

การประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบ แบคทีเรียซัลโมเนลลาในน้ำดื่ม

Applied Polymerase Chain Reaction Technique for the Detection of *Salmonella* in Drinking Water

นฤมล ชนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

ธีระชัย ชนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มด้วยวิธีที่ไม่ต้องสกัดแยกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชัน ผลการวิจัยพบว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียซัลโมเนลลาสูงและมีความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในน้ำดื่ม 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถเพิ่มความไวของการตรวจสอบได้ด้วยการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลวในระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปทำพีซีอาร์

คำสำคัญ : พีซีอาร์ การตรวจสอบแบคทีเรีย ซัลโมเนลลา น้ำดื่ม

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) technique without DNA extraction was developed for the detection of *Salmonella* in drinking water. Primer pairs were designed for amplification of DNA fragment of invasion (*InvA*) gene. The results showed that the new method of PCR technique in this study was specific to *Salmonella* with the sensitivity of at less 10^4 cells/ml and capable to enhance by growing bacterial cell in culture broth before amplification.

Keywords: PCR, Bacterial detection, *Salmonella*, Drinking water

1. บทนำ

แบคทีเรียซัลโมเนลลา (*Salmonella*) จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) ที่อยู่รอบๆ เซลล์ เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากอาหารในมนุษย์ที่มีความสำคัญเป็นลำดับต้นๆ สามารถก่อโรคติดเชื้อทั้งในระบบทางเดินอาหารและกระแสเลือด [1] ปัจจุบันยังคงเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขมูลฐานทั้งในประเทศอุตสาหกรรมและประเทศกำลังพัฒนา มีรายงานการแพร่ระบาดทั่วโลก โดยแพร่กระจายจากการปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและเครื่องดื่มที่ผ่านกรรมวิธีที่ไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียซัลโมเนลลาจึงมีความสำคัญต่อสุขอนามัยและอุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารอย่างยิ่ง [2,3,4]

ปัจจุบันมีวิธีทดสอบรวดเร็ว (rapid test) สำหรับแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในอาหารหลายวิธี อย่างไรก็ตามแต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^4 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก [5] ดังนั้นการนำเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาจึงได้รับความสนใจกันมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ เคยมีรายงานมาจะต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน [6,7] ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและเสียเวลามากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาในน้ำแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค

พีซีอาร์ โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอและเป็นวิธีที่ให้การตรวจสอบภายในเวลา 6 ชั่วโมง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาคือ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium แบคทีเรียควบคุมผลลบคือ *Escherichia coli* และ *Klebsiella* sp. โดยแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2.2 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชัน (invasion gene, *InvA*) [6] โดยออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) หมายเลข M90846 (gi:154154) ของ GenBank ซึ่งเป็นไพรเมอร์ขนาด 20 เบส จำนวน 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) ที่มีลำดับเบสเป็น 5' - CAG TGC TCG TTT ACG ACC TG - 3' ซึ่งมีค่า T_m ประมาณ 60°C และไพรเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer) ที่มีลำดับเบสเป็น 5' - AGA CGA CTG GTA CTG ATC GA - 3' ซึ่งมีค่า T_m ประมาณ 62°C

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB (nutrient broth) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ความเร็ว 750g เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 รอบ แล้วละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียในน้ำดื่มปราศจากเชื้อและนับจำนวน

แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ counting chamber หลังจากนั้นจึงปรับความเข้มข้นให้เป็น 10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยน้ำคั้นปราศจากเชื้อและใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น 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

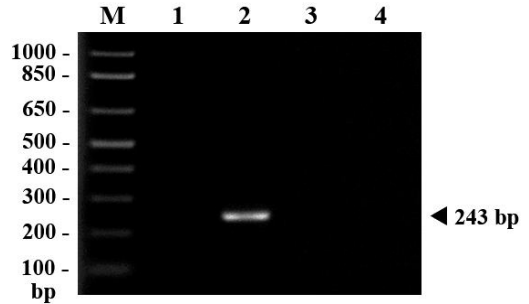
2.4 การทำพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชันในแบคทีเรียโดยนำตัวอย่างน้ำคั้นปริมาณ 1 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรมอร์ฟอริเวิร์ส และไพรมอร์ริเวิร์ส 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 [8] หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 1.5 เปอร์เซ็นต์ [9]

3. ผลและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรมอร์ฟที่ออกแบบจากชิ้นส่วนของยีนอินเวชันปรากฏว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 243 คู่เบส ในตัวอย่างน้ำคั้นที่มีแบคทีเรีย *Salmonella* Typhimurium แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างน้ำคั้นที่มีแบคทีเรีย *E. coli*, *Klebsiella* sp. และตัวอย่างน้ำคั้นที่ไม่มีแบคทีเรีย

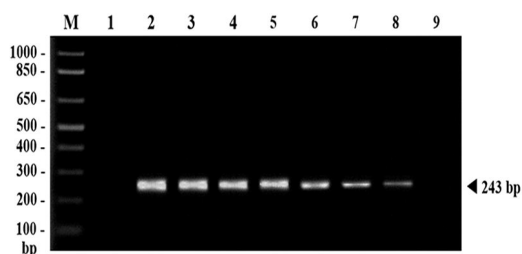
(ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่าไพรมอร์ฟอริเวิร์สและไพรมอร์ริเวิร์ส ที่ออกแบบนี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียซัลโมเนลลาเท่านั้น



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชันซึ่งตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อแบคทีเรียซัลโมเนลลาขนาด 243 คู่เบส [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างน้ำคั้นที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-4 คือตัวอย่างน้ำคั้นที่มีแบคทีเรีย *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* และ *Klebsiella* sp. ตามลำดับ]

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชันโดยใช้ตัวอย่างน้ำคั้นที่มีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างน้ำคั้นแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 1 ไมโครลิตร ซึ่งมีแบคทีเรีย 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 1 เซลล์ ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าตัวอย่างน้ำคั้นที่มีแบคทีเรีย 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 เซลล์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 243 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างน้ำคั้นที่มีแบคทีเรีย 1 เซลล์ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความไวต่อแบคทีเรียซัลโมเนลลา

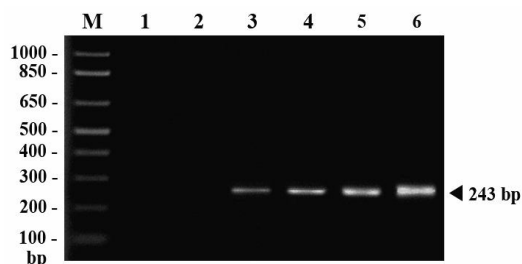
ถึง 10 เซลล์/ปฏิกิริยา หรือเทียบเท่ากับน้ำดื่มที่มีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร โดยมีความไวเท่ากับรายงานของ Jenikova และคณะ ซึ่งมีวิธีการและขั้นตอนการตรวจสอบที่ยู่ยากกว่า [5]



ภาพที่ 2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชันในตัวอย่างน้ำดื่มที่มีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้นต่างๆ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างน้ำดื่มที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-9 คือตัวอย่างน้ำดื่มที่มีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ]

ตัวอย่างน้ำดื่มที่มีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชันด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้น เมื่อเติมอาหาร 2x NB ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าตัวอย่างที่บ่มนาน 45, 60, 75 และ 90 นาที ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 243 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่บ่มนาน 30 นาที (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่มความไวของ

เทคนิคพีซีอาร์ได้ด้วยการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหาร NB เป็นเวลานานอย่างน้อย 45 นาที ก่อนนำไปทำพีซีอาร์ โดยการเพิ่มความไวของเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้อาจเพิ่มได้มากขึ้นอีกด้วยการบ่มแบคทีเรียในอาหาร NB เป็นเวลานานมากขึ้น ดังนั้นตัวอย่างน้ำดื่มที่มีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^2 , 10^1 และ 1 เซลล์/มิลลิลิตร นั้นจึงน่าจะสามารถตรวจสอบได้เช่นกันถ้าเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหาร NB ในระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปทำพีซีอาร์



ภาพที่ 3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนอินเวชันในตัวอย่างน้ำดื่มที่มีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างน้ำดื่มที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-6 คือตัวอย่างน้ำดื่มหลังจากเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหาร NB เป็นเวลา 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ตามลำดับ]

4. สรุป

การวิจัยนี้ได้ประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มโดยไม่ต้องสกัดแยกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย เทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้จะเพิ่ม

ขึ้นส่วนของยีนอินเวชัน โดยมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียซัลโมเนลลาสูงและมีความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในน้ำดื่ม 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และสามารถเพิ่มความไวของการตรวจสอบได้ด้วยการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหาร NB ในระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปทำพีซีอาร์ [10] นอกจากนี้เทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ยังสามารถตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มได้ภายใน 5-6 ชั่วโมงซึ่งค่อนข้างรวดเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยวิธีอื่นที่เคยมีรายงานมาก่อน [11,12,13]

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับทุนสนับสนุนจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Ohl, M.E. and Miller, S.I., *Salmonella: A Model for Bacterial Pathogenesis*, Annu. Rev. Med., Vol. 52, pp. 259-274, 2001.

[2] Ferretti, R., Mannazzu, L., Cocolin, L., Comi, G. and Clementi, F., Twelve-hours PCR-based Method for Detection of *Salmonella* spp. in Food, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, pp. 977-978, 2001.

[3] Lampel, K.A., Orlandi, P.A. and Kornegay L., Improved Template Preparation for PCR-based Assay for Detection of Food-borne Bacterial Pathogens, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 66, pp. 4539-4542, 2000.

[4] Carli, K.T., Unal, C.B., Caner, V. and Eyigor, A., Detection of *Salmonella* in Chicken Feces by a Combination of Tetrathionate Broth Enrichment, Capillary PCR, and Capillary Gel Electrophoresis, J. Clin. Microbiol., Vol. 39, pp. 1871-1876, 2001.

[5] Jenikova, G., Pazlarova, J. and Demnerova, K., Detection of *Salmonella* in Food Samples by the Combination of Immunomagnetic Separation and PCR Assay, Internatl. Microbiol., Vol. 3, pp. 225-229, 2000.

[6] Salehi, T.Z., Mahzounieh, M. and Saeedzadeh, A., Detection of *InvA* Gene in Isolated *Salmonella* from Broilers by PCR Method, Int. J. Poultry Sci., Vol. 4, pp. 557-559, 2005.

[7] Nucera, D.M., Maddox, C.W., Hoiem-Dalen, P. and Weigel, M., Comparison of API 20E and *invA* PCR for Identification of *Salmonella enterica* Isolates from Swine Production Units, J. Clin. Microbiol., Vol. 44, pp. 3388-3390, 2006.

[8] Galan, E., Ginocchio, C. and Costeas, P., Molecular and Functional Characterization of the Salmonella Invasion Gene *InvA*: Homology of InvA to Members of a New Protein Family, J. Bacteriol., Vol. 174, pp. 4338-4349, 1992.

[9] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

[10] Chiu, C.H. and Ou, J.T., Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific

- Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-multiplex PCR Combination Assay, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 34, pp. 2619-2622, 1996.
- [11] Lim, Y., Hirose, K., Izumiya, H., Arakawa, E., Takahashi, H., Terajima, J., Itoh, K., Tamura, K., Kim, S. and Watanabe, H., Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Selective Detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Jpn. J. Infect. Dis.*, Vol. 56, pp. 151-155, 2003.
- [12] Banavandi, M.J.S., Shahhosseiny, M.H., Shahbazzadeh, D., Karimi, V., Mirzahoseini, H., Mahboudi, F., Abachi, M. and Javadi, G., Selective Amplification of *prt*, *tyv* and *invA* Genes by Multiplex PCR for Rapid Detection of *Salmonella* Typhi, *Iranian Biomed. J.*, Vol. 9, pp. 135-138, 2005.
- [13] Chotar, M., Vidova, B. and Godany, A., Development of Specific and Rapid Detection of Bacterial Pathogens in Dairy Products by PCR, *Folia Microbiol.*, Vol. 51, pp. 639-646, 2006.