

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RGU6180001

ชื่อโครงการ: อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ให้ผลเร็ว

ชื่อนักวิจัย: อธิรุทธิ์ วิไลวัลย์และคณะ

E-mail address: vtirayut@chula.ac.th

ระยะเวลาของโครงการ: 1 ปี (15 สิงหาคม 2561 ถึงวันที่ 14 สิงหาคม 2562 ขยายเวลาถึง 14 กุมภาพันธ์ 2563)

การปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารและเครื่องดื่มซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค นับเป็นปัญหาที่มีความสำคัญระดับประเทศในแง่ของปลอดภัยของผู้บริโภคโดยตรง และในระดับโลก ในฐานะที่ประเทศไทยมีความโดดเด่นเรื่องการท่องเที่ยว ซึ่งอาหาร โดยเฉพาะอาหารแบบ street food มีบทบาทสำคัญในการสร้างรายได้เป็นอย่างมาก และประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกอาหารรายใหญ่ของโลกอีกด้วย ตัวอย่างของเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยและมีผลกระทบสูง เช่น *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, และ *Clostridium perfringens* การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เป็นได้ตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการ และชีวอนามัยในการเตรียมอาหาร ฯลฯ ดังนั้นการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อจึงมีความสำคัญ โดย วิธียมาตรฐานในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารยังมีข้อจำกัดอย่างใดอย่างหนึ่งหรือมากกว่า เช่น ใช้เวลานาน ความถูกต้องและความไวต่ำ ไม่สามารถแยกแยะระหว่างเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้ ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง อีกทั้งยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการวิเคราะห์และแปลผล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร ที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน และบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะ ในขณะเดียวกันก็ให้ผลการทดสอบที่แม่นยำเทียบเคียงได้กับวิธีการมาตรฐาน ซึ่งอย่างน้อยควรจะต้องได้ถึงระดับ species ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาอุปกรณ์และวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมใหม่เพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร โดยงานวิจัยจะแบ่งออกเป็นสองส่วนย่อย ทั้งสองส่วนจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะกับเชื้อที่สนใจ และตรวจสอบความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้น โดยจะมุ่งเน้นการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีอยู่แล้วไปเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่ใช้งานได้ง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนในการทดลอง อ่าน และแปลผล เช่นเดียวกับแถบทดสอบทางอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่มีใช้กันอย่างแพร่หลาย

โครงการย่อยที่หนึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้เทคโนโลยีของพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษร่วมกับการสร้างสีโดยใช้เอนไซม์ เพื่อนำไปประดิษฐ์เป็นอุปกรณ์ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในอาหารได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจง และได้พัฒนาอุปกรณ์ให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้ง่ายโดยการสร้างปลอกบรรจุ และแท่นวางสำหรับถ่ายรูปโดยใช้สมาร์ทโฟน ส่วนโครงการย่อยที่สองเป็นการนำสีย้อมประจุบวกที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอไปใช้ร่วมกับเทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เรียกว่าลูบเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP) ทำให้ได้วิธีตรวจวัดดีเอ็นเอที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าในหลอดทดลอง และในรูปแบบของปฏิกิริยาบนกระดาษ โดยได้ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* สายพันธุ์ก่อโรคในตัวอย่างอาหาร ผลการศึกษาพบว่าปฏิกิริยา LAMP-4QL²⁺ ในหลอดทดลองและบนฐานกระดาษสามารถตรวจพบ *E. coli* และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษ staphylococcal enterotoxin A (SEA) โดยพบว่าสามารถตรวจวัดเชื้อได้อย่างมี specificity สูง แต่ประสิทธิภาพในเชิงของ sensitivity ยังต้องมีการปรับปรุง

คำสำคัญ: อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ; ดีเอ็นเอ; แบคทีเรีย; พีเอ็นเอ; LAMP, อาหารปลอดภัย, การตรวจวัดเชิงสี, การทดสอบสารพันธุกรรม

Abstract

Project Code : RGU6180001

Project Title : Paper-based devices for rapid sensing of bacterial contamination in foods

Investigators : Tirayut Vilaivan and co-workers

E-mail Address : vtirayut@chula.ac.th

Project Period : 1 year (15 August 2018 - 14 August 2019 extended to 14 February 2020)

Contamination of bacteria in food and drink which causes food poisoning is not only a nationwide important problem in terms of safety of local consumers but is also important worldwide since Thailand major incomes are from the tourism industry whereby Thai food, especially street food plays an important role. Besides, Thailand is also a world major food exporter. Examples of foodborne pathogens that can be found frequently and create high impact include *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens*. The contamination can result from several factors including raw materials, process, and hygiene of the food preparation etc. Accordingly, the detection of contamination is highly important. The standard methods for the detection of bacterial contamination in food have one or more limitations including long waiting time, low specificity and sensitivity, inability to distinguish between similar bacterial strains, the requirement of expensive instruments and/or highly trained personnel. As a result, it is necessary to develop new diagnostic methods for the detection of bacterial contamination in foods that are convenient, rapid, do not require complicated instruments nor highly trained personnel while can still provide accurate results that are comparable with the standard methods, and should be able to identify the bacteria at species levels. This project aims to develop novel devices and methods for the detection of nucleic acids as an alternative for the detection of bacterial contamination in foods. The research was divided into two sub-projects, both involve amplification of the nucleic acids that are specific for the bacterial strains of interest and the success of the nucleic acid amplification is evaluated via paper-based devices that are easy to use and do not require special equipment for the experiment, collect and interpret the data in a similar way to the widely used immunochromatographic devices.

The first sub-project involved the use of PNA probes immobilized on filter paper in combination with an enzymatic colorimetric reaction to develop a sensing device for the detection of *B. cereus* in food with high sensitivity and specificity. The device was designed to be used easily by including a frame and a photographing stage suitable for any smartphones. The second sub-project employed a cationic DNA-binding dye in combination with a DNA amplification technique called loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to give a DNA sensing system that can be judged by naked eyes both in the PCR tube and on the paper. The efficiency of the method for the detection of contamination of *E. coli* and the enterotoxin A-producing strain (SEA) of *S. aureus* in food samples. The results show that the LAMP-dye combination in the PCR tube and on the paper can detect *E. coli* and *S. aureus* SEA with high specificity but the sensitivity should require further improvement.

Keywords: paper-based analytical devices; DNA; bacteria; PNA; LAMP; food safety; DNA binding dye; colorimetry; nucleic acid testing