Thai Journal of Genetics 2009, 2(2) : 125–130

การตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนในหมูบดแช่แข็งด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

Detection of Contaminated Bacteria in Frozen Minced Pork Using Multiplex Polymerase Chain Reaction Technique

นฤมล ธนานันต์[1] และ ธีระชัย ธนานันต์[2]*

Narumol Thanananta[1] and Theerachai Thanananta[2]*

[1] *คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี 13180*

[2] *ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120*

[1] *Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkrrn Rajabhat University under Royal Patronage, Pathum Thani 13180, Thailand.*

[2] *Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Center, Pathum Thani 12120, Thailand.*

**Corresponding author: thana@tu.ac.th*

บทคัดย่อ

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์แบบไม่สกัดแยกดีเอ็นเอ ได้พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรคในหมูบดแช่แข็ง โดยออกแบบไพรเมอร์ 5 คู่ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Campylobacter fetus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhi และ *Vibrio cholerae* ผลการวิจัยพบว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเป้าหมาย และมีความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนในหมูบดแช่แข็ง 10^4 เซลล์/กรัม

ABSTRACT

Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) technique without DNA extraction was developed for detection of pathogenic bacteria in frozen minced pork. Five primer pairs were designed for amplification of target DNA fragments of 5 bacterial species namely *Campylobacter fetus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Vibrio cholerae*. The results showed that the new method of multiplex PCR technique in this study was specific to the target bacteria with sensitivity at 10^4 cells/g.

คำสำคัญ: มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ การตรวจสอบแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

Keywords: multiplex PCR, bacterial detection, food-born pathogenic bacteria

บทนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกสินค้าเกษตรกรรมที่สำคัญ เพราะมีข้อได้เปรียบทางภูมิศาสตร์ที่เหมาะสม

ต่อการทำกสิกรรม ปศุสัตว์ และการประมง โดยผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ และส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศในรูปวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งกลุ่มอาหารสดและผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง เป็นสินค้าที่ได้รับความนิยมและมีศักยภาพสูงในตลาดโลก เนื่องจากไม่ทำให้อาหารเปลี่ยนแปลงมากนัก หรืออาจไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เลย ดังนั้นการตรวจสอบทางจุลชีววิทยา จึงมีความสำคัญและจำเป็นต่อการป้องกันการแพร่ระบาด และการก่อโรคของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารแช่แข็ง

แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ในอาหาร คือ แบคทีเรียสาเหตุของโรคที่ติดต่อจากอาหารสู่มนุษย์ ทำให้เกิดโรคจากอาหาร (food-borne disease) ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ และอาจมีอาการข้างเคียงอื่นๆ เช่น ปวดเมื่อยตามร่างกาย ข้ออักเสบ เป็นต้น โรคจากอาหารมี 2 ลักษณะ คือ โรคอาหารเป็นพิษ (food-borne intoxication) และโรคติดเชื้อจากอาหาร (food-borne infection) โดยโรคติดเชื้อจากอาหารที่พบบ่อยมีสาเหตุจาก *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp. และ *Escherichia coli* (ภาวิน, 2547)

ปัจจุบันมีวิธีตรวจสอบแบคทีเรียในอาหารแช่แข็งที่ใช้เป็นมาตรฐานอยู่แล้ว แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยากมีหลายขั้นตอน และใช้ระยะเวลานานในการวิเคราะห์และยืนยันผล ซึ่งถ้าสามารถประยุกต์วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียก็จะย่นระยะเวลาลงได้ นอกจากนี้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่เหมาะสมยังมีความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าอีกด้วย โดยปัจจุบันได้นำวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาประยุกต์ เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น น้ำดื่ม เนื้อสัตว์แช่แข็ง ปลาแช่แข็ง อาหารแปรรูป เป็นต้น โดยมีการพัฒนาให้เหมาะสมกับการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตามเกณฑ์มาตรฐานของอาหารแต่ละชนิด ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ตรวจสอบแบคทีเรียที่มักปนเปื้อนในอาหารแช่แข็ง 5 ชนิด ได้แก่ *Campylobacter fetus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhi และ *Vibrio cholerae*

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาคือ *Campylobacter fetus* (DMST17955/ATCC27374), *Escherichia coli* (DMST4212/ATCC25922), *Listeria monocytogenes* (DMST4553), *Salmonella enterica* serovar Typhi (DMST5784) และ *Vibrio cholerae* O1, non O139 (DMST2873) โดยแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ได้มาจากฝ่ายบักเตรีทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อ.เมือง จ.นนทบุรี

ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น โดยการดัดแปลงจากบทความวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อน (Table 1) มีค่า Tm ประมาณ 60-62°C

การเตรียมตัวอย่าง

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย peptone water 2 รอบ แล้วละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียใน peptone water และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ counting chamber หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นให้เป็น 10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร และใช้

Table 1 Primers used for this research

Targeted bacteria	Primer sequences (5′→3′)	Targeted genes	Size (bp)	References
Escherichia coli	F: GTAATTACCGACGAAAACGGC R: GCGTGGTTACAGTCTTGCG	*UidA*	143	Tantawiwat *et al*., 2005
Listeria monocytogenes	F: CGCAACAAACTGAAGCAAAGG R: TTGGCGGCACATTTGTCAC	*Hly*	210	Yeon *et al*., 2006
Vibrio cholerae	F: ATTATTGGCTCCTGTGCAGG R: CTTGGCGCATCACTGCCC	*EpsM*	242	Kong *et al*., 2002
Campylobacter fetus	F: GTTAAGTCCCGCAACGAGC R: GCTGATCTACGATTACTAGCG	*16S rDNA*	283	Stoyanchev, 2004
Salmonella enterica serovar Typhi	F: AGCCCCATCGTGTAGTCAG R: TGCGGCTGGATCACCTCC	*Its*	312	Chiu *et al*., 2005

เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น แล้วเจือจางทีละ 10 เท่า (10-fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้ตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตำแหน่งเป้าหมาย

ผสมแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ในหมูบดแช่แข็งที่ละลายแล้วในตู้ปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/กรัม หลังจากนั้นจึงชั่งหมูบดดังกล่าว 1 กรัม ใส่ใน peptone water 99 มิลลิลิตร แล้วเจือจางใน peptone water ทีละ 10 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} ตามลำดับ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการตรวจสอบความไวและความจำเพาะ

การทำพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตำแหน่งเป้าหมายในแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้ง 10 ไพรเมอร์ ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, Brazil) 0.5 ยูนิต มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที (2) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 56°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งเป้าหมาย ปรากฏว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 143 คู่เบส ของยีน *UidA* ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *E. coli* ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 210 คู่เบส ของยีน *Hly* ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 242 คู่เบส ของยีน *Ent* ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *V. cholerae* ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 283 คู่เบส ของยีน *16S rDNA* ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *C. fetus* และตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 312 คู่เบส ของยีน *lacZ* ในตัวอย่างน้ำที่มีแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Typhi แต่ไม่พบ

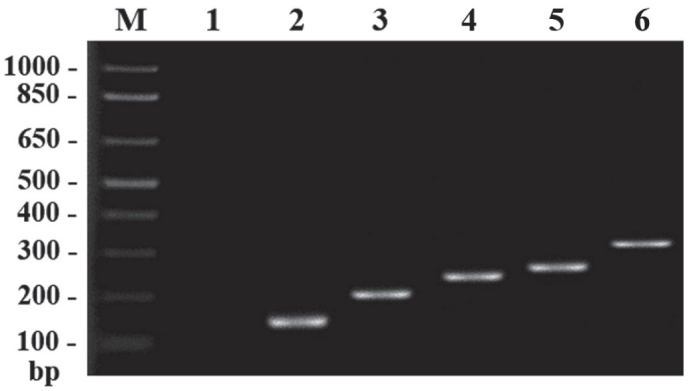

Figure 1 Electrophoretic analysis of PCR-amplified target genes from 5 different bacterial pathogens. Lane M, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Techologies, USA); lane 1, sample without bacteria; lane 2-6, sample with *E. coli*, *L. monocytogenes*, *V. cholerae*, *C. fetus* and *S. enterica* serovar Typhi, respectively.

แถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย (Fig. 1) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ดังกล่าว

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตำแหน่งเป้าหมาย โดยใช้ตัวอย่างที่มีแบคทีเรียรวม 5 ชนิด ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 10^{10}, 10^{9}, 10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4} และ 10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งมีแบคทีเรีย 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3}, 10^{2}, 10 และ 1 เซลล์ ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3}, 10^{2} และ 10 เซลล์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 143, 210, 242, 283 และ 312 คู่เบส ที่จำเพาะต่อต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *L. monocytogenes*, *V. cholerae*, *C. fetus* และ *S. enterica* serovar Typhi แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 1 เซลล์ (Fig. 2) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

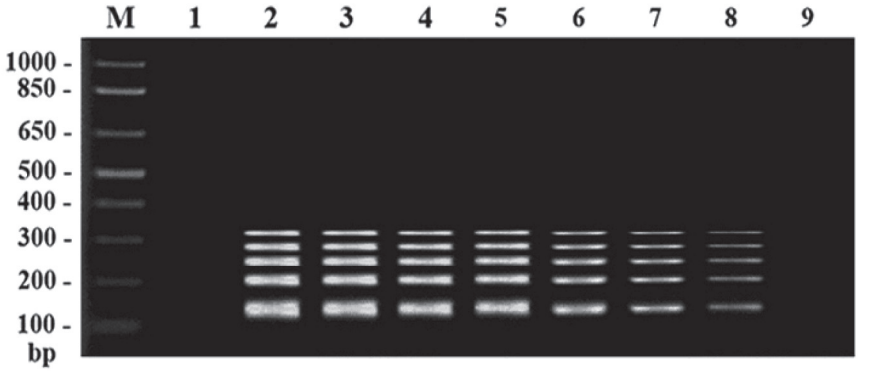

Figure 2 Electrophoretic analysis of PCR-amplified target genes from 5 pathogenic bacteria at different concentration. Lane M, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Techologies, USA); lane 1, sample without bacteria; lane 2-6, sample with five bacteria at 10^{10}, 10^{9}, 10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4} and 10^{3} cells/ml, respectively.

มีความไวต่อแบคทีเรียถึง 10 เซลล์/ปฏิกิริยา หรือเทียบเท่ากับตัวอย่างที่มีแบคทีเรียความเข้มข้น 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร โดยความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียนี้เท่ากับรายงานของ นฤมล และ ธีระชัย (2551; 2552)

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตำแหน่งเป้าหมาย โดยใช้ตัวอย่างหมูบดแช่แข็งที่มีแบคทีเรียรวม 5 ชนิด ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/กรัม และเจือจางเป็น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} พบว่าตัวอย่างหมูบดแช่แข็งที่เจือจางเป็น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 143, 210, 242, 283 และ 312 คู่เบส ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *L. monocytogenes*, *V. cholerae*, *C. fetus* และ *S. enterica* serovar Typhi แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่เจือจางเป็น 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความไวต่อแบคทีเรีย 10^4 เซลล์/กรัม โดยความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียนี้เท่ากับหรือสูงกว่ารายงานของ Fode-Vaughan *et al*. (2003) และ Tantawiwat *et al*. (2005)

สรุปผลการทดลอง

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด คือ *E. coli*, *L. monocytogenes*, *V. cholerae*, *C. fetus* และ *S. enterica* serovar Typhi ที่ปนเปื้อนในหมูบดแช่แข็ง ซึ่งไม่ต้องสกัดแยกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย ที่พัฒนาขึ้นในการวิจัยครั้งนี้ สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียสูง และมีความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหมูบดแช่แข็ง 10^4 เซลล์/กรัม นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนในหมูบดแช่แข็งได้ภายในเวลา 4-5 ชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างรวดเร็วมาก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และบางส่วนได้รับการสนับสนุนจากกลุ่มเมธีวิจัยอาวุโส สกว.-สกอ. (ศ.ดร. เพทาย เย็นจิตโสมนัส และคณะ)

เอกสารอ้างอิง

นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์. 2551. การตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli.* ในน้ำด้วยเทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์. *Thai J Genet* 1: 109-113.

นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์. 2552. การประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาในน้ำดื่ม. *ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 17: 37-42.

ภาวิน ผดุงทศ. 2547. แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร* 2: 51-65.

Chiu, T.H., Chen, T.R., Hwang, W.Z. and Tsen, H. Y. 2005. Sequence of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *Int J Food Microbiol* 97: 259-265.

Fode-Vaughan, K.A., Maki, J.S., Benson, J.A. and Collins, M.L.P. 2003. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 37: 239-243.

Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H. W. and Wu, R.S.S. 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res* 36: 2802 -2812.

Stoyanchev, T.T. 2004. Detection of *Campylobacter* using standard culture and PCR of 16S rDNA gene in freshly chilled poultry and poultry products in a slaughterhouse. *Trakia J Sci* 2: 59-64.

Tantawiwat, S., Tansuphasiri, U., Wongwit, W., Wongchotigul, V. and Kitayaporn, D. 2005. Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in drinking water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 162-169.

Yeon, S.P., Sang, R.L. and Young, G.K. 2006. Detectin of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *J Microbiol* 44: 92-97.