-Dextrose-Glycerol Broth (CMDG) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 ^{0}C ในสภาพไร้อากาศนาน 3-5 วัน นำเชื้อที่ได้ไปปั่นแยกเก็บส่วนใส เป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อทำลายคุณสมบัติของสารพิษของเชื้อ ส่วนนี้เรียกว่า heated sample นำส่วนใสผสมกับ antitoxin type A,B,C,D,E,F,G โดยแยกของแต่ละชนิดกันในแต่ละหลอด นำไปวางที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ส่วนนี้เรียกว่า neutralized sample ส่วนที่3 เป็น untreated supernatant เรียกส่วนนี้ว่า untreated sample นำตัวอย่างส่วนที่ 1,2,3 และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุม ปริมาตร 0.5 มล. ฉีดในช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนูขาว แปรผลตามตาราง

ตาราง การแปรผลการทดสอบหาสารพิษของ *C. botulinum* และชนิดของสารพิษในหนูขาว

Control	Heated	Neutralized	Untreated	Resulted
ไม่ตาย	ไม่ตาย	ไม่ตาย	ไม่ตาย	ไม่มี toxinของ *C. botulinum*
ไม่ตาย	ไม่ตาย	ไม่ตาย	ตาย	มี toxinของ *C. botulinum* type A,B,C,D,E,F,G ขึ้นอยู่กับชนิดของ antitoxin ที่ใช้ผสม
ไม่ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ตาย	อาจมี toxin ของ *C. botulinum* ที่ไม่ได้ทำ neutralized
ไม่ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	มี toxin อื่นที่ไม่ใช่ *C. botulinum* toxin

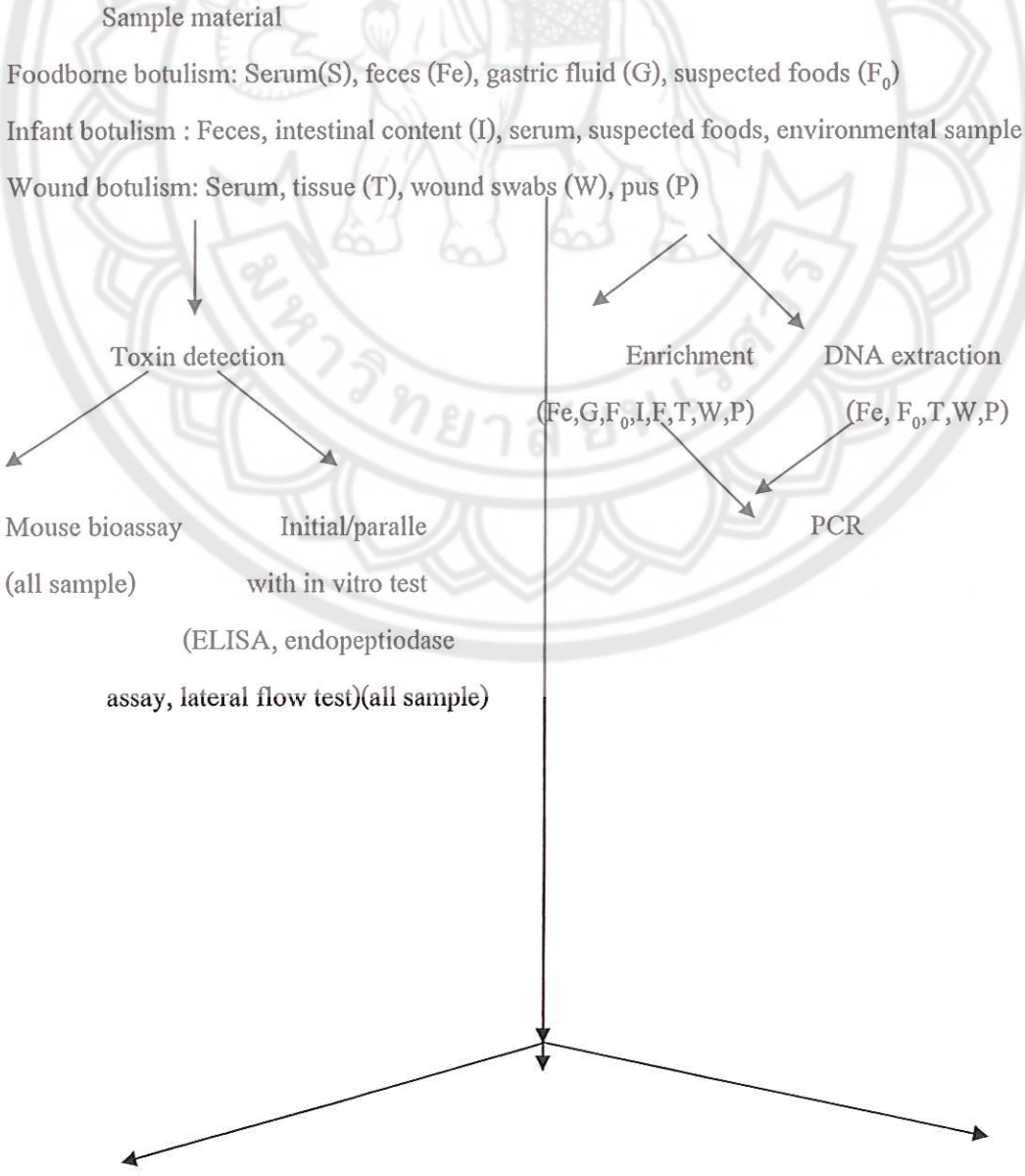
ที่มา:มยุรา กุสุมภ์ และ สุนันท์ จำรูญ, 2549

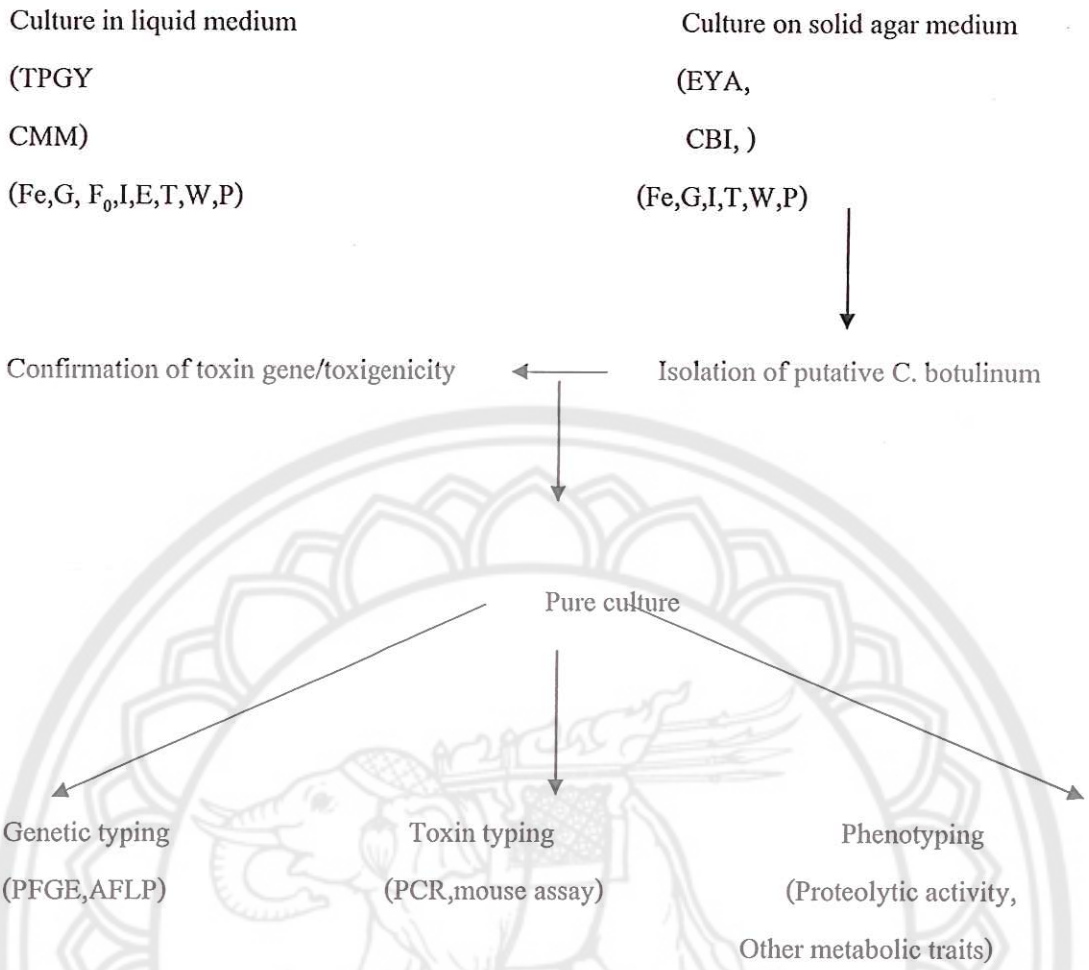
การสังเกตอาการหลังจากฉีดเป็นระยะ 4,8,12,18,24 ชม. และต่อไปทุกวันรวม 4 วัน โดยทั่วไปหนูจะตายในเวลา 6-24 ชม. โดยมีอาการ ขนพอง หายใจด้วยกล้ามเนื้อท้อง แขนขาอ่อนแรง อัมพาตทั้งตัว ตายเนื่องจากหายใจล้มเหลว

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *C. botulinum*

นับจากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *C. botulinum* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ทำให้มีการศึกษาคุณลักษณะต่างๆของ *C. botulinum* เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะลักษณะของโคโลนี (colony characteristics) ที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ดังนั้นนักจุลชีววิทยาหลายท่านจึงมุ่งพัฒนาสูตรอาหารสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *C. botulinum* ให้มีความแม่นยำเพิ่มขึ้น โดยในอดีตมักศึกษาร่วมกับการตรวจดูลักษณะของ เซลล์ *C. botulinum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การติดสีแกรม (gram straining) รูปร่างของ vegetative cell และสปอร์ และการทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics) เพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจหรือศึกษาว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจเป็น *C.botulinum* (De Jong, *et al.*, 2003; Shahidi and Ferguson,1971; Holdeman and Moore,1975) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีความยุ่งยากและต้องใช้ระยะเวลาในการทดสอบค่อนข้างมาก ดังนั้นนักจุลชีววิทยาจึงพัฒนาวิธีการตรวจมาตรฐานวิเคราะห์ *C.botulinum* ให้มีความถูกต้องและแม่นยำดังรายละเอียดแสดงในแผนผังต่อไปนี้\

แผนผังแสดงการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C.botulinum* จากตัวอย่าง (Lindstromand and Korkeala ,2006)





ขั้นตอน Sample Toxin detection Mouse bioassay เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจ *C. botulinum*

ขั้นตอน Initial/paralle with in vitro test Enrichment DNA extraction PCR เป็นการตรวจสอบอย่างไวในการตรวจสอบเชื้อ *C. botulinum*

ขั้นตอน Culture in liquid medium Culture on solid agar medium Isolation of putative *C. botulinum* Confirmation of toxin gene/toxigenicity Pure culture Genetic typing Toxin typing Phenotyping เป็นขั้นตอนที่ใช้ทดสอบการระบาดวิทยาของเชื้อ

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. botulinum* และสารพิษของเชื้อในอาหารต้องสงสัย

นำตัวอย่างอาหารมาเจือจางด้วย gelatin phosphate buffer ในอัตราส่วน 1:1 ปั่น 12,000 รอบ/นาที ที่ 4 °C นำส่วนที่เป็นตะกอนมาเติม gelatin phosphate buffer 1-2 มล. แยกเชื้อ โดยทำการ enrichment บนอาหาร cooked meat medium ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแยกโคโลนีที่เป็นลักษณะสำคัญของเชื้อ *C. botulinum* บนอาหาร modified BHI-EY agar หรือ Mc Clungtoabe Ey agar บ่มที่อุณหภูมิ 25-37°C เป็นเวลา 2 วันเลือกโคโลนีเฉพาะ lipase+ มีลักษณะมัน วาว ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม เพื่อเป็นการระบุเชื้อเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อ *C. botulinum* สำหรับส่วนใสนำไปตรวจหาสารพิษ โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำมา 1 มล. เติม 0.5% trypsin 2 มล. บ่มที่ 35-37°C เป็นเวลา 30-60 นาที เจือจางลำดับละ 10 เท่า 5 ลำดับ นำไปฉีดหนู 2 ตัว ตัวละ 0.5 มล. สังเกต

อาการหนู 96 ชั่วโมง ถ้าหนูตายนำไปหาชนิดของ toxin ส่วนที่ 2 นำมา 1 มล. ให้ความร้อนที่100°C 10 นาที นำมาฉีดหนู 2 ตัว ตัวละ 0.5 มล. สังเกตอาการหนู 96 ชั่วโมง หนูจะรอดชีวิต ในกรณีหนูตายส่วนใหญ่จะตายในเวลา 24 ชั่วโมง หนูที่ตายด้วย Botulinal toxin จะมีอาการเฉพาะ ได้แก่ ขนพอง หายใจด้วยกล้ามเนื้อท้อง แขนขาอ่อนแรง อัมพาตทั้งตัว ตายเนื่องจากหายใจล้มเหลว เมื่อทราบว่ามีสารพิษจึงไปทำการทดสอบหาชนิดของสารพิษตามวิธีมาตรฐาน Mouse bioassay ต่อไป (มยุรา กุสุมภ์ และ สุนันท์ จำรูญ, 2549 ;Austinard and Sander,2009)

วิธี Immonological methods ในการตรวจหาเชื้อ *C. botulinum* และสารพิษของเชื้อในอาหาร

วิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ non-competitive assay แบบ antigen sandwich โดย antibody (polyvalent antitoxin) ของเชื้อ *C. botulinum* จะถูกเคลือบไว้บน microtiter plate สารพิษของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจในอาหาร ทำหน้าที่เป็น antigen จะไปจับกับ antibody ที่ถูกเคลือบไว้บน microtiter plate ก่อน จากนั้นใส่ antibody ต่อสารพิษที่ถูกติดฉลากด้วย เอนไซม์ เมื่อทำการล้างเพื่อไล่ antibody ส่วนเกินออกแล้ว จะเติม substrate ที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ ตรวจวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ในช่วงการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) และมีความเฉพาะเจาะจงสูง (specificity) โดยมีความไวเป็นเมื่อคิดเป็นค่า MLD_{50} 10-100 เท่า ของวิธีมาตรฐาน Mouse bioassay ตรวจหาสารพิษปริมาณ 0.1-1 ng/ml (Sharma *et.al.*,2005) มีความความเฉพาะเจาะจงสูง 96 % เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน Mouse bioassay ถึงอย่างไรวิธีนี้อาจเกิดผล false positive เนื่องจากการใช้ความร้อนในการทำลายพิษของ toxin ในการผลิต antibody ที่ไม่มีความบริสุทธิ์พอ ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนที่เป็น toxin ได้ และอาจเกิด false negative เนื่องจากเชื้อชนิดหนึ่งอาจจะผลิต toxin ได้หลายชนิด ทำให้ลดความสามารถไปจับกับ monoclonal antibody ดังนั้นวิธี ELISA จึงเป็นวิธีทดสอบอย่างไวในการตรวจเชื้อ *C. botulinum* และสารพิษของเชื้อในอาหาร (Chiao *et.al.*,2008;Dezfulian ,1984;Lindstrom and Korkeala,2006) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการเพิ่มความไวของวิธี ELISA ได้แก่

enzyme-linked coagulation assay (ELCA) เรียกว่าวิธี ELISA-ELCA หลักการคือ antichicken Ab หรือ avidin เคลือบบน plate เตรียม chicken Ab +toxin+horseAbเคลือบ RVV-X_a (Russell's viper venum factor X activator as the labeling and coagulation based amplification system สารนี้จะทำหน้าที่เป็น detector ในการเปลี่ยน Alkaline phosphatase-fribinogen เป็น Alkaline phosphatase-fribrin จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดปริมาณความเข้มของสีที่เกิดขึ้น คือเป็นการเพิ่มความไวของวิธีการนั่นเอง หรือเตรียม antibody ต่อ biotin +toxin+ horseAbเคลือบ RVV-X_a จากนั้นนำกลุ่มสารดังกล่าวไปหยดบน plate ที่มี antichicken Ab หรือ avidin ถ้ามี toxin ของเชื้อ *C. botulinum* ในสิ่งส่งตรวจ ก็จะเกิดสัญญาณที่สามารถวัดความเข้มของสารที่เกิดขึ้นได้ภายใต้ความยาวช่วงคลื่นที่เฉพาะ วิธีนี้ให้ความไวสูง สามารถ ตรวจวัด toxin ได้ในปริมาณน้อยถึง 5-10 pg/ml (Dorllgast *et.al.*,1994)

Immuno-PCR วิธีนี้ใช้หลักการเดียวกับวิธี ELISA เพียงแต่แทนที่ detection antibody จะเชื่อมต่อกับเอนไซม์ แล้วเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรตเกิดสีซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณแอนติเจน นั่นคือปริมาณสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* เป็น detection antibody จะเชื่อมกับ DNA marker จะทำปฏิกิริยา PCR โดยมี nucleotide, enzyme DNA polymerase ให้ PCR product เกิดขึ้น ปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณ ปริมาณแอนติเจน นั่นคือ ปริมาณสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* วิธีนี้จะเป็นการเพิ่ม ความไวของการตรวจวัดปริมาณสารพิษ อย่างไรก็ตามขั้นตอนการเตรียม detection antibody เชื่อมกับ DNA marker ในการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก มีปัญหาในการตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้น จึงมีผู้คิดค้นในการใช้โปรตีนในการเชื่อมต่อระหว่าง detection antibody และ DNA marker นั่นคือ โปรตีน A-STV ซึ่งมีความสามารถในการเชื่อมต่อกับ Fc fracment ของ detection antibody และ biotylate DNA หรือ จะใช้โปรตีน streptiavidin ซึ่งมีความสามารถในการเชื่อมต่อกับ biotylate-IgG และ biotylate DNA หรือ จะสร้าง covalent linkage ระหว่าง antibody และ DNA marker ถึงอย่างไรวิธีนี้ก็ประสบปัญหาเนื่องจาก antibody ไม่สามารถจะคงอยู่ในสภาพที่มีการใช้สารเคมีหลายชนิดในระหว่างการทำปฏิกิริยา จึงทำให้มีปัญหาในการตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้น สำหรับการสร้าง covalent linkage ระหว่าง antibody และ DNA marker ทำได้ยากแต่ถ้าประสบความสำเร็จ วิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการทำ multiplex-IPCR โดย DNA marker จะถูกออกแบบมาให้เป็น marker สำหรับตรวจวัดสารพิษหลายชนิดของเชื้อ *C. botulinum* จะทำให้เกิดปริมาณ PCR product ที่มีขนาดต่างกัน ปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณ ปริมาณแอนติเจนที่เป็นสารพิษที่หลากหลายนั้น วิธีนี้จะเป็นการเพิ่มความไวมากกว่าวิธี ELISA ปกติประมาณ 100 เท่า (Niemeyer *et.al.*,2005) สำหรับวิธี Immuno-PCR ใช้เวลา 5-6 ช.ม. ในการทำ ELISA เลี้ยงเชื้อเพิ่มจำนวนข้ามคืน สามารถตรวจเชื้อ *C. botulinum* type A หรือ B ได้ในปริมาณ 1 cell สำหรับเชื้อ *C. botulinum* type E ตรวจได้ในปริมาณ 10 cell (Sharma *et.al.*,2005)

การตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นจากวิธี Immuno-PCR ทำได้ 3 วิธีได้แก่ นำ PCR product มาทำให้เห็นสัญญาณโดยวิธี gel electrophoresis วิธีนี้ใช้เวลานาน วิธี microplate readout ได้แก่ PCR-ELISA และ PCR-ELOSA วิธี PCR-ELISA เป็นวิธีที่นำเอา PCR product ที่เป็นชิ้นส่วนของ DNA มาติดฉลากด้วย biotin และ dioxigenin โดยปฏิกิริยา PCR โดย biotin จะจับกับ streptiavidin dioxigenin จะจับกับ antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สำหรับวิธี PCR-ELOSA นั้น oligonucleotide PCR product จะถูกนำมาเกาะติด microplate โดยวิธี DNA hybridization จากนั้น oligonucleotide PCR product จะถูกติดฉลากด้วย dioxigenin โดยผ่านปฏิกิริยา PCR dioxigenin จะจับกับ antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product หรือ oligonucleotide PCR product ซึ่งก็เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนคือสารพิษของเชื้อนั่นเอง วิธีอ่านผลทั้ง 2 วิธีจะเกิดปัญหาการปนเปื้อน ทำให้เกิด false positive ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้วิธี real time PCR ในการอ่านผล วิธีนี้สามารถวัดแสดงออกมาเป็นจำนวน cycle ที่จะถึงค่าเริ่มต้นของสัญญาณที่จะตรวจวัดได้ (Threshold) ที่สามารถแปลงมาเป็นปริมาณของ PCR product หรือ oligonucleotide PCR

product ซึ่งก็เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนคือสารพิษของเชื้อนั่นเอง จะทำให้เพิ่มความไวในการตรวจวัดนั่นเอง (Niemeyer *et.al.*,2005)

วิธี Immuno-rolling circled amplification เป็นวิธีที่ดัดแปลงโดยใช้ detection antibody ไปเกาะกับ oligonucleotide primer ทำปฏิกิริยากับ target template เส้น PCR product จะขยายออกไป จะไม่มีการแพร่ออกไปเพราะถูกตรึงอยู่กับ detection antibody วัดปริมาณของ PCR product ซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ detection antibody นั่นก็คือปริมาณแอนติเจนสารพิษของเชื้อนั่นเอง วิธีนี้ได้พัฒนาไปเป็น protein microarray analysis และ multiplex microarray analysis ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษชนิดต่างต่างได้

วิธีที่ได้พัฒนาต่อมาในการตรวจวัดสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* ได้แก่ วิธี biobarcode technology วิธีนี้จะใช้ gold nanoparticle biobarcodes ซึ่งถูกติดฉลากด้วย DNA และ specific antibody ทำหน้าที่เป็น detection probe และ magnetic microparticle probe ทำหน้าที่เป็น capture antibody ทั้ง gold nanoparticle biobarcodes และmagnetic microparticle probe จะใช้ส่วนของ antibody ไปจับกับ antigen ที่เป็นสารพิษของเชื้อนั่นเอง จากนั้น magnetic microparticle probe จะถูกเหนี่ยวนำให้หลุดออกไป DNAbiobarcode จะหลุดออกมาจาก gold nanoparticle DNAbiobarcode จะถูกตรวจวัดด้วยวิธี chipbased barcode DNA detection โดย DNAbiobarcode จะถูก hybridise บน supported medium gold nanoparticle ที่ถูกเคลือบด้วย silver จะมาจับกับ DNA biobarcode ความเข้มของสัญญาณที่เกิดขึ้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ปริมาณ DNA biobarcode และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนที่เป็นสารพิษนั่นเอง (Niemeyer *et.al.*,2005)

วิธี Lateral-flow assay ใช้หลักการของ immunochromatographic นั่นคือ ในแผ่น nitrocellulose membrane จะมีหลุม 3 หลุม ได้แก่ Sample well หลุมนี้ไว้ใส่สารแอนติเจน BoNT จะทำปฏิกิริยากับสารติดฉลาก anti-BoNTที่เคลือบด้วย gold ถ้ามีแอนติเจนจะให้สีแดง กลุ่มสารนี้จะแพร่ผ่าน nitrocellulose membrane ไปที่หลุม sample window ที่มี anti-BoNTแล้ว anti-BoNT จะทำปฏิกิริยากับ แอนติเจน BoNT ที่มีสารติดฉลาก anti-BoNTที่เคลือบด้วย gold ทำให้เกิด สีแดง anti-BoNTที่เคลือบด้วย gold ที่เหลือจะแพร่ผ่านไปยัง control window ที่มี anti-anti BoNT อยู่ ถ้าปฏิกิริยาดำเนินดีก็จะเกิดสีแดงในส่วนของ control window ถ้าเกิดความเข้มของสีให้ผลบวกทั้ง sample window และ control window ส่วนใหญ่ในเวลา 15 นาที แสดงว่ามีการตรวจพบ toxin ของเชื้อ *C. botulinum* ในตัวอย่าง จะเป็น ซีรั่ม หรือ สามารถประยุกต์ใช้ในอาหารชนิดต่างๆ วิธีนี้มีความไวน้อยสามารถตรวจปริมาณสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* ได้ 10-20 ng/ml มีข้อจำกัดดูได้ในเชิงคุณภาพ ไม่สามารถดูได้ในเชิงปริมาณ แต่สะดวกสามารถทำได้ในการปฏิบัติการภาคสนาม (Sharma *et.al.*,2005) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธี immunochromatographic ในการครวจสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* type D โดยใช้หลักการเดียวกัน วิธีนี้ได้เพิ่มความไวสามารถตรวจปริมาณสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* ได้ 50

pg/ml ใช้เวลาประมาณ 6-96 ช.ม. ยังพบปัญหา false positive เกิดขึ้น ทำให้วิธีนี้มีความเฉพาะเจาะจงต่ำ (Klewitz *et.al.*,2006)

วิธี chemiluminescent slot blot immunoassay เป็นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการนำเอา toxin ซึ่งเป็นแอนติเจนของเชื้อ *C. botulinum* ไปตรึงบนแผ่นเมมเบรนที่เป็นสารพวก polyvinylidene fluoride ใส่ antirabbit BoNT ลงไป antirabbit IgG ติดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase ตามด้วยใส่สับสเตรท ที่เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะเรืองแสง ความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ toxin วิธีนี้จะให้ความไวในการตรวจวัด 4 MLD ประมาณ 40 pg/ml neurotoxin (Cadieux *et.al.*,2005)

วิธี electrochemiluminescence assay เป็นวิธีที่ได้มีการพัฒนาขึ้นจากวิธี ELISA วิธีนี้ใช้ biotinylated capture antibody ไปจับกับ streptovidin coated paramagnetic bead จากนั้นนำกลุ่มสารนี้ไปเกาะกับ polypropylene plate ใส่แอนติเจนที่เป็นสารพิษลงไป แอนติเจนนี้จะเข้าไปเกาะกับ กลุ่มสารทั้งหมดดังกล่าวบน plate สามารถตรวจพบได้โดยใส่ ORT-TAG label detection antibody เป็น antibody ที่ติดฉลากโดยสารเรืองแสง infrared ที่สามารถตัววัดสัญญานความเข้มโดยใช้เครื่อง MIR analyzer วิธีนี้จะมีความไวสูงกว่าวิธี ELISA สามารถตรวจวัดสารพิษได้ในปริมาณที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบในสภาวะเดียวกัน (Cadieux *et.al.*,2005)

วิธี radioimmunoassay เป็นวิธีการที่ตรึง antitoxin ไว้ที่ solid phase ทำการ label toxin ด้วยสาร radioactive I^{125} จะเกิด complex ระหว่าง antitoxin และ toxin ด้วยสาร radioactive I^{125} เรียกว่า bound complex แล้วทำการใส่ toxin ลงไป antitoxin นี้ จะไปจับกับ antitoxin ไว้ที่ solid phase ทำให้เกิด unbound complex ของ toxin ด้วยสาร radioactive I^{125} สร้าง standard curve ratio bound/unbound complex จะลดลงตามปริมาณ toxin ที่ใส่ลงไป สามารถหาการลดลงของสาร radioactive ตามปริมาณของ toxin ที่ใส่ลงไป (Ceska *et.al.*,1978) วิธีนี้มีความไว 100 MLD (Lindstrom and Korkeala(2006).

วิธี endopeptidase assay เป็นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น เพื่อแก้ปัญหา false negative เนื่องจากมี antigenic variation ขึ้นใน toxin ของเชื้อ *C. botulinum* หลักการ toxin ของเชื้อ *C. botulinum* แต่ละชนิดมี cleavage site ที่เฉพาะเจาะจง ถ้าจะสังเคราะห์ specific peptide ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับชนิด B ก็ใช้เอนไซม์ endopeptidase ที่มี cleavage site ที่เฉพาะเจาะจง สำหรับชนิด B ได้ specific peptide ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับชนิด B ไปเคลือบบน microtiter plate นำ antibody ที่เฉพาะเจาะจง กับ peptide นี้ ที่ถูก label ด้วยเอนไซม์ ใส่ลงไป แล้วเติม สับสเตรทสำหรับเอนไซม์ลงไป ถ้าปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงต่อกัน จะทำให้เกิดสีขึ้น วิธีนี้สามารถตรวจ toxin เชื้อ *C. botulinum* ที่มีความไว 0.6-4.5 ng/ml หรือ 0.1-0.8 MLD ให้ความไวสูงและมีความเฉพาะเจาะจงสูงขึ้น (Hallis *et.al.*,1996)

วิธีชีวโมเลกุลในการระบุเชื้อ *C. botulinum*

Molecular detection of *C. botulinum*

เป็นการตรวจหา botulinum gene ที่ผลิต toxin ของเชื้อ *C. botulinum* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่มีความเฉพาะเจาะจงและมีความไวสูง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อ *C. botulinum* ปนเปื้อนในอาหารในปริมาณที่ต่ำ จึงควรที่จะ enrichment เชื้อ ในอาหารเหลว เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ และเพิ่มยีนส์เป้าหมาย ทำให้โอกาสในการตรวจพบเชื้อมีมากขึ้น วิธีนี้ สามารถตรวจแยก ชนิดของ toxin C. botulinum ในทุก ชนิด ใน 7 ชนิด และแยก toxin ที่เกิดจากเชื้อ *C. butyricum* และ *C. baratii* ข้อเสียของวิธีชีวโมเลกุลทดสอบหาสารพิษโดยตรง อาจเกิด false positive และ false negative จากการทำปฏิกริยา PCR จึงจำเป็นต้องทำ mouse bioassay ต่อไป (Lindstom and Korteala,2006) วิธีทางชีวโมเลกุลมีหลายวิธี มีวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารหลายวิธี ตรวจชนิด toxin ได้ครบทุกชนิด และให้ความไวที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางข้างล่างนี้

Sample type and Pre-treatment	Assay type	Toxin type detected	Sensitivity
Extracted DNA from pure culture	PCR+gel electrophoresis	A,B,E,F	0.3 ng
	PCR+gel electrophoresis	A,B,C,D,E,F	2.5 pg
	PCR+probe hybridization	A	12.5 fg
	Real time PCR	A,B,E	42-195 fg
	Real time PCR Multiplex	A	0.1 ng
	PCR+hybridization onto array	A,B,E,F	0.015-0.5 pg
Extracted DNA from spores inoculated in food	Real time PCR	A	10^2-10^3 spore/ml
Extracted DNA from enriched food	PCR+probe hybridization	A,B,E,F	0.1 cell/g
	PCR+probe hybridization	A,B,E,F,G	10 cell/g
	PCR+probe	A,B,E	0.1-21spores/g

	hybridization PCR+capillary electrophoresis	E	10 cells
Extracted DNA from enriched foods,environmental samples and clinical samples	PCR+gel electrophoresis	A,B,E	10^2 spore/g
Extracted DNA from enriched foods and environmental samples	PCR-ELISA	A,B,E,F	10^{-1} cell/g
Crude cell lysate from enrichment broth	Multiplex PCR+gel electrophoresis Multiplex PCR+hybridization on array	A,B,E,F A,B,E,F	10-10^2 cells 4x10^2 cells
Crude cell lysate from enriched foods	PCR+probe hybridization	A	10-10^3 cell/g
Crude cell lysate from enriched foods and feces	Multiplex PCR+gel electrophoresis	A,B,E,F	Food 10^{-2}-10^{-1}spore/g Feces 10^{-1}-10^3spore/g

(Lindstom and Korteala,2006)

Face และคณะ (1995) ได้ใช้ degenerated primers ในการ amplify botulinum gene ที่สร้าง toxin ชนิด A,B,E,F,G และใช้ specific probe ในการระบุ botulinum gene ในแต่ละ toxinotype วิธีนี้สามารถตรวจพบ PCR product ขนาดที่มีขนาด bp. ที่จำเพาะเจาะจง และสามารถตรวจพบสัญญาณจากการทำ hybridization ที่เฉพาะเจาะจงในแต่ละ toxinotype วิธีนี้สามารถตรวจพบ *C. botulinum* ในอาหารในปริมาณ 10 cell/g หลังจาก enrichment อาหารเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เทียบได้กับวิธี mouse bioassay 95.6%

วิธี PCR และ Multiplex PCR โดยใช้ primer 1 คู่และ primer หลายคู่ โดยวิธี PCR ใช้ primer 1 คู่ สามารถ สามารถตรวจจับ botulinum gene ที่สร้าง toxin ได้ทั้ง 7 ชนิด ส่วน Multiplex PCR ใช้

primer หลายคู่ เช่นมีการทดลองใช้ primer 4 คู่ ในการตรวจเชื้อ *C. botulinum* ในอาหาร และอุจจาระ โดยมี ค่า sensitivity ในการตรวจเชื้อ *C. botulinum* type A,B,E,F ในกรณีที่มีการ enrichment ตัวอย่าง ประมาณ 10^{-1} – 10^{-2} spore/g การที่ต้องมีการ enrichment ตัวอย่างเนื่องจาก ปริมาณเชื้อ *C. botulinum* ในสิ่งส่งตรวจมีน้อย ต้อง enrichment ให้ สปอร์งอกเป็น vegetative cell ถ้าไม่ enrichment เชื้อประจำถิ่นที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจ จะเจริญได้ดี ทำให้ตรวจพบเชื้อที่ต้องการได้ยาก sensitivity ที่พบประมาณ 10-10^2 cell (Lindstrom et.al.,2001) ต่อมาได้นำเทคนิค Nestd PCR และ seminested PCR มาใช้ระบุ botulinum toxin gene โดยทำการเพิ่มจำนวน spore ของเชื้อในอาหาร tryptone yeast extract glucose broth ใช้ forward และ reverse primer สำหรับ bont gene ของ type A,B,E,F ได้ PCR product ขนาด 1033-1054 bp แล้วทำ PCR รอบสอง โดยใช้ semi-nested PCR primer ผลจะได้ PCR product เฉพาะเจาะจงต่อ type A,B,E,F ขนาด 462, 256 ,633, 576 bp ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างของ จำนวนแถบแบน มีมากพอที่จะแยกความแตกต่างระหว่าง type ได้ในการทำ gel electrophoresis โดยเฉพาะการทำ enrichment-seminested PCR 1 spore/reaction สำหรับ type A และ 10 spore/reaction สำหรับ type B,E,F แต่ถ้าไม่ทำ enrichment จะให้ค่า sensitivity 10^2 spore/reaction สำหรับ type A และ 10^3spore/reaction สำหรับ type B,E,F (Shin *et.al.*,2007)

การตรวจวัดสัญญานที่เกิดขึ้นจากวิธี Immuno-PCR ทำได้ 3 วิธีได้แก่ นำ PCR product มาทำให้เห็นสัญญานโดยวิธี gel electrophoresis วิธีนี้ใช้เวลานาน วิธี microplate readout ได้แก่ PCR-ELISA และ PCR-ELOSA วิธี PCR-ELISA เป็นวิธีที่นำเอา PCR product ที่เป็นชิ้นส่วนของ DNA มาติดฉลากด้วย biotin และ dioxigenin โดยปฏิกิริยา PCR โดย biotin จะจับกับ streptiavidin dioxigenin จะจับกับ antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สำหรับวิธี PCR-ELOSA นั้น oligonucleotide PCR product จะถูกนำมาเกาะติด microplate โดยวิธี DNA hybridization จากนั้น oligonucleotide PCR product จะถูกติดฉลากด้วย dioxigenin โดยผ่านปฏิกิริยา PCR dioxigenin จะจับกับ antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product หรือ oligonucleotide PCR product ซึ่งก็เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนคือสารพิษของเชื้อนั่นเอง วิธีอ่านผลทั้ง 2 วิธีจะเกิดปัญหาการปนเปื้อน ทำให้เกิด false positive ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้วิธี real time PCR ในการอ่านผล วิธีนี้สามารถวัดแสดงออกมาเป็นจำนวน cycle ที่จะถึงค่าเริ่มต้นของสัญญานที่จะตรวจวัดได้ (Threshold) ที่สามารถแปลงมาเป็นปริมาณของ ปริมาณ PCR product หรือ oligonucleotide PCR product ซึ่งก็เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนคือสารพิษของเชื้อนั่นเอง จะทำให้เพิ่มความไวในการตรวจวัดนั่นเอง (Niemeyer *et.al.*,2005) การพัฒนาวิธี real time PCR ในการตรวจเชื้อ *C. botulinum* วิธีนี้สามารถตรวจหาชนิดและปริมาณเชื้อ ในแต่ละ cycle ของ PCR โดยการทำ standard curve ระหว่าง จำนวน cycle ที่ถึงค่า Threshold ที่สามารถที่จะ ตรวจวัดสัญญาน โดยจะใช้ probe ที่เครือบด้วยสารเรืองแสง หรือจะใช้ SYBR Green กับจำนวน copied number ของเชื้อ และยังสามารถตรวจชนิดของเชื้อ C. botulinum type A ในแต่ละ cycle ของ PCR โดยดูจาก melting profile ของ *C. botulinum* type A จะแยกที่อุณหภูมิ 71.35°C แยกจาก internal

amplify control ที่อุณหภูมิ 83.58°C วิธีนี้มี specificity และ detection limit $6x10^1$ copy number ของเชื้อ C. botulinum type A (Fenicia *et.al.*,2007) บางวิจัย พบ ความไว sensitivity วิธี real time PCR ในการตรวจเชื้อ *C. botulinum* ประมาณ $10\text{-}10^2$ cell โดยทั่วไป เชื้อ *C. botulinum* จะปนอยู่ในสิ่งส่งตรวจประมาณ 10- 1000 spore/kg วิธี PCR ที่ใช้จะเกิด fasle positive จาก silent toxin gene ที่แฝงอยู่ใน strain ของเชื้อ *C. botulinum* และจะเกิด false negative ได้จาก การเปลี่ยนแปลงของยีนส์ บริเวณ primer annealing (Lindstrom and Korkeala,2006)

Genetic characterization of *Clostridium botulinum*

Molecular typing เชื้อ *Clostridium botulinum* ได้มีการพัฒนาในการระบุชนิดของเชื้อลงได้ในระดับ strain เนื่องจากหลายวิธีสามารถทำได้กับ DNA ทั้งเส้นจึงมีอำนาจในการแยก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อที่มีความใกล้เคียงกันสูง ใช้ในการศึกษาในแง่ระบาดวิทยาได้ วิธี Pluse field gel electrophoresis เป็นวิธีที่ใช้ restriction emzyme หลายชนิด ในการตัดเส้น DNA ทั้งเส้น แล้วนำมาแยก โดยวิธี gel electrophoresis โดยปล่อยกระแสไฟฟ้าเป็น 3 ทิศทาง จึงมีประสิทธิภาพสูงในการแยก DNA fragment โดยเฉพาะที่มีขนาดใหญ่ ทำให้ได้ restriction digest pattern ที่มีอำนาจในการแยกแยะสูง ปัญหาที่เกิดขึ้นเนื่องจาก DNA ถูกทำลาย โดย enzyme DNAse จึงต้องป้องกันไม่ให้ DNA ถูกทำลาย โดยใช้ สาร formaldehyde เพื่อตรึงเซลล์ ก่อนการสลายเซลล์และแยก DNA ออกมา วิธีนี้สามารถใช้ศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* group I และ group II มี reproducibility ใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน มีประโยชน์ในแง่ระบาดวิทยา และใช้เปรียบเทียบเชื้อที่แยกจากคลีนิค (clinical isolate) (Lindstrom and Korkeala,2006;Hielm*et.al*,1998) วิธี ribotyping เป็นวิธีที่ใช้ ribosomal RNA probe ไป hybridise กับ ribosomal DNA gene ซึ่ง gene ส่วนนี้ถูก restriction enzyme ตัดเป็น fragment ดังนั้น restriction digest pattern ที่เกิดขึ้น ที่แสดงถึงแถบของแบน แสดงถึงจำนวนของ ribosomal RNA operon มีการใช้เอนไซม์ EcoI และ HindIII ในการตัด ribosomal DNA gene เป็น fragment จะได้ restriction digest pattern ผลปรากฏว่า restriction digest pattern ของการใช้เอนไซม์ EcoI จะมีอำนาจในการจำแนก (discrimitary index) ประมาณ 0.982 มากกว่าการใช้เอนไซม์ HindIII ที่มีอำนาจในการจำแนก (discrimitary index) ประมาณ 0.954 ซึ่งวิธีนี้จะใช้ในการระบุเชื้อ *Clostridium botulinum* ในระดับ group แยก *Clostridium botulinum* group I จาก group II ได้ดีและยังสามารถแยกในระดับ species ได้ดี โดยเทียบกับ reference strains จากการสร้าง dendogram โดยวิธี numerical classification วิธีนี้ใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน มี reproducibility อยู่ในระดับปานกลาง (Hielm et.al.,1999) วิธี AFLP เป็นวิธีที่ใช้ restriction enzyme 2 ชนิด ในการตัดชิ้นส่วน DNA ทั้งเส้นของเชื้อ *Clostridium botulinum* จากนั้นจะใช้ adapter ไปเชื่อมต่อบริเวณยีนส์ที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ และเลือกใช้คู่ของ primer ไป amplify ยีนส์ส่วนระหว่าง adapter นั้น ชิ้นส่วน PCR product ที่เกิดขึ้นจะมีความจำเพาะ ทำให้ restriction digest pattern ที่มี reproducibility สูงมาก เกิด dendogram ที่มีอำนาจในการจำแนกได้ดี AFLP สามารถที่จะใช้จำแนก *Clostridium botulinum* ในระดับ group I และ group II ได้ดี โดยใช้เอนไซม์ HindII และHpyCH4IV และสามารถระบุชนิด serotype ได้ด้วย

โดยมี group cut off line ที่ 10 % similarity และ serotype cut-off line ที่ 89% similarity วิธีที่จึงเป็นวิธีที่เหมาะสม ในระดับ group และ strain level (Timonen *et.al.*,2005) RAPD เป็นการใช้ universal primer ในการ random amplify DNA ทั้งเส้นของเชื้อ ภายใต้สภาวะ low stringency conditions วิธีนี้จะมีความสามารถจำแนกเชื้อที่อยู่ใน *Clostridium botulinum* group I ได้ดี แต่มี reproducibility ต่ำ จึงเป็นการยากที่จะเปรียบเทียบผลในต่างห้องปฏิบัติการกัน เป็นวิธีที่ง่ายใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน (Lindstrom and Korkeala,2006) REP-PCR เป็นวิธี ใช้ primer ไป amplify ส่วน interspersed noncoding repetitive DNA sequence มีความจำเพาะเจาะจงได้ restriction pattern ที่มีอำนาจการจำแนก (discrimitary index) ที่สูง มี reproducibility ปานกลาง ใช้แยกในระดับ species ระดับ toxinotype หรืออาจแยกลงไปในระดับ strain ใช้เวลาประมาณ 2 วัน ใช้ได้ดีกับ gram negative bactetia (Patrizia and Mastrantonio,2003) Real time PCR เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณของเชื้อ โดยหาความสัมพันธ์ระหว่าง Log genome copies กับ Threshold cycle number ถ้าปริมาณ genome copies ของเชื้อมาก จะใช้ Threshold cycle number ต่ำ ที่ทำให้ตรวจจับสัญญานเริ่มแรก หมายถึง ค่า Threshold value ในทางตรงข้าม ถ้าปริมาณ ถ้าปริมาณ genome copies ของเชื้อน้อย จะใช้ Threshold cycle number สูง ที่ทำให้ตรวจจับสัญญานเริ่มแรก หมายถึง ค่า Threshold value เมื่อทำ standard curve แล้ว นำตัวอย่างอาหารมาวิเคราะห์ โดยวิธี Real time PCR อ่านค่า Threshold cycle number ที่ทำให้ตรวจจับสัญญานเริ่มแรก หมายถึง ค่า Threshold value ไปเทียบกับ standard curve จะทำให้ได้ genome copies ออกมา จากนี้ ก็ไปเทียบกับ standard ที่หาความสัมพันธ์ระหว่าง genome copies และ cfu/g โดยใช้วิธี Real time PCR วิธีนี้จะเพิ่มความไว (sensitivity) หรือมี detection limit $6x10^1$ genome copies ของเชื้อได้ดี ให้ specificity ที่สูงมาก (Fenicia *et.al.*,2007) วิธี DNA microarray เป็นวิธีที่ใช้หลักการของ DNA hybridization ในการออกแบบ probe ที่จำเพาะเจาะจง สำหรับแต่ละ toxinotype ของเชื้อ *Clostridium botulinum* และสามารถออกแบบ probe ให้จำเพาะเจาะจง สำหรับ subtype ของ toxinotype A probe จะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และจะ hybridized กับ target gene ของแต่ละ toxinotype และ subtype ของเชื้อ *Clostridium botulinum* วิธีนี้มีประโยชน์โดยเฉพาะในด้านการระบาดของเชื้อ ในแหล่งต่างต่างทั่วโลก แสดงถึงการแพร่ระบาดของเชื้อในสเตรนต่างต่าง แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *Clostridium botulinum* เพื่อประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรค botulism (Raphael *et.al.*,2010) วิธี DGGE มีหลักการในการใช้ primer จะเป็น specific primer สำหรับ Clostridium species หรือ specific primer สำหรับ functional gene ของเชื้อ ในการ amplify ยีนส์เป้าหมาย ที่มีความยาวประมาณไม่เกิน 500 bp. จากนั้นเตรียมเจลที่ใส่สาร denaturant ได้แก่ urea และ formamide ในความเข้มเข้นเป็น gradient จากน้อยไปมาก ชิ้นส่วน PCR products ของเชื้อแต่ละชนิด หรือแต่ละ toxinotype ที่มี % similality ของ nucleotide sequence ที่ต่างกัน DNA จะมีการสลายตัว ณ ตำแหน่งที่ต่างกันบน gradient ทำให้สามารถระบุเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการได้ โดย Hung และคณะ ในปี 2008 ได้เปรียบเทียบการใช้ 16SrDNA universal primer กับการใช้ Clostridium specific primer ในการ amplify เป้าหมายจาก DNA ที่สกัดมาจากถังหมักก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้วิธี

๑ TP
ฉบับ
.๒๖
ร๑๗๕๕
๑๐ พ.ค. 2554
1.5462496 C3
สำนักหอสมุด

DGGE ปรากฏว่าถ้าใช้ 16SrDNA universal primer ไม่สามารถแยกเชื้อ *Clostridium butyricum* ออกจาก *C. pasteuriarum* แต่ถ้าใช้ Clostridium specific primer จะสามารถแยกเชื้อทั้งสองออกจากกันได้ เนื่อง Clostridium specific primer จะเกาะกับยีนส์เป้าหมายที่มี variation บริเวณที่มีความแตกต่างกันของของเชื้อทั้ง 2 ชนิดประมาณ 6 bp. ทำให้มีอำนาจในการจำแนกสูง สิ่งที่ค้นพบตามมาคือ *Clostridium butyricum* จะเห็นปรากฏเป็น 2 แบน เป็นปัญหาในการเทียบเคียงหรือระบุเชื้อโดยวิธี DGGE ทั้งนี้เนื่องจากมี variation ของยีนส์ ใน copies number ของเชื้อ Clostridium species (Hung et. al.,2008) ในช่วงปี ค.ศ. 1997 เทคนิค Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ได้รับการยอมรับเพื่อใช้ในงานวิจัยทางด้านการแพทย์ เพื่อตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ (mutation) ของดีเอนเอ รวมถึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphisms) ของมนุษย์ ต่อมามีการประยุกต์ใช้เทคนิค DHPLC ในการแยกความแตกต่างของ PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของชิ้นยีนเป้าหมาย เพื่อศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ (Barlann, *et al.*, 2005; Le Maréchal, *el at.*, 2001) การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DHPLC เช่น *C. botulinum* และ *Yersinia pestis* (Hurtle, *el at.*, 2003) จากการศึกษาของ Franciosa และคณะ รายงานการตรวจวิเคราะห์ *C. botulinum* ด้วยเทคนิค DHPLC โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบตามลำดับดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณอนุรักษ์สูง (highly conserved region) ของยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษโบทูลินุม (botulinum neurotoxin) ชนิด เอ บี อี และเอฟ และใช้ยีน 16S rDNA เพื่อเพิ่มจำนวนของ PCR products ของยีนดังกล่าว จากผลการทดลอง สารพิษโบทูลินุมที่ผลิตจากเชื้อ *C. botulinum* ชนิดเดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์ (different strain) จะให้รูปแบบของ peak หรือ DHPLC profiles ของยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษโบทูลินุมเหมือนกัน ในขณะที่สารพิษโบทูลินุมที่ผลิตจากเชื้อแตกต่างชนิดกัน จะให้รูปแบบของ peak ของยีนดังกล่าวต่างกัน และเมื่อเทียบกับ *C. butyricum* และ *C. baratii* ที่สร้างสารพิษ neurotoxin พบว่า รูปแบบของ peak ของยีนที่สร้างสารพิษ neurotoxin แตกต่างจากสารพิษโบทูลินุมของ *C. botulinum* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในส่วนผลการทดลองโดยใช้ยีน 16S rDNA พบว่า *Clostridium* ทั้ง 3 สปีชีส์ให้รูปแบบ peak แตกต่างกัน และเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่น ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* และ *Shigella dysenteriae* พบว่า ให้รูปแบบ peak ของยีน 16S rDNA ที่แตกต่างกันทั้งหมด (Franciosa, *et al.*, 2004) ทั้งนี้การใช้เทคนิค DHPLC มีความจำเพาะต่อการตรวจเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดสูง (high specificity) ซึ่งจากงานวิจัยหลายฉบับที่มีการใช้เชื้อ *C. perfringens* เป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ผลจากการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ไม่เพียงแต่เฉพาะรูปแบบของ peak ของยีนเป้าหมายเท่านั้นที่ใช้ในการจัดจำแนกหรือระบุชนิดของแบคทีเรีย ค่า retention time ของ peak ของยีนเป้าหมายที่แตกต่างกันของแบคทีเรียต่างชนิด สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจ *C. perfringens* และแบคทีเรียชนิดอื่นในตัวอย่างที่สนใจ (Goldenberg, *et al.*, 2007)

เทคนิค DHPLC เป็นเทคนิคที่ผสมผสานระหว่างเทคนิค denaturing DNA กับ reverse phase HPLC โดยเทคนิค denaturing DNA เป็นเทคนิคที่อาศัยความร้อนเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ส่งผลให้ DNA สายคู่กลายเป็นสายเดี่ยว ส่วนเทคนิค reverse phase HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารที่อาศัยส่วนของ stationary phase ในคอลัมน์เป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว และส่วนของ mobile phase เป็นส่วนที่มีขั้ว เมื่อสารตัวอย่างมีความเป็นขั้วสูง จะถูกชะล้าง ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารที่มีขั้วน้อยกว่าหรือไม่มีขั้วเลย จึงสามารถแยกสารต่างๆ ออกจากกันได้ ส่วนเทคนิค DHPLC จะมีส่วนของ stationary phase ที่ประกอบไปด้วยอนุภาค alkylated nonporous poly(styrene-divinylbenzene) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 ไมครอน เป็นอนุภาคที่ไม่มีขั้วและมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ส่วน mobile phase ที่ใช้ ได้แก่

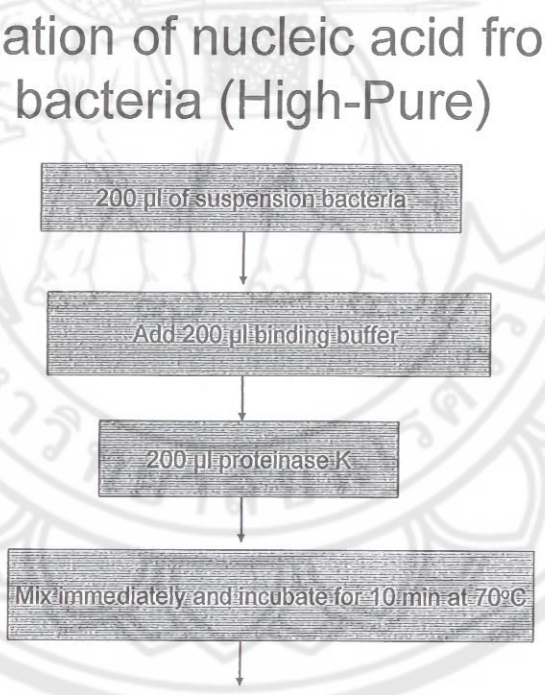
Buffer A ประกอบด้วย 0.1M triethylammoniam acetate (TEAA) ในน้ำบริสุทธิ์ ใช้ในการปรับปริมาตรการไหลเข้าของ buffer B สู่ระบบ

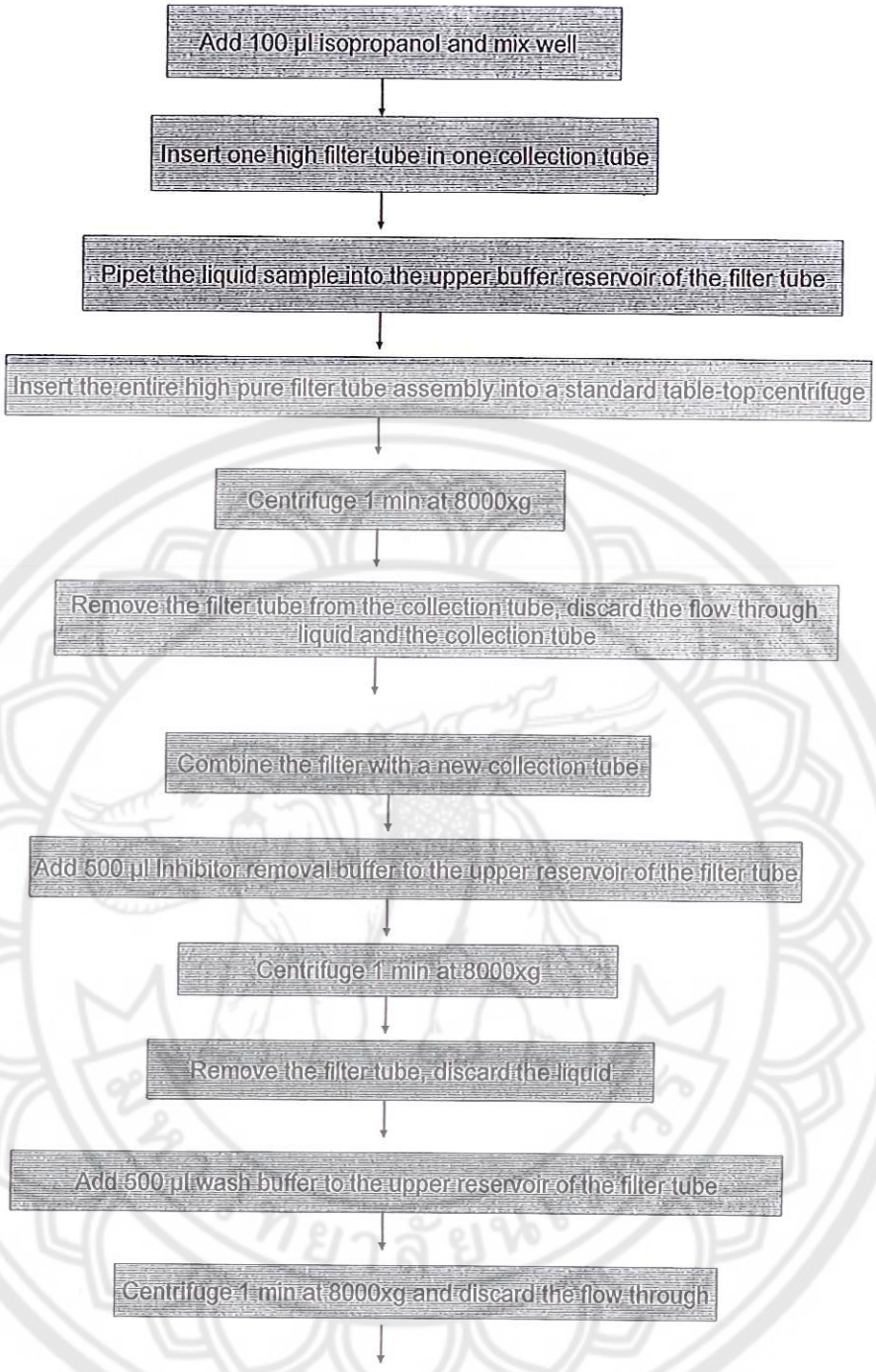
Buffer B ประกอบด้วย 0.1M TEAA กับ acetonitrile (ปริมาตรสุดท้าย 25%) หน้าที่ของ TEAA นั้นจะเป็นตัวกลางในการจับ DNA ไว้กับส่วนของ stationary phase ไว้ ซึ่งเรียกคุณสมบัตินี้ว่า ion-pairing reagent โดยประจุบวกบนหมู่ ammonium ในโมเลกุลของ TEAA จะจับกับประจุลบของหมู่ phosphate ในสาย DNA ในขณะเดียวกันด้วนที่มี alkyl chain จะไปจับ (interact) กับส่วนที่เป็น hydrophobic บนผิวหน้าของ stationary phase เมื่อมีปริมาณการไหลเข้าของ buffer B น้อย ปริมาณ acetonitile ในระบบก็จะน้อยตามไปด้วย แรงผลักของประจุลบที่เกิดจากโมเลกุลของ acetonitrile ต่อการผลักประจุลบด้วยกันเองของ DNA ก็จะน้อย จนไม่สามารถทำลายแรงจับระหว่าง TEAA กับ DNA ทำให้ DNA จึงยังคงติด (adsorb) อยู่ในส่วนของ stationary แต่เมื่อมีการค่อยๆเพิ่มปริมาณการไหลเข้าของ buffer B ในระบบ หรือ increasing gradient ของ Buffer B ซึ่งหมายถึงปริมาณของ acetonitrile ที่เพิ่มขึ้น ทำให้แรงผลักของประจุลบในโมเลกุลของ acetonitrile มากขึ้น จนความเข้มข้นของ acetonitile ถึงจุดๆหนึ่งซึ่งแรงประจุลบของ acetonitile มีแรงผลักมากกว่าแรงจับของ DNA กับ TEAA เป็นผลทำให้ DNA หลุดออกมาจากส่วนของ stationary phase และถูกชะออกจากคอลัมน์ในที่สุด ปัจจัยอีกปัจจัยหนึ่งที่ถือได้ว่ามีบทบาทที่สำคัญที่สุดในวิเคราะห์สาย DNA โดยเทคนิค DHPLC คืออุณหภูมิ ที่อยู่ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิจะมีผลต่อโครงสร้างของ DNA ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณ CG content ในสาย DNA ซึ่งจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของสายพันธุ์หรือสปีชีส์ อุณหภูมิจะไปมีผลทำให้โครงสร้าง DNA เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะ DNA ที่มี GC content ต่ำ จะมีความเสถียร (stable) น้อยกว่า ทำให้โครงสร้าง DNA เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้แรงจับระหว่าง DNA กับ TEAA มีน้อยกว่า สาย DNA ที่มี GC content สูงกว่า เป็นผลทำให้ DNA สายที่มี GC content น้อยกว่าถูกชะออกมาก่อน ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสายของ DNA ที่มาจากต่างสายพันธุ์กันโดยวิธี DHPLC คือปริมาณของ acetonitile ในระบบและอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ DNA ที่สนใจ (Sivakumaran *et.al.*, 2003)

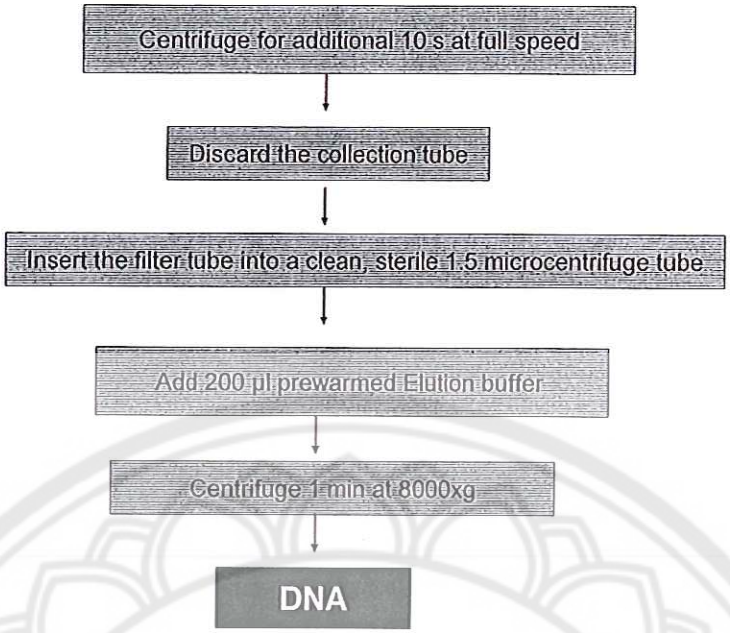
วิธีทาง Molecular ที่ได้พัฒนามาทั้งหมดเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ และสารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *Clostridium botulinum* ใช้เป็น screening test และ surveillance ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรค อย่างไรก็ตามเมื่อมีผู้ป่วยขึ้นจำเป็นที่จะต้องทำการแยกเชื้อ และระบุชนิดของเชื้อ รวมถึง สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น โดยวิธีมาตรฐาน mouse bioassay (Lindstrom and Korkeala,2006)

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1.หาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด DNA เชื้อเทียบเคียงเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในอาหาร EY agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เวลา 24 ช.ม. ในสภาวะไร้ออกซิเจน เจือจางเชื้อโดยใช้ normal saline จนได้ความขุ่น 1 Mc Farland standard นำมา จากนั้นนำปริมาณเชื้อที่ได้ 200 µl มาสกัด DNA ตาม โดยใช้ชุดสกัดของ High pure PCR template kit (Roche, UK) ตามแผนผังการทดลองดังนี้




Add 100 µl isopropanol and mix well
Insert one high filter tube in one collection tube
Pipet the liquid sample into the upper buffer reservoir of the filter tube
Insert the entire high pure filter tube assembly into a standard table-top centrifuge
Centrifuge 1 min at 8000xg
Remove the filter tube from the collection tube, discard the flow through liquid and the collection tube
Combine the filter with a new collection tube
Add 500 µl Inhibitor removal buffer to the upper reservoir of the filter tube
Centrifuge 1 min at 8000xg
Remove the filter tube, discard the liquid
Add 500 µl wash buffer to the upper reservoir of the filter tube
Centrifuge 1 min at 8000xg and discard the flow through



2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน ยีนส์ botulinum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้คู่ primer แสดงลำดับของ primer sequence ดังตารางที่ 1 โดยทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมของ PCR reaction mix ประกอบด้วย PCR buffer, dNTP, primer each และ Taq DNA polymerase ทำการ amplification ด้วยโปรแกรม pre-denaturation , รอบ ของ denaturation annealing extension และ final extension นำPCR products ที่ได้มาย้อมด้วย ethidium bromide ภายใต้ UV illumination บันทึกภาพภายใต้กล้อง Biorad-gel documentation

ตารางที่ 1 Primer ที่ใช้ในการตรวจยีนส์ botulinum โดยวิธี PCR (Face et.al.,1995)

Primer name	Sequences (5' to 3')	Target gene	Reference
P260	C(C/A)(G/A)(G/A)(T/A)(T/A)(T/A)TTTAAA(G/A)GA(G/T)TTT TGGGG	Botulinum toxin gene	Fach et al
Pr265*	GGGCCTAGAGGTAGCGTAA	Botulinum toxin gene	Fach et al

* ติด GC clamp ด้วยลำดับเบสดังต่อไปนี้ที่ด้าน 5' ของไพร์เมอร์ดังกล่าว [cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcc]

3. หาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ DGGEในการระบุ เพื่อแยกยีนส์ botulinum ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B. ออกจากกัน โดยใช้เครื่อง DCode TM Universal Mutation Detection System (BioRad,USA) ตามวิธี Muzer et.al.,1993 โดยเตรียม polyacrylamide gel ที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสาร denaturant จาก 40-70 % ทำการแยก PCR products ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ขนาด 150 bp โดยวิธี electrophoresis ใน 1xTAE buffer ย้อมเจลโดย SYBR green ส่องภายใต้ UV

4. เตรียมเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 , 10^7, 10^6, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml ใส่เชื้อปริมาณ 5 ml ในแต่ละความเจือจางลงในหน่อไม้อัดปี๊บที่บด 25 g ที่มี glycerol 20 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำ 1 ml ในส่วนตะกอน มาปั่นเหวี่ยงต่อที่ 13000 รอบ/นาที ตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 200 □l นำมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดของ High pure PCR template kit (Roche, UK)

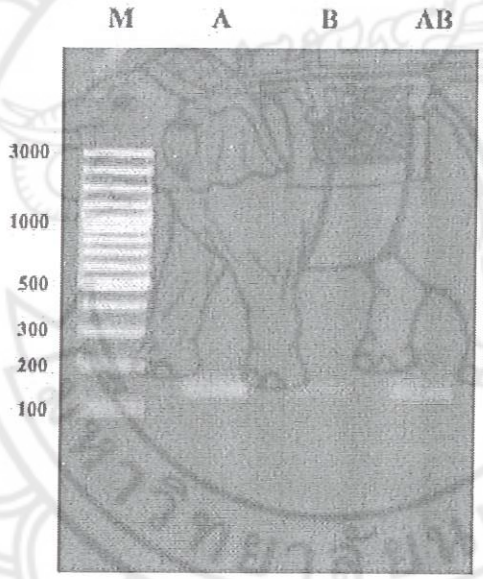
5. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน ยีนส์ botulinum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในหน่อไม้อัดปี๊บโดยใช้คู่ primer แสดงลำดับของ primer sequence ดังตารางที่ 1โดยทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมของ PCR reaction mix ประกอบด้วย PCR buffer, dNTP, primer each และ Taq DNA polymerase ทำการ amplification ด้วยโปรแกรม pre-denaturation , รอบ ของ denaturation annealing extension และ final extension นำPCR products ที่ได้มาย้อมด้วย ethidium bromide ภายใต้ UV illumination บันทึกภาพภายใต้กล้อง Biorad-gel documentation

6. หาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ DGGEในการระบุ เพื่อแยกยีนส์ botulinum ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในหน่อไม้อัดปี๊บ. ออกจากกัน โดยทำใน PCR product ที่มีปริมาณเชื้อในหน่อไม้ 10^8 , 10^7, 10^6, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml โดยใช้เครื่อง DCode TM Universal Mutation Detection System (BioRad,USA) ตามวิธี Muzer et.al.,1993โดยเตรียม polyacrylamide gel ที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสาร denaturant จาก 40-70 % ทำการแยก PCR products ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ขนาด 150 bp โดยวิธี electrophoresis ใน 1xTAE buffer ย้อมเจลโดย SYBR green ส่องภายใต้ UV

ผลและวิจารณ์ผล

1. ได้ DNA เชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B

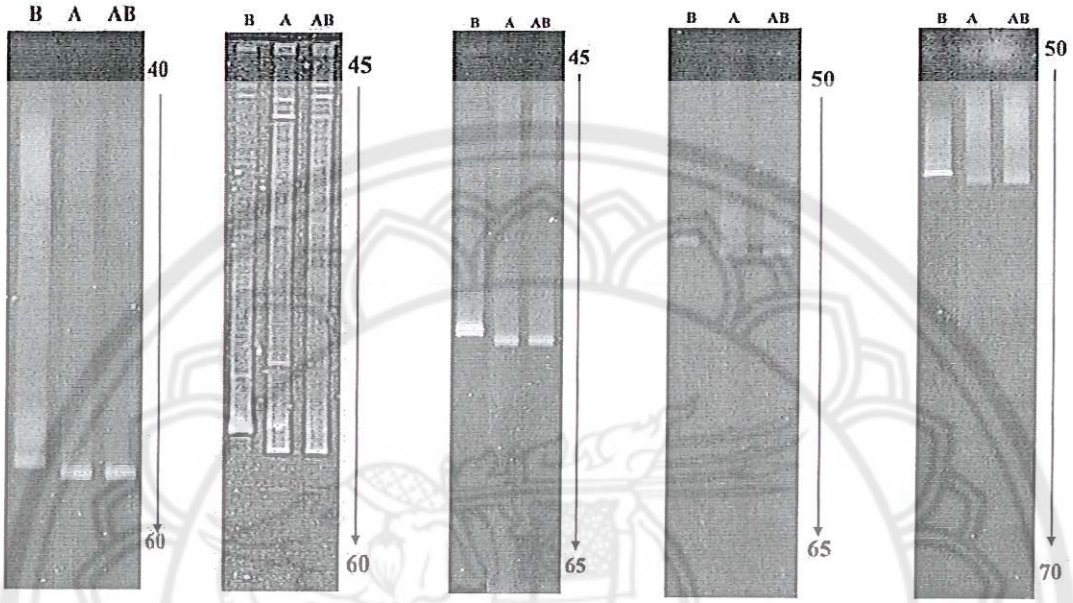
2. DNA เชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกริยา PCR โดยการเพิ่มจำนวนยีนส์ที่จำเพาะ botulinum โดยใช้ forward primer และ reverse primer P260 และ Pr265* (Face *et.al.*,1995) โดยได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ PCR reaction mix ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 1 uM primer each และ 0.04U Taq DNA polymerase และ DNA template 2-5 □l. ทำการ amplification ด้วยโปรแกรม pre-denaturation 95°C 3นาที, 45 รอบ ของ denaturation 95°C 1 นาที annealing 45°C 40 วินาที extension 72°C 5 นาที และ final extension 72°C 5 นาที ได้ผล PCR product ขนาด 150 bp ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B แสดงในรูปที่ 1



ภาพที่ 1 แสดง PCR product ของแต่ละ toxinotype ด้วยไพร์เมอร์ P260 และ Pr265

3. PCR-DGGE ของยีน botulinum(BoNT)จาก *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B จากการทดลองใช้ความเข้มข้นของ denaturant ในแต่ละช่วง gradient ได้แก่ 40-60%, 45-60%, 45-65%, 50-65%, และ 50-70% พบว่าที่ความเข้มข้นของ denaturant ในช่วง gradient 40-60%,45-60%, 45-65%, 50-65%, และ 50-70% สามารถแยกความแตกต่างของ toxinotype B ออกจาก A (ภาพที่ 3) และที่ช่วง gradient 45-65% มีความเหมาะสมที่สุดในการแยกความแตกต่างดังกล่าว คือ ความแตกต่างของ toxinotype B ออกจาก A เนื่องจากหน่อไม้อัดปี๊บมีการปนเปื้อนเชื้อเดียว ดังนั้น PCR product จึงเป็นของ toxinotype เดียว ความแตกต่างทาง genotype ของเชื้อทั้ง 2 toxinotye จะให้ค่า T_m ที่แตกต่างกัน จึงสามารถหยุดการเคลื่อนที่ที่จุดที่มีความเข้มข้นที่ต่างกันบนเจล DGGE(ภาพที่ 4)() อย่างไรก็ตามวิธี PCR-DGGE นี้ ไม่สามารถแยก

ความแตกต่างระหว่าง toxinotype A ผสม B ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อมี 2 toxinotypes ปนกันสภาพของ PCR product จะมี homoduplex ของทั้งสอง toxinotype ถ้าทั้งสอง toxinotype มีการต่างของเบสคู่สม จาก A-T เป็น T-A หรือ G-C เป็น C-G จะทำให้ค่า T_m แตกต่างกันน้อยมาก ณ T_m ที่แยกได้จากหน่อไม้อัดปี๊บที่มีเชื้อ toxinotype เดียว จะไม่สามารถแยกได้ในเชื้อสอง toxinotypeที่มีความใกล้เคียงกัน ปนกันได้ (Gudran *et.al.*,2007)



ภาพที่ 3 แสดง DGGE ในการแยกความแตกต่างของ *C. botulinum* type A, B และ AB ที่สภาวะต่างๆ

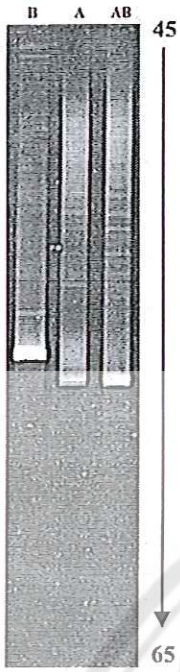
ภาพที่ 4 DGGE ในการแยกความแตกต่างของ *C. botulinum* type A, B และ typeA ผสม type B

4. ได้ DNA เชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในหน่อไม้อัดปี๊บที่ มีปริมาณเชื้อ 10^8 , 10^7, 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml

5. DNA เชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B ในหน่อไม้อัดปี๊บที่ มีปริมาณเชื้อ 10^8 , 10^7, 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml

ใช้ เป็นแม่พิมพ์ในการทำหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกริยา PCR โดยการเพิ่มจำนวนยีนส์ที่จำเพาะ botulinum โดยใช้ forward primer และ reverse primer P260 และ Pr265* (Face *et.al.*,1995) โดยได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ PCR reaction mix ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 1 uM primer each และ 0.04U Taq DNA polymerase และ DNA template 2-5 □l. ทำการ amplification ด้วยโปรแกรม pre-denaturation 95^0C 3นาที, 45 รอบ ของ denaturation 95^0C 1 นาที annealing 45^0C 40 วินาที extension 72^0C 5 นาที และ final extension 72^0C 5 นาที ได้ผล PCR product ขนาด 150 bp ของเชื้อ *C.botulinum* type A, *C.botulinum* type B และ *C.botulinum* type A ผสม type B

6. นำ PCR products ที่ได้จากหน่อไม้อัดปี๊บ ที่ มีปริมาณเชื้อ 10^8 , 10^7, 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2, 10^1 cfu/ml มาทำ PCR-DGGE พบว่า PCR-DGGE สามารถแยกความแตกต่างของ toxinotype B ออกจาก A (ภาพที่ 5) และที่ช่วง gradient 45-65% มีความเหมาะสมที่สุดในการแยกความแตกต่างดังกล่าว (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตามวิธี PCR-DGGE นี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง toxinotype A ผสม B ได้ ทั้งอาจเป็นเพราะเมื่อมี 2 toxinotypes ปนกันสภาพของ PCR product จะมี homoduplex ของทั้งสอง toxinotype ถ้าทั้งสอง toxinotype มีการต่างของเบสคู่สม จาก A-T เป็น T-A หรือ G-C เป็น C-G จะทำให้ค่า T_m แตกต่างกันน้อยมาก ณ T_m ที่แยกได้จากหน่อไม้อัดปี๊บที่มีเชื้อ toxinotype เดียว จะไม่สามารถแยกได้ในเชื้อสอง toxinotypeที่มีความใกล้เคียงกัน ปนกันได้ (Gudran *et.al.*,2007) และสามารถตรวจพบเชื้อ *C. botulinum* type A, B และ *C. botulinum* A ผสม B ที่ปลูกเชื้อลงในหน่อไม้ดอง ได้ในความเข้มข้น 10^8 CFU/ml เท่านั้น ซึ่งเท่ากับปริมาณเซลล์ 4 x10^6 cfu/ml สอดคล้องกับการรายงานของ Danito (2004) ค่า detection limit ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในระดับ สปีชีย์โดยสกัด DNA โดยตรงจากอาหารประมาณ 10^4-10^8 cfu/g (ภาพที่ 5)



สรุปผลการทดลอง

วิธี DGGE สกัด DNA จากหน่อไม้โดยตรง เพิ่มจำนวนยีนส์ botulinum สามารถตรวจพบ *Clostridium botulinum* type A หรือ type B ปนอยู่ในปริมาณอย่างต่ำ 10^6 cfu/g ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 2 วัน สามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรอง การปนเปื้อนของเชื้อ *Clostridium botulinum* type A หรือ type B อย่างเร็วในหน่อไม้อัดปี๊บ

เอกสารอ้างอิง

นรัศรา เต็มกุศลวงศ์ .(2533). **มาตรฐานหน่อไม้ในภาชนะบรรจุ** สำนักบริการมาตรฐาน 3 สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

ไพรินทร์ บุญกระจ่าง. (2546) **สาเหตุการป่วยและการตายหลังการบริโภคหน่อไม้อัดปี๊บ ในอำเภอสมปราบ จังหวัด ลำปาง ปี พ.ศ. 2546**ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่

มยุรา กุสุม์ และ สุนันท์ จำรูญ. 2549. **การตรวจวินิจฉัยโรคอาหารเป็นที่มีสาเหตุจาก *Clostridium botulinum* ในห้องปฏิบัติการ**. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข

สมพร ภูติยานันต์. (2542). **การตรวจเอกลักษณ์ พืชสมุนไพร : ภาคพิเศษ**. โครงการพัฒนาตำรา สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

อุษามาส วังชัยสุนทร.2547.**คุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยาคืออะไร**.วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม.กรุงเทพฯ.

ณรงค์ นิยมวิทย์. (2531). **หน่อไม้และผลิตภัณฑ์จากหน่อไม้ตอน: ผลิตภัณฑ์จากหน่อไม้**. อาหาร. ปีที่ 18 ฉบับที่ 3 กรกาคม-กันยายน หน้า183-187.

Aguilera, M.O., Stagnitta, P.V., Micalizzi, B., and De Guzmán, A.M.S. (2005). Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. ***Anaerobe***, 11, 327-334.

Aksu, H., Bostan, K., and Ergün, Ö. (2000). Presence of *Bacillus cereus* in packaged some spices and herbs sold in Istanbul. ***Pakistan Journal of Biological Sciences***, 3, 710-712.

Austinard,J.W. and Sander,G.(2009). Detection of *Clostridium botulinum* and its toxin in suspect foods and clinical specimens. ***HPB Method*** MFHPB-16,1-10.

Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly. M.Z., and Moussa, L.A. (1998). Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. ***Botanical Bulletin of Academia Sinica***, 39, 279-285

Banerjee, M., and Sarkar, P.K. (2003). Microbiological quality of some retail spices in India. ***Food Research International***. 36, 469-474

Barlann, E.A., Sugimori, M., Furukawa, S., and Takeuchi, K. (2005). Profiling and monitoring populations by denaturing high-performance liquid chromatography. ***Journal of Microbiological Methods***, 61, 399-412.

Bossi,P.;Tegnell,A.;Van Loock,F.;Hendrik,J.,Werrer,A.;Maidhof,H. and Gouvros,G.(2004). Bichat guidelines for the clinical management of botulism and bioterrorism-related botulism.***Eurosurveillance***,9:1-5.

Burnett, S.L., and Beuchat, L.R. (2001). Food-borne pathogens: human pathogens associated with raw procuce and unpasteurized juices and difficulties in decontamination. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, 27, 107-110.

Cadieux,B.; Blarchfield,B.; Smith,J.P. and Austin,J.w.(2005). A rapid chemiluminescent slot blot immunoassay for the detection and quantification of Clostridium botulism neurotoxin type E in culture. ***International Journal of Food Microbiology***,101:9-16

Caya, J.G.; Agni,R.; Miller, J.E.(2004). *Clostridium botulinum* and the Clinical Laboratorian: A Detailed Review of Botulism, Including Biological Warfare Ramification of Botulinum Toxin, ***Archive of Pathology and Laboratory Medicine***,128:653-662.

Ceska,M; Effenberger,F and Gressmoller,F. (1978). Highly Sensitive Solid-Phase Radioimmunoassay suitable for determination of low amounts of Cholera toxin and Cholera toxin antibodies. ***Journal of Clinical Microbiology***, 7:209-213.

CDC report,2000: CDC report. From the center for Disease Control and Prevention. (2000). Foodborne botulism from eating home-pickled eggs-Illinois, 1997. JAMA : ***The Journal of the American Medicine***, 129:221-228.

Chiao,D-J.; Way,J-J; Tang,S-S.(2008). Monoclonal Antibody based Enzyme Immonoassay for detection Botulinum neurotoxin A. ***Hybridoma***,24:43-47.

De Jong, A.E.I., Eijhusen, G.P., Brouwer-Post, E.J.F., Grand, M., Johansson, T., Kärkkäinen, T., Marugg, J., Veld, P.H. in't, Warmerdam, F.H.M., Wörner, G. Zicavo, A., Romboutsa, F.M., and Beumera, R.R. (2003). Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods. ***Journal of Microbiological Methods***, 54, 359-366.

Dezfulian,M.; Hatheway,C.L; Yolken,R.H. and Bartlett,J.G.(1984). Enzyme-Linked Immonosorbent Assay for detection of *Clostridium botulinum* Type A and Type B toxin in stool samples of infants with Botulism. ***Journal of Clinical Microbiology***,20:378-383.

Doellgast,G.J.; Brand,G.A., Bottoms,J.D.; Cheng,T.,Roh,B.H.; Roman,M.G.; Hall,P.A. and Triscott,M.V.(1994). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Enzyme-Linked Coagulation Assay for detection of Clostridium botulinum Neurotoxin A,B, and E and Solution-Phase Complexs with Dual-Label Antibodies. ***Journal of Clinical Microbiology***,32:105-111.

Donia, M.A.A. (2008). Microbiological quality and aflatoxinogenesis of Egyptian spices and medicinal plants. ***Global Veterinaria*** , 2, 175-181

Face,P.,Gibert,M.,Griffais,R.,Guiliou,J.P. and Popoff,M.R. 1995. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A,B,E,F and G producing Clostridium spp. and evaluation in food samples. ***Appied and Environmental Microbiology*** ,61(1),389-392)

Fenicia,L.,Anniballi,F.,Medici,D.D.,Delibato,E. And Aureli,P.(2007). SYBR Green Real-Time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. ***Applied and Environmental Microbiology***,73:2891-2896.

Franciosa, G., Pourshaban, M., De Luca, A., Buccino, A. Dallapiccola, B., and Aureli, P. (2004). Identification of type A, B, E, and F botulinum neurotoxin genes and of botulinum neurotoxigenic clostridia by denaturing high-performance liquid chromatography. ***Applied and Environmental Microbiology***, 70, 4170-4176.

Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., Bereswill, S., and Göbel, U. (2007). Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatograpy. ***Journal of Microbiological Methods***, 68, 94-105.

Gudran,H.R., Jana,O.K. and Carl,T.W.(2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. ***Pharmacogenomics***, 8,597-608.

Hallis,B.; James,B.A.F. and Shone,C.C. (1996). Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidases activities, ***Journal of Cinical Microbiology***,34:1934-1938.

Hielm,S.; Hyytia,E.; Ridell,J.; Korkela,H. (1996) Detection of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. ***International Journal of Food Microbiology,*** 31:357-365

Hielm,S.,Bjorkrath,J.,Hyytia,E. and Korkeala,H.(1998). Genomic analysis of *Clostridium botulinum* Group II by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. ***Applied and Environmental Microbiology***,64:703-708.

Holdeman,L.V. and Moore,W.E.C. (1975). **Anaerobe Laboratory Manual Virginia Polytechnic Institute and State University**. Blacksburg, Virginia, 3rd.

Hung, C.H., Cheng, C.H., Cheng, L.H., Liang, C.M., and Lin, C.Y. (2008). Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. ***International Journal of Hydrogen Energy***, 33, 1586-1592.

Hurtle, W., Lindler, L., Fan, W., Shoemaker, D., Henchal, E., and Norwood, D. (2003). Detection and identification of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* by denaturing high-performance liquid chromatography. ***Journal of Clinical Microbiology***, 41, 3273–3283.

ICMSF.(1986).**Microorganisms in food 2**. Univ. of Toronto Press. Canada.

Klewitz,T; Gesster,F; Beer,H.;Pflanz,K. And Scheper,T. (2006). Immunochromatographic assay for determination of botulinum neurotoxin type D. ***Sensors and Actuator*** B,113:582-589.

Le Maréchal, C., Audrézet, M.P., Quéré, I., Raguénès, O., Langonné, S., and Férec, C. (2001). Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counseling. ***Human Genetics***, 108, 290-298.

Lindstromand,M and Korkeala,F. (2006). Laboratory Diagnostics of Botulism. ***Clinical Microbiology Reviews*** ,19 :298-314.

Lindstrom,M.,Keto R.,Markkula A.,Nevas,M.,Hielm,S. And Korkeala,H.(2001). Multiplex PCR assay for detection and identification of Clostridium botulinum type A,B,E and F in food and fecal material. ***Appl. Environ Microbiol,***67:5694-9.

Maneesri,J. and Masniyom,P.(2007). Induction and inhibition of film yeast from fermented bamboo by seasoning plants. ***Songklanakarin J. Sci, Technol.***,29:1135-1143.

Mclauchlin,J.; Grant,K.A. and Little C.L. (2006). Food-borne botulinum in the United Kingdom. ***Journal of Public Health***,20:337-342.

Morakotkarn,D.; Kawasaki H. and Seki T. (2006). Molecular diversity of bamboo associated fungi isolated from Japan. ***FEMS Microbial Lett***,266:10-19.

Nevas,M.(2006). ***Clostridium botulinum*** **in Honey production with respect to infant botulism.** Academic dissertation, Department of Food and Environmental Hygience, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki,Finland.

Identification of *Clostridium botulinum* type A and B in Fermented Bambo Shoots by DGGE and DHPLC

Rosarin Wongvilairat[1], Nitsara Boonkerd[1], Anusak Kerdsin[2], Tawatchai Sumpradit[1], Surang Dejsirilert[2] and Leelawadee Saengsuk[2]

[1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Thailand, [2]National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Bangkok, Thailand.

Corresponding author: Rosarinw@nu.ac.th

Background: Fermented bamboo shoots probably contain *Clostridium botulinum* type A and B producing neurotoxins that cause human to paralyze in the respiratory muscles and die. Culture dependent methods for detection and identification of *C. botulinum* type A and B are time consuming and the detection limits are high. Culture methods combined with PCR have been used to identify *C. botulinum* type A and B, however they are expensive and time consuming. Here, we investigate the application of DGGE and DHPLC in order to solve the disadvantage of culture dependent methods and culture methods combined with PCR for detection and identification *C. botulinum* type A and B in fermented bamboo shoots.

Objective: The aim of this study was to develop DGGE and DHPLC techniques to rapidly identify *C. botulinum* typeA and B from the genomic DNA of fermented bamboo shoots.

Methods: Inoculated samples (inoculated, fermented bamboo shoots) with *C. botulinum* type A and B, samples (fermented bamboo shoots or uninoculated samples) and *C. botulinum* type A and B (pure cultures) were analyzed in these experiments. Genomic DNA were extracted using high pure DNA extraction kit (Biogenomed). DNA from all kinds of samples were amplified with primers spanning the V1-V2 regions of 16SrDNA under the specific conditions. PCR products were subjected to and analyzed in both DGGE and DHPLC under the specific conditions.

Results: DGGE results showed a similar four band pattern of *C. botulinum* type A and B (pure cultures), while the four-band pattern of *C. botulinum* type A and B from inoculated samples could not be visualized at the lower part of the DGGE gel. DGGE method using V1-V2 primer could not be differentiated *C. botulinum* type A and B in both pure cultures and inoculated, fermented bamboo shoots. DHPLC results showed that the DHPLC profiles of *C. botulinum* type A and B from inoculated samples and uninoculated sample had the same patterns. The pure cultures of *C. botulinum* type A and B showed difference DHPLC profiles, therefore DHPLC method using V1-V2 primer set could be used to identify and differentiated *C. botulinum* type A and B in pure cultures.

Conclution It was found that only DHPLC technique could successfully distinguish *C. botulinum* type A and B in pure cultures under the optimized condition. Our data showed that the DGGE and DHPLC profile could not identify *C. botulinum* type A and B in fermented bamboo shoots which could be due to competition with indigenous microflora in fermented bamboo shoots. Therefore, Clostridium-specific primer set should be developed to amplify only *C. botulinum* type A and B which then could be reliable for the identification of *C. botulinum* type A and B in fermented bamboo shoots by DGGE and DHPLC.

Key Words: *Clostridium botulinum*, DGGE, DHPLC