

การตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียในกุ้งแช่แข็ง ด้วยมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

Detection of Bacterial Contamination in Frozen Shrimp Using Multiplex Polymerase Chain Reaction

นฤมล ชนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

ธีระชัย ชนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์แบบไม่สกัดแยกดีเอ็นเอได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียในกุ้งแช่แข็ง โดยออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* และ *Salmonella enterica* serovar Typhi ผลการวิจัยพบว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเป้าหมาย และมีความไวของการตรวจสอบในกุ้งแช่แข็งได้ถึง 10^4 เซลล์/กรัม

คำสำคัญ : มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ การปนเปื้อนแบคทีเรีย กุ้งแช่แข็ง อีโคไล วิบริโอ ซัลโมเนลลา

Abstract

Multiplex polymerase chain reaction technique without DNA extraction was developed for the detection of bacterial contamination in frozen shrimp. Three primer pairs were designed to amplify the target DNA fragments of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. The results show that the new method of multiplex PCR technique in this study was specificity to the targeted bacteria and the sensitivity in frozen shrimp was as high as 10^4 cell/gram.

Keywords: multiplex PCR, bacterial contamination, frozen shrimp, *E. coli*, *V. cholera*, *S. Typhi*

1. บทนำ

กุ้งเป็นผลผลิตทางการประมงที่ประเทศไทย มีศักยภาพในการผลิตสูงมาก โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกกุ้งติดอันดับหนึ่งของโลก ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 23 ของผลผลิตทั่วโลก นอกจากนี้กุ้งยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย โดยมูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์กุ้งมาจากกุ้งสดแช่แข็งร้อยละ 51 และกุ้งแปรรูป (กุ้งต้ม กุ้งกระป๋อง และกุ้งปรุงแต่ง) ร้อยละ 49 ในปี พ.ศ. 2551 ผลิตภัณฑ์กุ้งสดแช่แข็งได้รับการจัดอันดับตามมูลค่าการส่งออกเป็นลำดับที่ 5 ของสินค้าเกษตรกรรม และเป็นลำดับ 1 ของสินค้าอุตสาหกรรม [1]

แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ในอาหาร คือ แบคทีเรียสาเหตุของโรคที่ติดต่อกับอาหารสู่มนุษย์ ทำให้เกิดโรคจากอาหาร (foodborne disease) ผู้ป่วยมักมีอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ และอาจมีอาการข้างเคียงอื่นๆ เช่น ปวดเมื่อยตามร่างกาย ข้ออักเสบ โรคจากอาหารแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ โรคอาหารเป็นพิษ (foodborne intoxication) และโรคติดเชื้อจากอาหาร (foodborne infection) โดยโรคติดเชื้อจากอาหารที่พบบ่อยมีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp. และ *Escherichia coli* [2]

ปัจจุบันมีวิธีตรวจสอบแบคทีเรียในอาหารแช่แข็งที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานอยู่แล้ว แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยาก มีหลายขั้นตอน และใช้เวลานานและสิ้นเปลืองผลค่อนข้างนาน ซึ่งหากประยุกต์วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อใช้ตรวจสอบแบคทีเรียก็จะสามารถลดเวลาลงได้ นอกจากนี้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่เหมาะสมยังมีความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าด้วย โดยปัจจุบันได้มีการนำวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์

หลายชนิด เช่น น้ำดื่ม เนื้อสัตว์แช่แข็ง ปลาแช่แข็ง อาหารแปรรูป โดยได้พัฒนาให้เหมาะสมกับการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตามเกณฑ์มาตรฐานของอาหารแต่ละชนิด ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบแบคทีเรียที่มักปนเปื้อนในกุ้งแช่แข็ง 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* และ *Salmonella enterica* serovar Typhi

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย

แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษา 3 ชนิด คือ *Escherichia coli* (ATCC 25922; DMST 4212), *Vibrio cholerae* O1, non O139 (DMST 2873) และ *Salmonella enterica* serovar Typhi (DMST 5784) ได้มาจากฝ่ายแบคทีเรียทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อ.เมือง จ.นนทบุรี

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง นำไปหมუნเหวียงเพื่อแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย peptone water (peptone 1 เปอร์เซ็นต์, NaCl 0.5 เปอร์เซ็นต์, pH 7.2) 2 รอบ แล้วละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียใน peptone water และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ counting chamber หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นให้เป็น 10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร และใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น แล้ว

เจือจางทีละ 10 เท่า (10-fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้ตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยตรวจยืนยันจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีของ Marshall [3]

ผสมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างกึ่งแข็งแข็งที่ละลายแล้วในตู้ปลอดเชื้อ โดยให้แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/กรัม หลังจากนั้นจึงชั่งตัวอย่างกึ่งแข็งดังกล่าว 1 กรัม ใส่ใน peptone water 99 มิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับตัวอย่างกึ่งความเข้มข้น 10^{-2} แล้วเจือจางใน peptone water ทีละ 10 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9}

ตามลำดับ ดังนั้นแต่ละความเข้มข้นจะมีแบคทีเรีย 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 เซลล์/กรัม ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่เตรียมได้นี้ใช้สำหรับการตรวจสอบความไวและความจำเพาะ โดยตรวจยืนยันจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีของ Marshall [3]

2.2 การออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นโดยการคัดแปลงจากบทความวิจัยที่เคยรายงานมาก่อน (ตารางที่ 1) ซึ่งแต่ละไพรเมอร์มีค่า Tm ประมาณ 60-62 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายในแบคทีเรียแต่ละชนิด

แบคทีเรียเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5'→3')	ยีนเป้าหมาย	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (bp)	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherichia coli</i>	F: GTAATTACCGACGAAAACGGC R: GCGTGGTTACAGTCTTGCG	<i>UidA</i>	143	Tantawiwat et al., 2005 [4]
<i>Vibrio cholerae</i>	F: ATTATTGGCTCCTGTGCAGG R: CTTGGCGCATCACTGCCC	<i>EpsM</i>	242	Kong et al., 2002 [5]
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	F: AGCCCCATCGTGTAGTCAG R: TGC GGCTGGATCACCTCC	<i>Its</i>	312	Chiu et al., 2005 [6]

2.3 การทำพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายในแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยนำตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 0.25 mM MgCl₂) ที่มีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP,

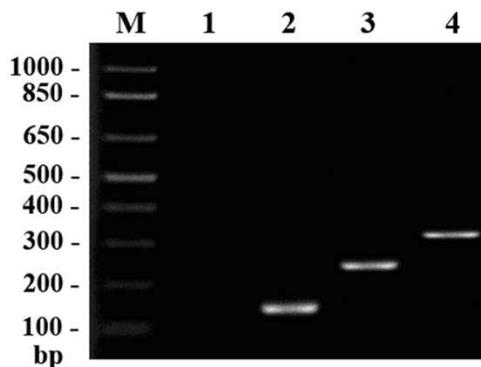
dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, Brazil) 0.5 ยูนิต โดยมีปริมาตรรวมในแต่ละหลอด 20 ไมโครลิตร ปฏิกริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (2) ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 56 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ [7]

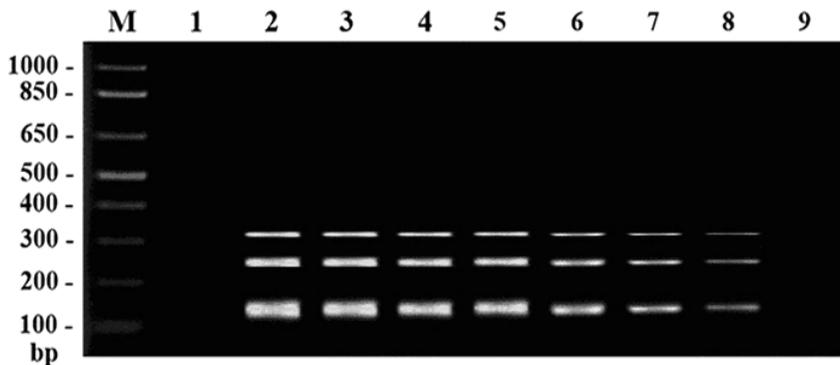
3. ผลและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งเป้าหมาย ปรากฏว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 143 คู่เบส ของยีน *Uida* ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *E. coli* ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 242 คู่เบส ของยีน *EpsM* ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *V. cholerae* และตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 312 คู่เบส ของยีน *Its* ในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Typhi แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าไพรมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ตัวอย่างที่มีแบคทีเรียรวม 3 ชนิด ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 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/ปฏิกิริยา ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 143, 242 และ 312 คู่เบส ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *V. cholerae* และ *S. enterica* serovar Typhi แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 1 เซลล์/ปฏิกิริยา (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีความไวต่อแบคทีเรียถึง 10 เซลล์/ปฏิกิริยา หรือเทียบเท่ากับตัวอย่างที่มีแบคทีเรียความเข้มข้น 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร โดยความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียนี้เท่ากับรายงานของ นฤมลและธีระชัย [8,9]



รูปที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *V. cholerae* และ *S. enterica* serovar Typhi ขนาด 143, 242 และ 312 คู่เบส ตามลำดับ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-4 คือตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย *E. coli*, *V. cholerae* และ *S. enterica* serovar Typhi ตามลำดับ]



รูปที่ 2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายในตัวอย่างที่มีแบคทีเรียรวม 3 ชนิด ความเข้มข้นต่างๆ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-9 คือตัวอย่างที่มีแบคทีเรียรวม 3 ชนิด ความเข้มข้น 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ]

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ตัวอย่างกึ่งเข้มข้นที่มีแบคทีเรียรวม 3 ชนิด ความเข้มข้น 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 เซลล์/กรัม พบว่าตัวอย่างที่มีแบคทีเรียรวม 3 ชนิด ความเข้มข้น 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 และ 10^4 เซลล์/กรัม ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 143, 242 และ 312 คู่เบส ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *V. cholerae* และ *S. enterica* serovar Typhi แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 10^3 , 10^2 และ 10 เซลล์/กรัม แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความไวต่อแบคทีเรีย 10^4 เซลล์/กรัม โดยความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียนี้เท่ากับหรือสูงกว่ารายงานของ Fode-Vaughan *et al.* และ Tantawiwat *et al.* [10,4]

4. สรุป

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด *E. coli*, *V. cholerae* และ *S. enterica* serovar Typhi ที่ปนเปื้อน

ในกึ่งเข้มข้น ซึ่งพัฒนาขึ้นในการวิจัยครั้งนี้ เป็นวิธีที่ไม่ต้องสกัดแยกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ด้วยความจำเพาะสูง โดยมีความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกึ่งเข้มข้น 10^4 เซลล์/กรัม นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบได้ภายในเวลา 4-5 ชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างรวดเร็วมาก

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ประจำปีงบประมาณ 2552 และบางส่วนได้รับการสนับสนุนจากกลุ่มเมธีวิจัยอาวุโส สกว.-สกอ. (ศาสตราจารย์ ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส และคณะ)

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] ณัฐมา ลิมากุล และรวีพิมพ์ ญวีสุข, การพยากรณ์ปริมาณการส่งออกกุ้งขาวแช่แข็งของประเทศไทยไปยังประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศญี่ปุ่นด้วยเทคนิคการวิเคราะห์อนุกรมเวลา, น. 189-200, ใน การประชุมสัมมนาวิชาการด้านการจัดการโลจิสติกส์และโซ่อุปทาน ครั้งที่ 9, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี, 2552.
- [2] นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, การตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนในหมูปดแช่แข็งด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์, Thai J. Genet. 2(2), น. 125-130, 2552.
- [3] Marshall, R.T., Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th Ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1993.
- [4] Tantawiwat, S., Tansuphasiri, U., Wongwit, W., Wongchotigul, V. and Kitayaporn, D., 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. Publ. Health, Vol. 36, pp. 162-169, 2005.
- [5] Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H.W. and Wu, R.S.S., Rapid Detection of Six Types of Bacterial Pathogens in Marine Waters by Multiplex PCR, Water Res., Vol. 36, pp. 2802-2812, 2002.
- [6] Chiu, T.H., Chen, T.R., Hwang, W.Z. and Tsen, H.Y., 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 Microb., Vol. 97, pp. 259-265, 2005.
- [7] นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียในน้ำนมโค, ว.วิทยาศาสตร์ มช. 38(2), น. 201-207, 2553.
- [8] นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, การตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำด้วยเทคนิคคูเพล็กซ์พีซีอาร์, Thai J. Genet. 1(2), น. 109-113, 2551.
- [9] นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, การประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาในน้ำดื่ม, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 17(2) น. 37-42, 2552.
- [10] Fode-Vaughan, K.A., Maki, J.S., Benson, J.A. and Collins, M.L.P., Direct PCR Detection of *Escherichia coli* O157:H7, Lett. Appl. Microbiol., Vol. 37, pp. 239-243, 2003.