Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 568-571 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 568-571 (2553)

การตรวจการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ด้วย เทคนิค PCR และคัดแยกสายพันธุ์ในกระบวนการผลิตผักสดเพื่อการส่งออก

PCR Detection and Isolation of *Salmonella* spp. in Exported Fresh Produce

วิภาวดี อ้นท้วม[1], พรเพ็ญ มรกตจินดา[1], วราภา มหากาญจนกุล[1] และ นิภา โชคสัจจะวาที[2]
Wipawadee Ontoum[1], Pornpen Morakotjinda[1], Warapa Mahakarnchanakul[1] and Nipa Chokesajjawatee[2]

Abstract

In 2005, the contamination of *Salmonella* spp. in fresh produce exporting affected on the import-export factory and all the stakeholders in this business, especially farmers. The contamination of this pathogen caused unreliable and more stringency in inspection by oversea buyers. The PCR technique which known as rapid method and internationally accepted test system in combination with MPN technique was conducted to compare with conventional method in the detection the amounts of *Salmonella* spp. in exported sweet basil, from Nakhonpathom province, and also in the surrounded environment. The results showed that pre-washed, post-washed and unloaded sweet basil exporting samples (n=10) were contaminated with *Salmonella* spp. 60, 100 and 40%, respectively. The isolates were done serotyping and found Hvittingfoss (group I) in pre-washed sweet basil. While surrounded environmental samples such as soils, manures, irrigation water (15 samples each) and gloves (n = 8), trimming tables (n = 6) and scissors (n = 5) were contaminated with *Salmonella* spp. at 33.33, 26.67, 53.33, 87.5, 100 and 60%, respectively. Serotype Bovismorbificans (group C) and Aberdeen (group F) were found from gloves and trimming tables. The detection of *Salmonella* spp. contaminated by PCR technique found positive 56.38% while the conventional method found 4.25% from 94 samples.

Key word: exporting fresh produce, *Salmonella* spp., PCR technique

บทคัดย่อ

อุบัติการณ์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดเพื่อการส่งออกในปี 2005 มีผลกระทบต่อโรงงานผักสดส่งออกตลอดจนผู้เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะเกษตรกรผู้ปลูก สร้างความไม่เชื่อมั่นในสินค้าและเข้มงวดในการตรวจสอบเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะประเทศผู้ซื้อสินค้า การพัฒนาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในโหระพาเพื่อการส่งออกและปัจจัยแวดล้อมจากแปลงผลิตผักจังหวัด นครปฐม โดยเทคนิค PCR ร่วมกับเทคนิค MPN เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบตามปกติ พบว่า โหระพาก่อนล้าง หลังล้างและหน้าโรงงาน จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. ร้อยละ 60, 100 และ 40 ตามลำดับ และจำแนกได้ซีโรไทป์ Hvittingfoss (group I) จากตัวอย่าง โหระพาก่อนล้าง ในขณะที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดิน ปุ๋ยและน้ำที่ใช้ในระหว่างกระบวนการเพาะปลูก จำนวนชนิดละ 15 ตัวอย่าง รวมถึง ถุงมือ จำนวน 8 ตัวอย่าง โต๊ะตัดแต่ง จำนวน 6 ตัวอย่าง และ กรรไกรที่ใช้ตัดแต่ง จำนวน 5 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อร้อยละ 33.33, 26.67, 53.33, 87.5, 100 และ 60 ตามลำดับ และจำแนกซีโรไทป์ Bovismorbificans (group C) และ Aberdeen (group F) ได้จาก ถุงมือ และโต๊ะตัดแต่ง ตามลำดับ จาก 94 ตัวอย่าง เมื่อตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบการปนเปื้อนคิดเป็น ร้อยละ 56.38 ในขณะที่การตรวจด้วยวิธีดั้งเดิมพบการปนเปื้อนเพียงร้อยละ 4.25

คำสำคัญ ผักสดส่งออก, *Salmonella* spp., เทคนิค PCR

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900
[2] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 113 ถนนพหลโยธินตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120
[2] National Center for Genetic Enginnering and Biotechnology 113 Paholyothin Rd. Klong 1, Klong Luang Pathumthani 12120 Thailand

คำนำ

ในปัจจุบันความต้องการในการบริโภคผักสดของผู้บริโภคต่างประเทศเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการส่งออกผักสดประเภทผักสวนครัว เพื่อจำหน่ายให้กับภัตตาคารอาหารไทย และเป็นเครื่องปรุงสำหรับอาหารตะวันออก ด้วยเหตุนี้ การส่งออกผักสดเหล่านี้จำเป็นต้องมีคุณภาพและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งมาตรการในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในผักสดเพื่อการนำเข้า หลายประเทศในยุโรปต่างมีข้อกำหนดที่เข้มงวดมากขึ้น ในประเทศไทยผักสดสวนครัวส่วนใหญ่ผลิตจากเกษตรกรรายย่อย ต่อมาจึงถูกรวบรวมโดยผู้ส่งออก ทำให้ผักสดซึ่งมาจากหลายแหล่งที่มีการปฏิบัติและการผลิตผักแตกต่างกัน ส่งผลให้คุณภาพและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มากน้อยต่างกัน ด้วยเหตุนี้ ปัจจุบันผักสวนครัวส่งออกจากประเทศไทยจึงมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. ทำให้เกิดการตีกลับของสินค้าผักสด และสร้างความไม่เชื่อถือสินค้าเกษตร นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า หากผักสดมีการปนเปื้อนแบคทีเรียตั้งแต่กระบวนการขั้นต้นของการผลิต คือตั้งแต่การปลูก การเก็บเกี่ยวและก่อนเข้าสู่โรงงาน การกำจัดแบคทีเรียเหล่านี้ทำได้ยาก เนื่องจากการล้างไม่สามารถลดการปนเปื้อนในผักได้หมด (Beuchat, 1996) จากข้อมูลของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคระบาดที่เกี่ยวกับการเกิดโรคระบาดที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในผักและผลไม้สดพบว่า ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา มีจำนวนอุบัติการณ์การเกิดโรคจากผักสดเป็นพาหะเพิ่มขึ้น (Johnston et al., 2005) การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญที่ระบุไม่ให้มีในผักสดเพื่อการส่งออก โดยใช้วิธี MPN คู่กับ PCR เพื่อตรวจนับปริมาณ รวมถึงจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. จากตัวอย่างที่คาดว่าอาจเป็นแหล่งการปนเปื้อน ให้สามารถระบุแหล่งของเชื้อ เพื่อเสนอการจัดการความเสี่ยงโดยการป้องกันและควบคุมการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในกระบวนการผลิตผักสดส่งออกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับการนับเชื้อแบบ MPN

เก็บตัวอย่างผักสดในแปลงที่มีการปลูกเพื่อการส่งออกในจังหวัด นครปฐม ได้แก่ โหระพาก่อนล้าง หลังล้างและหน้าโรงงาน ชนิดตัวอย่างละ 10 ตัวอย่าง และจากสิ่งแวดล้อมในแปลงเพาะปลูก ได้แก่ ดิน ปุ๋ย และน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูก ชนิดตัวอย่างละ 15 ตัวอย่าง รวมทั้งเก็บอุปกรณ์และบริเวณจุดตัดแต่ง เช่น ถุงมือ โต๊ะตัดแต่งและกรรไกร จำนวนตัวอย่างละ 8, 6 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บในที่กล่องน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำมาส่งที่ห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวิเคราะห์โดยเร็ว นำตัวอย่างมาตรวจด้วยวิธี MPN (BAM, 1995) ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย peptone water อย่างน้อย 3 ระดับ ระดับละ 3 หลอด แล้ว enrichment ตัวอย่างด้วย buffer peptone water (BPW) จากนั้นจึงนำไปทำการตรวจ PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. คือ *inv A* 139 และ 141 และมีการใช้ IAC (internal amplification control) เพื่อเป็นตัวชี้บ่งว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจให้ผลลบจริงหรือไม่ (false negative) (Malorny et al., 2003) ผลการตรวจ PCR นำไปวิเคราะห์ปริมาณและรายงานผลในหน่วย MPN

2. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp.

การตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp.โดยวิธี conventional (BAM, 1995) นำตัวอย่างทั้งหมดหลังจาก enrichment ด้วย BPW ใส่ใน RV broth หรือ Rappaport-Vassiliadis (selective enrichment) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) Agar และ HE (Hektoen Enteric) Agar คัดแยกโคโลนี ที่คาดว่าจะเป็น เชื้อ *Salmonella* spp. ทดสอบคุณสมบัติทางด้าน ชีวเคมี ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LIA (Lysine Iron Agar) และ TSI (Triple Sugar Iron) ทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยส่งตรวจที่บริษัท เอส.เอ.พี. แล็บบอราตอรี่

ผล

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี MPN ร่วมกับเทคนิค PCR ในโหระพา พบว่า โหระพาหลังล้างทุกตัวอย่างมีความชุกจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. คิดเป็น ร้อยละ 100 และมีปริมาณการปนเปื้อนจากเชื้อสูงที่สุด คือ 210 MPN/g เปรียบเทียบระหว่างโหระพาก่อนล้างและหน้าโรงงาน พบว่ามีความชุกจากการปนเปื้อนเท่ากับ ร้อยละ 40 และ 60 ตามลำดับ และมีปริมาณการปนเปื้อนสูงที่สุดเพียง 6 และ 20 MPN/g ตามลำดับ ซึ่งปริมาณความชุกจากการปนเปื้อนของเชื้อในโหระพาหลังล้างมีจำนวนมากกว่าเป็นสองเท่าในโหระพาก่อนเข้าโรงงาน ทั้งนี้สามารถคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้จากตัวอย่างโหระพาก่อนล้างได้เป็น *Salmonella* Hvittingfoss (Group I) (Table 1)

Table 1 The population of *Salmonella* spp. found in Sweet basil

Sample	Number of sample	Contaminate of sample (%)	Mean ± SD (MPN/g)	Range of contaminate (MPN/g)	Serotype (isolates)
Before washing	10	40	1.68 ± 2.3	< 3.0-6	*S.* Hvittingfoss (Group I) (3)
After washing	10	100	47.82 ± 73.8	3.6-210	-
After transporting to factory	10	60	4.12 ± 6.2	< 3.0-20	-

ส่วนปริมาณการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. ในแปลงเพาะปลูกได้แก่ ดิน ปุ๋ยและน้ำ (ที่ใช้เพาะปลูก) จำนวนชนิดตัวอย่างละ 15 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นจำนวน 5, 4 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูกมีจำนวนตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเป็นจำนวนมากคิดเป็นร้อยละ 53.34 ดินและปุ๋ยมีจำนวนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนน้อยกว่า คิดเป็นร้อยละ 33.34 และ 26.67 ตามลำดับ โดยที่ปริมาณของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ตรวจพบในดินและปุ๋ยมีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณที่เท่ากันคือ < 3.0 ถึง 15 MPN/g ซึ่งจำนวนเชื้อที่พบมากเป็นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อที่ตรวจพบในน้ำที่ใช้เพาะปลูก อย่างไรก็ดีปริมาณเชื้อที่สูงที่สุดพบปนเปื้อนในน้ำเพาะปลูก มีค่าเท่ากับ 7.4 MPN/ml (Table 2)

Table 2 The population of *Salmonella* spp. found in farm environment and trimming area

Sample	Number of sample	Contaminate of sample (%)	Mean ± SD (MPN/g, ml, cm^2)	Range of contaminate (MPN/g, ml, cm^2)	Serotype (isolates)
Soil	15	33.34	2.94 ± 4.9	< 3.0-15	-
Fertilizer	15	26.67	2.63 ± 4.8	< 3.0-15	-
Irrigation water	15	53.34	0.91 ± 1.9	< 0.3-7.4	-
Glove	8	87.5	0.62 ± 0.5	< 0.3-1.5	*S.* Aberdeen (group F)(1) *S.* Bovismorbificans (group C)(5)
Trimming table	6	100	0.54 ± 0.9	0.06-2.4	*S.* Aberdeen (group F)(2) *S.* Bovismorbificans (group C)(1)
Scissors	5	60	0.68 ± 0.7	< 0.3-1.6	-

จากการตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. บริเวณจุดตัดแต่ง (Table 2) พบว่า ถุงมือ โต๊ะตัดแต่งและกรรไกรมีปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยของเชื้อในระดับที่ไม่มีความแตกต่างกันมาก คือ 0.62, 0.54 และ 0.68 MPN/cm^2 ตามลำดับ แต่พบช่วงการปนเปื้อนของโต๊ะตัดแต่งค่อนข้างกว้างเมื่อเทียบกับตัวอย่างถุงมือและกรรไกร คือ 0.06-2.4 MPN/cm^2 ซึ่งในขณะที่ตัวอย่างถุงมือและกรรไกรมีช่วงปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อเท่ากับ < 0.3-1.5 และ < 0.3-1.6 MPN/cm^2 ตามลำดับ และพบการปนเปื้อนบริเวณโต๊ะตัดแต่งทุกตัวอย่าง (ร้อยละ 100) ซึ่งในขณะที่จำนวนตัวอย่างถุงมือและกรรไกรที่มีการปนเปื้อนเท่ากับร้อยละ 87.5 และ 60 ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้จากตัวอย่าง ถุงมือและโต๊ะตัดแต่ง จากตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวเป็นจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Salmonella* Aberdeen (group F) และ *Salmonella* Bovismorbificans (group C)

วิจารณ์และสรุป

จากการตรวจปริมาณการปนเปื้อของเชื้อ *Salmonella* spp. ในโหระพาก่อนล้าง หลังล้างและหน้าโรงงาน พบผักสดในทุกขั้นตอนกระบวนการผลิตมีการปนเปื้อน โหระพาหลังล้างมีความชุกและปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อสูง คาดว่ามีการปนเปื้อนในขั้นตอนของการล้างโหระพาก่อนเข้าโรงงานที่มีการปฏิบัติไม่ถูกต้อง ไม่มีการเปลี่ยนน้ำในอ่างเมื่อโหระพาที่มีเชื้อปนเปื้อนมาแล้วล้างในอ่างเดียวกัน เชื้อจึงแพร่กระจายภายในอ่าง ทำให้เกิดการปนเปื้อนซ้ำในตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนมาตั้งแต่แรกได้ ตลอดจนไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อในระหว่างการล้าง ส่งผลให้เชื้อ *Salmonella* spp. ยังคงปนเปื้อนอยู่ในผักสดแม้จะผ่านกระบวนการผลิตในโรงงานก็ไม่สามารถกำจัดเชื้อให้ลดลงได้ นอกจากนี้ในสิ่งแวดล้อมบริเวณแปลงปลูกผัก ได้แก่ แหล่งน้ำ ยังมีผลต่อการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. (Foltz, 1969; Cherry et al.,1972) ในขณะที่ ดินและปุ๋ยยังเป็นอีกสาเหตุหนึ่งจากการปนเปื้อนของเชื้อได้เช่นกัน โดยที่เชื้อมีการปนเปื้อนในดิน และสามารถใช้เวลาในการรอดชีวิตได้นานถึง 968 วัน (Jones, 1986) นอกจากนี้ แหล่งการปนเปื้อนของเชื้อในผักสดที่สำคัญอีกจุดหนึ่งคือ บริเวณจุดตัดแต่ง การลดปริมาณและความชุกในการปนเปื้อนควรเริ่มจากเกษตรกรโดยให้ความรู้และปลูกฝังให้เกษตรกรมีความตระหนักถึงการมีสุขลักษณะที่ดีเพื่อให้เกิดสุขอนามัยและการสุขาภิบาลที่ดี (วิชา และคณะ, 2549) โดยเฉพาะความสะอาดของอุปกรณ์ที่ใช้ บริเวณจุดตัดแต่ง ซึ่งคาดว่าจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. ในผักสดเพื่อการส่งออกได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุดสาย ตรีวานิช และอาจารย์สิริพร สธนเสาวภาคย์ สำหรับคำแนะนำในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

วิชา ธิติประเสริฐ, สมคิด รื่นภาควุฒิ, บุษรา จันทร์แก้วมณี, พัจนา สุภาสูรย์, ปรียานุช ทิพยะวัฒน์ และ วฤษณี ขาวเขียว. 2549. การป้องกันเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* ในผักสด. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

BAM. 1995. Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Food and Drug Administration. Published and Distributed by AOAC International. Gaithersburg. MD 20877, USA.

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. Journal of Food Protection 59 (2): 204-216.

Cherry, W.B., J.B. Hank, B.M. Thomason, A.M. Murlin, J.W. Biddle and J.M. Croom. 1972. Salmonellae as an index of pollution of surface waters. Journal of Applied Microbiology 24: 334 – 340.

Foltz, V.D., 1969. Salmonellacology. Journal of American Oil and Chemical Society 46: 222 – 224.

Johnston, L.M., L.A. Jaykus, D. Moll, M.C. Martinez, J. Anciso, B. Mora and C. L. Moe. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. Journal of Food Protection 68: 1840-1847.

Jones, P.W. 1986. Sewage sludge as a vector of Salmonellosis. In: Block, 3J.C., Haielaar, A.H., L' Hermite, P. (Eds.), Epidemiological studies of risks associated with the agricultural use of sewage sludge. Elsevier, London, pp. 21 – 33.

Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge and R. Helmuth. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. Journal of Applied and Environmental Microbiology 69: 290 – 296.