Agricultural Sci. J. 45 : 3/1 (Suppl.) : 25-28 (2014) ว. วิทย. กษ. 45 : 3/1 (พิเศษ) : 25-28 (2557)

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในแตงแคนตาลูปตัดแต่ง : กรณีศึกษาการตรวจเชื้อ *Listeria monocytogenes* นอกห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิค HDA และแผ่นเงินนาโนสีฟ้า

Bacterial Contamination Assay in Fresh Cut Cantaloupe : Case Study on Outside Laboratory Test of *Listeria monocytogenes* Based on Helicase Dependent Amplification (HDA) and the Utilization of Blue Silver Nanoplates

กัลย์กนิต พิสมยรมย์[1] **และ ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์**[1]
Kankanit Pisamayarom[1]and Piyasak Chaumpluk [1]

Abstract

A recall of US cantaloupe melon, potentially contaminated with the lethal *Listeria monocytogenes* in 2003 indicated a significant of quality control and safety management in this fresh-cut fruits. Conventional methods used thus far for safety monitoring, including plate counting, immunological methods, are laborious, time consuming, and heavily depending on laboratoly facilities. In this study, helicase dependent amplification (HDA) with DNA signal detection via blue silver nanoplates (AgNPls) was developed to detect *hly* gene of *L. monocytogenes* in fresh-cut cantaloupe. The detection processes were based on an enrichment procedure made directly in Terrific Broth using cotton ball swapping technique on fresh-cut surface to enable specific DNA amplification of *hly* gene at constant 65°C. HDA products were detected by a plasmonic colorimetric change of blue AgNPls. Positive specimen showed blue color of non aggregated nanoplates while all negative specimens exhibited a pale gray of aggregated nanoplates. The method had a limit of detection at 100 copies of *L. monocytogenes* DNA per 50 g specimen. No cross reactivity was observed from specimens contaminated with other bacteria. On field assay in Pathumwan district in Bangkok during June, 2013, demonstrated a null contamination of this lethal pathogen in fresh-cut cantaloupe. The method had merits on its rapidness, easy to use, and less reliable on laboratory facilities, suitable for field safety monitoring for fresh-cut products.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Helicase Dependent Amplification (HDA), Blue silver nanoplates (AgNPls)

บทคัดย่อ

การเรียกคืนสินค้าแตงแคนตาลูปในสหรัฐอเมริกา อันเนื่องจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ในปี ค.ศ. 2003 ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการควบคุมคุณภาพและการจัดการด้านความปลอดภัยในผลไม้สดตัดแต่ง วิธีการดั้งเดิมในการตรวจสอบความปลอดภัย ทั้งการตรวจนับจุลินทรีย์ วิธีการตรวจทางเซรั่มวิทยา ต้องใช้แรงงาน เวลา และที่สำคัญต้องพึ่งห้องปฏิบัติการในด้านเครื่องมือ การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการเฮลิเคสดีเพนเดนท์แอมพิฟิเคชันและการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้าในการตรวจสอบยีน *hly* ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในแตงแคนตาลูปสดตัดแต่ง กระบวนการตรวจสอบนี้ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลว Terrific Broth ด้วยการนำสำสีก้อนที่เช็ดบนพื้นผิวของผลไม้สดตัดแต่ง เพื่อสามารถทำการเพิ่มจำนวนยีน *hly* ที่อุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการเฮลิเคสดีเพนเดนท์แอมพิฟิเคชันตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลายแผ่นเงินนาโนสีฟ้า ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะไม่เกิดการตกตะกอนของแผ่นนาโน เห็นเป็นสีน้ำเงิน ขณะที่ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะเห็นเป็นสีเทาจางๆ จากการตกตะกอนแผ่นนาโน ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดที่วิธีการนี้สามารถตรวจสอบได้คือ 100 ก๊อปปี้ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ต่อ 50 กรัมตัวอย่าง และไม่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียชนิดอื่น ผลการเก็บตัวอย่างแตงแคนตาลูปสดตัดแต่งในเขตปทุมวัน กรุงเทพ ช่วงเดือนมิถุนายน ค.ศ. 2013 ไม่พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ในแตงแคนตาลูปสดตัดแต่ง วิธีการนี้มีข้อดีคือ รวดเร็ว ง่าย และลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจสอบความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์สดตัดแต่ง

คำสำคัญ: เชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes*, เฮลิเคส ดีเพนเดนท์ แอมพิฟิเคชัน, แผ่นเงินนาโนสีฟ้า

[1] ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืช และไบโอเซ็นเซอร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพฯ 10330
[1] Plant Transgenic Technology and Biosensor Laboratory, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

คำนำ

ปัจจุบันตลาดผลไม้สดตัดแต่งขยายตัวมาก เนื่องจากการตัดแต่งอำนวยสะดวกในการบริโภค จึงพบผลิตภัณฑ์ผลไม้ตัดแต่งว่างจำหน่ายทั้งในซุปเปอร์มาเกต ตลาดสด และรถเข็น ผลไม้ตัดแต่งพร้อมบริโภคต้องผ่านขั้นตอนการตัดแต่งที่มีการสัมผัสกับมีด ภาชนะ รวมถึงน้ำที่ใช้ในการทำความสะอาด การคำนึงถึงความปลอดภัยและสุขอนามัยของผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งสำคัญ แคนตาลูปเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมผิวของแคนตาลูปจะมีการสัมผัสกับพื้นดินในระหว่างปลูก จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคที่มีอยู่บนผิวดิน ในอดีตมีรายงานการเรียกคืนสินค้าแคนตาลูปและเมลอนตัดแต่ง เนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* (FDA, 2003) และการระบาดของเชื้อนี้ ในรัฐโคโลราโด สหรัฐเมริกา ซึ่งพบการติดเชื้อและเสียชีวิตถึง 13 ราย ส่งผลให้เกิดการเรียกคืนสินค้าแคนตาลูปออกจากตลาด (REUTERS, 2011)

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน เจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียอื่น สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน เมื่อติดเชื้อจะก่อให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส (listeriosis) ผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรค ได้แก่ ทารกแรกเกิดอายุต่ำกว่า 4 สัปดาห์ สตรีมีครรภ์ ผู้สูงอายุและผู้ที่ระบบภูมิคุ้มกันต่ำ อาการที่พบคล้ายอาการของ ไข้หวัดใหญ่ เช่น มีไข้ ปวดหัว อาจแสดงอาการของระบบทางเดินอาหาร ผลที่ตามมาจากการติดเชื้อ ทำให้สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) โลหิตเป็นพิษในทารก และทำให้หญิงมีครรภ์แท้ง (abortion) ได้ (Begley *et al*., 2003) เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแคนตาลูปตัดแต่ง ซึ่งวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการตรวจนับจุลินทรีย์เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจสอบ วิธีการตรวจทางเซรั่มวิทยา และการตรวจด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ อย่างไรก็ตาม การตรวจดังกล่าวผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญและต้องพึ่งห้องปฏิบัติการจึงยากที่นำออกตรวจในภาคสนาม อีกทั้งการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมักใช้วิธี gel electrophoresis โดยการย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และส่องด้วยแสงยูวี งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการเฮลิเคสดีเพนเดนท์แอมพิฟิเคชัน (Helicase Dependent Amplification (HDA)) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย และตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้า โดยมุ่งเน้นการตรวจสอบยีน *hly* ของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ในแคนตาลูปสดตัดแต่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียและตัวอย่างแคนตาลูป

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งสิ้น 12 สายพันธุ์ แบ่งเป็นกลุ่มทดลองบวก ได้แก่ *Listeria monocytogenes* และกลุ่มทดลองลบ ได้แก่ *L innocua* 2 สายพันธุ์ คือ *L. ivanovii, Vibrio parahaemolyticus, V. cholera, Salmonella enteritidis, E. coli* O157, ETEC, EPEC*, Pseudomonad putida และ Shigella flexneri* อีกอย่างละหนึ่งสายพันธุ์ นำเชื้อลงเลี้ยงในอาหาร Luria Broth (LB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดด้วยวิธี phenol extraction (Cossart, 1988) การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* จากแคนตาลูปทำโดยเก็บตัวอย่างแคนตาลูปสดตัดแต่งจากตลาดสดและแผงลอย ในเขตปทุมวัน กรุงเทพ และตรวจสอบการปนเปื้อนจากตัวอย่างน้ำหนัก 50 กรัม โดยใช้สำลีก้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช็ดบริเวณผิวสัมผัสของตัวอย่างให้ทั่ว และนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Terrific Broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที และทำการสกัดเชื้อที่ได้ด้วยวิธี phenol extraction เช่นกัน

การเปรียบเทียบผลการตรวจสอบการปนเปื้อนกับผลการทดลองที่เป็นบวกดำเนินการโดยนำ *L. monocytogenes* ที่เลี้ยงไว้ในอาหาร LB หยดลงบนแคนตาลูปห่นชิ้น จากนั้นนำเชื้อลงเลี้ยงในอาหารเหลว Terrific broth บ่มที่ 37 อาศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที และสกัดด้วยวิธี phenol extraction

เทคนิค HDA และตรวจสอบสัญญาณด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้า

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *hly* โดยวิธีอ้างอิงจาก Furrer *et al*. (1991) และแยกผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิสพร้อมส่องดูภายใต้แสงยูวี และนำตัวอย่างเดียวกันไปทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเฮลิเคสดีเพนเดนท์แอมพิฟิเคชัน ด้วยชุดตรวจสอบ IsoAmp®III Universal tHDA Kit (BioHelix, Beverly, MA, USA) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hly* 1 คู่ที่ออกแบบได้ด้วยโปรแกรม Primer3 (v.0.4.0) และตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้า โดยทดสอบความไวของเทคนิค และการทดสอบความจำเพาะของไพเมอร์ต่อยีนเป้าหมายร่วมกันกับแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มทดลองบวกและเชื้อกลุ่มทดลองลบจำนวน 11 สายพันธุ์

ผล

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเฮเลิเคสดีเพนเดนท์แอมพิฟิเคชัน และการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ สามารถได้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 91 คู่เบส และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปตรวจสัญญาณดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้า พบว่าในตัวอย่างที่เป็นกลุ่มควบคุมลบเกิดการตกตะกอนของแผ่นเงินนาโนสีฟ้า สอดคล้องกับการผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิสได้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 234 คู่เบส ส่วนตัวอย่างกลุ่มการทดลองบวก พบว่าไม่เกิดการตกตะกอนของแผ่นเงินนาโนสีฟ้า (Figure 1) ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค HDA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้า พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อเชื้อ Listeria เพียงชนิดเดียว โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่ได้จากกลุ่มการทดลองลบ (Figure 2(A)) และการทดสอบความไวของเทคนิค HDA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้า (Figure 2(B)) ไม่แตกต่างกัน โดยสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อที่มีปริมาณต่ำสุดได้ 100 ก๊อปปี้เทียบเท่า 100 CFU และจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในแคนตาลูปสดตัดแต่งเขตพื้นที่ปทุมวัน จำนวน 100 ตัวอย่างไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ (Figure 3(A)) และเมื่อทดสอบกับแคนตาลูปตัดแต่งที่มีเชื้อที่ระดับ 100 CFU พบว่า สามารถตรวจสอบแถบและสัญญาณดีเอ็นเอได้ (Figure 3(B))

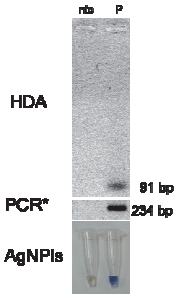

Figure 1 DNA product from the amplification of the *hly* gene by HDA compared with the products of PCR and with detection based on color changes in the blue AgNPIs, Lane ntc, non-template control; Lane P, positive DNA from *L. monocytogenes*.

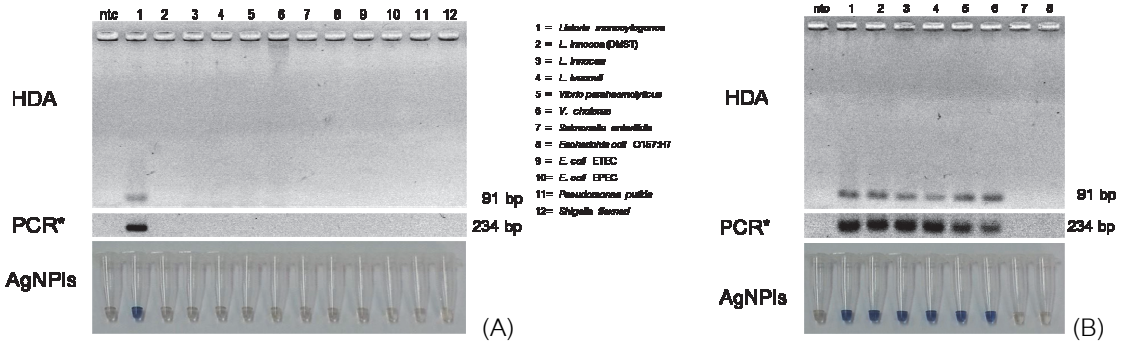

Figure 2 (A) The specificity of the HDA reaction for *L. monocytogenes* compared with that of PCR, along with detection based on AgNPIs. (B) The detection limit of the HDA reaction using DNA as the template compared with that of PCR and the colorimetric AgNPIs assay, Lane ntc, non-template control; Lanes 1-8, 10-fold serial dilutions of *L. monocytogenes* template DNA, ranging from 10^7 copies to 0 copies.

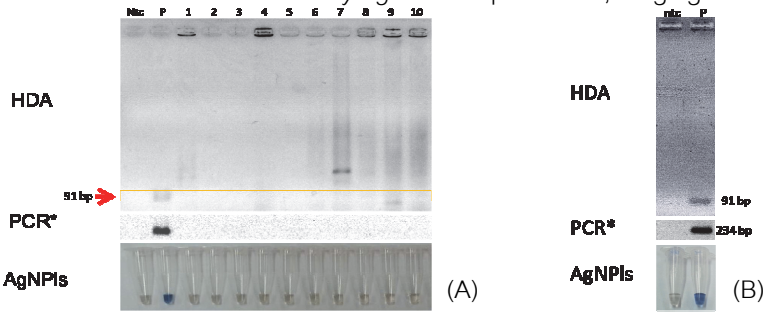

Figure 3 (A) Field study on 10 specimens detected via *hly* gene of *L. monocytogenes* (B) Fresh-cut cantaloupe spiked with bacteria 100 CFU of *L. monocytogenes* and an assay using HDA and colorimetric detection using AgNPIs

วิจารณ์ผล

การระบาดของเชื้อ *Listeria monocytogenes* สาเหตุของโรค listeriosis ทำให้เกิดการเฝ้าระวังเรื่องความปลอดภัยในอาหารสด อาหารแปรรูป และผลไม้สดตัดแต่งเพื่อลดความเสี่ยงและอันตรายที่จะเกิดขึ้น โดยเฉพาะกรณีที่มีผู้เสียชีวิตจากการระบาดของเชื้อชนิดนี้ (FDA, 2003 และ Reuters, 2011) การตรวจสอบเชื้อก่อโรคด้วยเทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการการตรวจสอบเชื้อชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ของ Zeng *et al*. (2006) แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีข้อจำกัด จึงมีการพัฒนาวิธีการเฮลิเคสดีเพนเดนท์แอมพิฟิเคชัน (Vincent *et al*., 2004) และการตรวจสอบสัญญานดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้าขึ้น ผลการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษายีน *hly* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร haemolysin (Cossart, 1988) และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนนี้ ผลการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค HDA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR (Furrer, 1991) ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน ส่วนการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อก่อโรค 12 ชนิดพบว่าทำปฏิกิริยาเฉพาะเชื้อ *L. monocytogenes* เท่านั้น และการทดสอบความไวของปฏิกิริยาเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค HDA และ PCR ให้ผลไม่แตกต่างกัน การตรวจสอบสัญญานดีเอ็นเอโดยอาศัยเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคนาโน (Li and Rothberg, 2004) ได้นำมาประยุกต์ใช้กับแผ่นเงินนาโนสีฟ้าเพื่อการตรวจสอบดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเทาจางๆในกลุ่มควบคุมลบและยังคงเป็นสีฟ้าในกลุ่มควบคุมบวก

สรุป

การพัฒนาเทคนิคเฮเลิเคสดีเพนเดนท์แอมพิฟิเคชันเพื่อการเพิ่มปริมานยีน *hly* ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยแผ่นเงินนาโนสีฟ้าในแคนตาลูปตัดแต่ง เป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่าย มีความจำเพาะ และลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อก่อโรคในอาหารเพื่อความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์สดตัดแต่งได้ ค่าใช้จ่ายประมาณ 150-180 บาทต่อตัวอย่าง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก สำหรับการสนับสนุนทุนในการทำวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการหน่วยรับรู้ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้อนุภาคเงิน

เอกสารอ้างอิง

Begly, M., C. Hill and C.G.M. Gahan. 2003. Identification and disruption of *btlA*, A locus involved in bile tolerance and general stress resistance in *Listeria monocytogenes*. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters 218: 31-38.

Food and Drug Administration (FDA). 2003. Duck delivery product recalls cut honeydew and cut cantaloupe melon for possible health risk. [Online]. Available source: http://classaction.findlaw.com/recall/drug/fda1/files/2003/duck07_03.html. (13 July 13, 2014).

Cossart, P. 1988. The listeriolysin O gene: A chromosomal locus crucial for the virulence of *Listeria monocytogenes*. Infection 16(2): S157-S159

Furrer, B., U. Candrian, Ch. Hoefelein and J. Luethy. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. J. Appl. Bacteriol. 70: 372-379.

Reuters. 2011. U.S. Listeria outbreak kills 13, infects 72; infections reported in 18 states. [Online]. Available source: http://www.reuters.com/article/2011/09/30/us-usa-listeria-idUSTRE78T4N320110930. (14 July 2014).

Vincent, M., Y. Xu and H. Kong. 2004. "Helicase-dependent isothermal DNA amplification". *EMBO Rep* 5(8):795–800.

Zeng, H., X. Ahang, Z. Sun and W. Fang. 2006. Multiplex PCR identification of *Listeria monocytogenes* isolates from milk and milk-processing environments. J. Sci. Food Agric. 86:367-371.

Li, H. and L. Rothberg. 2004. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004. 101(39):14036-14039.