

การพัฒนาการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ณัฐพล บุศยรัตน์

บทคัดย่อ

Salmonella เป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดจากอาหารโดยเป็นสาเหตุหลักของการเจ็บป่วยกว่าล้านครั้งต่อปี การตรวจจับและบ่งชี้เชื้อโรคที่รวดเร็วและเชื่อถือได้ในแหล่งอาหารและสิ่งแวดล้อมเป็นกุญแจสำคัญในการปกป้องห่วงโซ่อาหาร เทคนิค real-time PCR ที่จำเพาะสำหรับตรวจจับเชื้อโรคในอาหารถูกใช้เป็นเครื่องมือที่รวดเร็วและเชื่อถือได้สำหรับการควบคุมตัวอย่างที่ปนเปื้อนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหาร โดยมีข้อได้เปรียบในความเร็ว หลีกเลียงการปนเปื้อนข้าม และเป็นระบบอัตโนมัติ การศึกษาครั้งนี้สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบมาโดยเฉพาะ (TaqMan probe) ที่กำหนดเป้าหมายเป็นยีนที่อยู่ใน *Salmonella* DNA การทดสอบครั้งนี้สามารถระบุเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์มาตรฐาน และเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* ได้อย่างถูกต้อง 100%

คำสำคัญ: *Salmonella*, real-time PCR, การตรวจสอบหาการปนเปื้อน

A real-time PCR for Detection of *Salmonella* spp.

NATTAPHON BUSAYARAT

Abstract

Salmonella is a major foodborne pathogen responsible for more than a million illnesses annually. Rapid, reliable detection and identification of this pathogen in food and environmental sources is key to safeguarding the food supply. Real-time PCR for the specific detection of pathogens in foods is increasingly being used as a rapid and reliable tool for the control of contaminated samples along the food production chain. It offers an advantage in rapidity, avoiding of cross contamination and the possibility for automation. For the detection of *Salmonella* spp. uses specifically designed primer and probe (TaqMan probe) to target gene located on *Salmonella* DNA. The assay identified correctly 100% of 39 *Salmonella* and non-*Salmonella* standard strains tested.

Keywords: *Salmonella*, real-time PCR, Detection

บทนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. เป็นหนึ่งในเชื้อสำคัญด้านสาธารณสุขทั่วโลกอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2423 ใน Peyer's patches และม้ามของผู้ป่วยโรคไข้รากสาดน้อย (Typhoid) โดย Karl Joseph Eberth นักพยาธิวิทยาชาวเยอรมนี และได้มีการวิจัยศึกษาอย่างจริงจังโดยนายสัตวแพทย์ Daniel Elmer Salmon ร่วมกับ Theobald Smith โดยแยกเชื้อสาเหตุของโรคคหิวคอตส์กรออกมาจากสุกรที่ป่วยในปี พ.ศ. 2428

การติดเชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบ (Gastroenteritis) จากการศึกษาค้นพบว่าเชื้อ *Salmonella* เพียง 10 เซลล์ มีความสามารถทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ (Blaser and Newman, 1982) โดยผู้ที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* ประมาณ 95% จะเกิดอาการขึ้นหลังจากได้รับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* (Fatica and Schneider, 2011) ตามประกาศกรมปศุสัตว์ ณ วันที่ 30 ธันวาคม พ.ศ. 2551 เรื่องเกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออกของกรมปศุสัตว์ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ (364) พ.ศ. 2556 ณ วันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และ COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 ลงวันที่ 15 พฤศจิกายน 2548 เรื่อง microbiological criteria for foodstuffs กำหนดให้อาหารและผลิตภัณฑ์อาหารทุกชนิดที่ระบุในประกาศปริมาณ 25 กรัม ต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ทุกสายพันธุ์ (*Salmonella* spp.)

1. ชื่อโครงการ

การพัฒนาวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp.

2. ผู้รับผิดชอบ

นายณัฐพล บุศยรัตน์

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

3. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธี Real-time PCR

4. ขอบข่าย

ออกแบบวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธี Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และไพรอบที่สามารถตรวจหาอย่างจำเพาะเจาะจง

5. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธี Real-time PCR และสามารถนำไปใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อทดแทนชุดทดสอบสำเร็จรูปที่สั่งซื้อในปัจจุบัน

6. วิธีการดำเนินงาน

6.1 เตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเชื้อมาตรฐาน *Salmonella* spp. และ เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานอื่นๆ
จำนวน 39 สายพันธุ์

6.2 การสกัดสารพันธุกรรม

ตัวอย่างเชื้อใส่ในหลอด microcentrifuge นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยใช้ชุดทดสอบ High Pure PCR Template preparation Kit (Roche, Germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือวิธีการสกัดของชุดทดสอบ

6.3 ออกแบบ และ สังเคราะห์ primer/probe

สืบค้น ออกแบบ และปรับปรุงไพรเมอร์และโพรบ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Narjol González-Escalona เมื่อปี 2012

6.4 เตรียมสารละลายปฏิกิริยา Real-time PCR ในการตรวจหา *Salmonella* spp. มีรายละเอียดดังนี้

2X Probes master	ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง
10 µM Forward primer	ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง
10 µM Reverse primer	ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง
10 µM TaqMan probe	ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง
Distilled water, PCR grade	ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง
Template	ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง
Total volume	ปริมาตร 15.0 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง

โดยมีสภาวะการทำงาน : เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย 35 รอบ กำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที, 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, 54 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที

7. ผลการทดลอง

7.1 ความจำเพาะของการตรวจสอบกับเชื้อมาตรฐาน *Salmonella* spp. และ เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานอื่นๆ จำนวน 39 สายพันธุ์

ชนิดเชื้อ	Result	ชนิดเชื้อ	Result
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	negative	<i>Listeria welshimeri</i> NCTC 35897	negative
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	negative	<i>Proteus hauseri</i> ATCC 13315	negative
<i>Campylobacter coli</i> ATCC 43478	negative	<i>Proteus mirabilis</i> DMST 8212	negative
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	negative	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27858	negative
<i>Campylobacter lari</i> ATCC 35223	negative	<i>Rhodococcus equi</i> DMST 17256	negative
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	negative	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	negative
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	negative	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	negative
<i>Escherichia coli</i> ATCC 4212	negative	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DMST 20670	negative
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	negative	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	negative
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	negative	<i>Salmonella bongori</i> ATCC 43975	positive
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 DMST 12743	negative	<i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13314	positive
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	negative	<i>Salmonella diarizonae</i> ATCC 12325	positive

<i>Enterobacter sakazokii</i> DMST 20855	negative	<i>Salmonella</i> Choleraesuis ATCC 10708	positive
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	negative	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 49223	positive
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 10149	negative	<i>Salmonella</i> Paratyphi A (A) ATCC 9150	positive
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	negative	<i>Salmonella</i> Paratyphi B ATCC 8759	positive
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	negative	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	positive
<i>Listeria innocua</i> NCTC 11288	negative	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 29629	positive
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	negative	<i>Salmonella</i> Pullorum ATCC 13036	positive
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	negative		

8. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธี Real-time PCR ด้วยคูไพรเมอร์และไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้น ให้ผลการทดสอบที่มีความจำเพาะกับเชื้อมาตรฐาน *Salmonella* spp. และ เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานอื่นๆ จำนวน 39 สายพันธุ์ ที่ 100 เปอร์เซ็นต์

9. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ งานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา, กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ และ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

10. เอกสารอ้างอิง

- Blaser, M.J. and Newman, L.S. 1982. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. **Reviews of Infectious Diseases** 4: 1096-1106.
- Fatica, M.K. and Schneider, K.R. 2011. *Salmonella* and produce: survival in the plant environment and implications in food safety. **Virulence** 2: 573-579.
- González-Escalona, N., Brown, E.W. and Zhang, G. 2012. Development and evaluation of a multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting *ttrRSBCA* locus and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella* spp. in fresh produce and eggs. **Food Res. Int.** 48: 202-208.