

Reverse CAMP Test : วิธีการที่รวดเร็วในการจำแนก *Clostridium perfringens* ในอาหาร

Rapid Method in Identification of *Clostridium perfringens* in Foods by Reverse CAMP Test

สิริพร สอนแสวภาคย์¹ สุพรรณณี จิตพิณิจยล² และวรรณีย์ สมพร²

Siriporn Stonsaovapak Supannee Chitpinitiyol and Wannee Somporn

ABSTRACT

Ninety-seven percent of *Clostridium perfringens* isolated from various kinds of food were reverse CAMP test positive. *C. perfringens* was detected by inoculation at right angles to within 1 to 2 mm. of a β - hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* on sheep blood agar. A positive test was indicated by the formation of an arrowhead-shaped hemolytic pattern at the junction of the two cultures. The reverse CAMP test significantly reduces the time and cost for identifying *C. perfringens* frequently isolated from food.

Key words : *Clostridium perfringens*, identification, reverse CAMP test, rapid method.

บทคัดย่อ

ในอาหาร

Clostridium perfringens ที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งได้จำแนกตามวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (standard laboratory method) เมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี reverse CAMP test พบว่า 97% ของเชื้อ *C. perfringens* ให้ผลบวก การจำแนกทำได้โดยเชื้อ *C. perfringens* ให้ตั้งฉากกับแนวของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (β -hemolytic group B) บน sheep blood agar ให้ห่างกันประมาณ 1-2 มม. ถ้าเกิดการสลายตัวของเม็ดเลือดแดงเป็นรูปหัวลูกศรบริเวณรอยต่อของทั้งสองเชื้อ แสดงว่าให้ผลบวก วิธี reverse CAMP test ช่วยย่นระยะเวลาและช่วยลดค่าใช้จ่ายในการจำแนก *C. perfringens*

คำนำ

Clostridium perfringens หรือที่รู้จักกันอีกชื่อหนึ่งคือ *C. wellchii* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning bacteria) ที่สำคัญตัวหนึ่ง เชื้อนี้พบแพร่กระจายทั่วไปในดิน อากาศ ฝุ่นละออง น้ำ ขยะ อุจจาระของคนและสัตว์ ตลอดจนอาหารชนิดต่างๆ ทั้งอาหารดิบและอาหารที่ผ่านกระบวนการแล้วซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนในภายหลัง

C. perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนสร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic

1. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok 10903, Thailand.
2. กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
Biological Science Division, Department of Science Service, Bangkok 10400, Thailand.

bacteria) เจริญได้ดีที่ pH ระหว่าง 5.0-8.5 อุณหภูมิ 15 ถึง 43°C. อาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *C. perfringens* เกิดขึ้นเมื่อรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนด้วย vegetative cell ของ *C. perfringens* 10^6 - 10^8 cell forming unit/กรัม เชื้อนี้จะแบ่งตัวสร้างสปอร์ในลำไส้เล็กและผลิตสารพิษ (enterotoxin) ออกมาอาการโดยทั่วไปคือปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน ระยะฟักตัวของเชื้อ (incubation period) ประมาณ 6-24 ชั่วโมง (Hatheway et al., 1980)

การจำแนกเชื้อ *C. perfringens* ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโดยทั่วไปจะทำการทดสอบ Nagler test โดยการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ lecithinase ซึ่งใช้ antitoxin A ของเชื้อนี้ และต้องทำการทดสอบทางชีวเคมี เช่น ทดสอบ nitrate, motility, liquefaction ของ lactose gelatin, stormy clot ใน litmus milk, indole และการใช้น้ำตาล (fermentation of carbohydrates) (AOAC, 1984; Ohashi et al., 1978) ซึ่งต้องเสียเวลาประมาณ 8-10 วัน ในการจำแนกและ antitoxin A ก็มีราคาแพง (ขวดบรรจุ 10 มิลลิลิตร ราคาประมาณ 4,000.- บาท) และต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ได้มีผู้ทดลองใช้วิธี reverse CAMP test จำแนกเชื้อ *C. perfringens* จากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสีย (Hansen and Elliott, 1989) และตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (clinical specimens) เช่น เลือด cerebrospinal fluid ฯลฯ (Buchanan, 1982) โดยอาศัยหลักการที่ว่า *C. perfringens* จะสร้าง alpha toxin *Streptococcus agalactiae* สร้าง CAMP โปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์ (nonenzymatic protein) alpha toxin ซึ่งผลิตโดย *C. perfringens* จะทำปฏิกิริยากับ sphingomyelin ในผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงและให้ ceramide ออกมา CAMP โปรตีนซึ่งผลิตโดย *S. agalactiae* จะจับตัวกับ ceramide เกิดการเรียงตัวอย่างผิดปกติในชั้นไขมันของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำให้เกิด complete lysis โดยจะเกิดการสลายตัวเป็นรูปหัวลูกศร (arrowhead-shaped) ที่บริเวณรอยต่อของทั้งสองเชื้อ

เนื่องจากยังไม่เคยมีผู้ทำการวิจัยจำแนกเชื้อ *C. perfringens* ในอาหารโดยวิธี reverse CAMP test เพื่อช่วยย่นระยะเวลาในการจำแนกมาก่อน คณะผู้วิจัยจึงได้ทำ

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ reverse CAMP test จำแนก *C. perfringens* แทนวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งต้องใช้เวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

S. agalactiae ATCC 12386

C. perfringens antitoxin A ของบริษัท Wellcome Reagents, Beckenham, England

เลือดแกะ (Sheep blood, defibrinated) จากสถาบันสุขภาพสัตว์ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ โดยใส่ลูกแก้ว (glass bead) ในเลือดแกะอย่าให้ fibrin ตกตะกอน เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ด้วยวิธี Aseptic technique อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เช่น Cooked meat medium ของ Oxoid, Trypticase soy agar, modified (TSA II) ของ BBL เติมเลือดแกะ 5% และ FM-CW agar ของบริษัท Eiken

ตู้เพาะเชื้อปราศจากอากาศ (Anaerobic incubator) ของบริษัท Forma Scientific โดยเติม 5% CO₂ 10% H₂ และ 85% N₂

และอุปกรณ์ที่จำเป็นอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

วิธีการ

1. การจำแนกเชื้อ *C. perfringens* ตามวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

1.1 ชั่งอาหารตัวอย่างละ 25 กรัม เติม phosphate buffer 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยความเร็วสูงประมาณ 1 นาที จะได้สารละลายความเข้มข้น 1:10

1.2 คูลสารละลายอาหารจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Cooked meat medium 2 หลอดบ่มเชื้อที่ 35-37°C. 24 ชั่วโมง

1.3 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.2 มา streak บนจาน FM-CW agar บ่มเชื้อที่ 35-37°C. 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

1.4 เลือกโคโลนีสีเหลือง มีรัศมีขุ่นรอบ ๆ โคโลนี นำมาทดสอบปฏิกิริยา antitoxin A โดยนำจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร FM-CW agar ซึ่งมีผิวหน้าแห้งแบ่งครึ่งกันจานด้วยดินสอเขียนแก้ว แล้วทำเครื่องหมายไว้ส่วนหนึ่ง เกลี่ย antitoxin A ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ส่วนที่ทำเครื่องหมายไว้ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจิ้มโคโลนีที่ต้องการทดสอบ ลากเป็นเส้นตรงจากด้านที่ไม่มีเครื่องหมายมายังด้านที่ทำเครื่องหมายไว้ บ่มเชื้อ 35-37°C. 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน ถ้าไม่เกิดรัศมีขุ่นรอบๆ การเจริญของเชื้อบนด้านที่มี antitoxin A (Figure1) แสดงว่าเชื้อนี้เป็น *C. perfringens* เนื่องจากเกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ lecithinase โดย antitoxin A หลังจากนั้นนำมาทดสอบยืนยันทางชีวเคมีต่อไป

2. การจำแนกเชื้อ *C. perfringens* โดย reverse CAMP test

2.1 เขี่ยเชื้อ *S. agalactiae* ลากเป็นเส้นตรงลงกลางจานอาหาร Trypticase soy blood agar

2.2 เขี่ยเชื้อ *C. perfringens* จากข้อ 1.3 ให้ตั้งฉากกับเชื้อ *S. agalactiae* ให้ห่างจากเส้นที่ลากในข้อ 2.1 ประมาณ 1-2 มม. (ในจานอาหาร 1 จาน อาจทดสอบ *C. perfringens* ได้ 2-4 เชื้อ) บ่มเชื้อ 35-37°C. 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

2.3 ถ้าเกิดการย่อยสลายของเม็ดเลือดแดงเป็นรูปหัวลูกศร (Figure2) หมายความว่า reverse CAMP test ให้ผลบวก แสดงว่าเป็น *C. perfringens* แต่ถ้าให้ผลลบจะไม่เกิด hemolysis เป็นรูปหัวลูกศร ดังแสดงใน Figure 3

ผล

C. perfringens ที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ ผ่านการตรวจสอบและยืนยันตาม standard laboratory method จำนวน 146 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบโดย reverse CAMP test ให้ผลบวก 142 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 97.3 (Table 1)

จากการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการ

จำแนก *C. perfringens* ทั้งสองวิธีพบว่าถ้าใช้ reverse CAMP test จะใช้เวลาเพียง 3 วัน ในขณะที่ถ้าใช้วิธีเดิมตาม standard laboratory method ต้องใช้เวลาในการจำแนก 8-10 วัน (Figure 4)

วิจารณ์

จากการจำแนก *C. perfringens* ที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งผ่านการตรวจสอบยืนยันตาม standard laboratory method เมื่อนำมาทดสอบโดย reverse CAMP test ให้ผลบวกถึงร้อยละ 97.3 แสดงว่า reverse CAMP test ให้ความถูกต้องมากพอที่จะนำมาใช้ในหองปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหารได้

Buchanan (1982) ได้ทดลอง reverse CAMP test กับ *Clostridium* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าเฉพาะ *C. perfringens* เท่านั้นที่ให้ผลบวก ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า reverse CAMP test มีปฏิกิริยาจำเพาะ (highly specific) กับเชื้อ *C. perfringens*

จาก Figure 4 จะเห็นได้ว่า reverse CAMP test จะช่วยย่นระยะเวลาในการจำแนก *C. perfringens* จาก 8-10 วันเหลือเพียง 3 วันเท่านั้น และยังหลีกเลี่ยงการใช้ antitoxin A ซึ่งมีราคาแพงได้อีกด้วย และในการทำ reverse CAMP test สามารถทดสอบ *C. perfringens* ได้หลายสายพันธุ์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน (Figure2) ดังนั้นจึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายลงอีกทางหนึ่ง

การสลายตัวของเม็ดเลือดแดงเป็นรูปหัวลูกศร (arrowhead-shaped) บน sheep blood agar เป็นปรากฏการณ์ synergistic hemolysis ระหว่าง *C. perfringens* ที่สร้าง alpha toxin กับ *S. agalactiae* ที่สร้าง CAMP factor ดังนั้นในการทำ reverse CAMP test เชื้อ *S. agalactiae* ที่ใช้จึงต้องเป็นเชื้อมาตรฐานที่ให้ CAMP factor ออกมาในปริมาณที่มากพอสมควร ในขณะเดียวกันถ้า *C. perfringens* ที่นำมาทดสอบสร้าง alpha toxin ในปริมาณน้อยหัวลูกศรที่เกิดขึ้นก็อาจมีขนาดเล็กกล้งหรือมองเห็นไม่ชัด (Gubash, 1978)

ปัจจุบันนี้ตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุขที่

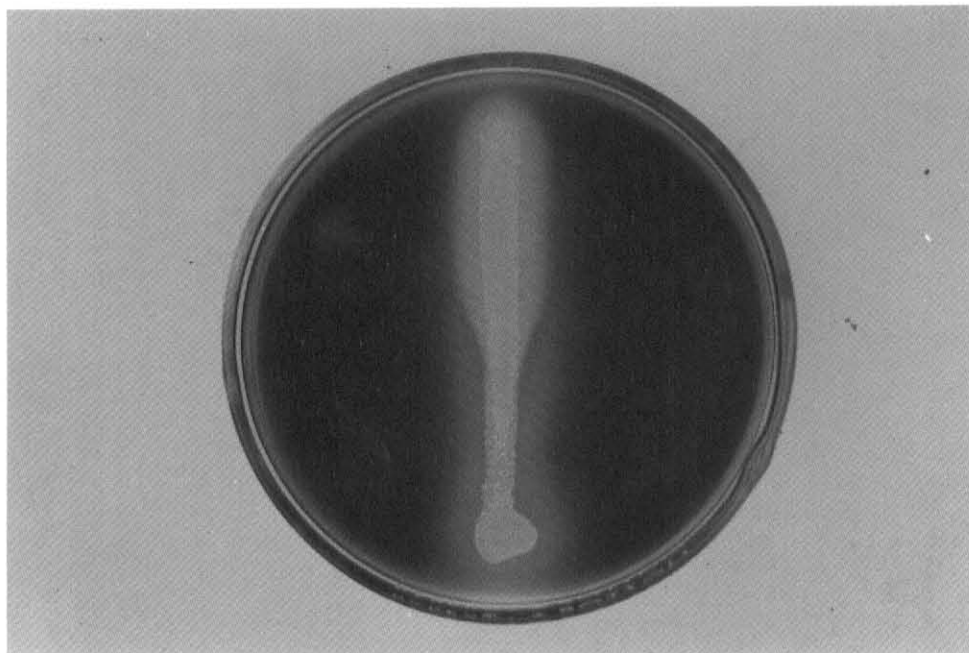


Figure 1 Lecithinase inhibition test by *C. perfringens* antitoxin A on FM-CW agar plate.

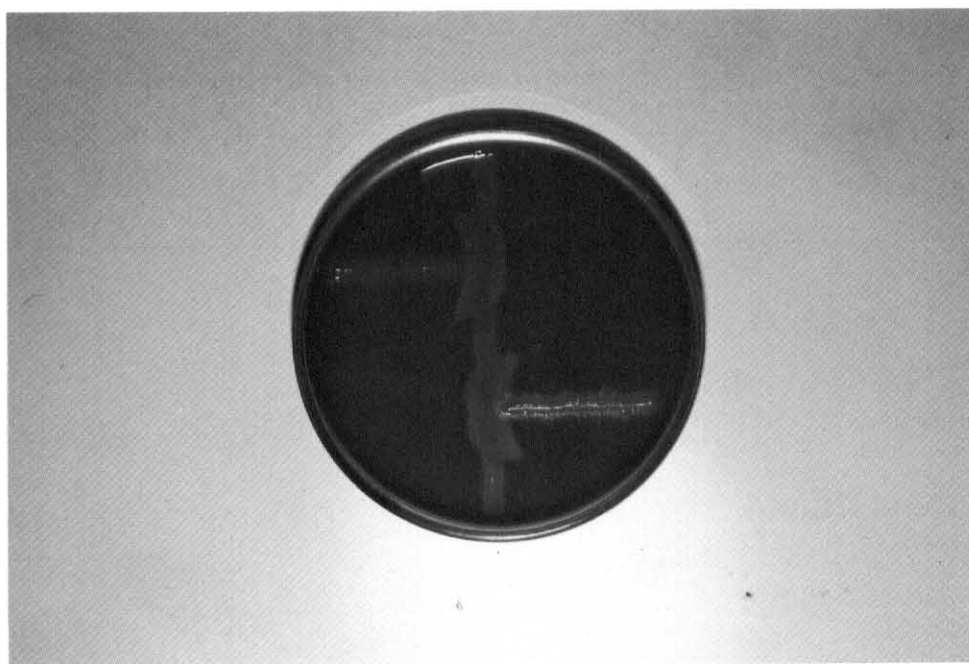


Figure 2 Zones of synergistic beta-hemolysis obtained between the streaks of *C. perfringens* and *S. agalactiae*.

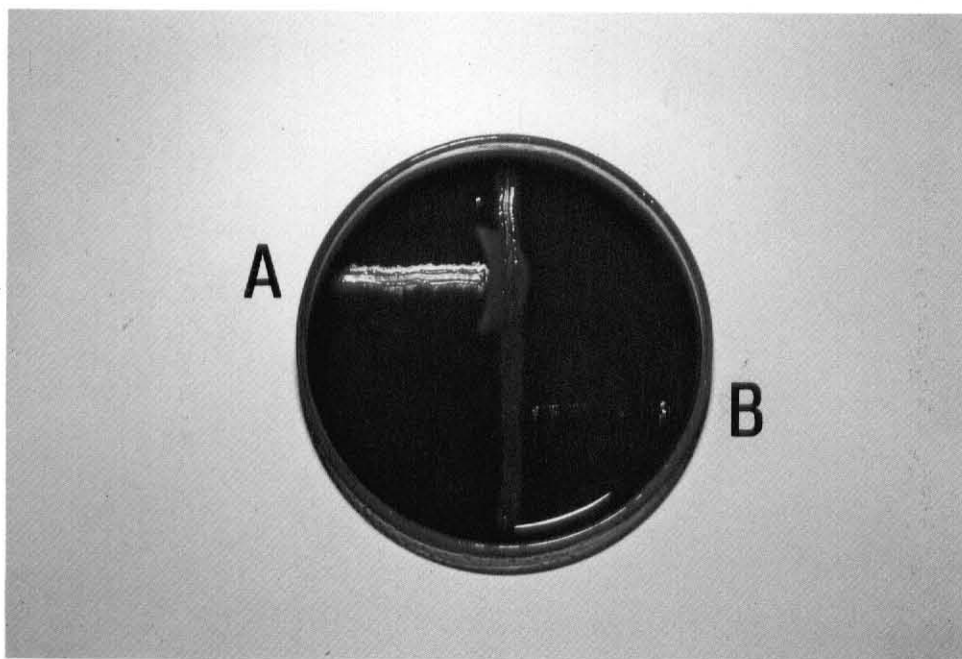


Figure 3 A reverse CAMP test positive
B reverse CAMP test newgative

Table 1 Comparision of *C. perfringens*, isolated from various kinds of food, identified according to standard laboratory method and reverse CAMP test.

Source	Positive for <i>C. perfringens</i>		$\frac{(b)}{(a)} \times 100(\%)$
	Standard laboratory method (a)	Reverse CAMP test (b)	
milk powder	1	1	100
cheese	1	1	100
chocolate	3	3	100
ice cream	32	30	93.8
bakery goods	2	2	100
dry onion leaf	1	1	100
ready-to-eat food	37	36	97.3
instant noodle	2	2	100
seasoning of instant noodle	5	5	100
chilli powder	10	10	100
soy sauce	2	2	100
shrimp paste	10	9	90.0
soy bean paste	15	15	100
ready made chilli paste	25	25	100
Total	146	142	97.3

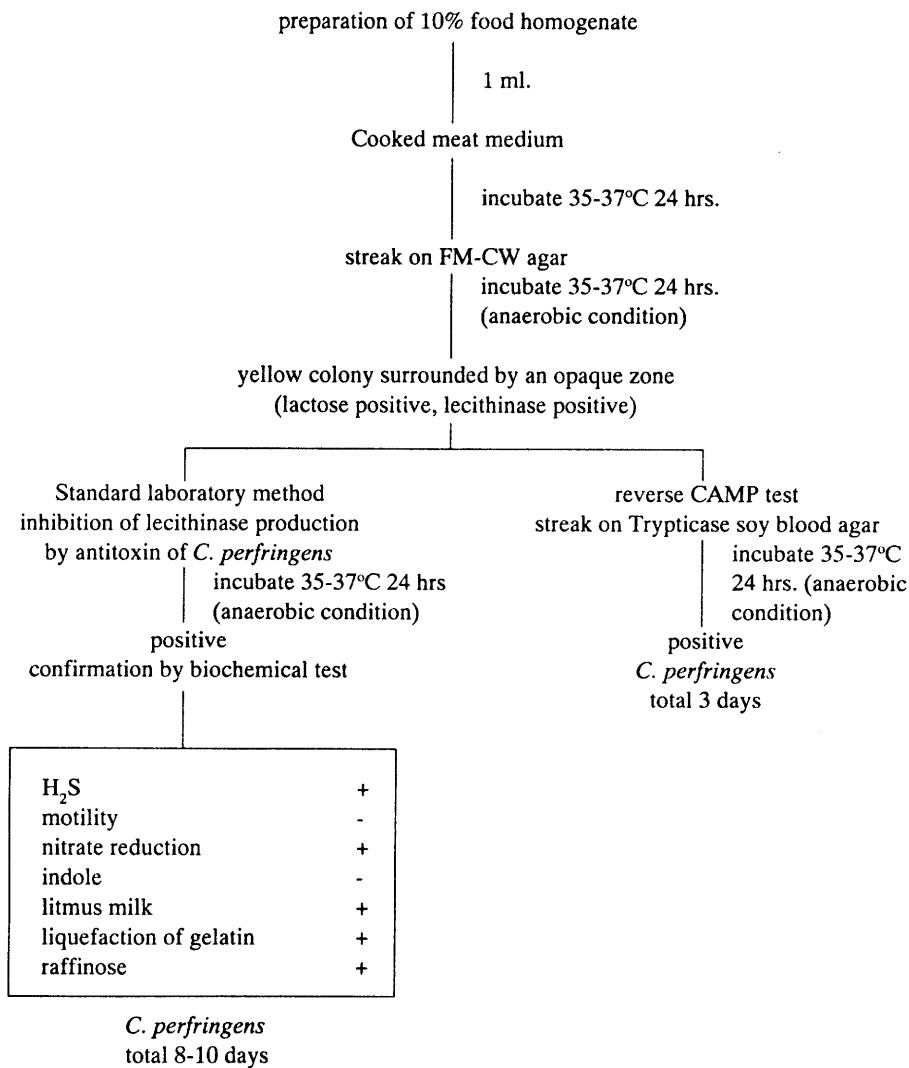


Figure 4 Comparison the methods of standard laboratory and reverse CAMP test for identifying *C. perfringens*.

ควบคุมเกี่ยวกับคุณภาพอาหารทางด้านจุลินทรีย์ล้วน
แต่กำหนดให้มีการจำแนก *C. perfringens* แทบทุกฉบับ
ดังนั้นผู้ตรวจอาหารทางด้านจุลินทรีย์จะประสบปัญหา
การใช้เวลามากในการจำแนก *C. perfringens* reverse
CAMP test จะเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่ง ที่ผู้ตรวจสอบ
เชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสามารถเลือกใช้ได้ด้วยความสะดวก

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14 th. ed.
Association of Official Analytical Chemists,
Arlington, VA. 1141 p.
- Buchanan, A.G. 1982. Clinical laboratory evaluation of
a reverse CAMP test for presumptive identification
of *Clostridium perfringens*. J. Clin. Microbiol. 16 :
761-762

- Gubash, S.M. 1978. Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha-toxin-producing *Clostridium perfringens* and streptococcal CAMP factor in presumptive streptococcal grouping. J. Clin. Microbiol. 8 : 480-488
- Hansen, M.V. and L.P. Elliott. 1980. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens* : reverse CAMP test. J. Clin. Microbiol. 12 : 617-619
- Hatheway, C.L., D.N. Whaley, and V.R.Jr. Dowell. 1980. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness. Food Technol. 34 (4) : 77
- Ohashi, M., H. Murakami, Y. Kudoh and S. Sakai. 1978. Manual for the laboratory diagnosis of bacterial food poisoning and the assessment of the sanitary quality food. SEAMIC : Tokyo p. 55-57.