

การตรวจหา *Bacillus cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร
โดยวิธีปฏิกิริยาแลกไซโพลีเมอเรส

นางสาวสุพัตรา อัสวเผ่าพงศ์
นางสาวอรนุช ทองอุไร

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

DETECTION OF *BACILLUS CEREUS* IN FOOD
BY POLYMERASE CHAIN REACTION

MISS SUPATRA ASSWAPAOPHONG
MISS ORANUCH THONGURAI

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ
เรื่อง การตรวจหา *Bacillus cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร
โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

.....
(นางสาวสุพัตรา อัสวเผ่าพงศ์)

.....
(นางสาวอรนุช ทองอุไร)

.....
(รศ.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ
การตรวจหา *Bacillus cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร
โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

สุพัตรา อัสวเผ่าพงศ์, อรุณช ทองอุไร

อาจารย์ที่ปรึกษา: จันทรเพ็ญ วิวัฒน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ: *Bacillus cereus*, ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส, *nheA*, การควบคุมคุณภาพนม

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณยีนจาก DNA อย่างแพร่หลาย โดย primers ที่ใช้มีความจำเพาะสามารถเพิ่มปริมาณ *nheA* (non hemolytic enterotoxin) gene ได้ ซึ่งมีความสามารถตรวจหา *Bacillus cereus* ได้ถึงร้อยละ 98 ของ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจหา *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหารโดยใช้ primers *nheA* คือ forward primer: TACGCTAAGGAGGGGCA, reverse primer: GTTTTATTGCTTCATCGGCT

B. cereus เป็นเชื้อที่รู้จักกันดีว่าทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ และพบว่าเป็นปัญหาเพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมนม อาการที่ทำให้อาหารเป็นพิษมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ ทำให้เกิดอาการท้องเสีย และอาเจียน การเกิดพิษส่วนใหญ่ไม่รุนแรง แต่พบรายงานการเสียชีวิตจากเชื้อ *B. cereus* การเกิดอาการที่ก่อโรคจากการได้รับเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 10^5 cells/g วิธีการหา *B. cereus* โดยวิธีทางจุลชีววิทยา เช่น การเกิดบริเวณตกตะกอนบน Mannitol-yolk-polymyxin (MYP) ใช้เวลาอย่างน้อย 4 วัน และการใช้เทคนิค immunoblot ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์อย่างน้อย 2 วัน PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง และรวดเร็วจึงถูกนำไปใช้ในงานต่างๆ ซึ่งการศึกษานี้ใช้ระยะเวลาภายใน 1 วัน ในการนำวิธี PCR มาตรวจหา *B. cereus* ในนม, อาหารปรุงสำเร็จที่เย็นแล้ว และผักสด (นม 19 ตัวอย่าง, อาหารปรุงสำเร็จที่เย็นแล้ว 8 ตัวอย่าง และผักสด 5 ตัวอย่าง) พบ *B. cereus* ในอาหาร 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.9) ที่มีขนาดของ PCR product 499 bp

อย่างไรก็ตามวิธี PCR สามารถตรวจหา *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหารได้ตั้งแต่ 10^4 cells/ml ซึ่งน้อยกว่าปริมาณที่ทำให้ก่อโรค ดังนั้นถ้ามี *B. cereus* ในอาหารปริมาณน้อยจะไม่สามารถตรวจพบ อาจนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะทำ PCR

Abstract

Detection of *Bacillus cereus* in foods by polymerase chain reaction

Supatra Asswapaophong, Oranuch Thongurai

Project advisor: Chanpen Wiwat

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: *Bacillus cereus*, Polymerase chain reaction, *nheA*, Quality control of milk

The polymerase chain reaction (PCR) technique is widely used for amplification of DNA. The specific primers could be used to amplify 98 percent of *nheA* (non-hemolytic enterotoxin) gene of *Bacillus cereus*. The purpose of this study was to detect *B. cereus* contaminating in foods using PCR primers of *nheA*; Forward primer: TACGCTAAGGAGGGGCA, Reverse primer: GTTTTATTGCTTCATCGGCT.

B. cereus is well recognised as a food poisoning organism and increasing problem for dairy industry. There are two distinct types that divided according to their symptoms, the diarrhoeal and emetic types. The poisoning is usually mild, intoxications have caused deaths. The initial infective dose is 10^5 *B. cereus* cell/g. The microbiological method is confirmatory testing up to 4 days for detection of zone of precipitation on Mannitol — yolk — polymyxin (MYP). The immunoblot technique, the analysis takes at least 2 days to perform. This study used PCR for detecting *B. cereus* within a day. The PCR has been used in many systems due to unique sensitivity, rapid and reliable method for detecting *B. cereus*. The developed method has been used to detect *B. cereus* in commercial milks, cooked foods, and vegetables (19 of milks, 8 of cooked foods and 5 of vegetables). Two food samples (5.9 percent) were found PCR product of 499 bp.

However, our PCR protocol could detect *B. cereus* at initial concentration 10^4 cell/ml (less than infective dose). Therefore, if the numbers of *B. cereus* in food are lower, it can not detect. Hence, pre-enrichment of food samples may be performed before amplification.