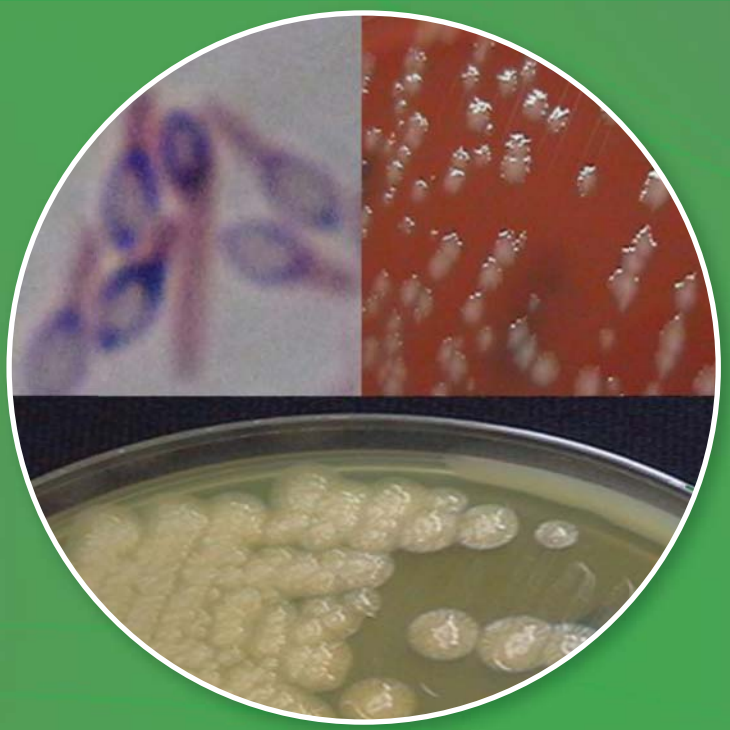
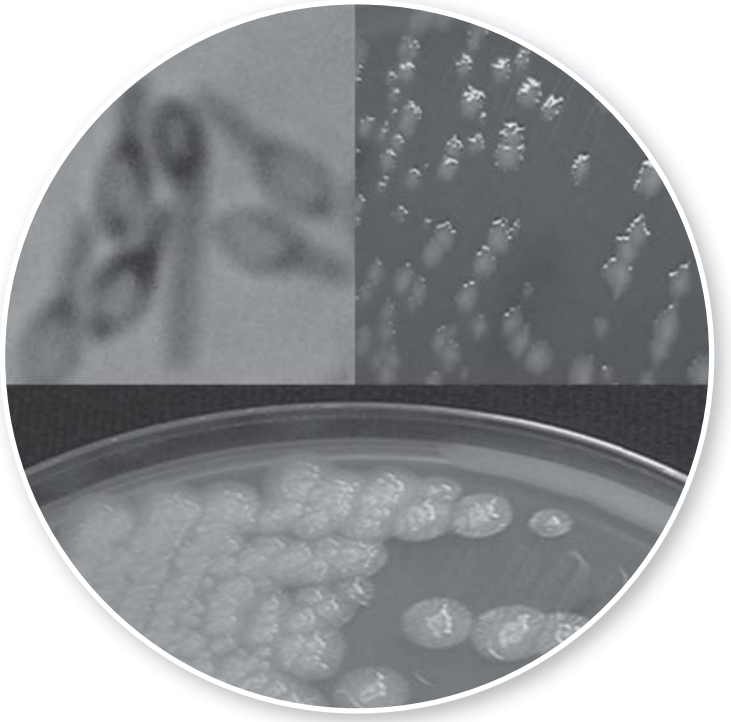
คู่มือการตรวจวินิจฉัยเชื้อ
Clostridium botulinum
ในห้องปฏิบัติการ



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

คู่มือการตรวจวินิจฉัยเชื้อ
Clostridium botulinum
ในห้องปฏิบัติการ



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

คู่มือการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Clostridium botulinum* ในห้องปฏิบัติการ

ISBN 978-616-11-2534-9

ผู้เรียบเรียง **ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์, ชุติมา จิตตประสาทศีล, ธนิตชัย คำแถลง**

สงวนลิขสิทธิ์

จัดพิมพ์โดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
โทรศัพท์ 0 2951 0000 ต่อ 99403 โทรสาร 0 2951 5449
www.dmsc.moph.go.th

พิมพ์ครั้งที่ 1 มิถุนายน 2558

จำนวน 1,000 เล่ม

พิมพ์ที่ บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด
158/3 ซอยยาสูบ 1 ถนนวิภาวดีรังสิต แขวงจอมพล เขตจตุจักร
กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 0 2617 8611-2 โทรสาร 0 2617 8616

คำนำ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ทำหน้าที่เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ของประเทศ โดยมีภารกิจที่สำคัญคือ การตรวจวินิจฉัยและยืนยันการระบาดของโรค การจัดทำคู่มือการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Clostridium botulinum* ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจให้กับนักระบาดวิทยา แพทย์ นักเทคนิคการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ ได้ทราบถึงคุณสมบัติของเชื้อ *C. botulinum* วิธีการเก็บตัวอย่าง การนำส่งตัวอย่างที่ถูกต้องให้กับห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์การทดสอบหาสารพิษ Botulinum neurotoxin ในหนูทดลอง และการเพาะหาเชื้อ *C. botulinum* อีกทั้งวิธีการตรวจหายีนที่สร้างสารพิษของ *C. botulinum* ชนิดต่างๆ โดยวิธี Multiplex PCR

การจัดทำคู่มือการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *C. botulinum* ในห้องปฏิบัติการเล่มนี้ เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจแก่ผู้ใช้งานหรือบุคลากรที่เกี่ยวข้อง และหวังว่าหนังสือเล่มนี้จะช่วยส่งเสริมให้บุคลากรได้รับความรู้และเป็นประโยชน์นำไปสู่การปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง

(นายสมชาย แสงกิจพร)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

สารบัญ

	หน้า
คำนำจากผู้อำนวยการสถาบัน	III
คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ *C. botulinum*	1
การก่อให้เกิดโรคในคน	2
ชนิดของ Botulinum toxin ที่ก่อโรคในคน	4
อาการของโรค	5
การป้องกันโรค	5
การรักษา	5
ลักษณะเชื้อ *C. botulinum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	7
คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *C. botulinum*	7
การเก็บตัวอย่างส่งตรวจหา *C. botulinum*	8
วิธีที่ทำการการตรวจสอบหา *C. botulinum*	9
ระยะเวลาการรายงานผลการตรวจวินิจฉัย *C. botulinum*	9
ความปลอดภัยที่ควรระวังในการปฏิบัติงาน *C. botulinum*	10
การทำลายฆ่าเชื้อ *C. botulinum* และ Toxin	11
วิธีการตรวจวินิจฉัย *Clostridium botulinum*	11
การตรวจหา Toxin ของ *C. botulinum* จากตัวอย่างโดยใช้ Mouse Bioassay	
- ตัวอย่างน้ำเหลือง	15
- ตัวอย่างอาหารที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรค /อุจจาระ/ อาเจียน/ น้ำล้างกระเพาะ	16
การทดสอบหายีนที่สร้างสารพิษของ *C. botulinum* type A, B, E และ F โดยวิธี Multiplex PCR	18
การตรวจหา Toxin ของ *C. botulinum* โดยวิธี Digoxigenin-label IgGs ELISA (DIG-ELISA) kit ของ CDC-Atlanta	20
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	
- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย *Clostridium botulinum*	25

เชื้อคลอสทริเดียม โบทูลินัม (*Clostridium botulinum*)

เชื้อคลอสทริเดียม โบทูลินัม (*Clostridium botulinum*)

เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) พบได้ในดินและน้ำสิ่งแวดล้อมทั่วไป ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ที่ส่วน Subterminal (รูปที่3) สปอร์สามารถทนต่อความร้อนทำให้สปอร์ยังคงหลงเหลืออยู่ในกระบวนการที่ให้ความร้อนไม่เหมาะสม คือไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิที่เหมาะสมสปอร์จะงอกเจริญเติบโตเป็น Vegetative cell และมีการสร้างสารพิษขึ้น อาการป่วยที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษปะปนเรียกว่า โรคโบทูลิซึม **(Botulism)**

ลักษณะโรค โรคโบทูลิซึมมักมีอาการรุนแรง แต่พบได้ไม่บ่อยสามารถป้องกันได้ เกิดจากท็อกซินหรือสารพิษของเชื้อคลอสทริเดียม โบทูลินัม (*C. botulinum*) ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Botulinum neurotoxin) ทำให้เกิดอาการอัมพาตกล้ามเนื้ออ่อนแรง (flaccid paralysis) แต่มีความสำคัญเพราะมีอันตรายถึงชีวิตเพียงได้รับสารพิษขนาด 0.5 µg. เท่านั้น

เชื้อต้นเหตุ ปัจจุบันพบท๊อกซินทั้งหมด 8 ชนิด (types) ได้แก่ A, B, C, D, E, F, G, H ที่พบการระบาดในคนมักเกิดจากสารพิษ type A, B และ E อาจพบ type F และ G ได้แต่น้อย การระบาดของ type E มักพบสาเหตุจากเนื้อปลา อาหารทะเล มักพบจากการปรุงอาหารกระป๋องที่ไม่ถูกวิธี สารพิษจะถูกทำลายด้วยความร้อน แต่การทำลายสปอร์ต้องใช้ความร้อนสูงกว่ามาก สารพิษ type E สามารถสร้างขึ้นอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิต่ำกว่าตู้เย็นธรรมดา คือ ต่ำกว่า 3°C

ระบาดวิทยาในประเทศไทย มีรายงานการระบาดเป็นครั้งแรกที่จังหวัดน่าน เมื่อปี พ.ศ. 2541 เกิดจากสาเหตุการรับประทานหน่อไม้อัดปี๊บที่ไม่ได้ต้มปนเปื้อนด้วยท็อกซินของเชื้อคลอสทริเดียม โบทูลินัม มีผู้ป่วยทั้งหมด 13 ราย เสียชีวิต 2 ราย คิดเป็นอัตราป่วยตายร้อยละ 15 ต่อมามีการระบาดเล็ก ๆเกิดประปรายในบางปีในเขตภาคเหนือบางจังหวัด เช่นลำปาง (พ.ศ. 2546) มีผู้ป่วย 11 ราย เสียชีวิต 1 ราย สาเหตุจากการรับประทานหน่อไม้ปี๊บ จังหวัดพิษณุโลก (พ.ศ. 2548) พบเหตุปัจจัยเสี่ยงร่วมจากการรับประทานเนื้อหมูป่าดิบ และการระบาดครั้งใหญ่ที่สุดเกิดขึ้นที่จังหวัดน่าน (พ.ศ. 2549) มีผู้ป่วยรวม 209 ราย แต่ไม่มีผู้เสียชีวิต สาเหตุจากรับประทาน

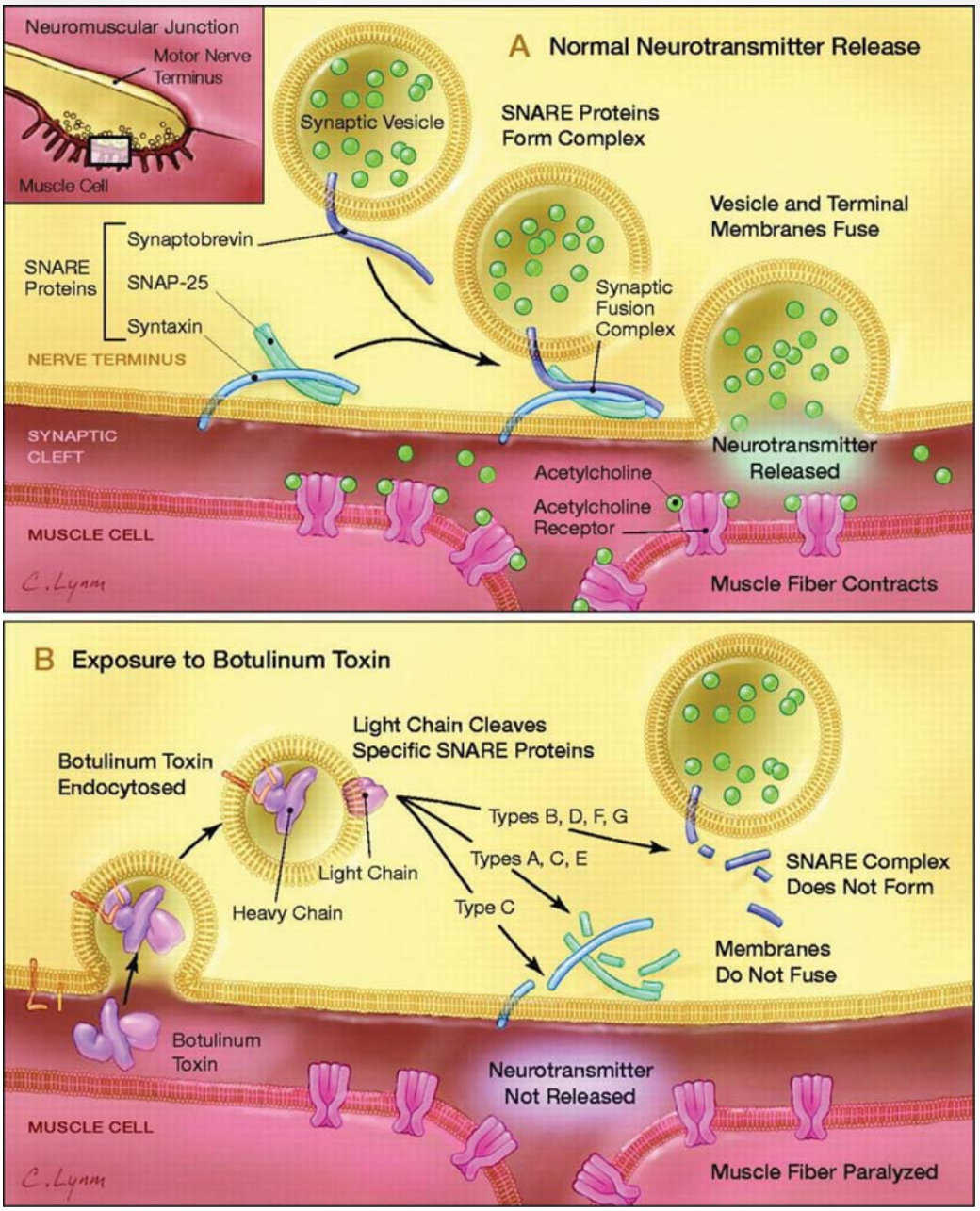
หน่อไม้ปี๊บไม่ได้ต้ม ปี 2553 มีการระบาด 3 ครั้ง ครั้งแรกเกิดที่ จังหวัดลำปางมีผู้ป่วย 11 ราย เสียชีวิต 2 ราย สาเหตุจากการรับประทานเนื้อหมูป่า ครั้งที่สองเกิดที่จังหวัดสระบุรีมีผู้ป่วย 4 ราย เสียชีวิต 1 ราย สาเหตุจากการรับประทานหมูยอ ครั้งที่สามเกิดที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนมีผู้ป่วย 9 รายไม่มีผู้เสียชีวิต สาเหตุจากการรับประทานถั่วเน่า ปี 2556 มีการระบาดที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีมีผู้ป่วยจำนวน 2 ราย ไม่มีผู้เสียชีวิต สาเหตุจากการรับประทานปูดอง ปี 2557 มีการระบาดที่จังหวัดชัยภูมิมีผู้ป่วยจำนวน 4 ราย ไม่มีผู้เสียชีวิต สาเหตุจากการรับประทานหน่อไม้ปี๊บที่ไม่ได้ต้ม

วิธีติดต่อ รับประทานอาหารที่มีสารพิษปนอยู่ ซึ่งมักเกิดจากการอุ่นอาหารด้วยอุณหภูมิไม่เพียงพอระหว่างบรรจุกระป๋อง หรือรับประทานอาหารโดยไม่ได้อุ่นอีก ในประเทศสหรัฐอเมริกาเกิดจากการรับประทานอาหารและผลไม้กระป๋องที่ทำเองในครัวเรือน ในประเทศญี่ปุ่นพบสาเหตุจากการรับประทานเนื้อปลา

การก่อให้เกิดโรคในคน

Botulinum Toxin เป็น heat labile toxin โดยการถูกทำให้หมดฤทธิ์ได้ที่อุณหภูมิ 80°C 30 นาที หรือ 100°C 10 นาที มีโครงสร้างเป็น dichain ขนาด 150 KDa ซึ่งประกอบไปด้วย heavy chain ขนาด 100 KDa และ light chain ขนาด 50 KDa เมื่อสร้างระยะแรกเป็น protoxin ซึ่งต้องอาศัยเอ็นไซม์ protease เช่น Trypsin ในกระเพาะอาหารเพื่อแบ่ง toxin เป็น 2 chain เชื่อมกันด้วย non-covalent bonds Botulinum Toxin จะถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสโลหิตส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เมื่อพบกับบริเวณที่จำเพาะซึ่ง Botulinum Toxin จะมีความจำเพาะต่อปลายประสาทส่วนปลาย ซึ่งเป็นจุดเชื่อมต่อระหว่างเส้นประสาทและกล้ามเนื้อ กลไกการเกิดโรคคือ Toxin จะจับกับ Presynaptics Receptors ของเซลล์ประสาทซึ่ง Receptors จะแตกต่างกันไปเล็กน้อยตามชนิดของ Toxin

Botulinum Toxin จะเข้าสู่เซลล์ประสาทโดยวิธี Endocytosis เมื่อเข้าไปแล้ว Toxin จะไปยับยั้งขบวนการปล่อย AcetylCholine ของเซลล์ประสาท (รูปที่ 1) ซึ่งทำให้ระบบประสาทไม่สามารถปล่อยสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) ก่อให้เกิดการหยุดการทำงานของ Motor Neuron system ทำให้เสียหน้าที่ของระบบประสาทอัตโนมัติทำให้เกิดการเป็นอัมพาตแบบอ่อนแรง ซึ่งแตกต่างจากการเป็นอัมพาตจากโรคบาดทะยักซึ่งเป็นอัมพาตแบบแข็งเกร็ง การจับของ toxin เป็นการจับแบบถาวร ดังนั้นการฟื้นตัวจาก Botulism จึงเกิดได้โดยการงอกใหม่ของปลายประสาทบริเวณ neuromuscular junction ซึ่งใช้เวลานานมาก



Arnon, S. S. et al. JAMA 2001;285:1059-1070.

รูปที่ 1 การเข้าสู่เซลล์ประสาทของ Botulinum Toxin

ชนิดของ Botulinum toxin ที่ก่อโรคในคน

แบ่งออกเป็น

1) Proteolytic strain ประกอบด้วย type A, B และ F แบคทีเรียกลุ่มนี้ย่อยอาหารได้ ทำให้อาหารมีลักษณะถูกปนเปื้อน

2) Non-proteolytic strain ประกอบด้วย type B, E และ F แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ทำให้อาหารมีลักษณะเปลี่ยนแปลง

โรค Botulism จำแนกออกเป็น 4 รูปแบบคือ

1. โรคอาหารเป็นพิษโบทูลิซึม (Foodborne botulism) สาเหตุมาจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อน neurotoxin ของเชื้อ *C. botulinum* เข้าไปในร่างกาย ระยะฟักตัวของเชื้อ อยู่ในช่วง 12-36 ชม. อาหารที่เชื้อไปเจริญเติบโตมักเป็นอาหารที่ถูกเก็บในสภาพ anaerobic เช่น อาหารอัดกระป๋องโดยอาหารเหล่านี้มักไม่ผ่านการกำจัด spore อย่างเพียงพอ ตัวอย่างอาหารได้แก่ เนื้อสัตว์ ไส้กรอก เห็ด asparagus และผักต่างๆ สภาพที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีได้แก่ อุณหภูมิ 4 -10°C มี pH 4.6-7.0 และมี organic acid alanine หรือ cysteine

2. โรคโบทูลิซึมในทารก (Infant botulism) จากการสร้างโคโลนีของเชื้อในทางเดินอาหารของทารก มักเกิดในเด็กอายุต่ำกว่า 12 เดือน ส่วนใหญ่ พบในเด็กทารกอายุระหว่าง 6 สัปดาห์ - 6 เดือน อาการที่พบในเด็กทารกเริ่มด้วยท้องผูก เบื่ออาหารอ่อนเพลีย ดูดกลืนลำบาก ร้องไห้เสียงเบา และคออ่อนพับ

รูปที่ 2 อาหารที่มักมีการปนเปื้อน *C. botulinum*

3. โรคโบทูลิซึมที่บาดแผล (Wound botulism) เกิดจากสปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* เกิดการงอกและผลิตสารพิษออกมา ได้ปนเปื้อนเข้าสู่บาดแผลเชื้อจะเจริญเพิ่มจำนวนในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำโดยทั่วไปจะพบเกี่ยวข้องกับการบาดเจ็บรุนแรงอาการจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษโบทูลิซึม แต่อาจใช้เวลานานถึง 2 สัปดาห์ หลังติดเชื้อ จึงจะเริ่มแสดงอาการ

4. โรคโบทูลิซึมจากการสูดดม (Inhalational botulism) เป็นโรค botulism ที่เกิดจาก toxin ที่ได้มาจากการหายใจ คาดการว่าจะเป็นวิธีการนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ

อาการของโรค

ผู้ที่บริโภคอาหารที่มีสารพิษของ *Clostridium botulinum* เข้าไปพบว่าอาการจะเกิดขึ้นภายใน 12-36 ชม. หลังการบริโภค และอาจเสียชีวิตภายใน 1-6 วัน อาการสารพิษแต่ละ type พบว่าคล้ายคลึงกันคือจะมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน หน้ามืด ระบบย่อยอาหารผิดปกติ ปวดท้อง อาจมีอาการท้องเสียเกิดขึ้น หลังจากนั้นจะพบว่ามีอาการอิดโรย มึนงง กระหายน้ำ มีความรู้สึกแห้งที่ปาก มีเสมหะมากในคอ สำหรับในรายที่รุนแรง มีอาการระบบประสาทด้วย เช่น มองเห็นไม่ชัด มองเห็นภาพซ้อน กล้ามเนื้อตาเป็นอัมพาต ลืมตาไม่ขึ้น ตากระตุกตลอดเวลา กลืนอาหารลำบาก พูดตะกุกตะกัก หายใจขัด ระบบหายใจขัดข้อง และเสียชีวิตในที่สุด โรคนี้พบว่ามีอัตราการตายสูงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในรายที่ไม่เสียชีวิตนั้นพบว่าต้องใช้เวลาในการรักษาเป็นเวลาหลายเดือน

การป้องกันโรค

1. การถนอมอาหารอย่างถูกต้องทำให้อาหารเป็นกรดที่มี pH<4.5 หรือให้ความร้อนสูงและนานเพียงพอเพื่อทำลาย toxin และการแช่แข็งเพื่อถนอมอาหารเป็นเวลานาน

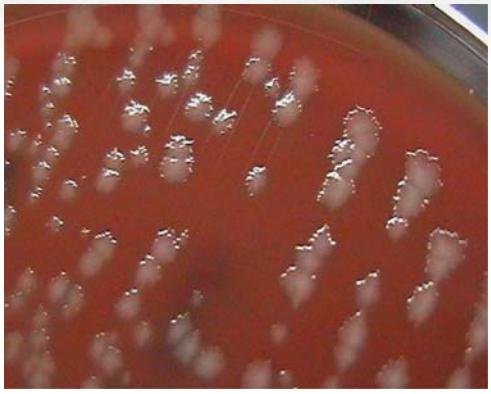
2. ถ้าอาหารมีลักษณะผิดปกติเช่น กระป๋องบวม หรือเสียหาย หรือมีรสผิดปกติอาจมี fermentation เป็นความเสี่ยงต่อการนำโรค อย่างไรก็ตาม botulism สามารถสร้าง toxin ได้แม้อาหารและกระป๋องยังดูปกตินอกจากนี้ type E ยังไม่ทำให้อาหารมีรสผิดปกติเลย

3. บริโภคอาหารกระป๋องที่ผ่านความร้อนเพียงพอที่จะทำลาย toxin ทุกครั้ง

การรักษา

การให้ยาต้านพิษ (antitoxin) ทางหลอดเลือดและเข้ากล้ามเนื้อโดยเร็วที่สุด ควรเจาะเลือดของคนไข้เพื่อเก็บตรวจหาสารพิษก่อนให้ยาต้านพิษแต่ไม่ควรรอดูผลเลือดเพื่อให้ยาต้านพิษ และสิ่งที่สำคัญที่สุดคือการดูแลรักษาในแผนกผู้ป่วยวิกฤติ (Intensive Care Unit) เพื่อสามารถแก้ไขสภาวะการหายใจล้มเหลว ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการตาย

รูปที่ 3 ลักษณะของเซลล์ *C. botulinum* Gram positive rod oval subterminal spore

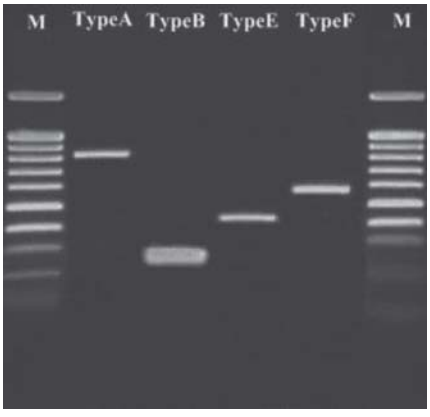


รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนี *C. botulinum* บน Wilkins Chalgren Sheep Blood agar

รูปที่ 5 ลักษณะโคโลนี *C. botulinum* (Type A) บน Egg yolk agar ให้ Lipase Positive

รูปที่ 6 ลักษณะโคโลนี *C. botulinum* (Type B) บน Egg yolk agar ให้ Lipase Positive

รูปที่ 7 ลักษณะโคโลนี *C. botulinum* (Type F) บน Egg yolk agar ให้ Lipase Positive



รูปที่ 8 PCR *C. botulinum* Type A, B, E, F product size 782, 205, 389, 543 bps. ตามลำดับ

ลักษณะเชื้อ *C. botulinum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างเชื้อที่สงตรวจมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Sheep Blood agar และ Egg Yolk Agar นำไปเข้าตู้อบที่ 35-37°C ในสภาวะ ไร้ออกซิเจน (Anaerobic Condition) นานประมาณ 48 ชม. ต้องพิสูจน์ว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะในสภาวะไร้ออกซิเจน ไม่เจริญในสภาวะอากาศปกติ และ เชื้อที่ขึ้นบน Sheep Blood Agar มีลักษณะสีเทาขาว ผิวมันหรือด้าน ให้ Beta-hemolysis ส่วน โคโลนีบน Egg yolk Agar มีลักษณะ ผิวด้าน มีความมันวาวสะท้อนแสง มีสีเหลือบคล้ายรุ้งหรือไข่มุก ซึ่งหมายถึงให้ผลบวกต่อ Lipase แต่ไม่มีขอบขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนี (Opaque zone) แสดงว่าให้ผลลบต่อ Lecithinase ดังแสดงในรูป 4-7 จากนั้นนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งต้องมีการทดสอบปฏิกิริยาของน้ำตาล และสารอื่น ๆ ตามตารางที่ 1.

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. botulinum*

รายการทดสอบ	C. *botulinum* Type A,B,F (Proteolytic)	C. *botulinum* Type B,E,F (Non-Proteolytic)	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	-
Mannitol	-	$-^{w}$	-	-
Mannose	-	a	w	-
Starch pH	-	v	$-^{w}$	-
Starch Hydrolysis	-	$+^{-}$	-	-
Sucrose	-	a^{w}	-	-
Xylose	-	$-^{w}$	-	-
Gelatin Hydrolysis	+	+	+	+
Milk	Digest	Curd	Digest[c]	Digest[c]
Indol	-	-	$-^{+}$	-
Nitrate	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-	-
Lipase	+	+	+	+
Motility	+	+	+	-

+ = Positive reaction for 90-100 % of strains
- = Negative reaction for 90-100 % of strain
$+^{-}$= Most strains positive, some strains negative-
$-^{+}$= Most strains negative, some strains positive
v = variable
$-^{w}$= Most strains negative, some strains weak
a = Strong Acid (pH < 5.5) for 90-100 % of strain
$-^{a}$= Most strains negative, somestrains acid
w= Weak Acid (pH 5.5-6.0) for 90-100 % of strain
a^{w}= Most strains acid, some strains weak

การเก็บตัวอย่างส่งตรวจหา *Clostridium botulinum*

น้ำเหลือง

ควรเก็บอย่างน้อย 5-10 ml **ก่อนทำการให้ antitoxin** ใส่ใน Sterile tube นำส่งในห้องปฏิบัติการเร็วที่สุด นำส่งโดยใส่ภาชนะที่มีความเย็น 4-8 °C

อุจจาระ

ควรเก็บอย่างน้อย 10 กรัม **ก่อนทำการให้ antitoxin** ใส่ในภาชนะที่สะอาด **ไม่ต้องใช้ transport medium** นำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด นำส่งโดยใส่ภาชนะที่มีความเย็น 4-8 °C

อาเจียน

ควรเก็บอย่างน้อย 10 กรัม เก็บใส่ภาชนะที่ปิดสะอาด **ก่อนทำการให้ antitoxin** นำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด โดยใส่ภาชนะที่มีความเย็น 4-8 °C

น้ำล้างกระเพาะ

ควรเก็บอย่างน้อย 10 กรัม เก็บใส่ภาชนะที่ปิดสะอาด **ก่อนทำการให้ antitoxin** นำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด โดยใส่ภาชนะที่มีความเย็น 4-8°C

อาหารที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรค

ควรส่งตรวจอาหารพร้อมภาชนะที่บรรจุอาหารนั้นถ้าเป็นไปได้ แต่ถ้าทำไม่ได้ให้เก็บตัวอย่างอาหารใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณอย่างน้อย 200-300 กรัม นำส่งโดยใส่ภาชนะที่มีความเย็น 4-8 °C

ตัวอย่างจากบาดแผล

ควรเก็บตัวอย่างจากแผลบริเวณลึก ทำด้วยความรวดเร็ว ใส่ใน transport medium สำหรับตรวจหาเชื้อ anaerobe เช่น Thioglycolate medium ปิดฝาจุกเกลียวให้แน่น รีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันที **โดยไม่ต้องแช่เย็น**

ในกรณีส่งเชื้อบริสุทธิ์ที่ทำการแยกได้แล้วสงสัยว่าเป็นเชื้อ *Clostridium botulinum* ต้องการส่งเพื่อตรวจสอบยืนยันและทดสอบ Type ของ สารพิษ ให้นำเชื้อเลี้ยงใน Cooked meat medium ปิดจุกเกลียวแน่น อาจปิดทับผิวหน้าด้วย Sterile Paraffin นำส่งฝ่ายแบคทีเรียไร้อากาศ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ **โดยไม่ต้องแช่เย็น**

หมายเหตุ - ติดต่อสอบถามเพิ่มเติมที่ฝ่ายแบคทีเรียไร้อากาศ สวส. เบอร์โทรศัพท์ 02-5899850 – 7 ต่อ 99403

- ติดต่อส่งตัวอย่างตรวจ ได้ที่ศูนย์ประสานงานการตรวจวิเคราะห์และเฝ้าระวังโรคทาง ห้องปฏิบัติการ สวส. เบอร์โทรศัพท์ 02-5899850 – 7 ต่อ 99248

วิธีที่ทำการตรวจสอบหา *Clostridium botulinum*

น้ำเหลือง

ตรวจหา toxin โดยวิธี Mouse bioassay โดยหา toxicity และ specific neutralization กับ antitoxin

Directly test หา toxin ใช้ DIG-ELISA kits (kit from CDC-Atlanta)

อุจจาระ / อาเจียน / น้ำล้างกระเพาะ/ ตัวอย่างจากบาดแผล

Directly test โดยวิธี Mouse bioassay หา Toxigenicity

Directly test หา toxin ใช้ DIG-ELISA kits (kit from CDC-Atlanta)

Culture และ biochemical test

Multiplex PCR จากตัวเชื้อ (pure culture)

Mouse bioassay จากตัวเชื้อ (pure culture) หา Specific neutralization กับ Antitoxin

อาหารที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรค

Directly test โดยวิธี Mouse bioassay

Directly test หา toxin ใช้ DIG-ELISA kits (kit from CDC-Atlanta)

Culture และ biochemical test

Multiplex PCR จากตัวเชื้อ (pure culture)

Mouse bioassay จากตัวเชื้อ (pure culture) หา Specific neutralization กับ Antitoxin

ระยะเวลาการรายงานผลการตรวจวินิจฉัย *Clostridium botulinum*

1.1 วิธีการเพาะเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี

- รายงานผลเบื้องต้น 48 ชม. Suspected พบ *Clostridium* spp. สร้าง subterminal spore และสร้างเอนไซม์ lipase บน Egg yolk agar

- รายงานผลภายใน 10 วันทำการ Suspected *Clostridium botulinum* โดยการทดสอบทางชีวเคมี

หมายเหตุ : กรณีที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนมากอาจต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ก่อน จึงจะทำการทดสอบทางชีวเคมีได้

1.2 วิธี Multiplex PCR

- รายงานผลภายใน 5 วันทำการ เป็น *Clostridium botulinum* ที่มียีนสร้าง band จำเพาะต่อ type A, B, E และ F

1.3 วิธี Detection toxin ใช้ DIG-ELISA kits

- รายงานผลเบื้องต้นจากตัวอย่างอาหาร ภายใน 48 ชม. เป็น *Clostridium botulinum* toxin A, B, E และ F

1.4 วิธี Mouse bioassay (Gold standard)

- รายงานผลเบื้องต้นจาก ตัวอย่างอาหาร มี toxigenicity ภายใน 48-96 ชม.
- รายงานผล *Clostridium botulinum* สร้าง toxin โดย specific neutralization ภายใน 7-10 วันจากตัวอย่างอาหาร และ 14-20 วันจากตัวอย่างอุจจาระ

ความปลอดภัยที่ควรระวังในการปฏิบัติงาน *Clostridium botulinum*

1. เจ้าหน้าที่ปฏิบัติงาน ผู้ส่งตัวอย่าง ควรใส่ เสื้อกาวน์ ถุงมือ แว่นตา หรือใช้แผ่นกั้น (Shileds) เวลาเก็บตัวอย่าง ขณะปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ
2. ขณะเตรียมตัวอย่าง หรือเตรียม Toxin ควรปฏิบัติใน Biological Safety Cabinet (BSC) เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจาย(Aerosol) ในอากาศของสารพิษจากตัวอย่าง
3. ภาชนะทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่อาจปนเปื้อน Toxin ควรจะ Neutralized ด้วย 0.1 N NaOH ก่อนแล้วนำไป Autoclaved อีกครั้งหนึ่ง
4. ทำความสะอาดบริเวณที่ปฏิบัติงาน ก่อนและหลังปฏิบัติงานด้วย 1% Hypoclorite
5. **ห้าม** ใช้ปากดูด Pipette ดูดสารละลาย ควรใช้ Mechanical Pipette
6. ขณะใช้ centrifuge ควรปิดฝาครอบ bucket ให้แน่น เพื่อป้องกันการหก หรือ แตกของภาชนะ

7. ไม่ควรปฏิบัติงานคนเดียว โดยเฉพาะ การ Injected ตัวอย่างในสัตว์ทดลอง

8. ห้ามนำอาหารหรือเครื่องดื่มเข้ามารับประทานระหว่างการปฏิบัติงาน

9. มีเบอร์โทรศัพท์สำหรับติดต่อขอความช่วยเหลือจากสถานพยาบาลที่มี Anti-Toxin ให้ทันเวลา กรณีเกิดอุบัติเหตุฉุกเฉิน เมื่อเกิดการ Exposure Toxin ระหว่างทดสอบ หรือ ฉีดสัตว์ทดลองพลาดโดนตัวเอง โดยติดอยู่ในสถานที่มองเห็นได้ชัดเจน

การทำลายฆ่าเชื้อ *Clostridium botulinum* และ Toxin

1. Inactivated Botulinum Toxins โดยใช้

- 0.1 % Sodium Hypochlorite
- 0.1 N NaOH
- Heating 80 °C 30 นาที หรือ 100 °C 10 นาที

2. Vegetative Cell *C. botulinum* ไวต่อ Disinfectant เช่น 1 % Sodium Hypocholrite , 70 % Alcohol

3. Spore ของ *C. botulinum* สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน ถูกทำลายโดยความร้อนชื้น 120 °C 15 นาที

วิธีการตรวจวินิจฉัย *Clostridium botulinum*

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 ตัวอย่างส่งตรวจ Botulinum toxin หากเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วย ได้แก่ น้ำเหลือง, อาเจียน / น้ำล้างกระเพาะและอุจจาระ ควรเก็บตัวอย่างก่อนการให้ Antitoxin ใส่ภาชนะที่สะอาดปิดมิดชิด นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด ที่อุณหภูมิ 4-8°C ตัวอย่างน้ำเหลืองควรเก็บจาก clot blood ไม่ใช้ EDTA ปริมาณอย่างน้อย 5-10 มิลลิลิตร ตัวอย่างอุจจาระ ควรเก็บอย่างน้อย 10 กรัม โดยไม่ต้องใช้ transport medium

1.2 ตัวอย่างอาหารที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของโรค เช่น อาหารกระป๋อง อาหารหมักดอง ควรส่งตรวจพร้อมภาชนะบรรจุ หรือใส่ในภาชนะที่สะอาดปราศจากเชื้อ ปริมาณอย่างน้อย 200-300 กรัม นำส่งห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 4-8°C

1.3 ตัวอย่างหนองจากบาดแผล ควรเก็บจากบริเวณส่วนลึกของแผล ใส่ใน anaerobic transport medium รีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันทีโดยไม่ต้องแช่เย็น

1.4 การส่งเชื้อบริสุทธิ์ตรวจยืนยัน *C. botulinum* ควรเพาะเลี้ยงเชื้อใน Cooked meat medium ปิดทับผิวหน้าด้วย sterile liquid paraffin ส่งห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องแช่เย็น

2. การเตรียมตัวอย่างทำโดยการตัดเป็นชิ้นเล็กๆและบดให้ละเอียด ผสมกับ Gelatin Phosphate-Buffered Collecting Fluid (GBS) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°Cนาน 30 นาที (วิธีการทดสอบปฏิบัติตาม flow chart หน้าที่ 13)

3. Sample direct testing ใช้เวลา 5-7 วัน

3.1 หลังจากปั่นตกตะกอนแล้วใช้ serological pipette ดูดแยกส่วนใส (supernatant) แล้วนำมากรองด้วย 0.45 ไมครอน sterile filter membrane ก่อนนำไปทดสอบ mouse bioassay โดยตรง

3.2 ตัวอย่างน้ำเหลืองนำมาทดสอบ mouse bioassay โดยไม่ต้องทำการกรอง

4. Sample direct plating ใช้เวลา 15-17 วัน

4.1 นำส่วนตะกอนที่ปั่นแยกได้ (จากข้อ 2) มาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Egg yolk agar (EY) และ Botulinum selective media (BSM) หรือ Reinforced clostridial medium (RCM) บ่มเพาะเชื้อในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C นาน 48 ชั่วโมง

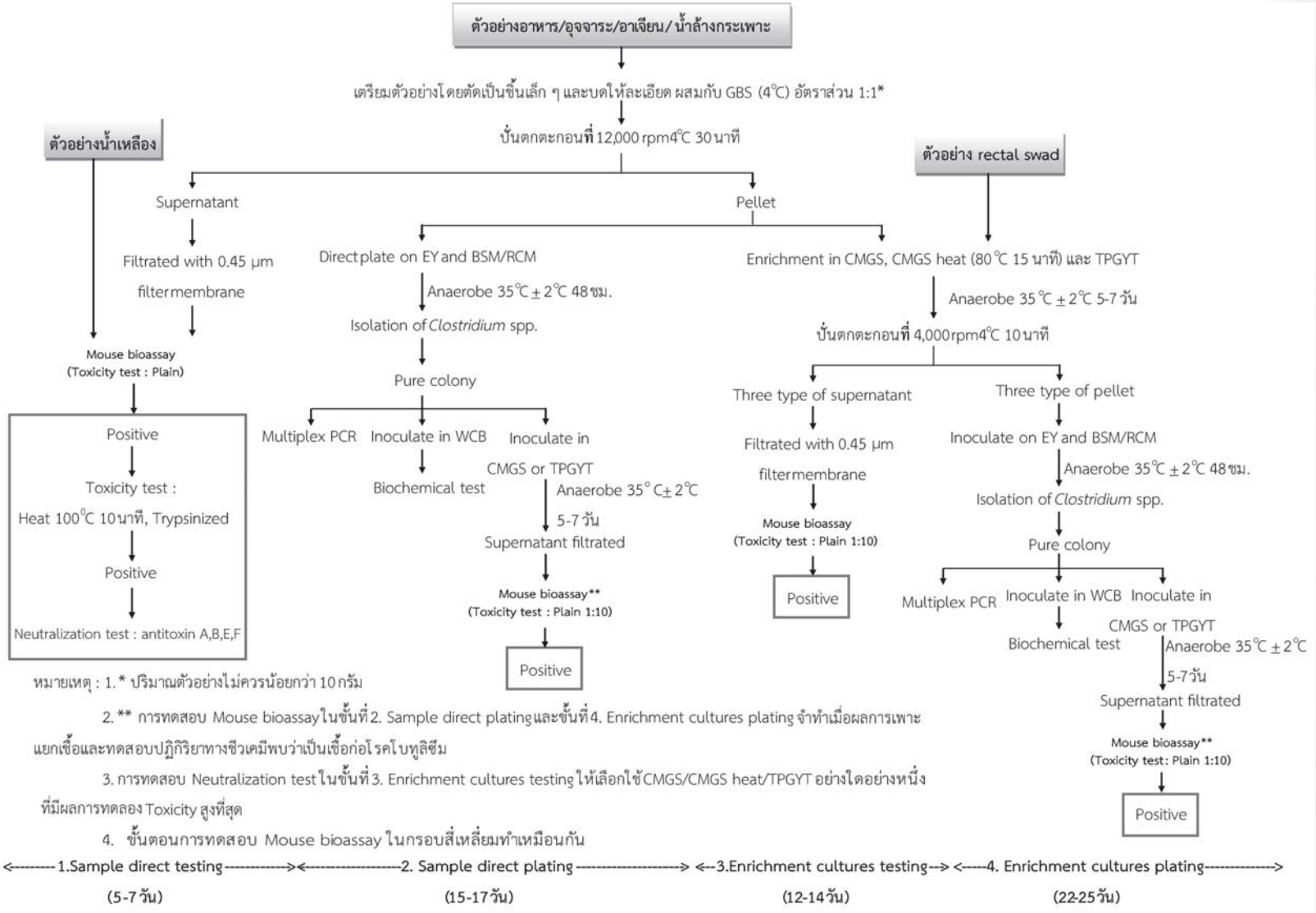
4.2 แยกเชื้อ *Clostridium* spp. โดยการสังเกตลักษณะโคโลนี การสร้างเอ็นไซม์ lipase/lecithinase การย้อมสีแกรมเห็นเซลล์สร้างสปอร์ และทดสอบ aerotolerance testing ว่าไม่เจริญในภาวะอากาศปกติ (ambient air) subculture ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

4.3 หากสงสัยเป็นเชื้อ *Clostridium* spp. ให้นำไปทำ Multiplex PCR (ดูหน้า 18) ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (ดูหน้า 7) และเพาะเลี้ยงเชื้อใน Chopped Meat Glucose Starch (CMGS) หรือ Trypticase Peptone Glucose Starch with Trypsin (TPGYT) เพื่อทดสอบ mouse bioassay ต่อไป

4.4 บ่มเพาะเชื้อที่สงสัยใน CMGS หรือ TPGYT ที่สภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 35 ± 2 °C นาน 5-7 วัน

4.5 หากผลการทดสอบ Multiplex PCR และการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ให้ผลเป็น *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. barati* ให้นำเชื้อในข้อ 4.4 อายุครบ 5-7 วัน มาปั่นตกตะกอนที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนใส นำไปกรองด้วย 0.45 ไมครอน sterile filter membrane แล้วทำการทดสอบ mouse bioassay ต่อไปโดยทำการเจือจาง ส่วนใส 1 ส่วน ใน GBS 10 ส่วน (1:10)

5. นำส่วนตะกอนตัวอย่าง (จากข้อ 2) ไปเพิ่มปริมาณเชื้อใน Enrichment broth 3 ชนิด ได้แก่



หมายเหตุ : 1. * ปริมาณตัวอย่างไม่ควรน้อยกว่า 10 กรัม

2. ** การทดสอบ Mouse bioassay ในขั้นที่ 2. Sample direct plating และขั้นที่ 4. Enrichment cultures plating จำทำเมื่อผลการเพาะแยกเชื้อและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคโบทูลิซึม

3. การทดสอบ Neutralization test ในขั้นที่ 3. Enrichment cultures testing ให้เลือกใช้ CMGS/CMGS heat/TPGYT อย่างใดอย่างหนึ่งที่มีผลการทดลอง Toxicity สูงที่สุด

4. ขั้นตอนการทดสอบ Mouse bioassay ในกรอบสี่เหลี่ยมทำเหมือนกัน

5.1 CMGS เหมาะสำหรับเชื้อในกลุ่ม proteolytic

5.2 TPGYT เหมาะสำหรับเชื้อในกลุ่ม non-proteolytic

5.3 CMGS ที่นำไปให้ความร้อน 80°C นาน 15 นาที เพื่อลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนที่ไม่ใช่ *Clostridium* spp.

6. บ่มเพาะเชื้อในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C นาน 5-7 วัน ก่อนนำมาปั่นตกตะกอนที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที

7. Enrichment cultures testing ใช้เวลา 12-14 วัน

นำส่วนใสทั้งสามชนิด (จากข้อ 6) มากรองด้วย 0.45 ไมครอน sterile filter membrane แล้วทำการทดสอบ mouse bioassay โดยเจือจาง ส่วนใส 1 ส่วน ใน GBS 10 ส่วน (1:10) ให้เลือกใช้ CMGS, CMGS heat, TPGYT อย่างใดอย่างหนึ่งที่ให้ผลการทดสอบ Toxicity สูงที่สุดไปทดสอบ Neutralization

8. Enrichment cultures plating ใช้เวลา 22-25 วัน

นำตะกอนทั้งสามชนิด (จากข้อ 6) มาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EY และ BSM หรือ RCM จากนั้นทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 4.

9. การทดสอบ mouse bioassay ประกอบด้วย

a. Toxicity test คือ ความสามารถของสารในการก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์ทดลอง สารซึ่งมีความเป็นพิษสูงจะก่อให้เกิดอันตรายเมื่อได้รับเข้าไปในปริมาณน้อย ส่วนสารที่มีความเป็นพิษต่ำ จะไม่ก่อให้เกิดอันตราย นอกเสียจากว่าจะได้รับเข้าไปในปริมาณมากโดยสังเกตอาการของสัตว์ทดลอง

b. Neutralization test คือ การทดสอบหา Neutralization activity ในสัตว์ทดลองที่นำเอา Botulinum toxin ผสมกับ Monovalent antitoxin ชนิดต่างๆ เพื่อหาชนิดของ Toxin *Clostridium botulinum* โดยสังเกตอาการของสัตว์ทดลอง

การทดสอบหา Toxin ของ *Clostridium botulinum* จากตัวอย่างโดยใช้mouse bioassay

สัตว์ทดลอง

1. ใช้หนู Out Breed Strain สายพันธุ์ White ICR ขนาดน้ำหนักตัว 20-30 กรัม

2. Anti-Toxins ชนิด Monovalent Types A, B, E, และ F

3. Mouse Injection Intra-Peritoneal Route โดยใช้ Tuberculin Syringe 25-Guage 5/8inc. Needle หรือเล็กกว่า

4. สังเกตอาการหนูหลังจากฉีดตัวอย่างในช่วงเวลา 4, 8, 12 และ 18 ชม.ถึง 4 วัน โดยสังเกตอาการป่วย และจำนวนหนูที่ตาย

หมายเหตุ Botulinum Toxin สามารถทำให้หนูตายได้ภายใน 6-24 ชม. โดยเริ่มจากมีอาการขนพอง (Ruffling of Fur) ตามด้วยหายใจหอบแรง(Labored Abdominal Breathing), ขาอ่อนแรง(Weakness of Limbs) อัมพาต(Paralysis) และตายด้วยอาการหายใจล้มเหลว

5. การอ่านผล หนูที่ทำการฉีด ตายทั้งหมด แสดงว่ามี Toxin ยกเว้นตัวอย่างที่ผสมด้วย Anti-Toxins เฉพาะ Type นั้นๆ และ ตัวอย่างที่ผ่านการต้มที่ 80°C นาน 10 นาที หนูจะไม่ตาย เพราะ Toxin ของ Botulinum เป็น Heat Labile Toxin

ข้อควรสังเกต ถ้าการใช้ monovalent antitoxins ฉีดหนูแล้วมีการตายของหนูทั้งหมดให้คำนึงถึง

- ปริมาณ Toxin ในตัวอย่างมีมาก อาจต้องทำการ Dilute Sample
- ในตัวอย่างมี Toxin มากกว่า 1 ชนิด
- สาเหตุการตายเนื่องจากสาเหตุอื่นเช่น เป็น Toxin ชนิดอื่น, มีการปนเปื้อนเชื้ออื่น ฯลฯ

การเตรียมตัวอย่าง

1. ตัวอย่างน้ำเหลือง

1.1 ใช้น้ำเหลือง1 ml ใส่ในหลอดปราศจากเชื้อ และ เติม 0.25 ml Monovalent anti-toxin (ตาม type ที่ต้องการทดสอบ) ตามตารางที่ 2

1.2 ผสมกันโดย**ใช้มือเขย่า**ให้น้ำเหลืองกับ Anti-toxin เข้ากันดี **ไม่ควร** ใช้ Vortex จะทำให้เกิดฟอง ซึ่งทำให้เกิด Inactivated Anti-toxin

1.3 นำไปอุ่นที่อุณหภูมิห้อง นาน 30-60 นาที

1.4 นำไปฉีดเข้าช่องท้อง (Intra-peritoneal) ในหนูทดลอง 2 ตัว ปริมาณตัวละ 0.5 ml และ ฉีด Untreated Serum ในหนูทดลอง 2 ตัว ตัวละ 0.5 ml เพื่อเป็น Negative Control

1.5 สังเกตอาการหนูหลังจากฉีด ทุก 2 ชม.ในวันแรก และ ทุกๆ วันจนครบ 96 ชม.

หมายเหตุ :
- นำน้ำเหลืองมาทดสอบ Direct Mouse Test หา Toxicity (ใช้ Plain Serum) ก่อน ถ้าให้ผลบวกจึงทำ Neutralization ต่อ Monovalent anti-toxin
- กำหนดให้ปริมาณน้ำเหลืองที่ฉีดเข้าในหนูทดลองจะต้องไม่เกิน 0.8 ml ต่อตัว เนื่องจากถ้าฉีดน้ำเหลืองมากเกิน 0.8 ml หนูอาจตายได้
- ในกรณีที่หนูตายเมื่อฉีดปริมาตร 0.8 ml ให้ทำ Neutralization โดยเพิ่มปริมาณน้ำเหลือง เป็น 1/8 ของ Monovalent anti-toxin เช่น 2 ml ของน้ำเหลือง ต่อ 0.25 ml Monovalent anti-toxin

ตารางที่ 2 Method of Testing Serum for Botulinum Toxin

Tube number	Vol. of Serum (ml)	Vol. of anti-toxin (ml)	Type of Anti-toxin	Vol. Drain into syringe(ml)	Vol. injected into Each mice (ml)
1	1.0	0.0	none	1.0	0.5
2	1.0	0.25	A	1.0	0.5
3	1.0	0.25	B	1.0	0.5
4	1.0	0.25	E	1.0	0.5
5	1.0	0.25	F	1.0	0.5
..	..	..	..	..	..

2. อาหารที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรค/ อุจจาระ/ อาเจียน/ น้ำล้างกระเพาะ

2.1 ใช้ ตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง อาหาร และ อุจจาระ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.1.1 ใช้ Supernatant จาก Direct Sample ที่ผ่านการ Centrifuge และ Filter แล้ว

2.1.2 ถ้าเป็น Supernatant ที่มาจาก enrichment broth ควรทำ Dilute 1:10 เพื่อลดปริมาณ Toxin ลง

2.1.3 ถ้าเป็นโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่าง ที่ Suspected *C. botulinum* ควรนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงใน Enrichment broth 5 วันก่อน แล้วนำไป Dilute 1:10

2.2 ทำการทดสอบเหมือนตัวอย่างน้ำเหลือง **แต่**ให้เพิ่มหลอดสำหรับ Heated sample และ Trypsin activation sample ด้วยตาม**ตารางที่ 3**

2.3 ถ้าพบ Toxin Positive ในเฉพาะ Trypsinized Sample ควรทำ Neutralization ซ้ำอีกครั้งโดยใช้ 0.5% Trypsinized extract นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 – 60 นาทีตาม**ตารางที่ 4**

2.4 ในตัวอย่างอุจจาระอาจมี Toxic Substance ทำให้เกิดผลผิดพลาดได้ควรทำการ Diluted Two-fold เพื่อกำจัดหรือลดสารพิษที่เป็นสิ่งรบกวนอยู่

ตารางที่ 3 Method of Testing Culture fluids for Botulinum Toxin

Tube number	Vol. of Culture fluids (ml)	Treatment	Type of Antitoxin	Vol. Drain into syringe (ml)	Vol. injected into each mice (ml)
1	1.0	None	None	1.0	0.5
2	1.0	Heat 100°C 10 นาที	None	1.0	0.5
3	1.0	0.25 ml of Trypsin	None	1.0	0.5
4	1.0	0.25 ml of Anti-toxin	A	1.0	0.5
5	1.0	0.25 ml of Anti-toxin	B	1.0	0.5
6	1.0	0.25 ml of Anti-toxin	E	1.0	0.5
7	1.0	0.25 ml of Anti-toxin	F	1.0	0.5

ตารางที่ 4 Method of Testing Trypsinized Culture fluids for Botulinum Toxin

Tube number	Vol. of Trypsinized test material (ml)	Vol. of antitoxin (ml)	Type of Antitoxin	Vol. Drain into syringe (ml)	Vol. injected into Each mice (ml)
1	1.25	0.25	A	1.2	0.6
2	1.25	0.25	B	1.2	0.6
3	1.25	0.25	E	1.2	0.6
4	1.25	0.25	F	1.2	0.6

หมายเหตุ : ควรนำตัวอย่างผสมกับ Trypsin ก่อน เขย่าให้เข้ากันดีวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30-60 นาทีก่อน แล้วเติม Antitoxin ลงไปเขย่าให้เข้ากันดี แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30–60 นาทีก่อนนำไปฉีดหนู

การทดสอบหายีนที่สร้างสารพิษของ *Clostridium botulinum* types A, B, E และ F ด้วยวิธี Multiplex PCR

1. การสกัด DNA

1.1 ใช้ sterile cotton swab ป้ายเชื้อ 2-3 โคโลนี ใส่ใน lysis buffer 1 (25% Sucrose, 10 mg/ml lysozyme, TES) ปริมาตร 0.5 ml บ่มที่ 37°C นาน 15 นาที

1.2 นำไปปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที

1.3 ใช้ Pasture pipette ดูดส่วนน้ำ (supernatant) ทิ้งไป

1.4 ละลายตะกอน (pellet) ที่ได้ใน lysis buffer 2 (0.8% Sarkosyl, 100 µg/ml Protienase K, TEN) ปริมาตร 200 µl บ่มที่ 56°C นาน 1 ชม.

1.5 นำไปปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที

1.6 ดูดส่วนน้ำ (DNA) 100 µl เก็บที่อุณหภูมิ -30°C สำหรับทำ PCR ต่อไป

2. การทำ Multiplex PCR (Lindstrom, M., et al., 2001)

2.1 Primers

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
CBMLA1	AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT	782
CBMLA2	CGT ATT TGG AAA GCT GAA AAG G	
CBMLB1	CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA	205
CBMLB2	CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG	
CBMLE1	CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA	389
CBMLE2	GCT ATT GAT CCA AAA CGG TGA	
CBMLF1	CGG CTT CAT TAG AGA ACG GA	543
CBMLF2	TAA CTC CCC TAG CCC CGT AT	

2.2 PCR reaction preparation

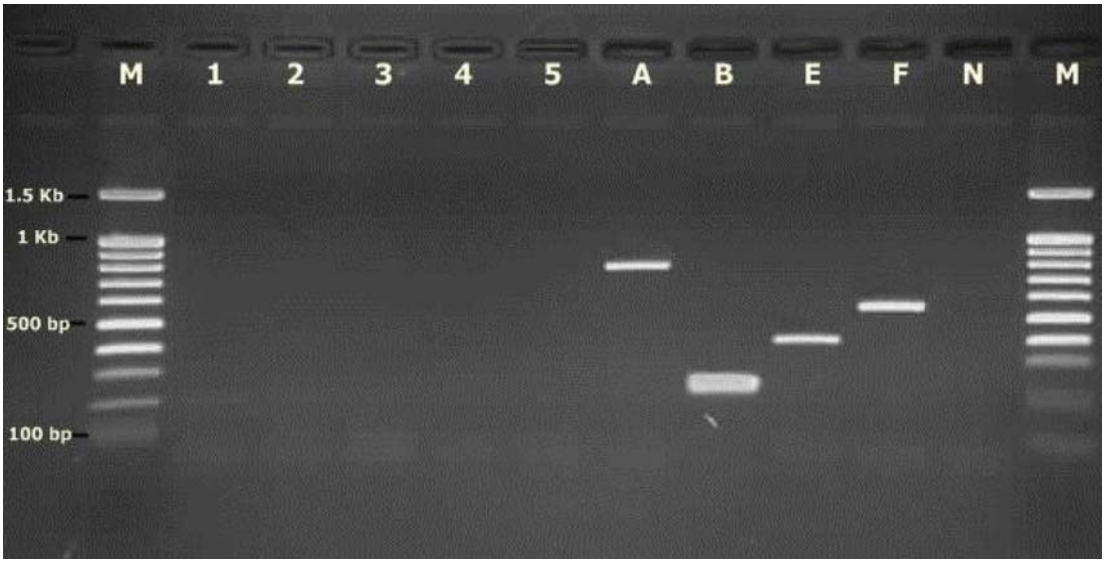
PCR Mixture Total Volume 30 µl ประกอบด้วย 0.5 µl Template DNA, 0.1 µM of each Primer, 0.2 mM dNTP mixture, 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$ และ 1U Go *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA)

2.3 PCR amplification

Pre-denaturation 94 °C 5 นาที 35 Cycles Denaturation 95 °C 20 วินาที Annealing 55°C 30 วินาที Extension 60°C 2 นาที Final-extension 60°C 7 นาที Holding Temperature 4 °C

2.4 Gel electrophoresis

ใช้ 2% Agarose gel หยอด PCR Product 10 µl ผสมกับ Loading dye 2 µl Run 100 Volt 60 นาที ย้อม Ethidium bromide 5 นาที ล้างน้ำ 10 นาที 2 ครั้ง



รูปที่ 9 ผลการทดสอบ Multiplex PCR for *Clostridium botulinum* type A, B, E, F (Lindstrom M, et al.,2001)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder **Lane 1 – 5** *Clostridium barati* non-toxigenic strain **Lane A** : *C. botulinum* type A DMST 27808 PCR product size 782 bp **Lane B** : *C. botulinum* type B DMST 27809 PCR product size 205 bp **Lane E** : *C. botulinum* type E EK 21885 PCR product size 389 bp **Lane F** : *C. botulinum* type F DMST 27810 PCR product size 543 bp **Lane N** : Negative control

การตรวจหา Toxin ของ *Clostridium botulinum* โดยวิธี Digoxigenin -label IgGs ELISA (DIG-ELISA) kit ของ CDC-Atlanta

เป็นวิธี presumptive ในการตรวจหา neurotoxin A, B, E และ F ใน culture supernatant ของอาหาร ตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามเมื่อ ELISA ให้ผลบวก จะต้อง confirm ทุกครั้งด้วย mouse bioassay ควรปฏิบัติงานโดยใช้ Biosafety level 2 ขณะทำการ diluted toxin ควรทำการทดสอบภายใต้อุณหภูมิ 20-25 °C

การเตรียมตัวอย่าง

Supernatant ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารก่อนทำการทดสอบควรผ่านการ filter 0.45 µm. และ diluted 1:10 ด้วย dilution buffer

Single colony ที่ใส่ใน enrichment broth ควร diluted 1:10 ด้วย dilution buffer

หมายเหตุ : Gelatin buffer ที่ใช้ใน mouse bioassay ก็สามารถนำมาใช้ dilutedตัวอย่าง 1: 10 ได้

การเตรียมน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

1) Positive control : ใช้ความเข้มข้นที่ 1 ng/ml (diluted 2.0 µl ต่อ 1.998 ml dilution buffer

2) Wash buffer : ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง โดย diluted จาก 10 เท่าเป็น 1 เท่า โดยใช้ sterile Milli Q water

3) Dilution buffer : ควรเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ตลอด และใช้เป็น negative control

4) Detector antibody : เติม 1 ml deionized water ในขวด lyophilized detector Ab mix โดย invert 3 ครั้ง และปล่อยวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนใช้ **สามารถเก็บไว้ที่ 2-8°C นาน 2 สัปดาห์** : ก่อนใช้ A, B, E และ F ต้องทำการ diluted ให้ได้ dilution 1:12 (solution 0.083 ml ต่อ 0.917 ml dilution buffer)

5) Anti-DIG HRP : เติม 0.3 ml deionized water ในขวด lyophilized anti-DIG HRP mix ให้ส่วนผงละลายให้หมด และปล่อยวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนใช้ **สามารถเก็บไว้ที่ 2-8°C นาน 2 สัปดาห์**: ก่อนใช้ anti-DIG HRP ต้องทำการ diluted ให้ได้ dilution 1: 240 (solution 4.2 ml ต่อ 0.996 ml dilution buffer)

6) Tetramethylbenzidine (TMB) : ควรเก็บไว้ในที่มืด ไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 4°C เพราะจะไวต่อแสงมาก (light sensitive) ทำให้เกิด oxidation

7) Stop solution : 1 N H_2SO_4 (4.68% H_2SO_4)

8) Sodium Hydroxide (NaOH) : สำหรับ toxin inactivation โดยใช้ 40 ml ของ 10 N NaOH ต่อ 4 ลิตรของขวดสำหรับทิ้ง buffer (waste reservoir)

หมายเหตุ 1) ไม่ควรทำ reagent ต่าง lot no. มาผสมกันใช้ทำ test

2) Reagent และตัวอย่าง ต้องนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้

3) Wash buffer ที่ใช้แล้ว รวมทั้ง microplate ควรทำการ autoclave ก่อนนำไปทิ้ง

ขั้นตอนการทดสอบ

1. ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการทดสอบต้อง diluted 1:10 ก่อนด้วย dilution buffer
2. เติม 100 µl ของตัวอย่าง, positive control, negative control (ใช้ dilution buffer) โดยทำ duplicate (2 ช่องต่อ 1 solution)
3. ปิด microplate ด้วย aluminum foil
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) นาน 2 ชม. โดยวางบน microplate shaker ปรับความเร็ว 950 RPM
5. ทำการ Dilute detector antibody ตามที่ระบุในการเตรียมน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ
6. ครบ 2 ชม. ล้าง microplate 5 ครั้ง ด้วย wash buffer
7. เติม 100 µl Diluted detector antibody และปิด microplate ด้วย aluminum foil
8. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) นาน 1 ชม. โดยวางบน microplate shaker
9. ครบ 1 ชม. ล้าง microplate 5 ครั้ง ด้วย wash buffer
10. ทำการ dilute anti-DIG HRP ตามที่ระบุในการเตรียมน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ
11. เติม 100 µl dilute anti-DIG HRP และปิด microplate ด้วย aluminum foil
12. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) นาน 1 ชม. โดยวางบน microplate shaker
13. ครบ 1 ชม. ล้าง microplate 3 ครั้ง ด้วย wash buffer และพยายามเคาะน้ำที่ติดอยู่ออกให้หมด
14. เติม 100 µl TMB และปิด microplate ด้วย aluminum foil
15. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) นาน 15 นาที โดยวางบน microplate shaker

ข้อควรระวัง อย่าปล่อยเกินเวลา 15 นาที

16. เติม 100 µl stop solution
17. นำไปอ่านที่ absorbance 450 และ 690 nm (หรือ 630 nm) ภายในเวลา 30 นาที หลังจากที่เติม stop solution แล้ว

การอ่านผล

1) ค่า Absorbance ที่ 450 nm ใช้สำหรับในการแปลผล ส่วน Absorbance ที่ 690 nm ใช้เป็น background

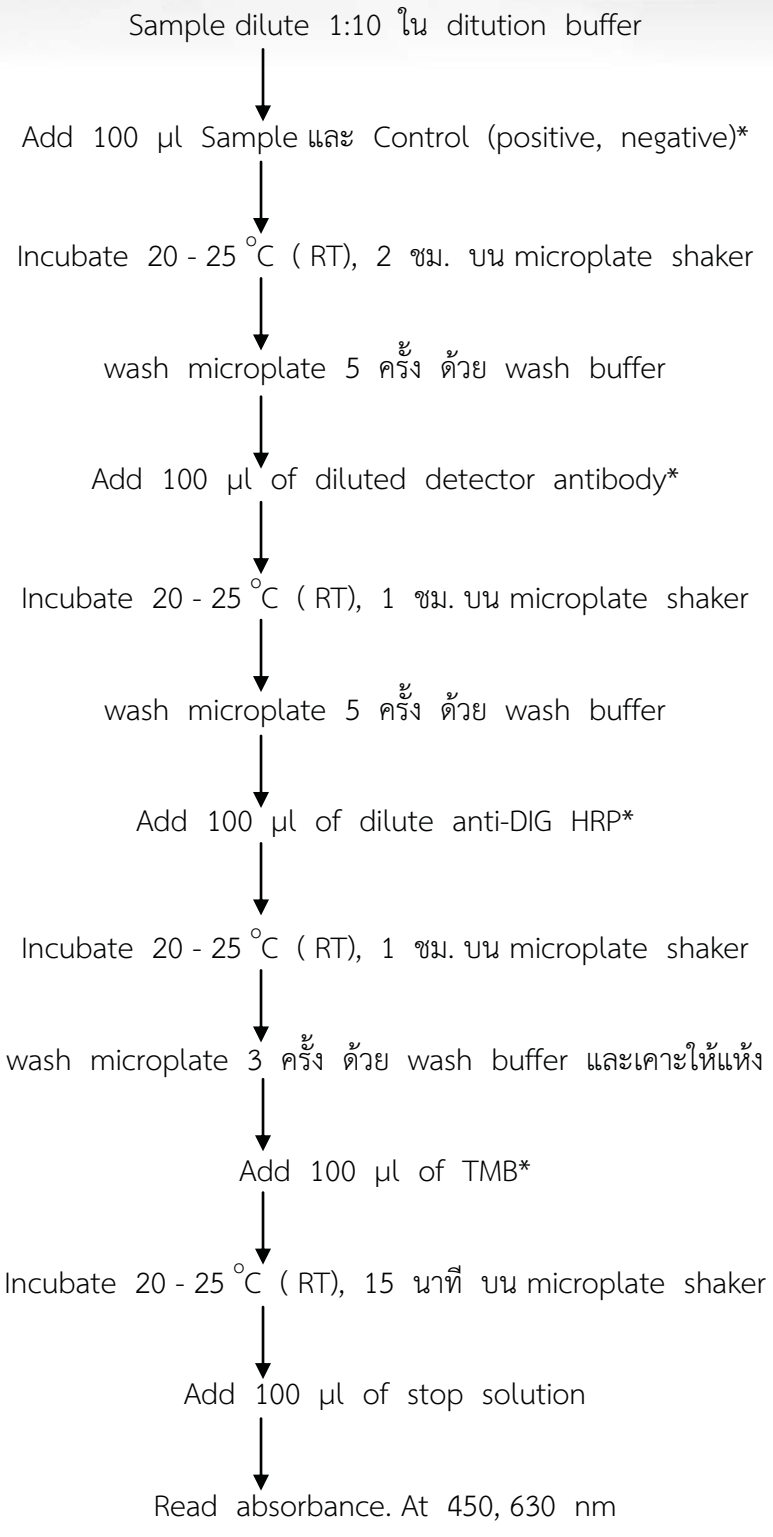
2) หาค่า average (ค่าเฉลี่ย) ที่ทำ duplicate ของทุกช่อง มี positive control, negative control และ Sample

3) ค่า Absorbance ของ negative control ควร < 0.35

4) ค่า Absorbance ของ positive control ควร > 1.0

5) ค่า Absorbance ของ Sample ที่อ่านเป็น positive จะต้องมีค่ามากกว่า 0.2 + ค่าเฉลี่ยของ negative control.

รูปที่ 10 ชุดทดสอบของ CDC-Atlanta วิธี Digoxigenin -lable IgGs ELISA (DIG-ELISA)



* ปิด microplate ด้วย aluminum foil

เอกสารอ้างอิง

1. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidermiologist, Clinicians and Laboratory workers.
2. U.S. Food and Drug Administrition. In Chapter *17 Clostridium botulinum*, Bacteriological Analytical Manual Online, Jan 2001.
3. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management JAMA. 2001; 285 (8) :1059-70.
4. Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 5694-9.
5. Holdeman LV and Moore WEC. Anaerobe Labolatory Manual. Virginia Polytedinic Institute and State University. Blacksbury, Virginia 3rd ed., 1975.
6. Dowell VR, Hawkins TM. Detection of *Clostridium botulinum* and Botulinal toxin in Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology CDC Laboratory Manual. 5th ed., 1981, P.41-44.
7. Paula S, Ellen JB, Drane MC, Catherine S, Hannah MW and Sydney MF. Advanced Identification Methods (level III) in Wadworth Anaerobic. Bacteriologyy Manual 5th ed., 1993,P. 85-87.
8. Ramathibodi Poison Center. พิษจากอาหาร : Botulism Bulletin. July – September 1998, Vol.6 no. 3
9. Albert Balows. Manual of Clinical microbiology. Fifth Edition. USA: Washington D.C, 1991.
10. Swaddiwudhipong W, Wongwatcharapaiboon P. Foodborne botulism outbreaks following consumption of home-canned bamboo shoots in Northern Thailand. J Med Assoc Thai. 2000; 83: 1021-5.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism from home-canned bamboo Shoots -- Nan Province, Thailand, March 2006. MMWR. 2006; 55: 389-92.
12. Wangroongsarb P, Kohda T, Jittaprasartsin, C, Suthivarakom K, Kamthalang T, Umeda K, *et al*. Molecular characterization of *Clostridium botulinum* isolates

from foodborne outbreaks in Thailand, 2010. PLos One. 2014; 9(1):e77792

13. Wangroongsarb P, Jittaprasartsin C, Suthivarakom K, Kamthalang T, Yeesoonsang S, Sangkitporn S. An outbreak of foodborne botulism in Surat Thani Province, Thailand, 2012. Jpn J Infet Dis. 2013; 66: 353-354.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจหา *Clostridium botulinum*

1. Egg York agar (EY)
2. Tryptone-Peptone-Glucose-Yeast Extract (TPGY) broth
3. Tryptone-Peptone-Glucose-Yeast Extract (TPGY) broth with trypsin (TPGYT)
4. Cooked Meat Dextrose Glycerol (CMDG) broth
5. Trypsin solution (Difco 1:250)
6. Botulinum selective media (BSM)
7. Reinforced clostridial medium (RCM) with 50 mg/l neomycin

Egg Yolk Agar (EY)

ใช้สำหรับเพาะเชื้อและทดสอบ Enzyme lecithinase และ lipase ของเชื้อ anaerobes (*Clostridium*) และเชื้อ *Bacillus*

ส่วนประกอบ

ผสม Egg yolk emulsion ซึ่งเตรียมตามวิธีข้างล่าง

Egg yolk emulsion

1. เลือกไข่ขนาดใหญ่ ที่เปลือกไม่มีรอยร้าว ล้างเบาๆ ด้วยใยขัดผสมน้ำยาล้างจานแล้วล้างด้วยน้ำให้สะอาด

2. แช่ไข่ใน 70% alcohol นาน 15-20 นาที นำขึ้นมาผึ่งบนจานที่ปราศจากเชื้อ ในขั้นตอนต่อไปต้องทำด้วยความระมัดระวังอย่าให้เกิดการปนเปื้อนจากมือหรือสิ่งสกปรกภายนอก

3. ใช้ปากคีบลนไฟ เจาะเปลือกไข่ด้านที่ตรงข้ามกับด้านแหลม จะมีเยื่อบางๆ หุ้มเนื้อไข่อยู่ เลาะเปลือกไข่ที่อยู่รอบๆ เยื่อออกพอให้เทไข่ขาวออกได้สะดวก แล้วลอกเยื่อออกทิ้งไป

4. เทเนื้อไข่ขาวออกให้หมด เหลือแต่ไข่แดง แล้วเทใส่ใน Flask ขนาด 250 ml ที่ปราศจากเชื้อ เขย่าให้ไข่แดงแตก แล้วเติม Steriled Normal Saline 5 ml/1 ฟอง เขย่าให้เข้ากัน

ใช้ Loop เผาไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยถุงหุ้มไข่แดงออก หรือ กรองผ่านกระชอนที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปผสมกับ Base Agar ที่ลดอุณหภูมิแล้ว

Mac Clung - Toabe agar base

ส่วนประกอบ	gm/litre
Proteose peptone No.2 (Polypeptone)	40
Disodium phosphate (Na_2HPO_4)	5
Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)	1
Magnesium sulfate	0.1
D-Glucose	2
Sodium chloride	2
Agar	15
Hemin sol^n 5 mg/ml	1 ml

Final pH. 7.6 ± 0.2 at 25 °C

วิธีทำ

1. ชั่งส่วนประกอบตามสูตรผสมในน้ำกลั่น
2. ต้มให้ agar ละลาย นำไป Sterilize ใน autoclave 121°C (15 ปอนด์) นาน 15 นาที
3. ลดอุณหภูมิเหลือประมาณ 55-60°C
4. เติม Egg yolk emulsion
5. เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จานละ 18 –20 ml

Tryptone-Peptone-Glucose-Yeast Extract (TPGY) broth

ส่วนประกอบ	gm/litre
Tryptone	50
Proteose peptone	5
Yeast Extract	20
Dextrose	4
Sodium Thioglycolate	1
Starch	1

วิธีทำ

1. ชั่งส่วนประกอบตามสูตรผสมในน้ำกลั่น
2. ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic Stirrer

3. นำไป Sterilize ใน autoclave 121°C (15 ปอนด์) นาน 15 นาที
4. กรอกใส่หลอดแก้ว Sterlized หลอดละ 10 ml

Tryptone-Peptone-Glucose-Yeast Extract (TPGY) with Trypsin broth

ส่วนประกอบ

Tryptone-Peptone-Glucose-Yeast Extract (TPGY) broth	1 หลอด (10 ml)
0.5 %(w/v) Trypsin 1 : 250 (difco) Sterized by filter	1 ml

วิธีทำ

1. เตรียม Tryptone-Peptone-Glucose-Yeast Extract (TPGY) broth ตามวิธีข้างต้น
2. เติม 0.5 %(w/v) Trypsin 1 : 250 (difco) Sterized by filter หลอดละ 1.0 ml

Cooked Meat Dextrose Glycerol (CMDG) broth

ส่วนประกอบ	gm/litre
Dextrose	4
Cellobiose	1
Maltose	1
Starch	1
Cooked Meat(Difco)	

วิธีทำ

1. ชั่งส่วนประกอบของ water part ตามสูตรผสมในน้ำกลั่น
2. ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic Stirrer
3. นำไป Sterilize ใน autoclave 121°C (15 ปอนด์) นาน15 นาที
4. ชั่ง Cooked Meat (Difco) 1.25 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้ว Steriled
5. เติม Water part หลอดละ 10 ml ปิดฝา

0.5% Trypsin solution (Difco 1:250)

ส่วนประกอบ

Trypsin 1:250 (Difco)

Sterlized Distilled water

วิธีทำ

1. ชั่ง Trypsin 0.5 กรัม ละลายใน Sterlized Distilled water 100 ml
2. Steriled โดยการ Filter

Botulinum selective media (BSM)

ส่วนประกอบ	gm/litre
Heart infusion broth	25
Bacto-agar	25
water 940 ml	
Egg-York suspension 50% ster.	30 ml
Cycloserine solution (1%)	25 ml
Trimethroprim solution	4 ml
Sulfamethoxazole solution	4 ml
Thymidine phosphorylase	0.5 ml

วิธีทำ

1. ชั่ง Heart infusion broth, Bacto-agar และ water ตามสูตร ผสมให้เข้ากัน
2. นำไป Sterilize ใน autoclave 121°C (15 ปอนด์) นาน15 นาที

ลดอุณหภูมิเหลือประมาณ 55-60°C
เติมส่วนผสมที่เหลือ เขย่าให้เข้ากัน
เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จานละ 18 –20 ml

Reinforced clostridial medium (RCM) with 50 mg/l neomycin

ส่วนประกอบ

1. Reinforced clostridial medium (Oxoid : CM0149)	38 กรัม
2. น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
3. Neomycin	50 mg.

วิธีทำ

1. ต้ม Reinforced clostridial medium กับน้ำกลั่นให้ละลายเข้ากันดี
2. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C 15 นาที
3. ลดอุณหภูมิเหลือประมาณ 55-60°C เติม neomycin 50 mg/l
4. เขย่าให้เข้ากัน เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จานละ 18 –20 ml

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

TEXT & JOURNAL PUBLICATION CO., LTD.

บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด

เชี่ยวชาญเฉพาะ

งานพิมพ์หนังสือ-ตำรา

158/3 ซอยยาสูบ 1 ถนนวิภาวดีรังสิต แขวงจอมพล

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทร. 0 2617 8611 - 2 มือถือ 081 421 0753

แฟ็กซ์ 0 2617 8616 อีเมล์ tj8575@gmail.com