

การตรวจสอบแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัสออเรียส ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

Detection of *Staphylococcus aureus* Using Polymerase Chain Reaction

นฤมล ธานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ธีระชัย ธานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Theerachai Thanananta*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสสามารถสร้างสารพิษ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคจากอาหาร ดังนั้นวิธีตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียในอาหารที่มีความรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้ได้พัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบไม่สกัดแยกดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัสออเรียส โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *femA* ผลการวิจัยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสสูง

คำสำคัญ : พีซีอาร์ (ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์), การตรวจสอบแบคทีเรีย, สแตปฟีโลคอคคัสออเรียส

Abstract

Staphylococcus aureus can produce enterotoxin which is the cause of the food-borne disease in human. Therefore, the rapid and reliable detection protocol as the indication of contamination in food is the most important. In this research, polymerase chain reaction without DNA extraction was

developed to detection of *S. aureus*. The primer pairs were designed for amplification of the DNA fragment of *femA* gene. The results showed that the new protocol in this study was highly specific to the target bacteria.

Keywords: PCR (polymerase chain reaction), bacterial detection, *Staphylococcus aureus*

1. คำนำ

จุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย รา และ ยีสต์ สามารถปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่จะทำให้อาหารมีการเปลี่ยนแปลงรูปลักษณ์ แต่จุลินทรีย์บางชนิดเมื่อปนเปื้อนในอาหารแล้วไม่ทำให้อาหารมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ โดยจุลินทรีย์บางชนิดมีประโยชน์ เช่น ทำให้เกิดอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ทำให้อาหารมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น แต่จุลินทรีย์บางชนิดก่อโทษ เช่น ทำให้อาหารเน่าเสีย ทำให้เกิดโรคจากอาหาร (food-borne disease) (บุษกร, 2550)

แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ในอาหาร คือ แบคทีเรียสาเหตุของโรคที่ติดต่อกับอาหาร สัมผัสและสัตว์ ทำให้เกิดโรคจากอาหาร ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ และอาจมีอาการข้างเคียงอื่น ๆ เช่น ปวดเมื่อยตามร่างกาย ข้ออักเสบ โรคจากอาหารมี 2 ลักษณะ คือ อาหารเป็นพิษ (food-borne intoxication) และการติดเชื้อจากอาหาร (food-borne infection) (ภาวิน, 2547)

สแตปฟีโลคอคคัสออเรียส (*Staphylococcus aureus*) จัดอยู่ในวงศ์ Micrococcaceae เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) บริเวณผิวหนัง และโพรงจมูก (Kluytmans *et al.*, 1997) นอกจากนั้นยังพบที่เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร บาดแผลที่เป็นฝีหนอง และในฝุ่นละออง สามารถเจริญได้ดีทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่เคลื่อนไหวที่ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างลักษณะกลม ขนาด 0.5-1.0 ไมครอน มัก

เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจพบเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ หนูน สีครีม-เหลือง-ส้ม ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) อุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง (นิติพงษ์และเอกชัย, 2552)

สแตปฟีโลคอคคัสออเรียสสามารถสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นสารพิษแบ่งเป็น 8 ชนิด ได้แก่ A, B, C1, C2, C3, D, E และ H ชนิดที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษคือ A กับ D เนื่องจากทนความร้อน โดยไม่ถูกทำลายเมื่อต้มเดือดครึ่งชั่วโมง ทนต่อรังสีแกมมา (γ-ray) ในปริมาณที่อนุญาตให้ใช้กับอาหาร และสามารถทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงพบวาสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสเป็นจุลินทรีย์หนึ่งที่เป็นสาเหตุในการก่อโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งผู้ป่วยมักเกิดอาการขึ้นอย่างรวดเร็ว อาการจะรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความไวต่อสารพิษและสุขภาพของแต่ละคน โดยแสดงอาการหลังจากได้รับสารพิษ 2-4 ชั่วโมง ผู้ป่วยมักมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง เป็นตะคริวที่ท้อง ปวดศีรษะ และอ่อนเพลีย อาการจะค่อย ๆ ทุเลาลงภายใน 1-2 วัน แต่ถ้าเป็นเด็กอาจเสียชีวิตได้หากได้รับการรักษาไม่ถูกวิธี (Banwart, 1989) ดังนั้นการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาจึงมีความสำคัญต่อการป้องกันการแพร่ระบาดและการก่อโรคของสแตปฟีโลคอคคัสออเรียส

ปัจจุบันมีวิธีทดสอบรวดเร็ว (rapid test) สำหรับสแตปฟีโลคอคคัสอเรียสหลายวิธี อย่างไรก็ตามแต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีปริมาณแบคทีเรีย 10^4 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก (Wilson *et al.*, 1959) ดังนั้นการนำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาจึงได้รับความสนใจกันมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ โดยงานวิจัยที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สำหรับตรวจสอบสแตปฟีโลคอคคัสอเรียสที่เคยมีรายงานมาก่อนจะต้องสกัดแยกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย (Brakstad *et al.*, 1992) ซึ่งมีหลายขั้นตอนและเสียเวลามาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจสอบสแตปฟีโลคอคคัสอเรียสแบบรวดเร็วด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอและเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจสอบภายในเวลา 4-6 ชั่วโมง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาคือ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียควบคุมผลลบ คือ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Klebsiella pneumoniae* และ *Serratia marcescens* โดยแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2.2 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *femA* โดยเลียนแบบ Mehrotra และคณะ (2000) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด

(forward primer) ขนาด 20 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) มีลำดับเบสเป็น 5'-AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG-3' ซึ่งมีค่า Tm ประมาณ 54 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer) ขนาด 20 นิวคลีโอไทด์ มีลำดับเบสเป็น 5'-GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG-3' ซึ่งมีค่า Tm ประมาณ 56 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB (nutrient broth) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 800g เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายเพปโตน (peptone water; 1% peptone, 0.5% NaCl, pH 7.2 $\pm$ 0.2) 2 รอบ แล้วผสมเซลล์แบคทีเรียในสารละลายเพปโตน และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ counting chamber จากนั้นปรับความเข้มข้นให้เป็น 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น แล้วเจือจางทีละ 10 เท่า (10-fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้ตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยตรวจยืนยันจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีของ Marshall (1993)

2.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

เพิ่มปริมาณชิ้นยีน *femA* ในแบคทีเรียโดยนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและไพรเมอร์รีเวิร์สชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และใช้

เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, Brazil) 0.5 ยูนิต มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (2) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 1.8 เปอร์เซ็นต์ (นฤมลและธีระชัย, 2551)

3. ผลและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *femA* ปรากฏว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 132 คู่เบส (base pairs, bp) ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *S. aureus* แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอเดียวกันนี้ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *E. coli*, *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* และ *S. marcescens* และตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและไพรเมอร์รีเวิร์สที่ออกแบบนี้มีความจำเพาะต่อสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสเท่านั้น

การเพิ่มปริมาณยีน *femA* โดยใช้ตัวอย่างที่มีสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 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 ปรากฏ

แถบดีเอ็นเอขนาด 132 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 1 เซลล์ (Figure 2) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรสที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีความไวต่อมีสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสถึง 10 เซลล์/ปฏิกิริยา หรือเทียบเท่ากับตัวอย่างที่มีมีสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสความเข้มข้น 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร โดยมีความไวเท่ากับรายงานของ Mehrotra และคณะ (2000) ซึ่งมีขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบที่ยุงยากกว่า

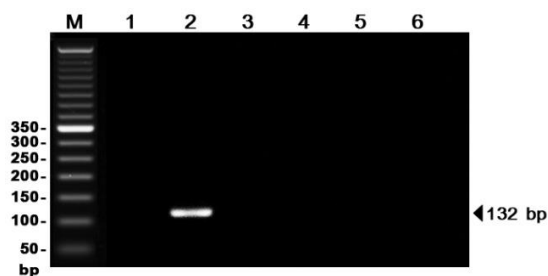


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of *femA* gene. Lane M: DNA molecular size marker (50 bp DNA Ladder; Invitrogen™ Life Technologies, USA). Lanes 1-6: no bacteria (negative control), *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* and *S. marcescens*, respectively.

4. สรุป

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสจากเซลล์แบคทีเรียโดยตรง เป็นวิธีที่ไม่ได้สกัดแยกดีเอ็นเอ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *femA* พบว่ามีความจำเพาะต่อสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสสูงและมีความไวของการตรวจสอบ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถเพิ่มความไวของการตรวจสอบได้ด้วยการ

เพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหารที่เหมาะสมช่วงเวลาหนึ่งก่อนนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (นฤมลและธีระชัย, 2552) นอกจากนี้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ยังสามารถตรวจสอบแต่พีโลคอคคัสออเรียสได้

ภายใน 4-6 ชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างรวดเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยวิธีอื่นที่เคยมีรายงานมาก่อน (Kobayashi *et al.*, 1994; Naravaneni and Jamil, 2005; Lei *et al.*, 2008; Tasci *et al.*, 2011)

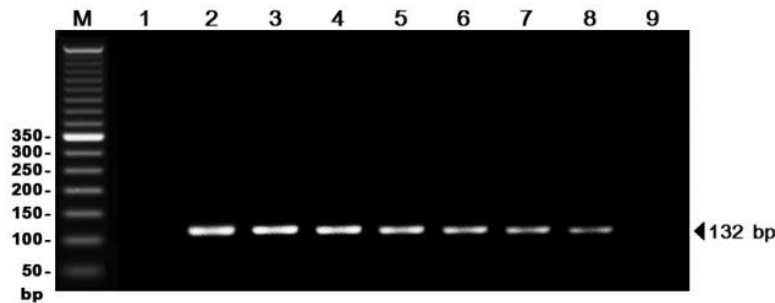


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of *femA* gene. Lane M: DNA molecular size marker (50 bp DNA Ladder; Invitrogen™ Life Technologies, USA). Lane 1: no bacteria (negative control). Lanes 2-9: each concentration of *S. aureus*, i.e. 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 and 10^3 cells/ml, respectively.

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับทุนสนับสนุนจาก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

6. เอกสารอ้างอิง

นฤมล ธนानันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2551, การตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำด้วยเทคนิค ดูเพล็กซ์พีซีอาร์, Thai J. Genet. 1: 109-113.
 นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2552, การประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาในน้ำดื่ม, ว.วิทยา-ศาสตร์และเทคโนโลยี 17(2): 37-42.
 นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552, การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus*, สงขลานครินทร์เวชสาร, 27: 347-358.

บุษกร อตรภิชาติ, 2550, จุลชีววิทยาทางอาหาร, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.

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

Brakstad, O.G., Aasbakk, K. and Maeland, J.A., 1992, Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene, J. Clin. Microbiol. 30: 1654-1660.

Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H., 1997, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms and associated risks, Clin. Microbiol. Rev. 10: 505-520.

Kobayashi, N., Wu, H., Kojima, K., Taniguchp, K., Urasawa, S., Uehara, N., Omizu, Y.,

- Kish, Y., Yagihasha, A. and Kurokawa, I., 1994, Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of *Staphylococci* using polymerase chain reaction, *Epidemiol. Infect.* 113: 259-266.
- Lei, I.F., Roffey, P., Blanchard, Chris and Gu, K., 2008. Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens, *J. Food Drug Anal.* 16: 37-43.
- Marshall, R.T., 1993, *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 16th Ed, American Public Health Association, Washington, D.C.
- Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W.M., 2000, Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance, *J. Clin. Microbiol.* 38: 1032-1035.
- Naravaneni, R. and Jamil, K., 2005, Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques, *J. Med. Microbiol.* 54: 51-54.
- Tasci, F., Sahindokuyucu, F. and Ozturk, D., 2011, Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province, *Afr. J. Agr. Res.* 6: 937-942.
- Wilson, E., Foter, M.J. and Lewis, K.H., 1959, A rapid test for detecting *Staphylococcus aureus* in food, *Appl. Microbiol.* 7: 22-26.