การตรวจหาเชื้อปนเปื้อนในอาหารโดยใช้วิธีพีซีอาร์

จันทร์แรม รูปขำ นักวิจัยชำนาญการ
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหารก่อให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุขและความปลอดภัยอาหารอย่างร้ายแรง เมื่อเกิดปัญหาแล้วจำเป็นต้องหาทางแก้ไขให้รวดเร็วที่สุด การตรวจหาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับความปลอดภัยอาหาร ซึ่งมีวิธีการตรวจได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจด้วยไบโอเซนเซอร์ การตรวจภูมิคุ้มกันวิทยา และการตรวจจากกรดนิวคลีอิกหรือตรวจจากดีเอ็นเอ เช่นเทคนิคการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพรีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) การหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) การวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ เป็นต้น ความปลอดภัยด้านอาหารเป็นปัญหาสำคัญในขณะที่ประชากรเพิ่มขึ้นและทรัพยกรธรรมชาติลดลง อาหารมักมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส พยาธิ และโปโตซัว และก่อให้เกิดโรคในมนุษย์โดยผ่านทางอาหารและน้ำที่รับประทานเข้าสู่ร่างกาย การปนเปื้อนของจุลินทรีย์หรือสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างจะส่งผลต่อการเจ็บป่วยของผู้บริโภค (ตารางที่ 1)

โรคที่เกิดจากอาหารมีความรุนแรงในระดับที่ไม่เท่ากันบางชนิดมีความรุนแรงมากมีอันตรายถึงแก่ชีวิต ดังนั้นผู้ประกอบอาหารหรือผลิตอาหารควรมีความเข้าใจและตระหนักถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งต้องปฏิบัติโดยใช้มาตรการรักษาความสะอาด อุปกรณ์และวัตถุดิบที่ใช้ต้องสะอาด มีการแยกอาหารที่ปรุงสุกแล้วออกจากอาหารดิบ ปรุงอาหารให้สุกอย่างทั่วถึง เก็บรักษาอาหารให้อยู่ในอุณหภูมิที่เหมาะสม การตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหารจึงมีความสำคัญและจำเป็นเบื้องต้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารด้วยเทคนิค PCR ที่พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ (ตารางที่ 2) ในการระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งวิธีการนี้ได้ผลที่เร็วกว่าการตรวจเพาะเชื้อตามวิธีมาตรฐานซึ่งปกติใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์

ตารางที่ 1 ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

ชนิดจุลินทรีย์	อาการที่ก่อให้เกิดโรค
Escherichia coli	ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้
Clostridium botulinum	อาหารเป็นพิษ
Campylobacter	ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้
Listeria monocyte	ท้องเสีย
Staphylococcus aureus	อาหารเป็นพิษ
Salmonella spp.	ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้
Vibrio parahaemolyticus	อาหารเป็นพิษ
Vibrio cholera	ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน
Yersinia	อาหารเป็นพิษ
Aspergillus (aflatoxin)	สารพิษ aflatoxin ทำลายตับ สาเหตุการเกิดโรคมะเร็ง
Penicillium verrucosum, และ *A. ochraceus*	สารพิษ ochratoxin ทำลายไต สาเหตุการเกิดโรคมะเร็ง
Fusarium moniliforme F. proliferatum และ *Alternaria alternate*	สารพิษ fumonisin เป็นพิษต่อระบบประสาท สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งหลอดอาหาร
P. expansum Aspergillus และ *Byssochlamys*	สารพิษ patulin เป็นสารก่อมะเร็ง

ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ที่จำเพาะในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

Microorganism/Gene	Primer sequence	Size (bp)	reference
Escherichia coli (afa)	F 5' GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC 3' R 5' CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG 3'	750	Yamamoto et al.,1995
Campylobacter coli (ceuE) *C. jejuni (mapA)*	F 5' ATTTGAAAATTGCTCCAACTATG 3' R 5' TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG 3' F 5' CTATTTTATTTTTGAGTGCTTGTG 3' R 5' GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA 3'	462 589	Gonzalez et al., 1997 Denis et al., 1999; Gonzalez et al., 1997 Denis et al., 1999
Clostridium. botulinum types B *C. botulinum* type E	F 5' CAGGATTATTTGCAGGTTGGGTGA 3' F 5' GTATTAACTGTTGAGAGCCATTGCG 3' F 5′ GTGAGTTATTTTTTGTGGCTTCCGAGA 3' F 5′ TTATTTTCACCTTCGGGCACTTTCTG	370 307	Alsallami et al., 2001
Listeria monocytogenes (hlyA)	F 5' CGGAGGTTCCGCAAAAGATG 3' R 5' CCTCCAGAGTGATCGATGTT 3'	234	Furrer et al., 1991
Vibrio parahaemolyticus (ToxR) *V. cholerae (Rfb O139)* *V. vulnificus (cth)* *Shigella (ipaH)*	F 5' GTCTTCTGACGCAATCGTTG 3' R 5' ATACGAGTGGTTGCTGTCATG 3 F 5' AGCCTCTTTATTACGGGTGG 3' R 5' GTCAAACCCGATCGTAAAGG 3' F 5' TTCCAACTTCAAACCGAACTATGA 3' R 5' ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG 3' F 5' GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC 3' R 3' GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC 3'	368 449 205 600	Kim et al. 1999 Hoshino et al. 1998 Brasher et al. 1998 Hartman et al., 1990
Salmonella spp.(fimA) *Salmonellae (invA)*	F 5' CCTTTCTCCATCGTCCTGAA 3' R 5' TGGTGTTATCTGCCTGACCA 3' F 5' ACCACGCTCTTTCGTCTGG 3' R 5' GAACTGACTACGTAGACGCTC 3'	120 941	Cohen et al. 1996 Eichelberg et al., 1994
Staphylococcus aureus (coa)	F 5' ATAGAGATGCTGGTACAGG 3' R 5' GCTTCCGATTGTTCGATGC 3'	656	Hookey et al., 1989
*Fusarium : p*olyketide synthase *(PKS4)*	F 5′ CGTCTTCGAGAAGATGACAT 3′ R 5′ TGTTCTGCAAGCACTCCGA 3′	280	Atoui et al., 2012; Meng et al., 2010
*Fusarium : p*olyketide synthase *(PKS13)*	F 5′ CTGAGAAATATCGCTACACTACCGAC 3′ R 5′ CCCACTCAGGTTGATTTCGTC 3′	192	Atoui et al., 2012; Meng et al., 2010
Fusarium : Zearalenone synthesis ZEB1	F 5′ AAATAATTTACCCGTTCTTCTGGGAACT 3′ R 5′ CTGAAACGGAGGTGTTGAGG 3′	129	Gaffoor and Trail, 2006; Kim et al., 2005; Lee, S.H. et al., 2011
Fusarium : Zearalenone synthesis ZEB2	F 5′ GGGATTAACCGCTGTGG 3′ R 5′ TAGGCATGCCCGAAACCGAAAGT 3	80	Gaffoor and Trail, 2006; Kim et al., 2005; Lee, S.H. et al., 2011
Aspergillus and *Penicillium* *Aflatoxins (aflR)*	F 5' CGAAAGCTCCGGGATAGCTGTACG 3' R 5' CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG 3'	979	Chen et al., 2020
Aspergillus and *Penicillium* *Aflatoxins (omt-1)*	F 5' GTGGACGGACCTAGTCCGACATCAC 3' R 5' GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG 3'	797	Chen et al., 2020
Aspergillus and *Penicillium* *Aflatoxins (nor-1)*	F 5' ACCGCTACGCCGGCGCTCTCGGCAC 3' R 5' GTTGGCCGCCAGCTTCGACACTCCG 3'	397	Chen et al., 2020
Aspergillus and *Penicillium* *Aflatoxins (ver-1)*	F 5' GCCGCAGGCCGCGGAGAAAGGTGGT 3' R 5' CCGCAGTCAATGGCCATGCAGCG 3'	452	Chen et al., 2020
A. carbonarius, A. melleus, A. sulfureus, A. ochraceus, P. verrucosum P. citrinum and Monascus ruber OTA and citrinin producing	F' 5' GCCAGACCATCGACACTGCATGCTC 3' R 5' CGACTGGCGTTCCAGTACCATGAGCC 3'	520	Dao et al., 2005
A. ochraceus	F 5' CATCCTGCCGCAACGCTCTATCTTTC 3' R 5' CAATCACCCGAGGTCCAAGAGCCTCG 3'	690	Dao et al., 2005

เอกสารอ้างอิง

Alsallami, A. A., & Kotłowski, R. (2001). Selection of primers for specific detection of *Clostridium botulinum* types B and E neurotoxin genes using PCR method. *International journal of food microbiology*, *69*(3), 247-253.

Atoui, A., El Khoury, A., Kallassy, M., & Lebrihi, A. (2012). Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. International journal of food microbiology, 154(1-2), 59-65.

Brasher, C. W., DePaola, A., Jones, D. D., & Bej, A. K. (1998). Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. *Current microbiology*, *37*(2), 101-107.

Cohen, H. J., Mechanda, S. M., & Lin, W. (1996). PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Applied and environmental microbiology*, *62*(12), 4303-4308.

Chen, L., Guo, W., Zheng, Y., Zhou, J., Liu, T., Chen, W., ... & Zhang, J. (2020). Occurrence and characterization of fungi and mycotoxins in contaminated medicinal herbs. *Toxins*, *12*(1), 30.

Dao, H. P., Mathieu, F., & Lebrihi, A. (2005). Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, *104*(1), 61-67.

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of am-PCR assay for simultaneous identification of Campylobacter jejuni and C. coli. *Letters in applied microbiology*, *29*(6), 406-410.

Eichelberg, K., Ginocchio, C. C., & Galan, J. E. (1994). Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of *InvC* to the F0F1 ATPase family of proteins. *Journal of bacteriology*, *176*(15), 4501-4510.

Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C., & Luethy, J. (1991). Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. *Journal of Applied Bacteriology*, *70*(5), 372-379.

Gaffoor, I., & Trail, F. (2006). Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. Applied and Environmental Microbiology, 72(3), 1793-1799.

Gonzalez, I., Grant, K. A., Richardson, P. T., Park, S. F., & Collins, M. D. (1997). Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(3), 759-763.

Hartman, A. B., Venkatesan, M., Oaks, E. V., & Buysse, J. M. (1990). Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *Journal of bacteriology*, *172*(4), 1905-1915.

Hookey, J. V., Richardson, J. F., & Cookson, B. D. (1998). Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *Journal of clinical microbiology*, *36*(4), 1083-1089.

Hoshino, K., Yamasaki, S., Mukhopadhyay, A. K., Chakraborty, S., Basu, A., Bhattacharya, S. K., ... & Takeda, Y. (1998). Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *20*(3), 201-207.

Kim, Y. B., Okuda, J. U. N., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., & Nishibuchi, M. (1999). Identification of Vibrio parahaemolyticus strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(4), 1173-1177.

Kim, Y. T., Lee, Y. R., Jin, J., Han, K. H., Kim, H., Kim, J. C., ... & Lee, Y. W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. Molecular microbiology, 58(4), 1102-1113.

Lee, S., Son, H., Lee, J., Lee, Y. R., & Lee, Y. W. (2011). A putative ABC transporter gene, ZRA1, is required for zearalenone production in *Gibberella zeae*. Current genetics, 57(5), 343-351.

Meng, K., Wang, Y., Yang, P., Luo, H., Bai, Y., Shi, P., ... & Yao, B. (2010). Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene PKS4. Food Control, 21(2), 207-211.

Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *12*(2), 85-90.