การพัฒนาเทคนิค Most Probable Number ร่วมกับ Loop-mediated Isothermal Amplification (MPN-LAMP) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในน้ำดื่มและผัก

Development of Most Probable Number combined with Loop-mediated Isothermal Amplification (MPN-LAMP) Techniques for Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Drinking Water and Vegetables

ชนนิกานต์ ทองพรม

Chonnikan Tongphrom

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การพัฒนาเทคนิค Most Probable Number ร่วมกับ Loop-mediated Isothermal Amplification (MPN-LAMP) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในน้ำดื่มและผัก

Development of Most Probable Number combined with Loop-mediated Isothermal Amplification (MPN-LAMP) Techniques for Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Drinking Water and Vegetables

ชนนิกานต์ ทองพรม
Chonnikan Tongphrom

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิค Most Probable Number ร่วมกับ Loop-mediated Isothermal Amplification (MPN-LAMP) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในน้ำดื่มและผัก

ผู้เขียน นางสาวชนนิกานต์ ทองพรม

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ดร.พวงทิพย์ ภู่พงษ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....
(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....
(นางสาวชนนิกานต์ ทองพรม)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวชนนิกานต์ ทองพรม)
นักศึกษา

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวชนนิกานต์ ทองพรม
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710220032
วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับ 2	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)
ทุนผู้ช่วยวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ปีการศึกษา 2557 ถึง 2559
ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2558

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน
Tongphrom C., Mittraparp-arthorn P., Charernjiratrakul W., Vuddhakul V. 2016. Detection of total coliforms and *Escherichia coli* in raw leafy vegetables. 1st Joint Seminar in Science and Technology for ASEAN Community (STAC) : Better Together at Prince of Songkla University, Thailand.

Tongphrom C., Mittraparp-arthorn P., Charernjiratrakul W., Nishibushi M., Vuddhakul V. Most-probable-number loop-mediated isothermal amplification technique for detection and enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in drinking water and vegetables. (submitted)

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิค Most Probable Number ร่วมกับ Loop-mediated Isothermal Amplification (MPN-LAMP) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในน้ำดื่มและผัก
ผู้เขียน นางสาวชนนิกานต์ ทองพรม
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* จัดเป็นแบคทีเรียบ่งชี้ซึ่งใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหาร เพื่อบ่งชี้สุขาภิบาลของกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งส่งผลต่อความปลอดภัยทางอาหารของผู้บริโภค งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิค most probable number ร่วมกับ loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำดื่มและผัก โดยออกแบบ LAMP primers จำนวน 2 ชุด ที่จำเพาะกับยีน *lacZ* และ *uidA* เพื่อตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (*lacZ*-LAMP) และ *E. coli* (*uidA*-LAMP) ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า *lacZ*-LAMP สามารถตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ทดสอบได้ทุกชนิด (*E. coli, Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* และ *Serratia marcescens*) ส่วนการตรวจวิเคราะห์โดย *uidA*-LAMP พบว่าสามารถตรวจหา *E. coli* ได้ทุกสายพันธุ์ เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นมีความไวสูงมาก สามารถตรวจวัดแบคทีเรียได้ต่ำสุด 1 CFU/ปฏิกิริยา เมื่อนำเทคนิค MPN มาใช้ร่วมกับเทคนิค LAMP พบว่าสามารถตรวจหา *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก ที่มีเชื้อปนเปื้อนเพียง 1 CFU/ 100 มิลลิลิตร และ 5 CFU/กรัม ตามลำดับ การประยุกต์ใช้เทคนิค MPN-LAMP ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มจำนวน 33 ตัวอย่าง และตัวอย่างผักจำนวน 46 ตัวอย่าง พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดของทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน แต่เทคนิค MPN-LAMP มีความไวสูงกว่าเทคนิค MPN ในการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค MPN-LAMP ที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว มีความจำเพาะและความไวสูง ไม่สิ้นเปลืองแรงงาน ซึ่งเป็นประโยชน์มากสำหรับห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมคุณภาพอาหารในหน่วยงานต่าง ๆ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ในน้ำดื่มและผักได้

คำสำคัญ: คุณภาพทางจุลชีววิทยา; โคลิฟอร์ม; วิธีรวดเร็ว; *Escherichia coli*; loop-mediated isothermal amplification; most-probable-number;

Thesis Title Development of Most Probable Number combined with Loop-mediated Isothermal Amplification (MPN- LAMP) Techniques for Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Drinking Water and Vegetables
Author Miss Chonnikan Tongphrom
Major Program Microbiology
Academic 2015

ABSTRACT

Total coliforms and *Escherichia coli* are bacterial indicators used in microbiological examination of drinking water and foods to indicate the sanitation in food processing which led to ensure the public health safety. In this study, we developed most-probable-number loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) method for examination of total coliforms and *E. coli* in drinking water and vegetables. The LAMP assays were performed using two sets of specific primers, *lacZ* and *uidA*, for identification of total coliforms and *E. coli*, respectively. The *lacZ*-LAMP was able to detected all members of the coliform group (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens*). In addition, *uidA*-LAMP was successfully detected all *E. coli* strains tested. The detection limit of LAMP was 1 CFU/reaction. In spiked samples, presumptive evaluation by MPN-LAMP method could detect *E. coli* at the concentration of 1 CFU/100 ml and 5 CFU/g in water and vegetables, respectively. Analyzing 33 drinking water samples and 46 raw vegetable samples, the results obtained by MPN-LAMP method were in agreement with the MPN technique for total coliforms detection. However, MPN-LAMP had better sensitivity than conventional MPN technique on *E. coli* detection. No false-negative results were observed in all samples. Thus, this method can be used as an alternative test for rapid examination of total coliforms and *E. coli* in drinking water and vegetables with high specificity and high sensitivity. Moreover, MPN-LAMP may therefore be considered as a useful tool for application in food industry.

Keywords: coliforms; *Escherichia coli*; loop-mediated isothermal amplification; microbial quality; most-probable-number; rapid method

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิมลศรี มิตรภาพอาทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล และรองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา เสียสละเวลาในการช่วยเหลือ และให้การสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ดร. พวงทิพย์ ภู่พงษ์ ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทุนผู้ช่วยวิจัย (Research Assistant) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2557 ที่สนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาและค่าครองชีพ ตลอดระยะเวลา 2 ปี จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ห้อง PR 516 และ วท.510 ที่คอยให้คำแนะนำ กำลังใจ ให้คำปรึกษาต่าง ๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญในยามท้อแท้ คอยให้กำลังใจ และให้คำปรึกษาในทุก ๆ เรื่องมาโดยตลอด

ชนนิกานต์ ทองพรม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(5)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(11)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(12)
สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน	(13)
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
ทฤษฎีและหลักการ	2
แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria)	2
Escherichia coli	2
เกณฑ์และมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหารประเภทผัก	3
เทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชี้วัดคุณภาพน้ำและอาหาร	4
เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)	8
เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	9
วัตถุประสงค์	14
ผลการทดลอง	15
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	23
สรุปผลการทดลอง	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	44

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	LAMP primers ที่ใช้ในการศึกษา	15
ตารางที่ 2	แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาและความจำเพาะของ LAMP primers	16
ตารางที่ 3	จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มที่ตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค MPN และ MPN-LAMP	19
ตารางที่ 4	จำนวนตัวอย่างผักที่ตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดโดยเทคนิค MPN	20
ตารางที่ 5	จำนวนตัวอย่างผักที่ตรวจพบ *Escherichia coli* โดยเทคนิค MPN และ MPN-LAMP	21
ตารางที่ 6	ความจำเพาะและความไวของเทคนิค MPN-LAMP เปรียบเทียบกับเทคนิค MPN ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก	22

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชี้วัดคุณภาพน้ำด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)	5
รูปที่ 2	การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชี้วัดคุณภาพอาหารด้วยวิธี Most Probable Number (MPN**)**	6
รูปที่ 3	ก) เทคนิคการกรอง (membrane filtration) ข) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม	7
รูปที่ 4	ตำแหน่งที่จำเพาะบน DNA เป้าหมายของเทคนิค LAMP	9
รูปที่ 5	ขั้นตอนการสร้าง Dumbbell-shaped DNA structures	10
รูปที่ 6	ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA แบบหมุนเวียนต่อเนื่อง	11
รูปที่ 7	การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP เมื่อตรวจวัดโดยวิธีดูความขุ่น	12
รูปที่ 8	การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP เมื่อตรวจวัดโดยการใช้สีฟลูออเรสเซนต์	12
รูปที่ 9	การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP เมื่อตรวจวัดโดยวิธี agarose gel electrophoresis	13
รูปที่ 10	ตำแหน่งการเกาะของ primers บริเวณยีนเป้าหมาย ก) *lacZ* หรือ ข) *uidA*	15
รูปที่ 11	การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP เมื่อตรวจวัดโดยวิธีการใช้ ก) agarose gel electrophoresis หรือ ข) สี PicoGreen	17
รูปที่ 12	ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค MPN และ MPN-LAMP ก) ตรวจตัวอย่างน้ำดื่ม ข) ตรวจตัวอย่างผัก	25

สัญลักษณ์และย่อ

MPN	=	Most Probable Number
PCR	=	Polymerase chain reaction
LAMP	=	Loop-mediated isothermal amplification
ºC	=	Degree Celsius
APC	=	Aerobic plate count
CFU	=	Colony forming unit
มอก.	=	มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
BGLB	=	Brilliant green lactose bile broth
EC medium	=	*E. coli* medium
PBS	=	Phosphate buffer
h	=	hours
EMB	=	Eosin methylene blue agar
ml	=	Milliliter
UV	=	Ultra violet
MF technique	=	Membrane filter technique
dNTPs	=	Deoxynucleotide triphosphates
PPi	=	Pyrophosphate
%	=	Percentage

รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

1. **ชื่อภาษาไทย** การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในผักสด

ชื่อภาษาอังกฤษ Detection of total coliforms and *Escherichia coli* in raw leafy vegetables

2. **ชื่อภาษาไทย** เทคนิค Most probable number loop-mediated isothermal amplification ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในน้ำดื่มและผัก

ชื่อภาษาอังกฤษ Most-probable-number loop-mediated isothermal amplification technique for detection and enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in drinking water and vegetables

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาเป็นขั้นตอนสำคัญในการประเมินคุณภาพของน้ำและอาหาร รวมทั้งใช้บ่งชี้ความสะอาดและสุขอนามัยของผู้ผลิต ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค การตรวจหาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยตรงทำได้ยาก เพราะมักพบเชื้อปนเปื้อนปริมาณน้อย อีกทั้งวิธีการตรวจสอบมีความยุ่งยากและใช้ระยะเวลานาน วิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำและอาหาร จึงเป็นการตรวจหาแบคทีเรียบ่งชี้ (biological indicators) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliforms) และ *Escherichia coli* โดยใช้เทคนิค multiple tube fermentation หรือ เทคนิค most probable number (MPN) ซึ่งเป็นวิธีการประมาณจำนวนเชื้อในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ โดยใช้หลักการทางสถิติ ซึ่งตรวจสอบผลจากการเจริญของเชื้อและความสามารถในการหมักน้ำตาลแล็กโทสแล้วให้กรดกับแก๊สในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบหลายหลอด (Feng and Hartman, 1982) ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้มีข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองแรงงาน ไม่เหมาะกับการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำและอาหารพร้อมกันหลายตัวอย่าง และใช้ระยะเวลานาน (4-6 วัน) ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคและอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด เพื่อร่นระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ แต่พบว่ามีค่าใช้จ่ายสูง สิ้นเปลืองแรงงาน และบางเทคนิคต้องการความเชี่ยวชาญในการแปลผล (Maheux *et al*., 2015) มีการพัฒนาเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพบว่า รวดเร็ว และมีความจำเพาะสูง (Dick and Field, 2004) แต่มีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น ปฏิกิริยาถูกยับยั้งด้วยสารปนเปื้อนจากตัวอย่าง ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ และจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ (Hill *et al*., 2008) เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคใหม่ทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อลดข้อจำกัดต่าง ๆ ของเทคนิค PCR (Notomi *et al*., 2000) รวมทั้งมีการพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *Salmonella*, *Legionella, Listeria*, verotoxin-producing *E. coli* และ *Campylobacter* (Mori *et al*., 2001) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการพัฒนาเทคนิค LAMP มาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำและอาหาร

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้จึงต้องการพัฒนาเทคนิค MPN ร่วมกับเทคนิค LAMP (MPN-LAMP) เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและหาปริมาณของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำดื่มและผัก

ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้นอกจากจะส่งผลโดยตรงต่อความปลอดภัยทางอาหารของผู้บริโภคแล้ว ยังเป็นประโยชน์สำหรับห้องปฏิบัติการในหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่ดำเนินการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำและอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว เช่น การตรวจวิเคราะห์เพื่อขอขึ้นทะเบียน เพื่อการส่งออก หรือเพื่อการตรวจสอบปัญหาในกระบวนการผลิต เป็นต้น

ทฤษฎีและหลักการ

1. แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria)

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่ง จัดอยู่ใน Family *Enterobacteriaceae* ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทส ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วให้กรดและแก๊สภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง (Ashbolt *et al*., 2001) โดยทั่วไปสามารถพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ พืช ผัก รวมทั้งพบได้ในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น(Geldreich *et al*., 1964; Tate, 1978) แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค (non-pathogen) แต่ปริมาณของโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (total coliforms) ใช้เป็นดัชนีชี้วัดสุขอนามัยของน้ำและอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งหากตัวอย่างน้ำหรืออาหารตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถบ่งชี้ได้ว่าสุขลักษณะในขั้นตอนการผลิตไม่มีประสิทธิภาพ หรือขาดการทำให้ปราศจากเชื้อ ซึ่งจะส่งผลอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (Rompré *et al*., 2002)

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 Fecal coliforms ได้แก่ *E. coli* เป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่พบในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งสามารถแพร่กระจายมาในสิ่งแวดล้อมผ่านอุจจาระ

กลุ่มที่ 2 Non-fecal coliforms ได้แก่ *Citrobacter, Enterobacter, Hafnia*, *Klebsiella* และ *Serratia* เป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่พบได้ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ, ดิน, พืช, ผัก

2. Escherichia coli

E. coli จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์มประเภท fecal coliform ที่ใช้บ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น (Dombek *et al*., 2000) ซึ่งส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคในคน แต่บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Clermont *et al*., 2000) หรือทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะได้ (Trotman and Bell, 2006; Hill *et al*., 2008) เจริญในอาหาร MacConkey agar ให้โคโลนีสีแดงชมพูขนาดใหญ่ภายในเวลา 18 ชั่วโมง เนื่องจากหมักแล็กโทส ส่วนอาหาร Eosin methyleneblue agar (EMB) ให้โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) (Leininger *et al*., 2001)

ตัวอย่างสายพันธุ์ของ *E. coli* ที่สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ Verocytotoxic *E. coli* (VTEC) หรือ Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) เป็นกลุ่ม *E. coli* ที่ก่อโรครุนแรงในมนุษย์ ซึ่งในกลุ่มนี้ตัวที่ก่อโรครุนแรงที่สุดได้แก่ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157: H7 โดยจะทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบร่วมกับมีอุจจาระเป็นเลือดปน นอกจากนี้หากเข้าไปก่อโรคในเด็กจะทำให้เกิดโรคไตวายร่วมด้วย (Hemolytic Uremic Syndrome : HUS) (Johnson *et al*., 1995) นอกจากสายพันธุ์ดังกล่าวแล้ว ยังมี Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) เป็นต้น (Vilchez *et al*., 2009)

3. เกณฑ์และมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหารประเภทผัก

3.1 เกณฑ์คุณภาพน้ำดื่ม

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 ข้อ 3 (น้ำดื่มที่ไม่ได้บรรจุในภาชนะปิดสนิท เช่น น้ำผ่านเครื่องกรอง) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

Escherichia coli / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
Staphylococcus aureus / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
Salmonella spp. / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
Clostridium perfringens / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ

มาตรฐานทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำบริโภค ข้อ 5 (สุขลักษณะ) สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (มอก. 257-2549)

MPN Coliform bacteria / 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 1.1
Escherichia coli / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
Staphylococcus aureus / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
Salmonella spp. / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
Clostridium perfringens / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ

3.2 เกณฑ์คุณภาพอาหารประเภทผัก

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 ข้อ 2.1.1 (ผัก ผลไม้ สลัด ส้มตำ) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	น้อยกว่า 1×10^6
จำนวนรา / กรัม	น้อยกว่า 500
MPN *Escherichia coli* / กรัม	น้อยกว่า 100
Salmonella spp. / 25 กรัม	ไม่พบ
Listeria monocytogenes / 25 กรัม	ไม่พบ

มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผัก-ผลไม้สด ตัดแต่ง บรรจุพร้อมบริโภค ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร ข้อ 3.5 (ข้อกำหนดจุลินทรีย์) สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (มกอช. 9007-2548)

Escherichia coli / กรัม	น้อยกว่า 100
Salmonella spp. / 25 กรัม	ไม่พบ

4. เทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชี้วัดคุณภาพน้ำและอาหาร

4.1 เทคนิคหลายหลอด

(Multiple fermentation tube หรือ Most Probable Number: MPN)

เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อในการหมักน้ำตาลแล็กโทสแล้วให้กรดและแก๊ส (US. FDA, BAM: Chapter 4, 2002) วิธีนี้จะทดสอบในหลอดทดลอง โดยเติมตัวอย่างลงไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนหลายหลอด ที่มีน้ำตาลแล็กโทสเป็นส่วนประกอบแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิมาตรฐาน การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (fecal และ non-fecal coliforms) ด้วยวิธี MPN ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้น presumptive test, confirmed test, และ completed test (รูปที่ 1 และ รูปที่ 2) โดยมีวิธีการในแต่ละขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้น presumptive test

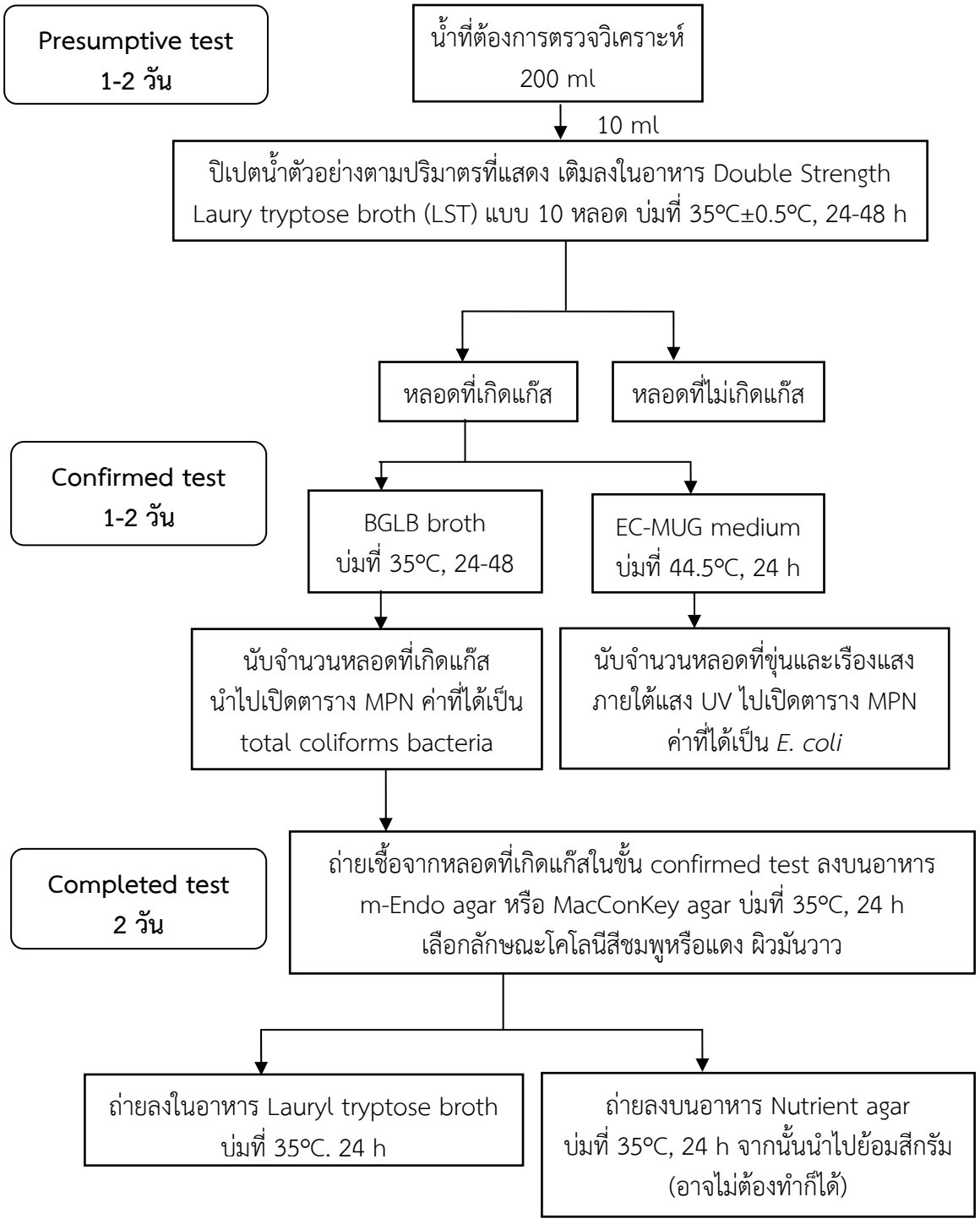
ทำโดยเติมตัวอย่าง หรือ สารละลายของตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแบบลำดับ 10 (10-fold dilution) สำหรับตัวอย่างน้ำจะใช้วิธีไม่เจือจางตัวอย่างแต่เติมตัวอย่างในปริมาตรที่ต่างกันก็ได้ ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth แบบ 3, 5 หรือ 10 หลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการหมักน้ำตาลแล็กโทส โดยสังเกตจากหลอดที่ขุ่นและเกิดแก๊ส แล้วนำหลอดที่ให้ผลบวกมาทดสอบในขั้น confirmed test ต่อไป หากไม่มีแก๊สภายใน 48±3 ชั่วโมงถือว่าเป็นผลลบ

2. ขั้น confirmed test

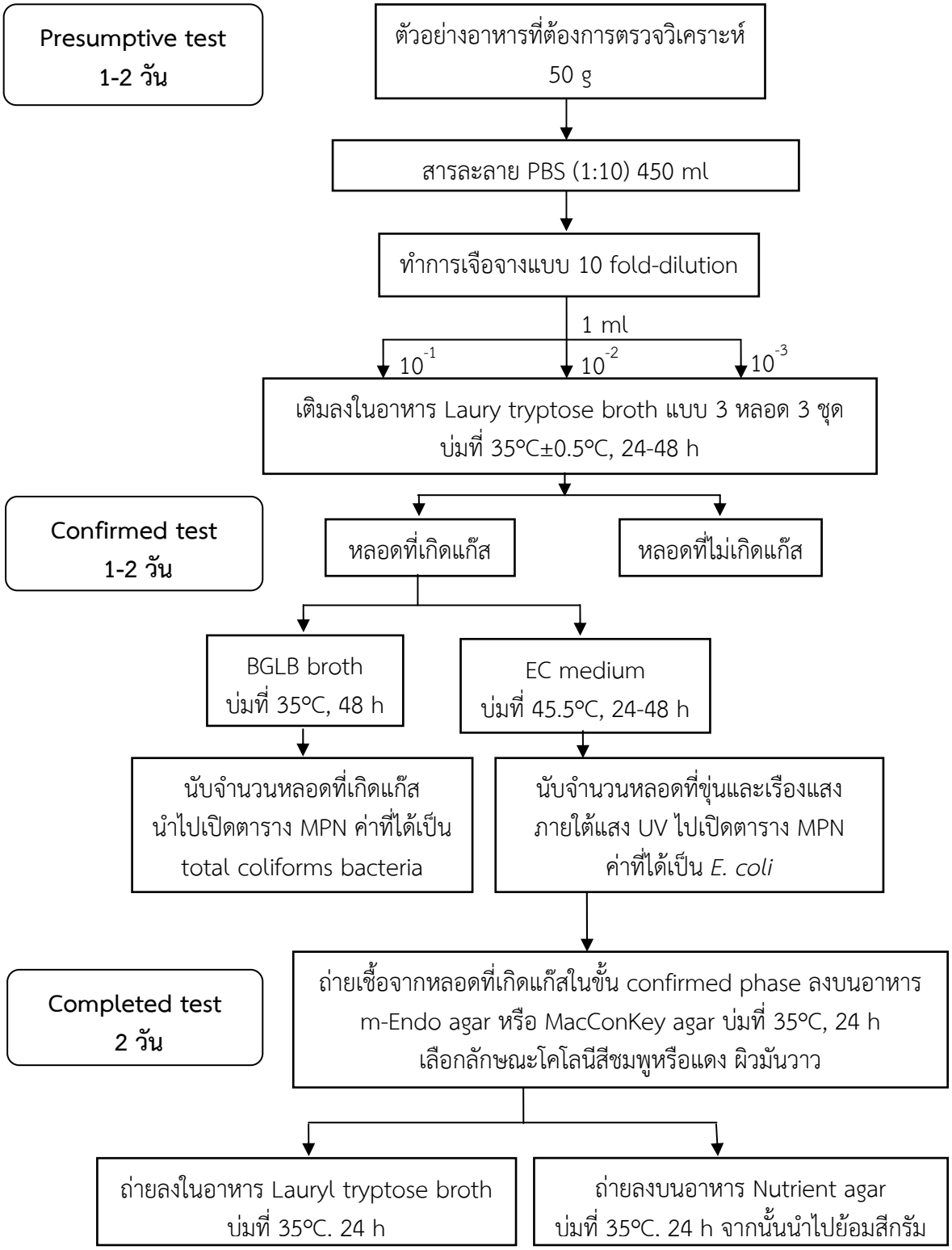
ขั้นนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะสำหรับตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) สำหรับแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด EC medium สำหรับ fecal coliforms และ EC-MUG medium สำหรับ *E. coli* โดยนำเชื้อจากหลอดที่เกิดแก๊สทุกหลอดในขั้น presumptive test มา 2-3 loop ถ่ายลงในหลอด BGLB, EC medium และ EC-MUG แล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลอด BGLB บ่มที่ 35±0.5 องศาเซลเซียส EC medium บ่มที่ 45.5 องศาเซลเซียส กรณีเป็นตัวอย่างอาหาร ส่วนในกรณีเป็นตัวอย่างน้ำ อาหารหลอด EC-MUG บ่มที่ 44.5 องศาเซลเซียส หลอด BGLB และ EC medium ให้ตรวจสอบผลการหมักน้ำตาลแล็กโทส โดยสังเกตจากหลอดที่ขุ่นและเกิดแก๊ส ส่วน EC-MUG ให้ตรวจสอบผลการย่อยสลายสาร 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide (MUG) โดยสังเกตจากหลอดที่ขุ่นและมีการเรืองแสงสีเขียวฟ้า (bright blue) ภายใต้แสง UV แล้วนับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปเปิดตาราง MPN เพื่อประมาณจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด, fecal coliforms และ *E. coli* ซึ่งค่าที่แสดงในตาราง MPN เป็นค่าประมาณทางสถิติ ที่บ่งบอกค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ ที่คาดคะเนว่าจะมีได้มากที่สุดในตัวอย่าง จากนั้นรายงานผลเป็น MPN/100 มิลลิลิตร หรือ MPN/กรัม

3. ขั้น completed test

ขั้นนี้เป็นการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพ ทำโดยนำเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในขั้น confirmed test มาถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ m-Endo agar หรือ MacConkey agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* (สีชมพูแดง ผิวมันวาว) มาถ่ายลงในอาหาร Lauryl tryptose broth เพื่อตรวจสอบผลการหมักน้ำตาลแล็กโทส และตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยวิธีการย้อมสีกรัม



รูปที่ 1 การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชี้วัดคุณภาพน้ำด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) (APHA, AWWA, WEF, 2012)

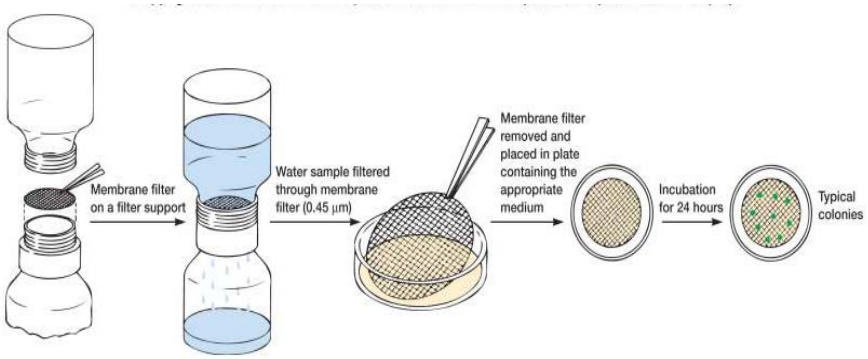


รูปที่ 2 การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชี้วัดคุณภาพอาหารด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) (US. FDA, BAM: Chapter 4, 2002)

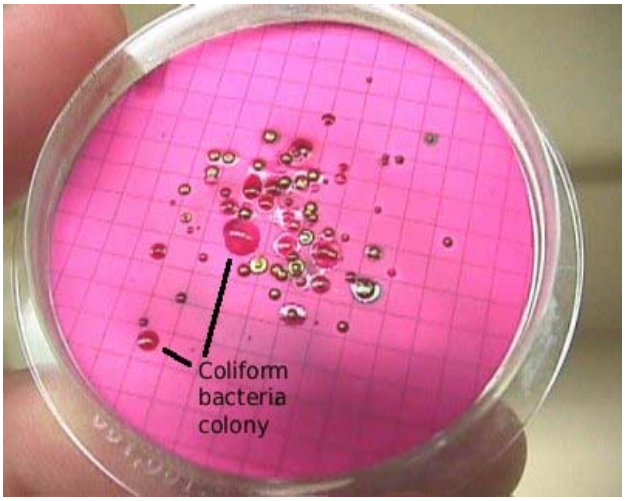
4.2 เทคนิคการกรอง (Membrane Filter technique: MF)

เป็นวิธีที่รวดเร็วและแม่นยำกว่าเทคนิค MPN ทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำ หรือสารละลายตัวอย่างอาหาร มากรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุน ขนาด 0.2—0.45 ไมโครเมตร แบคทีเรียจะติดอยู่บนแผ่นกรอง จากนั้นจึงนำแผ่นกรองไปวางบนอาหารที่มีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย นำไปบ่มที่อุณหภูมิมาตรฐาน แล้วนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนแผ่นกรอง (รูปที่ 3) เทคนิคนี้ใช้ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์, อาหารเลี้ยงเชื้อ, และอุปกรณ์ต่างๆ ไม่มากเท่ากับเทคนิค MPN และยังตรวจวัดได้เร็วกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะกับตัวอย่างที่มีความขุ่น และการใช้แรงดันอาจจะทำให้เชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างถูกทำลายได้ ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ LES Endo agar และ m-Endo medium เป็นต้น

ก)



ข)



รูปที่ 3 ก) เทคนิคการกรอง (membrane filtration) ข) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (APHA, AWWA, WEF, 2012)

จากข้อจำกัดของเทคนิคทั้ง 2 วิธี ข้างต้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจวัดวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหาร

5. เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) (Erlich, 1989)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือ DNA เป้าหมาย ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หลายล้านเท่า โดยมีหลักการ คือ มี DNA แม่แบบ (DNA template) และเอนไซม์ DNA polymerase สังเคราะห์สาย DNA โดยใช้นิวคลีโอไทด์ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP มาต่อเป็นเบสคู่สมกับสาย DNA แม่แบบ ส่วนประกอบของเทคนิค PCR มีดังนี้ DNA แม่แบบ, thermostable DNA polymerase, dNTPs ทั้ง 4 ชนิด และ oligonucleotide primers 1 คู่

เทคนิค PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นที่ 1 Denaturation: เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดการแยกสายของ DNA สายคู่ได้เป็นสายเดี่ยว ความร้อนที่ใช้อยู่ที่ 90-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 2 Primer annealing: เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาเหลือที่ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primers สามารถจับกับ DNA สายเดี่ยวที่ได้จากขั้นแรก

ขั้นที่ 3 Primer extention: เป็นขั้นตอนที่เกิดการขยายสาย DNA ซึ่งเกิดจากการต่อหมู่นิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’ ของ primers แล้วขยาย DNA สายใหม่จากทิศทาง 5’ ไป 3’ อาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จะเท่ากับ 2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของปฏิกิริยา

ได้มีรายงานการพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อตรวจหาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวชี้วัดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหาร เช่น การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยใช้ primers ที่จำเพาะกับยีน *lacZ* (Bej *et al*., 1990) ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ß-galactosidase มาย่อยสลายน้ำตาลแล็กโทส ซึ่งเป็นการพัฒนาเทคนิค PCR ตามหลักการของวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี MPN (Bej *et al*., 1991b) อย่างไรก็ตามพบว่า *Shigella* sp. และ *Salmonella* sp. ก็ให้ผลบวกด้วยวิธีดังกล่าว สำหรับการตรวจหา *E. coli* ได้มีการออกแบบ primers ให้จำเพาะกับยีน *uidA* ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ß-D-glucuronidase (GUD) (Feng *et al*., 1991) หรือ ยีน *malB* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่ใช้ในการขนส่งน้ำตาลมอลโทส (Hill *et al*., 2008) ถึงแม้ว่าเทคนิค PCR จะมีความจำเพาะแต่ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ อีกทั้งแบคทีเรียในตัวอย่างอาจมีมีปริมาณน้อย ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอน enrichment ก่อนที่จะทำ PCR และยังต้องอาศัยเครื่องมือที่มีความจำเพาะ ปัจจุบันนี้เทคนิค PCR จึงยังไม่เป็นที่นิยมใช้กับงานกันมากนัก (Mantynen *et al*., 1997)

มีรายงานการนำเทคนิค MPN มาใช้ร่วมกับเทคนิค PCR (MPN-PCR) เพื่อนำมาใช้เชิงปริมาณในการตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์ในดิน (Picard *et al*., 1992; Myrold and Huss-Danell, 1994; Mantynen *et al*., 1997) พบว่า MPN-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ดีแม้มีปริมาณเชื้อเพียง 10^3 เซลล์ จัดเป็นเทคนิคที่ง่าย ลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์แทนเทคนิค MPN ดั้งเดิมที่ใช้ระยะเวลานาน อีกทั้งยังมีความน่าเชื่อถือ การนำเทคนิค MPN-PCR มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลเปรียบเทียบกับเทคนิค MPN แบบดั้งเดิม (Miwa *et al*., 2003) พบว่าเทคนิค MPN-PCR สามารถตรวจหา *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลได้มากกว่าเทคนิค MPN แบบดั้งเดิม นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Listeria monocytogenes* ในอาหารหมัก (Martin *et al*., 2004) และ *Campylobacter* ในน้ำ (Henry *et al*., 2015) อีกด้วย

6. เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi *et al*., 2000)

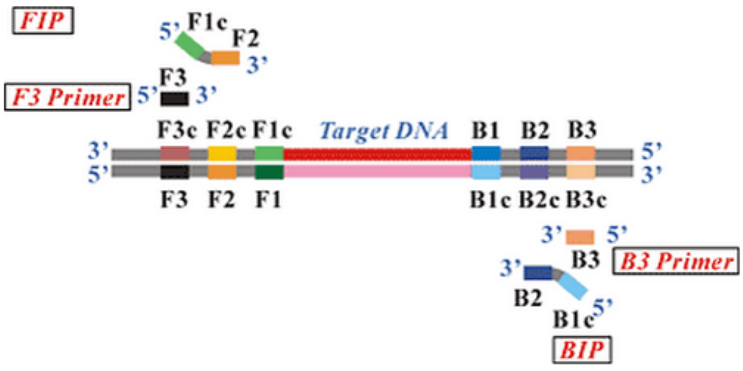
เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาแบบใหม่ที่พัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นเพื่อลดข้อจำกัดของเทคนิค PCR ได้แก่ ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะเนื่องจากปฏิกิริยาจะเกิดที่อุณหภูมิเดียว (ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส) สามารถตรวจสอบผลได้ในขั้นตอนเดียวกัน มีความไวสูงสามารถตรวจวัดเชื้อปริมาณน้อยได้ และมีความไวกว่าเทคนิค PCR

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค LAMP ไปใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารและน้ำดื่มหลายชนิด เช่น การตรวจหา *E. coli* ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) โดยออกแบบ primers ที่จำเพาะกับยีนก่อโรคของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เช่น *stx* gene (EHEC), *stb* gene (ETEC) หรือ *invE* gene (EIEC) เป็นต้น (Carnevale *et al*., 2015) นอกจากนี้ในยังมีการนำมาใช้ในการตรวจหา *Salmonella* spp. ในผักผลไม้ เช่น แคนตาลูป, ผักกาดหอม และมะเขือเทศ เป็นต้น (Yang *et al*., 2015), ตรวจหา *Staphylococcus aureus* ในนม, เนื้อวัว และเนื้อไก่ (Yang *et al*., 2011) และ *Listeria monocytogenes* ในน้ำนม เป็นต้น (Cho *et al*., 2014)

6.1 หลักการของเทคนิค LAMP

เทคนิค LAMP เป็นการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายโดยใช้ primers 4 เส้นที่มีความจำเพาะกับ 6 ตำแหน่งบน DNA เป้าหมาย ในปฏิกิริยาจะอาศัยเพียงอุณหภูมิเดียวและคงที่ตลอดการทดลอง และอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เสถียรและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส โดยจะทำหน้าที่แยก DNA สายคู่ ให้เป็นสายเดี่ยว (strand displacement) โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงเหมือนวิธี PCR นอกจากนี้ *Bst* DNA polymerase ยังสามารถเร่งการต่อสาย DNA โดยที่จะเติม dNTP เข้าตรงปลายด้าน 3'-OH ของสายที่กำลังสร้าง พร้อมกับปล่อยสาร pyrophosphate (PPi) ออกมา เมื่อ PPi มาจับกับ magnesium ions ในสารละลาย จะให้ตะกอน magnesium pyrophosphate มีสีขาว ไม่ละลายน้ำ (Mori *et al*., 2001) ดังนั้นการตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จึงทำได้ในขั้นตอนเดียว

Primers ที่ใช้ในเทคนิค LAMP มี 4 เส้น (F3, B3, FIP, BIP) ออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับ DNA เป้าหมาย 6 ตำแหน่ง ดังนี้ F1, F2, F3, B1, B2, และ B3 (รูปที่ 4)



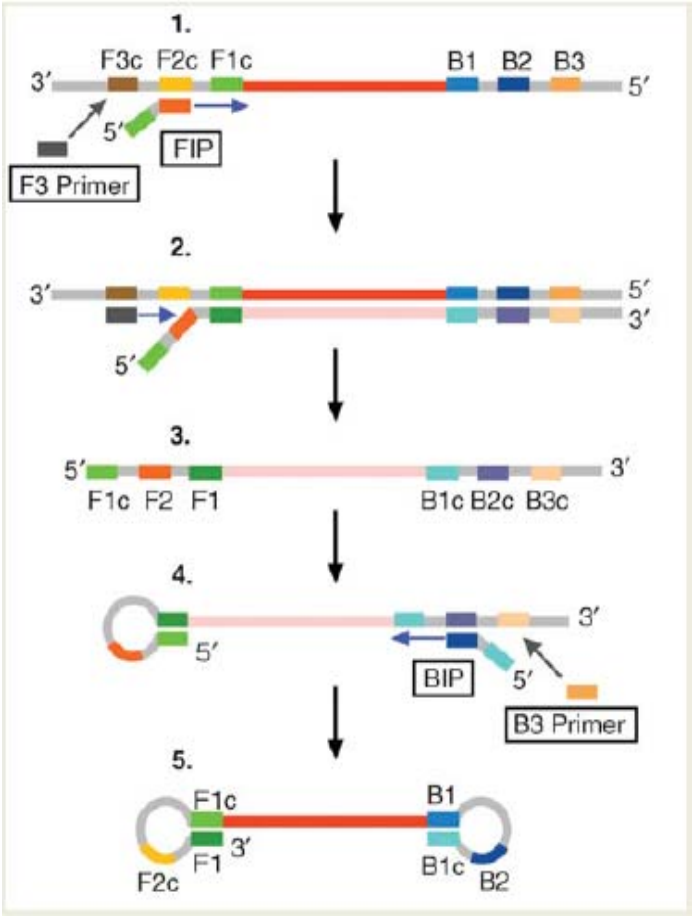
รูปที่ 4 ตำแหน่งที่จำเพาะบน DNA เป้าหมายของเทคนิค LAMP (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

6.2 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค LAMP

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนสำคัญ ได้แก่

1. ขั้นตอนการสร้าง stem-loop หรือ dumbbell-shaped DNA structures

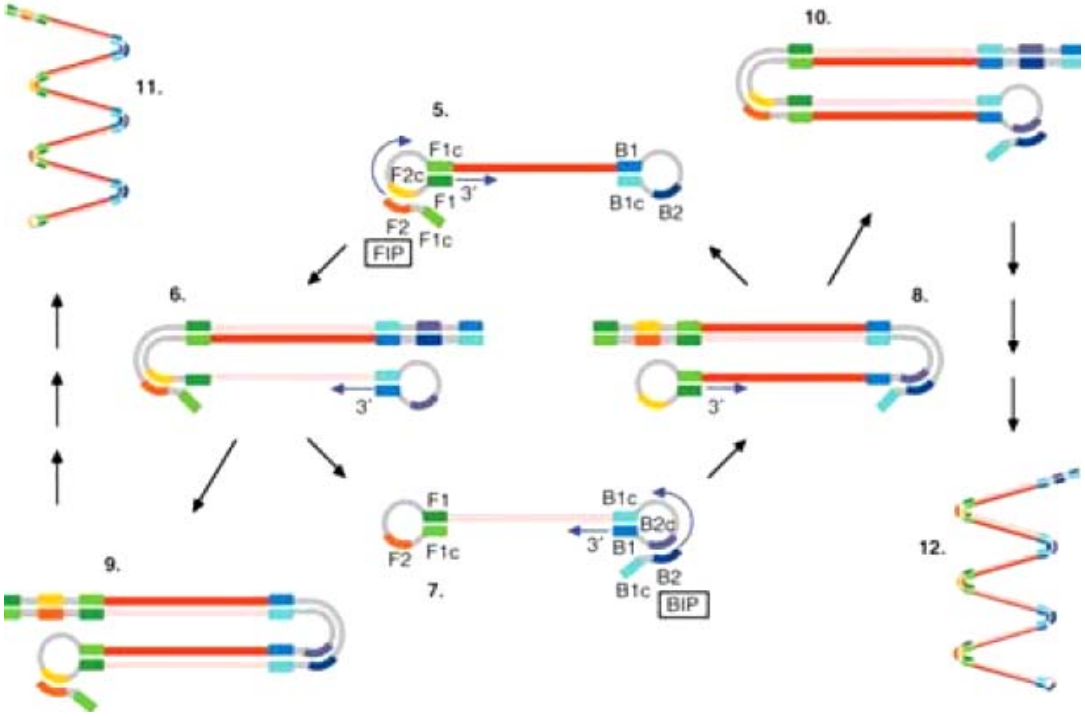
เริ่มโดย *Bst* DNA polymerase ทำหน้าที่ strand displacement ซึ่ง inner primer (FIP, BIP) จับกับ DNA เป้าหมาย แต่บางส่วนของ primer ตรงปลาย 5’ เหลือลำดับเบสบางส่วนไว้ซึ่งจะเป็นเบสคู่สมกับลำดับเบสของ DNA เส้นใหม่ที่จะสร้างขึ้น จึงทำให้โค้งมาจับกันได้เกิดเป็นโครงสร้างแบบ loop ได้ปลาย 5’ จากนั้น DNA สายใหม่ก็ถูกสร้างขึ้นจาก template เส้นเดิมแต่มี outer primers (F3, B3) เข้ามาจับซึ่ง DNA เส้นใหม่ที่สร้างจาก outer primer นี้จะมาแทนที่ และดัน DNA เส้นที่สร้างจาก inner primer ออกไปจาก DNA template จะเกิดโครงสร้างแบบ loop ที่ปลาย 3’ และเกิดเป็นโครงสร้างลักษณะคล้ายดรัมเบล ซึ่งต่อมาจะใช้เป็น DNA ต้นแบบในการเพิ่มจำนวน DNA ในขั้นการเพิ่มจำนวนแบบหมุนเหวี่ยงหรือ cycling amplification step ซึ่งจะเกิดในสภาวะอุณหภูมิคงที่ ดังนั้นการเพิ่มจำนวน DNA แบบนี้จึงเรียกว่า loop-mediated isothermal amplification (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ขั้นตอนการสร้าง Dumbbell-shaped DNA structures (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

2. ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA จาก stem-loop แบบหมุนเวียนต่อเนื่อง

เริ่มโดย inner primers เข้ามาจับตรงบริเวณ loop แล้ว *Bst* DNA polymerase ก็จะเข้ามาต่อสาย DNA ตรงปลาย 3' ของ primer ก็จะได้ DNA เส้นใหม่ และ DNA เส้นใหม่นี้จะถูกดันออกไป และใช้เป็น DNA template ต่อไป โดยปฏิกิริยาจะเกิดแบบหมุนเวียนต่อเนื่องเช่นนี้จนเกิดโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันยาว และมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งจะมีโครงสร้างคล้ายดอกกะหล่ำ (cauliflower-like structure) จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ ก็ทำให้ได้ DNA เป้าหมายหลายๆ copies ซึ่งพบว่าอัตราการสร้าง DNA เป้าหมายอยู่ที่ประมาณ 10^{9}-10^{10} copies ภายในเวลา 15-60 นาที (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA แบบหมุนเวียนต่อเนื่อง (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

6.3 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP

6.3.1 การดูความขุ่น

หลอดที่เกิดผลบวก หรือ มีการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย จะเกิดตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate อ่านผลโดยนำหลอดทดสอบไปปั่นให้ตกตะกอน ถ้าเกิดการเพิ่ม DNA เป้าหมายมากก็จะมีปริมาณตะกอนสีขาวมาก (รูปที่ 7)

รูปที่ 7 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP เมื่อตรวจวัดโดยวิธีดูความขุ่น; (-) ผลลบ; (+) ผลบวก
(Mori *et al.*, 2001)

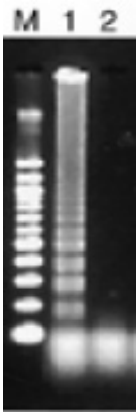
6.3.2 การอ่านผลจากสีฟลูออเรสเซนต์ (Boehme *et al.*, 2007)

วิธีนี้ต้องเติมสีฟลูออเรสเซนต์ หรือสาร chelating agent เช่น calcein ลงไปร่วมกับการทำปฏิกิริยา LAMP โดยผลบวกสังเกตจากการเรืองแสงสีเขียวเมื่อดูใต้แสง UV แสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจาก ในปฏิกิริยาเริ่มต้น calcein จะจับอยู่กับ magnesium ion ในปฏิกิริยา และหากมีการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย pyrophosphate ion จะจับกับ magnesium ion แทนทำให้ calcein เกิดการเปล่งแสง (รูปที่ 8)

รูปที่ 8 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP เมื่อตรวจวัดโดยการใช้สีฟลูออเรสเซนต์; (-) ผลลบ; (+) ผลบวก
(Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

6.3.3 การใช้ agarose gel electrophoresis

สามารถนำ DNA product จากเทคนิค LAMP ไป run agarose gel electrophoresis หากมีการเพิ่มจำนวน DNA (ผลบวก) จะเห็นแถบ DNA หลายขนาด (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP เมื่อตรวจวัดโดยวิธี agarose gel electrophoresis; M คือ ladder; Lane 1 ผลบวก; Lane 2 ผลลบ (Notomi *et al.*, 2000)

6.4 ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิค LAMP

ข้อดี

1. สามารถเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายภายใต้สภาวะเดียว สามารถใช้เครื่องมือที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการเป็นตัวให้อุณหภูมิ เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block
2. มีความไวสูง มากกว่าเทคนิค PCR 10-100 เท่า
3. มีความจำเพาะสูง เนื่องจากมีความจำเพาะกับตำแหน่งบน DNA เป้าหมายถึง 6 ตำแหน่ง
4. มีความไวต่อสารยับยั้งปฏิกิริยาน้อยกว่าเทคนิค PCR
5. การตรวจสอบผลผลิตผลง่าย ไม่ซับซ้อน
6. สามารถนำมาใช้ร่วมกับปฏิกิริยา reverse transcription ในการเพิ่มจำนวน RNA ได้

ข้อด้อย

1. การออกแบบ LAMP primers ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องออกแบบให้มีความจำเพาะถึง 6 ตำแหน่ง
2. ต้องใช้ primers ในปริมาณมาก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค most probable number ร่วมกับ loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในน้ำดื่มและผัก
2. เพื่อประเมินเทคนิค MPN-LAMP ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในน้ำดื่มและผัก

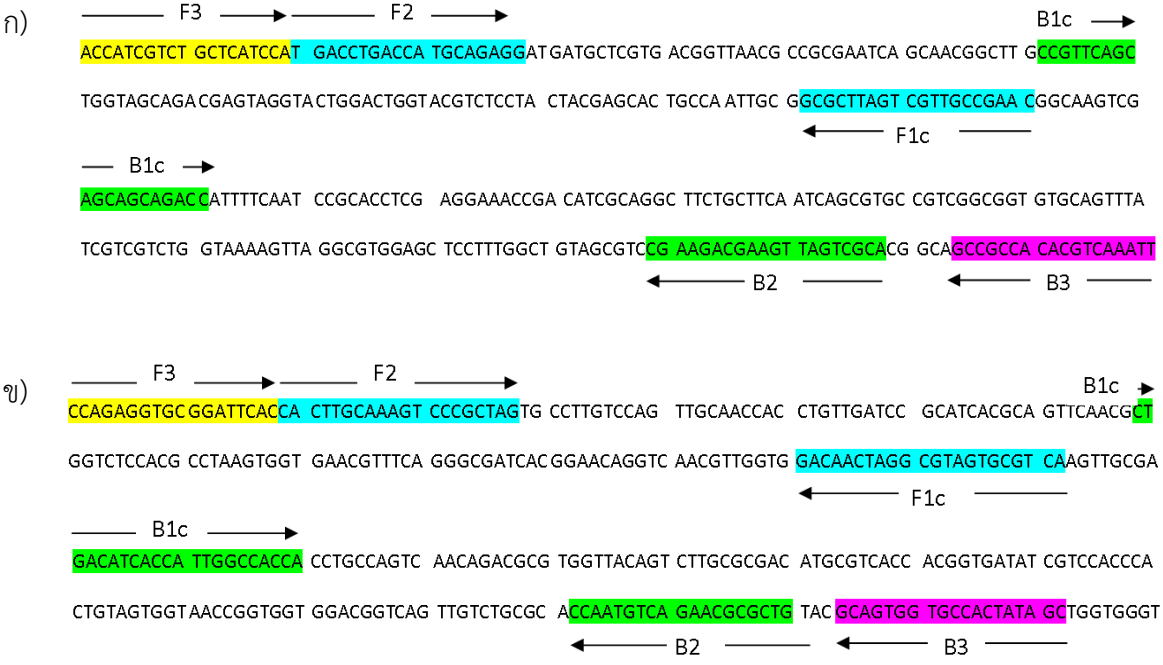
ผลการทดลอง

1. การออกแบบ LAMP primers

การศึกษานี้ได้ออกแบบ LAMP primers ที่จำเพาะกับยีน *lacZ* ของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และ *uidA* ของ *E. coli* โดยแต่ละชุดประกอบด้วย primers 4 เส้น (ตารางที่ 1) ซึ่ง LAMP primers แต่ละชุดจะเกาะบนยีนเป้าหมาย 6 ตำแหน่ง (รูปที่ 10) ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ LAMP F3/B3 primers ของยีน *lacZ* และ *uidA* มีขนาด 181 และ 136 bp ตามลำดับ

ตารางที่ 1 LAMP primers ที่ใช้ในการศึกษา

ยีนเป้าหมาย	Primer	Sequence (5'- 3')
lacZ	F3	ACCATCGTCTGCTCATCCA
	B3	TTAAACTGCACACCGCCG
	FIP	CAAGCCGTTGCTGATTCGCGTTTTTGACCTGACCATGCAGAGG
	BIP	CCGTTCAGCAGCAGCAGACCTTTTACGCTGATTGAAGCAGAAGC
uidA	F3	CCAGAGGTGCGGATTCAC
	B3	CGATATCACCGTGGTGACG
	FIP	ACTGCGTGATGCGGATCAACAGTTTTCACTTGCAAAGTCCCGCTAG
	BIP	CTGACATCACCATTGGCCACCATTTTGTCGCGCAAGACTGTAACC



รูปที่ 10 ตำแหน่งการเกาะของ primers บริเวณยีนเป้าหมาย ก) *lacZ* หรือ ข) *uidA*

2. ความจำเพาะของ LAMP primers

การศึกษาความจำเพาะของ LAMP primers ทั้ง 2 ชุด ต่อการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (*lacZ*-LAMP) และ *E. coli* (*uidA*-LAMP) โดยใช้แบคทีเรียจำนวน 46 สายพันธุ์ พบว่า *E. coli* ทุกสายพันธุ์, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *S. marcescens* และ *Shigella* spp. ให้ผลบวกต่อ *lacZ*-LAMP ส่วน *Salmonella* และแบคทีเรียที่ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ให้ผลลบ นอกจากนี้พบว่า *E. coli* ทุกสายพันธุ์ และ *Shigella* spp. ให้ผลบวกต่อ *uidA*-LAMP ในขณะที่แบคทีเรียอื่น ๆ ให้ผลลบ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาและความจำเพาะของ LAMP primers

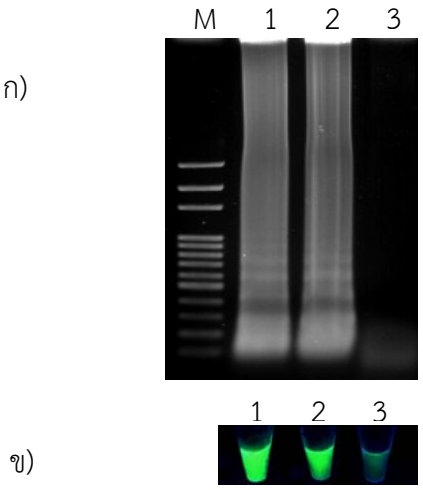
แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	ผลการทดสอบ *lacZ*-LAMP	ผลการทดสอบ *uidA*-LAMP
Family Enterobacteriaceae			
Coliforms (*n*=34)			
Escherichia coli ATCC25922 (positive control)	1	+	+
E. coli	28	+	+
Enterobacter aerogenes	1	+	−
Enterobacter cloacae	1	+	−
Klebsiella pneumoniae	1	+	−
Citrobacter freundii	1	+	−
Serratia marcescens	1	+	−
Non-coliforms (*n*=8)			
Salmonella enterica	4	−	−
Shigella spp.	4	+	+
Non-Enterobacteriaceae (*n*=4)			
Aeromonas spp.	2	−	−
Plesiomonas shigelloides	1	−	−
Pseudomonas aeruginosa	1	−	−

3. ความไวของเทคนิค LAMP

การศึกษาความไวของเทคนิค LAMP โดยใช้ *E. coli* ATCC25922 เป็นเชื้อทดสอบ พบว่า *lacZ*-LAMP และ *uidA*-LAMP สามารถตรวจหา *E. coli* ได้ในระดับความเจือจางต่ำที่สุด คือ 1 CFU/reaction ซึ่งตรวจนับจากจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR โดยใช้ LAMP primers F3/B3 พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลสอดคล้องกัน

4. การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP

การศึกษานี้ได้ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายจากเทคนิค LAMP ด้วยวิธีการใช้ agarose gel electrophoresis โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็นเป็น ladder-like pattern (รูปที่ 11) นอกจากนี้ยังได้ทดลองใช้สี PicoGreen ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ ในการตรวจสอบผลผลิต พบว่าการใส่สี PicoGreen (1:200) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอด LAMP หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเกิดการเรืองแสงสีเขียวภายใต้ UV (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP เมื่อตรวจวัดโดยวิธีการใช้ ก) agarose gel electrophoresis หรือ ข) สี PicoGreen; M คือ 100-bp ladder; 1, positive control (*E. coli* ATCC25922); 2, ตัวอย่างที่ตรวจพบ *E. coli*; 3, negative control

5. การประเมินเทคนิค MPN-LAMP เพื่อตรวจหา *E. coli* ในน้ำดื่มและผักที่เติมเชื้อ

การศึกษานี้ได้เติม *E. coli* ATCC25922 ที่เจือจางในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในตัวอย่างน้ำดื่มและผักที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วประเมินความไวของเทคนิค MPN-LAMP เปรียบเทียบกับวิธี MPN ในการตรวจหา *E. coli* ในตัวอย่าง ผลการทดสอบพบว่า เทคนิค MPN-LAMP สามารถตรวจวัด *E. coli* ที่เติมลงไปในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 1 CFU/100 มิลลิลิตร และ 5 CFU/กรัม ในน้ำดื่มและผัก ตามลำดับ และทั้งสองเทคนิคให้ผลสอดคล้องกัน

6. การประเมินเทคนิค MPN-LAMP ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก

การศึกษานี้ได้ประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค MPN-LAMP ในการประยุกต์ใช้ตรวจคุณภาพน้ำดื่มและผัก โดยเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะกับเทคนิค MPN ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก จำนวน 79 ตัวอย่าง ประกอบด้วย น้ำดื่ม 33 ตัวอย่าง และ ผัก 46 ตัวอย่าง

6.1 การตรวจตัวอย่างน้ำดื่ม

ผลการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มจำนวน 33 ตัวอย่าง ที่ได้จากตู้บริการน้ำดื่มภายในสถานศึกษาต่าง ๆ ในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา พบว่าเทคนิค MPN และ MPN-LAMP ให้ผลสอดคล้องกันในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (ตารางที่ 3) และไม่พบความแตกต่างของค่า MPN ของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี อย่างไรก็ตามการตรวจหา *E. coli* พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่สอดคล้องกัน โดยเทคนิค MPN-LAMP ตรวจพบ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มอีก 7 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจไม่พบด้วยเทคนิค MPN

เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่ม (มอก. 257-2549) กำหนดให้ตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดได้น้อยกว่า 1.1 MPN/100 มิลลิลิตร และตรวจไม่พบ *E. coli* ผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเทคนิค MPN พบว่าน้ำดื่มจำนวน 11 ตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MPN-LAMP พบว่ามีน้ำดื่มอีกจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาเนื่องจากตรวจพบ *E. coli* (ตารางที่ 3)

6.2 การตรวจตัวอย่างผัก

ผลการตรวจตัวอย่างผักจำนวน 46 ตัวอย่าง ที่ได้จากตลาดท้องถิ่นต่าง ๆ ภายในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา พบว่าทุกตัวอย่างตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด โดยพบปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุดในผักประเภท ผักกาดหอม ผักสลัด และกะหล่ำปลี (ตารางที่ 4) เทคนิค MPN และ MPN-LAMP ให้ผลสอดคล้องกันในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และไม่พบความแตกต่างของค่า MPN ของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี อย่างไรก็ตามการตรวจหา *E. coli* พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่สอดคล้องกัน โดยเทคนิค MPN-LAMP ตรวจพบ *E. coli* ในตัวอย่างผักอีกจำนวน 4 ตัวอย่างซึ่งตรวจไม่พบด้วยเทคนิค MPN (ตารางที่ 5)

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารประเภทผักสด ผักพร้อมบริโภคจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กำหนดให้ตรวจพบ *E. coli* ได้น้อยกว่า 100 MPN/กรัม ผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเทคนิค MPN พบว่า ผักจำนวน 15 ตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยา (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MPN-LAMP พบว่ามีผักอีกจำนวน 2 ตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาเนื่องจากตรวจพบ *E. coli* มากกว่า 100 MPN/กรัม

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มที่ตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค MPN และ MPN-LAMP

ตัวอย่าง	แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด /100 มิลลิลิตร		*Escherichia coli* /100 มิลลิลิตร	
	MPN	MPN-LAMP	MPN	MPN-LAMP
1*	1.1	1.1	<1.1	1.1
2*	1.1	1.1	<1.1	1.1
3	1.1	1.1	1.1	1.1
4	16	16	16	16
5	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
6	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
7	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
8	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
9	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
10	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
11	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
12	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
13	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
14	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
15	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
16	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
17	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
18	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
19	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
20	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
21	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
22	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
23	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
24	3.6	3.6	3.6	3.6
25	12	12	12	12
26	1.1	1.1	1.1	1.1
27*	2.2	2.2	<1.1	2.2
28*	2.2	2.2	<1.1	2.2
29	>23	>23	5.1	>23
30*	16	16	<1.1	1.1
31	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
32*	23	23	<1.1	9.2
33*	9.2	9.2	<1.1	3.6

*ตัวอย่างน้ำดื่มที่ให้ผลลบในการตรวจหา *E. coli* โดยเทคนิค MPN แต่ให้ผลบวกโดยเทคนิค MPN-LAMP

ตารางที่ 4 จำนวนตัวอย่างผักที่ตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดโดยเทคนิค MPN

ชนิดของผัก (*n*)	จำนวนตัวอย่างผักที่ตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด: MPN/กรัม)*					
	<3.0	3.0-10	>10-10^2	>10^2-10^3	>10^3-10^4	>10^4-10^5
ผักกาดหอม (8)	–	–	–	1 ($4.2x10^2$)	5 ($1.1\text{-}4.6x10^3$)	2 ($1.1\text{-}4.6x10^4$)
ผักสลัด (8)	–	–	3 (15.0 – 23.0)	2 ($1.5\text{-}7.5x10^2$)	1 ($2.0x10^3$)	2 ($1.1\text{-}1.5x10^4$)
กะหล่ำปลี (8)	–	2 (3.6 - 9.2)	2 (23.0 – 43.0)	2 ($4.2–4.6x10^2$)	1 ($1.1x10^3$)	1 ($1.1x10^4$)
โหระพา (4)	–	–	–	1 ($4.6x10^2$)	3 ($1.5\text{-}4.6x10^3$)	–
แมงลัก (4)	–	–	1 (38.0)	1 ($4.6x10^2$)	2 ($1.5x10^3$)	–
กะเพรา (4)	–	–	–	2 ($4.6\text{-}7.5x10^2$)	2 ($1.1x10^3$)	–
ผักชี (4)	–	–	–	3 ($1.5\text{-}7.5x10^2$)	1 ($1.1x10^3$)	–
สะระแหน่ (4)	–	–	–	3 ($1.5\text{-}4.6x10^2$)	1 ($1.1x10^3$)	–
พริกขี้หนู (1)	–	–	–	–	1 ($1.1x10^3$)	–
ผักกูด (1)	–	–	–	–	1 ($1.5x10^3$)	–

*แสดงเฉพาะค่า MPN เนื่องจากวิธี MPN และ MPN-LAMP ให้ผลสอดคล้องกัน

ตารางที่ 5 จำนวนตัวอย่างผักที่ตรวจพบ *Escherichia coli* โดยเทคนิค MPN และ MPN-LAMP

ชนิดของผัก (*n*)	จำนวนตัวอย่างผักที่ตรวจพบ *Escherichia coli* โดยเทคนิค MPN (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด: MPN/กรัม)						จำนวนตัวอย่างผักที่ตรวจพบ *Escherichia coli* โดยเทคนิค MPN-LAMP (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด: MPN-LAMP/กรัม)					
	<3.0	3.0-10	>10-10^2	>10^2-10^3	>10^3-10^4	>10^4-10^5	<3.0	3.0-10	>10-10^2	>10^2-10^3	>10^3-10^4	>10^4-10^5
ผักกาดหอม (8)	-	2 (3.6–9.2)	1 (27.0)	2 (2.4–6.4x10^2)	2 (1.1–1.5x10^3)	1 (4.6x10^4)	–	1 (9.2)	2 (14.0-27.0)	2 (2.4-6.4x10^2)	2 (1.1-1.5x10^3)	1 (4.6x10^4)
ผักสลัด (8)	2	2 (3.6–9.2)	1 (23.0)	1 (2.4x10^2)	2 (1.1–2.9x10^3)	–	1	3 (3.6-9.2)	1 (23.0)	1 (2.4x10^2)	2 (1.1-2.9x10^3)	–
กะหล่ำปลี (8)	6	1 (3.6)	1 (23.0)	–	–	–	3	2 (3.0-9.2)	3 (23.0-75.0)	–	–	–
โหระพา (4)	–	–	3 (15.0-43.0)	1 (4.3x10^2)	–	–	–	–	3 (15.0-43.0)	1 (4.3x10^2)	–	–
แมงลัก (4)	1	–	3 (23.0-75.0)	–	–	–	1	–	2 (38.0-75.0)	–	1 (1.1x10^3)	–
กะเพรา (4)	–	1 (3.6)	–	2 (2.4x10^2)	1 (1.1x10^3)	–	–	1 (3.6)	–	2 (2.4x10^2)	1 (1.1x10^3)	–
ผักชี (4)	–	–	3 (11.0-93.0)	1 (2.4x10^2)	-	–	–	–	2 (11.0-93.0)	2 (1.2-2.4x10^2)	–	–
สะระแหน่ (4)	–	–	2 (43.0-93.0)	1 (1.5x10^2)	1 (1.1x10^3)	–	–	–	2 (43.0-93.0)	1 (1.5x10^2)	1 (1.1x10^3)	–
พริกขี้หนู (1)	–	1 (9.2)	–	–	–	–	–	1 (9.2)	–	–	–	–
ผักกูด (1)	–	–	1 (43.0)	–	–	–	–	–	1 (43.0)	–	–	–

6.3 การเปรียบเทียบความจำเพาะและความไวของเทคนิค MPN-LAMP ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก

จากการเปรียบเทียบผลการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผักจำนวน 79 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3-5) พบว่าเทคนิค MPN-LAMP มีความไวและความจำเพาะ 100% ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* เนื่องจากเทคนิค MPN-LAMP สามารถตรวจหา *E. coli* ในตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่าง ที่ให้ผลลบต่อการตรวจสอบด้วยวิธี MPN (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ความจำเพาะและความไวของเทคนิค MPN-LAMP เปรียบเทียบกับเทคนิค MPN ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *Escherichia coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก

เชื้อแบคทีเรีย	MPN		% specificity	% sensitivity	MPN-LAMP		% specificity	% sensitivity
	+	-			+	-		
แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด	59	20	100	100	59	20	100	100
E. coli	43	36*	100	80	54	25	100	100

*มี 11 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ *E. coli* โดยวิธี MPN-LAMP แต่ตรวจไม่พบโดยวิธี MPN ซึ่งยืนยันด้วยการนำเชื้อที่แยกได้จาก presumptive phase บนอาหาร EMB และ 16s rRNA sequencing

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิธีตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหารในปัจจุบันยังคงอาศัยหลักการเลี้ยงเชื้อซึ่งมีข้อเสีย คือ ใช้แรงงานมาก และระยะเวลานาน แม้จะมีการพัฒนาเทคนิค LAMP ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาแบบใหม่ เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหาร เนื่องจากไม่สามารถหาปริมาณเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างได้ (Hill *et al*., 2008) การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและอาหารที่อาศัยแบคทีเรียบ่งชี้ จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลเชิงปริมาณของแบคทีเรียในตัวอย่าง ปัจจุบันจึงยังไม่มีรายงานการนำเทคนิค LAMP มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *E. coli* ดังนั้นการศึกษานี้จึงพัฒนาเทคนิค MPN ซึ่งเป็นเทคนิคเดิมที่ใช้ในการหาปริมาณเชื้อ ร่วมกับเทคนิค LAMP (MPN-LAMP) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์และนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำดื่มและอาหาร เพื่อลดข้อด้อยด้านสิ้นเปลืองแรงงาน และระยะเวลานาน

จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดที่ใช้ทดสอบให้ผลบวกในปฏิกิริยา *lacZ*-LAMP แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่ใช้ในการศึกษานี้ครอบคลุมแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่พบบ่อย การศึกษาในประเทศอินเดียโดย Ramteke *et al*. (1992) พบว่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่พบบ่อยในน้ำดื่มที่ได้จากน้ำบาดาล ได้แก่ *Klebsiella* sp. (50.9%), *Citrobacter* sp. (20.4%), และ *E. coli* (11.7%) และ fecal coliform ที่พบบ่อย คือ *E. coli* (75.1%) การศึกษานี้พบว่า *Shigella* spp. ไม่ใช่แบคทีเรียโคลิฟอร์มแต่ให้ผลบวกกับ *lacZ*-LAMP และ *uidA*-LAMP ด้วย ซึ่งมีรายงานว่า *Shigella* spp. กับ *E. coli* มีความเหมือนกันของดีเอ็นเอในระดับสูง ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสองชนิดนี้ได้ด้วยเทคนิค PCR (Bej *et al*., 1991a) มีการใช้ยีน *lacY* เป็นยีนเป้าหมายในการจำแนก *Shigella* spp. และ *E. coli* ออกจากกัน เนื่องจากยีน *lacY* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ galactocidase permease ซึ่งทำหน้าที่ในการนำน้ำตาลแล็กโทสเข้าสู่เซลล์ โดยพบว่า *Shigella* spp. แม้จะมียีนที่สร้างเอนไซม์ β-galactocidase (*lacZ*) แต่ไม่มียีนที่จะนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ ในขณะที่ *E. coli* จะตรวจพบได้ทั้งสองยีน (Horakava *et al*., 2008) อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เทคนิค MPN-LAMP ในการศึกษานี้สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อทั้งสองได้โดยอาศัยผลการทดสอบการหมักน้ำตาลแล็กโทสแล้วให้กรดกับแก๊สในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้น presumptive test ของเทคนิค MPN

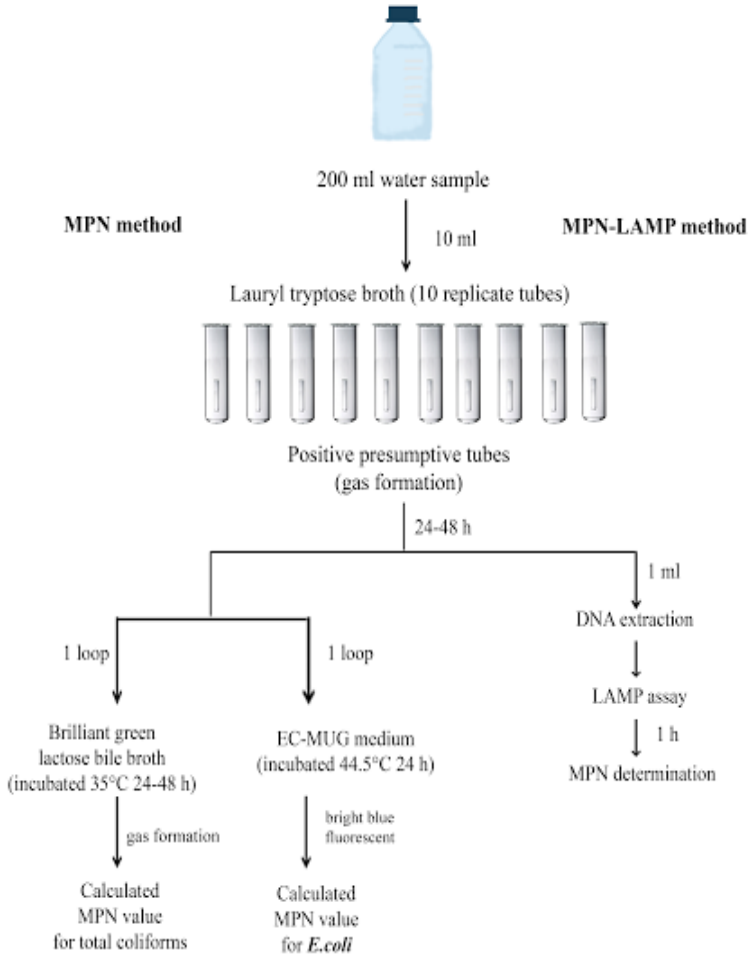
การศึกษานี้แสดงในเห็นว่า เทคนิค MPN-LAMP สามารถตรวจวัดได้แม้มีเชื้อเพียง 1 CFU/ปฏิกิริยา และสามารถตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผักที่มีปริมาณเชื้ออยู่ในตัวอย่างเพียง 1 CFU/100 มิลลิลิตร และ 5 CFU/กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค MPN-LAMP มีความไวสูงมาก และสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้าที่พัฒนาเทคนิค LAMP มาใช้ในการตรวจหา Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) โดยอาศัยยีน Shiga toxin, virulence gene อื่นๆ และกลุ่มยีน O-antigen เป็นยีนเป้าหมาย ซึ่งมีความไวเท่ากับ 1-20 CFU/ปฏิกิริยา โดยเมื่อนำมาตรวจวัดในตัวอย่างผักจะมีความไว 10^3-10^4 CFU/กรัม (Wang *et al.,* 2014) จากรายงานการตรวจวิเคราะห์ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) จากตัวอย่างน้ำนมดิบ พบว่า มีความไวเท่ากับ

547 CFU/มิลลิลิตร (Yang *et al*., 2014) และเมื่อเปรียบเทียบเทคนิค MPN-LAMP กับ MPN-PCR ในการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับน้ำ เช่นในการตรวจวิเคราะห์ *Campylobacter* spp. ในน้ำด้วยเทคนิค MPN-PCR พบว่ามีความไวอยู่ที่ 8.2 MPN/100 มิลลิลิตร (Henry *et al*., 2015) ในขณะที่การตรวจหา *E. coli* ในน้ำดื่มด้วยเทคนิค MPN-LAMP จากการศึกษาครั้งนี้มีความไวอยู่ที่ 1.1 MPN/100 มิลลิลิตร เทคนิค MPN-LAMP เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ดีแม้จะมีเชื้อในปริมาณน้อย

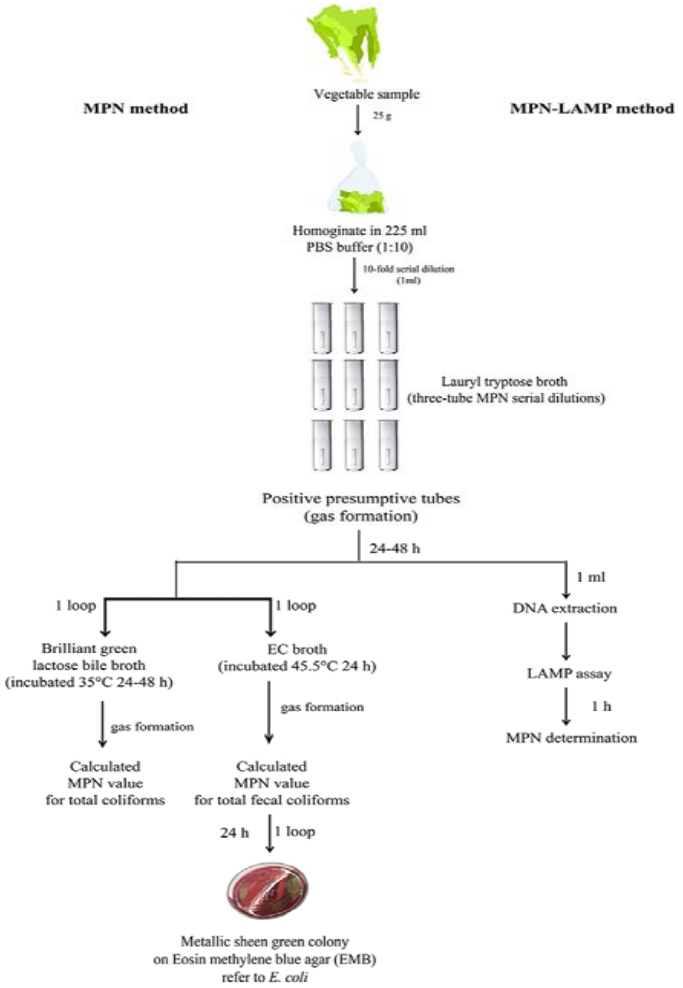
การเปรียบเทียบเทคนิค MPN กับเทคนิค MPN-LAMP ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก จำนวน 79 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างผักที่เลือกมาตรวจวิเคราะห์ได้แก่ ผักสลัด, ผักสมุนไพร และอื่น ๆ เป็นผักที่นิยมบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อน และมีโอกาสพบเชื้อได้จำนวนมากเนื่องจาก ลักษณะทางกายภาพของผักเมื่อเติบโตเต็มที่พร้อมเก็บเกี่ยว ส่วนของผักเกือบทั้งหมดจะสัมผัสกับดิน ประกอบกับส่วนของใบจะมีการซ้อนทับกันมาก ซึ่งการล้างทำความสะอาดก่อนรับประทานอาจกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกไปได้ไม่หมด (Xu and Warriner, 2005) จากการศึกษาพบว่า การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดให้ผลที่สอดคล้องกันทั้ง 2 เทคนิค แต่มีตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่าง (14%) ที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ทั้ง 2 เทคนิคไม่สอดคล้องกัน จากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ด้วยวิธี MPN แท้จริงแล้วมี *E. coli* เนื่องจากสามารถแยก *E. coli* ได้จากการแยกเชื้อโดยตรงจากหลอด presumptive tubes ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar และยืนยันโดยวิธี 16S rRNA sequencing ดังนั้นผลลบปลอมที่เกิดขึ้นในขั้น confirmed test ของเทคนิค MPN ครั้งนี้อาจเกิดจาก *E. coli* บางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร *E. coli* (EC) broth (Baylis, 2008) สาเหตุอื่นๆ ที่อาจทำให้พบผลลบปลอมในขั้น confirmed test ของการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ในน้ำดื่มด้วยวิธี MPN คือ *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อย MUG ได้ จึงไม่สามารถตรวจพบได้ใน EC-MUG medium ซึ่งมีรายงานว่าการตรวจหา *E. coli* โดยใช้วิธี PCR ที่มียีน *uidA* เป็นยีนเป้าหมาย มีความไวสูงกว่าการตรวจโดยอาศัยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร EC-MUG medium เนื่องจากยีน *uidA* จะสามารถตรวจพบได้ทั้งใน MUG-positive *E. coli* และMUG-negative *E. coli* (Bej *et al*., 1991b) หากวิธีการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ไม่มีความไวเพียงพอ ส่งผลกระทบต่อความผิดพลาดในการรายงานผลการทดสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำและอาหาร ดังนั้นการนำเทคนิค LAMP มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค MPN จึงเป็นการเพิ่มความไวและความน่าเชื่อถือของเทคนิค MPN ได้

การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิค MPN-LAMP เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและหาปริมาณของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำดื่มและผัก ซึ่งสามารถพัฒนาเทคนิคนี้เพื่อตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารประเภทอื่น ๆ เช่น เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก อาหารทะเล และผลไม้ ได้ เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค MPN และเทคนิค MPN-LAMP แล้ว สามารถลดและระยะเวลาการวิเคราะห์ลงได้จาก 4-6 วัน เหลือเพียง 1-2 วัน (รูปที่ 12) เทคนิค MPN-LAMP จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับห้องปฏิบัติการที่ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ต้องการลดแรงงาน และระยะเวลา หรือ ต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและแม่นยำ

ก)



ข)



รูปที่ 12 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค MPN และ MPN-LAMP ก) ตรวจตัวอย่างน้ำดื่ม (APHA, AWWA, WEF, 2012), ข) ตรวจตัวอย่างผัก (US. FDA, BAM: Chapter 4, 2002)

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษานี้ได้ออกแบบ LAMP primers จำนวน 2 ชุด ที่จำเพาะกับยีน *lacZ* หรือ *uidA* โดย LAMP primers แต่ละชุดประกอบด้วย primers จำนวน 4 เส้น โดย *lacZ*-LAMP ใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ส่วน *uidA*-LAMP ใช้ในการตรวจหา *E. coli*
2. เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง โดยแบคทีเรียโคลิฟอร์มทุกชนิดที่ทดสอบให้ผลบวกกับ *lacZ*-LAMP และ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ให้ผลบวกกับ *uidA*-LAMP โดยแบคทีเรียที่ไม่ใช่เป้าหมายทั้งหมดให้ผลลบ ยกเว้น *Shigella* spp. ซึ่งไม่มีผลต่อความจำเพาะของการศึกษานี้เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเทคนิค LAMP จะตรวจเฉพาะหลอดที่ให้ผลบวกในขั้น presumptive ของวิธี MPN ซึ่ง *Shigella* spp. ให้ผลลบ
3. เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นมีความไวสูงมาก สามารถตรวจวิเคราะห์ได้แม้มีเชื้อเพียง 1 เซลล์/ปฏิกิริยา ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 1 ชั่วโมง หากต้องการทราบผลที่ชัดเจนสามารถอ่านผลการทดสอบได้โดยใช้สีฟลูออเรสเซนต์ เช่น PicoGreen
4. เมื่อนำเทคนิค LAMP มาใช้ร่วมกับ MPN ในการตรวจหาปริมาณของ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผักที่เติมเชื้อ พบว่ามีความไวสูงมาก สามารถตรวจวิเคราะห์ได้แม้มีเชื้อปนเปื้อนในน้ำดื่มเพียง 1 CFU/100 มิลลิลิตร หรือ มีเชื้อปนเปื้อนในผักเพียง 5 CFU/กรัม
5. การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มและผักจำนวน 79 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค MPN-LAMP เปรียบเทียบกับเทคนิค MPN แบบดั้งเดิม พบว่าทั้ง 2 เทคนิคให้ผลสอดคล้องกันในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่าง (14%) ที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ทั้ง 2 เทคนิคไม่สอดคล้องกัน คือ ให้ผลลบด้วยวิธี MPN แต่ให้ผลบวกด้วยวิธี MPN-LAMP โดยผลจากการทดลองแยกเชื้อโดยตรงลงบนอาหาร EMB agar และยืนยันด้วย 16s rRNA sequencing จากตัวอย่างที่ให้ผลลบในการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ด้วยเทคนิค MPN ยืนยันว่าพบ *E. coli*
6. เทคนิค MPN-LAMP ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะและความไว 100% ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มและผัก โดยมีความไวสูงกว่าเทคนิค MPN ดั้งเดิม
7. เทคนิค MPN-LAMP สามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *E. coli* ในตัวอย่างจาก 4-6 วัน เหลือเพียง 1-2 วัน รวมทั้งสามารถลดปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อและแรงงานได้

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. เกณฑ์คุณภาพทาง จุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร. วันที่ค้นข้อมูล 14 มีนาคม 2559, เข้าถึงได้จาก http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/dmscguideline.pdf

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรมมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม : มอก. 257-2549. น้ำบริโภค. วันที่ค้นข้อมูล 11 ธันวาคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www2.rid.go.th/research/vijais/moa/fulltext/TIS257-2549.pdf

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ : มกอช. 9007-2548. ข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร. วันที่ค้นข้อมูล 8 กรกฎาคม 2559,เข้าถึงได้จาก http://www.acfs.go.th/standard/download/food_safety_thai.pdf

APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: American Public Health Association; 2012, 1360 pp. ISBN 978-087553-013-0.

Ashbolt, N. J., Grabow, W., and Snozzi, M. 2001. Indicators of microbial water quality. IWA Publishing:289-316.

Baylis, C. 2008. Growth of pure cultures of Verocytotoxin- producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media. Journal of Applied Microbiology 105 (5):1259-1265.

Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L., and Atlas, R. M. 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. Applied and Environmental Microbiology 56 (2):307-314**.**

Bej, A. K., DiCesare, J. L., Haff, L., and Atlas, R. M. 1991a. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. Applied and Environmental Microbiology 57 (4):1013-1017.

Bej, A. K., McCarty, S. C., and Atlas, R. 1991b. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. Applied and Environmental Microbiology 57 (8):2429-2432.

Boehme, C. C., Nabeta, P., Henostroza, G., Raqib, R., Rahim, Z., Gerhardt, M., Sanga, E., Hoelscher, M., Notomi, T., and Hase, T. 2007. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. Journal of Clinical Microbiology 45 (6):1936-1940.

Carnevale, M. L., Roche, P. J., Najih, M., Paliouras, M., Beitel, L. K., and Trifiro, M. A. 2015. A rapid diagnostic method for *E. coli* serogroups responsible for gastro-intestinal diseases using loop-mediated isothermal amplification. Analytical Methods 7 (1):287-295.

Cho, A.-R., Dong, H.-J., Seo, K.-H., and Cho, S. 2014. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Listeria monocytogenes prfA* in milk. Food Science and Biotechnology 23 (2):467-474.

Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiology 66 (10):4555-4558.

Dick, L. K., and Field, K. G. 2004. Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidetes* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 70 (9):5695-5697.

Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., and Sadowsky, M. J. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. Applied and Environmental Microbiology 66 (6):2572-2577.

Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan. Design of primers. Retrieved from http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html (accessed 10 August 2014).

Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan. Basic principle. Retrieved from http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html (accessed 10 August 2014).

Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan. Detection methods - Visual detection. Retrieved from http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/detect_index.html (accessed 10 August 2014).

Erlich, H. A. 1989. Polymerase chain reaction. Journal of Clinical Immunology 9 (6):437-447.

Feng, P., and Hartman, P. A. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 43 (6):1320-1329.

Feng, P., Lum, R., and Chang, G., W. 1991. Identification of *uidA* gene sequences in beta-D-glucuronidase-negative *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 57 (1):320-323.

Geldreich, E. E., Kenner, B., and Kabler, P. 1964. Occurrence of coliforms, fecal coliforms, and *Streptococci* on vegetation and insects. Applied Microbiology 12 (1):63-69.

Henry, R., Schang, C., Chandrasena, G. I., Deletic, A., Edmunds, M., Jovanovic, D., Kolotelo, P., Schmidt, J., Williamson, R., and McCarthy, D. 2015. Environmental

monitoring of waterborne *Campylobacter*: evaluation of the Australian standard and a hybrid extraction-free MPN-PCR method. Frontiers in Microbiology 6.

Hill, J., Beriwal, S., Chandra, I., Paul, V. K., Kapil, A., Singh, T., Wadowsky, R. M., Singh, V., Goyal, A., and Jahnukainen, T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology 46 (8):2800-2804.

Horakova, K., Mlejnkova, H., and Mlejnek, P. 2008. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease,ß-D-glucuronidase, and ß-D-galactosidase. Journal of Applied Microbiology 105 (4):970-976.

Johnson, R. P., Durham, R. J., Johnson, S. T., MacDonald, L. A., Jeffrey, S. R., and Butman, B. T. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. Applied and Environmental Microbiology 61 (1):386-388.

Leininger, D. J., Roberson, J. R., and Elvinger, F. 2001. Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13 (3):273-275.

Maheux, A. F., Dion-Dupont, V., Bouchard, S., Bisson, M.-A., Bergeron, M. G., and Rodriguez, M. J. 2015. Comparison of four ß-glucuronidase and ß-galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms in water. Journal of Water and Health 13 (2):340-352.

Mantynen, V., Niemela, S., Kaijalainen, S., Pirhonen, T., and Lindstrom, K. 1997. MPN-PCR-quantification method for staphylococcal enterotoxin *c* 1 gene from fresh cheese. International Journal of Food Microbiology 36 (2):135-143.

Martin, B., Jofre, A., Garriga, M., Hugas, M., and Aymerich, T. 2004. Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN- PCR method. Letters in Applied Microbiology 39 (3):290-295.

Miwa, N., Nishio, T., Arita, Y., Kawamori, F., Masuda, T., and Akiyama, M. 2003. Evaluation of MPN method combined with PCR procedure for detection and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 44 (6):289.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochemical and biophysical research communications 289 (1):150-154.

Myrold, D. D., and Huss-Danell, K. 1994. Population dynamics of *Alnus*-infective *Frankia* in a forest soil with and without host trees. Soil Biology and Biochemistry 26 (5):533-540.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic acids Research 28 (12):e63-e63.

Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., and Simonet, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology 58 (9):2717-2722.

Ramteke, P., Bhattacharjee, J., Pathak, S., and Kalra, N. 1992. Evaluation of coliforms as indicators of water quality in India. Journal of Applied Bacteriology 72 (4):352-356.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., and Laurent, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. Journal of Microbiological Methods 49 (1):31-54.

Tate, R. L. 1978. Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols. Applied and Environmental Microbiology 35 (5):925-929.

Trotman, H., and Bell, Y. 2006. Neonatal sepsis in very low birthweight infants at the University Hospital of the West indies. The West Indian medical journal 55 (3):165-169.

U. S. Food and Drug Administration. BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Retrieved from http://www.fda.gov//Food/Food Science Research/LaboratoryMethods/ucm064948.htm. (access 12 December 2015).

Vilchez, S., Reyes, D., Paniagua, M., Bucardo, F., Möllby, R., and Weintraub, A. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. Journal of Medical Microbiology 58 (5):630-637.

Wang, F., Yang, Q., Qu, Y., Meng, J., and Ge, B. 2014. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification suite for the rapid, reliable, and robust detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in produce. Applied and Environmental Microbiology 80 (8):2516-2525.

Yang, H., Ma, X., Zhang, X., Wang, Y., and Zhang, W. 2011. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food. European Food Research and Technology 232 (5):769-776.

Yang, W., Song, X., Wang, J., Li, Z., Ji, M., and Li, Y. 2014. Detection methods for milk pathogenic bacteria by loop-mediated isothermal amplification. Bioscience Trends 8 (6):316-321.

Yang, Q., Wang, F., Jones, K. L., Meng, J., Prinyawiwatkul, W., and Ge, B. 2015. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of Salmonella in produce. Food Microbiology 46:485-493.

Xu, J., and Warriner, K. 2005. Coliphage as an indicator of fecal contamination in hydroponic cucumber (*Cucumis sativus* L) greenhouses. Journal of the Science of Food and Agriculture 85 (14):2397-2400.

ภาคผนวก

ต้นฉบับที่ส่งไปยังวารสารวิชาการ

Proceeding

วิธีการทดลองเพิ่มเติม

1. การตรวจหายีน *lacZ* และ *uidA* ด้วยเทคนิค LAMP

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม Reaction mixture	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
10X buffer	1X	2.5
100 mM $MgSO_4$	8 mM	2
10 mM dNTP	1.4 mM	3.5
5M Betaine	0.8 M	4
DI water	-	0.5
total	-	12.5

ส่วนผสม LAMP Reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร
Reaction mixture	-	12.5
50 µM F3	0.2 µM	1
50 µM B3	0.2 µM	1
40 µM FIP	1.6 µM	1
40 µM BIP	1.6 µM	1
8 U Bst DNA polymerase	-	1
DI water	-	5.5
DNA template	-	2
total	-	25

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา

ยีน *lacZ* อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที

ยีน *uidA* อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที

2. ตารางแสดงค่า MPN แบบ 3 หลอดในการตรวจวิเคราะห์อาหาร (US. FDA, BAM Appendix 2, 2010)

Pos. Tubes				Conf. lim.		Pos. tubes				Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001	MPN/g	Low	High	0.10	0.01	0.001	MPN/g	Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

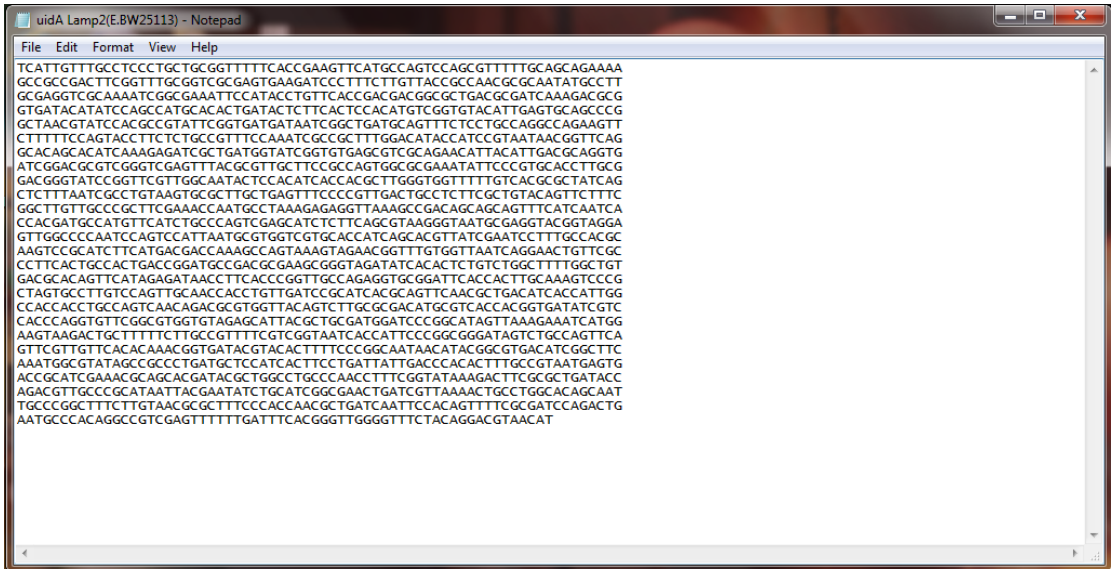
3. ตารางแสดงค่า MPN แบบ 10 หลอดในการตรวจตัวอย่างน้ำดื่ม (US. FDA, BAM Appendix 2, 2012)

Pos. tubes	MPN/100ml	Conf. lim.	
		Low	High
0	<1.1	–	3.3
1	1.1	.05	5.9
2	2.2	.37	8.1
3	3.6	.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.9	33
9	23	8.1	53
10	>23	12	–

4. การออกแบบ LAMP primer ด้วยโปรแกรม PrimerExplorer V4.

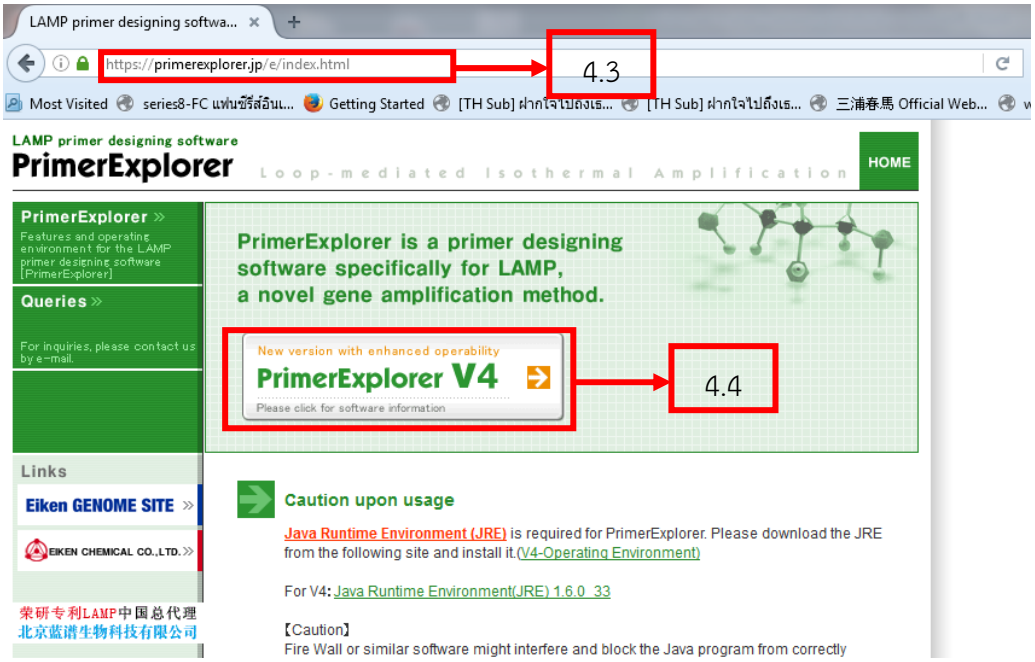
4.1 หาลำดับเบสของยีนที่ต้องการใช้ในการตรวจวิเคราะห์จากฐานข้อมูล NCBI

4.2 copy sequence ใส่ใน notepad แล้ว save file เป็นนามสกุล .txt ดังรูป



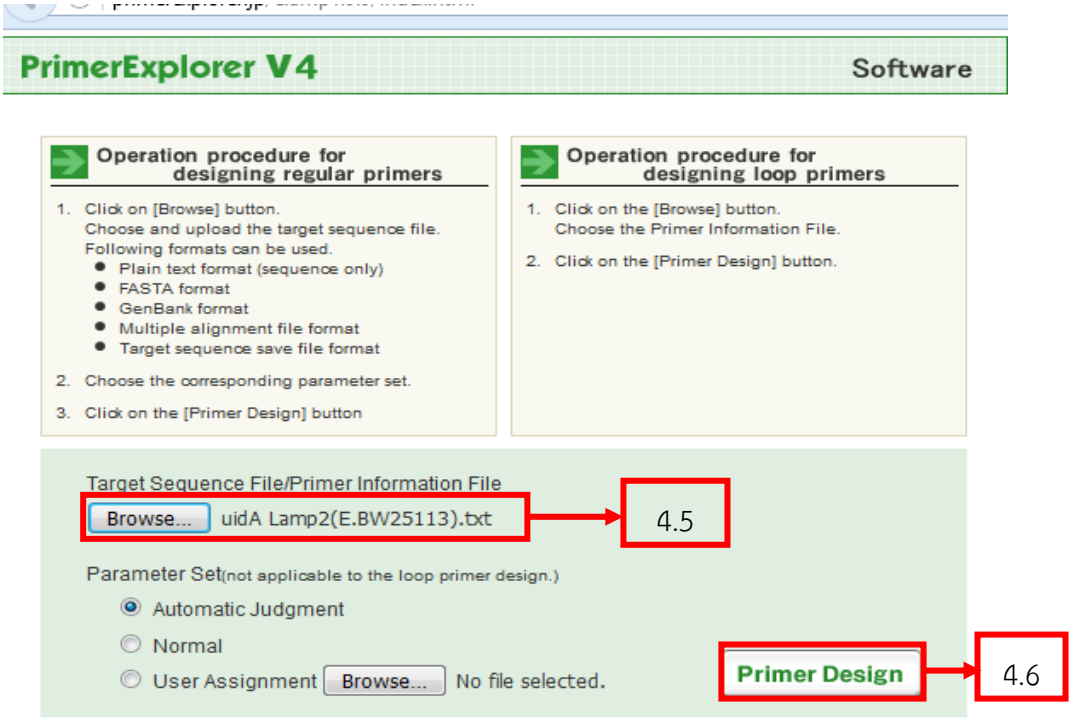
4.3 เข้าโปรแกรม PrimerExplorer จากเว็บไซค์โดยใช้ Mozilla Firefox browsers

4.4 กด PrimerExplorer V4



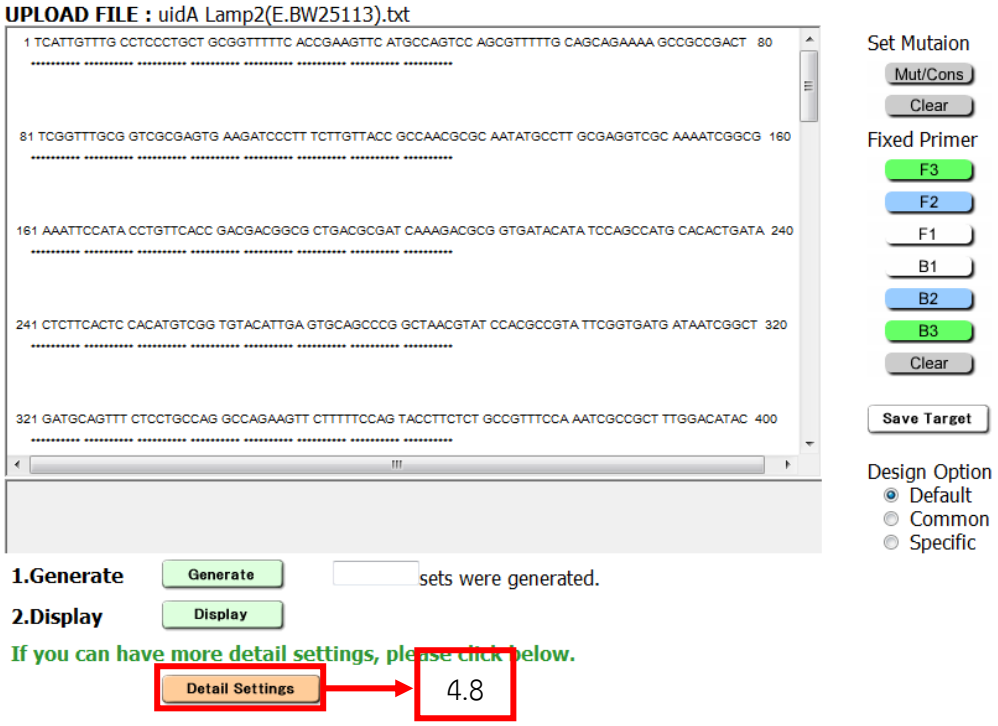
4.5 กด Browse เลือก file ลำดับเบสของยีนที่ save ไว้

4.6 แล้วกด Primer Design



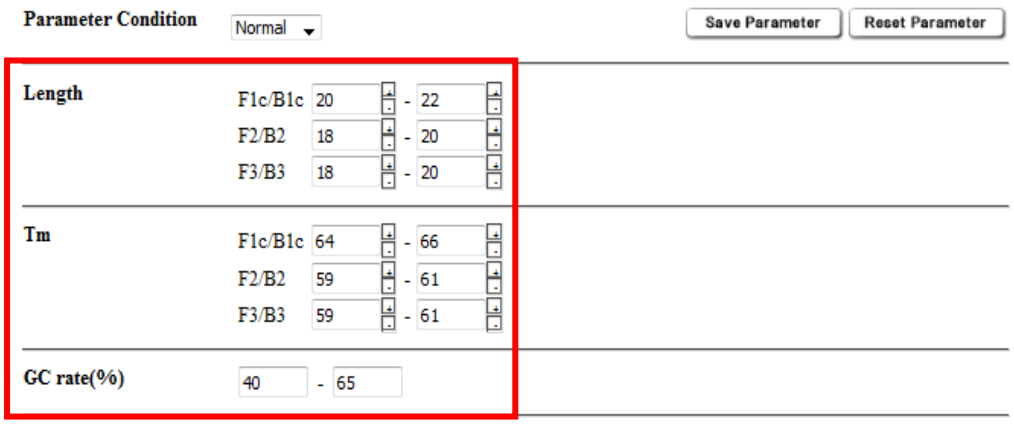
4.7 หลังจากกด Primer Design จะปรากฏหน้าจอดังแสดง

4.8 เลือก Detail Settings เพื่อตรวจสอบค่า Parameter ต่างๆ

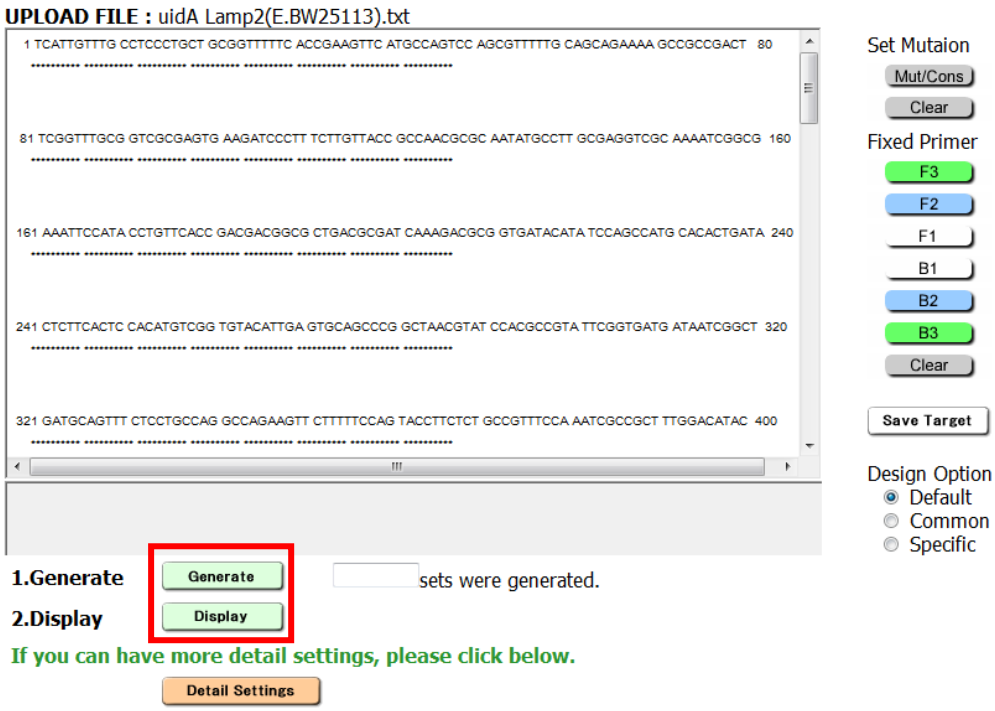


ค่า parameter ที่ต้องตรวจสอบมีดังนี้

1. Length อยู่ในช่วง 18-25 bp
2. Tm ของ F1c/B1c อยู่ในช่วง 64-66°C
   Tm ของ F2/B2 F3/B3 อยู่ในช่วง 59-61°C
3. GC rate% อยู่ในช่วง 40-65% หรือ 50-60%

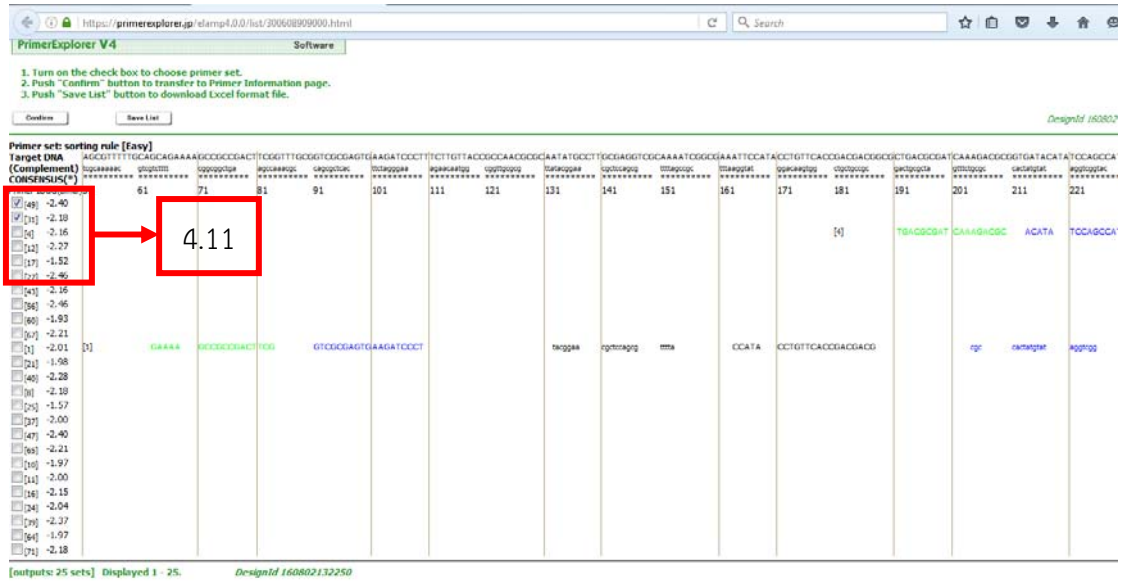


4.9 กด Generate และ Display



4.10 จะปรากฏหน้าจอแสดงชุดของ LAMP primer ที่ออกแบบได้

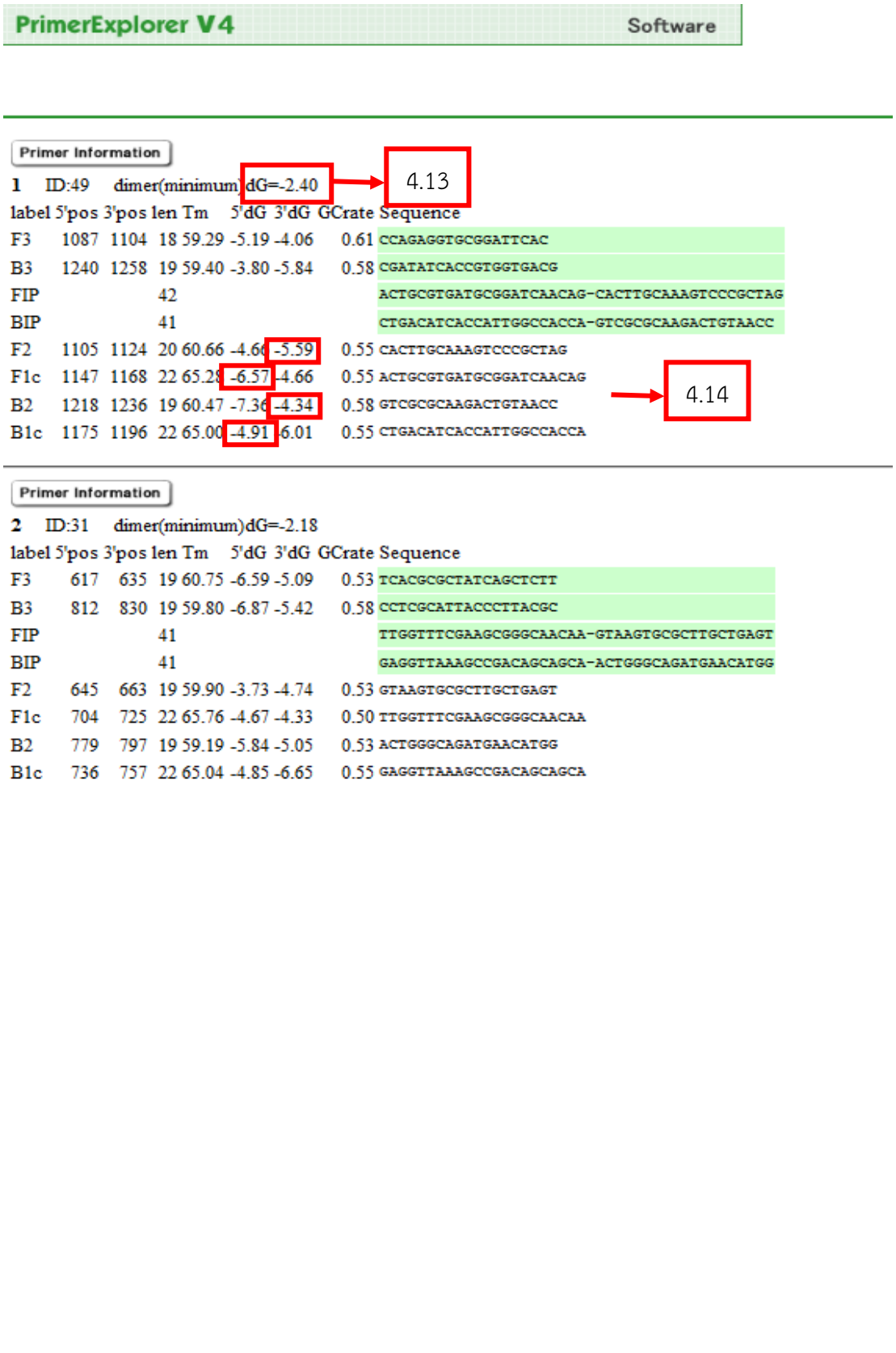
4.11 กดเลือกชุด LAMP primer ที่ต้องการ



4.12 ในชุด LAMP primer 1 ชุด จะประกอบด้วย primer F3, B3, FIP และ BIP พร้อมลำดับเบสของ primer แต่ละเส้นดังแสดงในรูป

4.13 พิจารณา dG ของทั้งหมดต้องเข้าใกล้ 0

4.14 พิจารณา dG ของปลาย 3’ F2/B2 และ 5’ F1c/B1c ที่มีค่าประมาณ -4 kcal/mol หรือน้อยกว่า



PrimerExplorer V4 Software

Primer Information

1 ID:49 dimer(minimum)dG=-2.40 → 4.13

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	1087	1104	18	59.29	-5.19	-4.06	0.61	CCAGAGGTGCGGATTCAC
B3	1240	1258	19	59.40	-3.80	-5.84	0.58	CGATATCACCGTGGTGACG
FIP			42					ACTGCGTGATGCGGATCAACAG-CACTTGCAAAGTCCCGCTAG
BIP			41					CTGACATCACCATTGGCCACCA-GTCGCGCAAGACTGTAACC
F2	1105	1124	20	60.66	-4.66	-5.59	0.55	CACTTGCAAAGTCCCGCTAG
F1c	1147	1168	22	65.28	-6.57	-4.66	0.55	ACTGCGTGATGCGGATCAACAG
B2	1218	1236	19	60.47	-7.36	-4.34	0.58	GTCGCGCAAGACTGTAACC
B1c	1175	1196	22	65.00	-4.91	-6.01	0.55	CTGACATCACCATTGGCCACCA

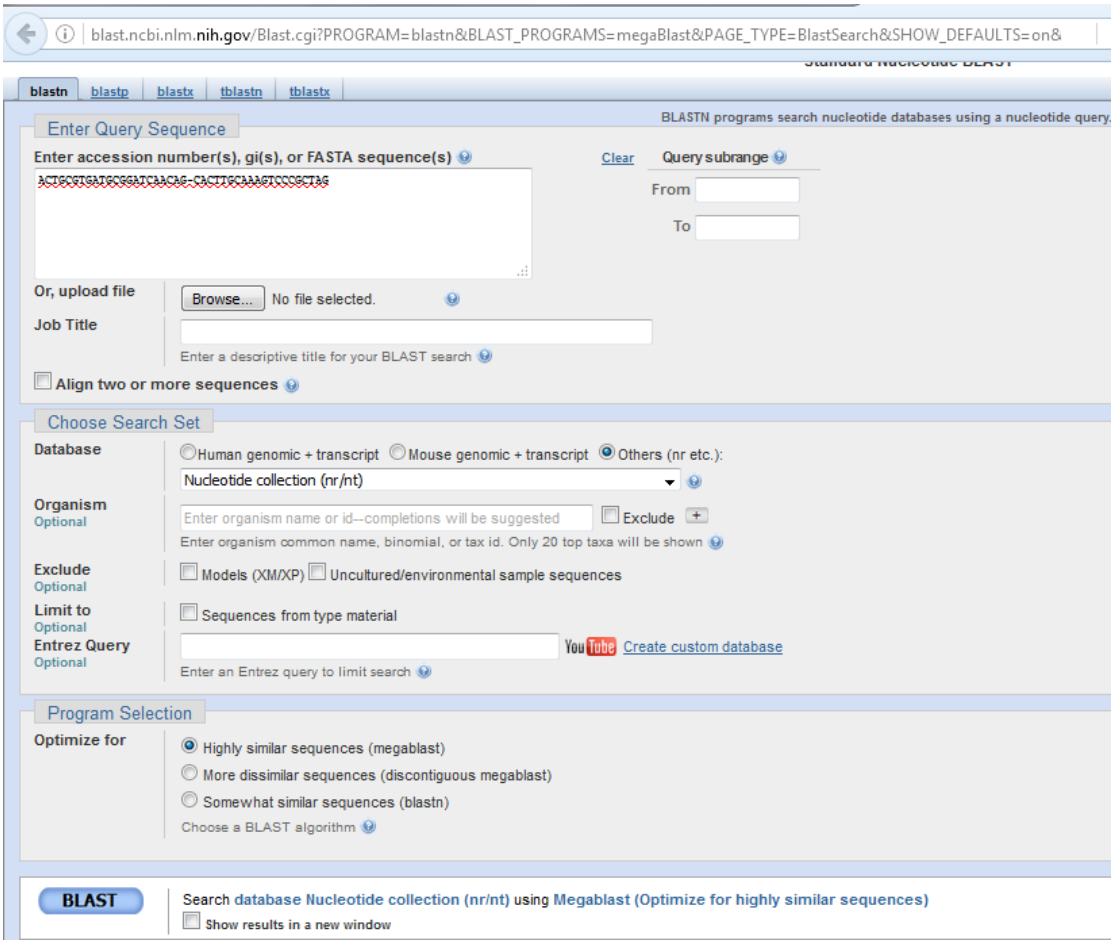
→ 4.14

Primer Information

2 ID:31 dimer(minimum)dG=-2.18

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	617	635	19	60.75	-6.59	-5.09	0.53	TCACGCGCTATCAGCTCTT
B3	812	830	19	59.80	-6.87	-5.42	0.58	CCTCGCATTACCCTTACGC
FIP			41					TTGGTTTCGAAGCGGGCAACAA-GTAAGTGCGCTTGCTGAGT
BIP			41					GAGGTTAAAGCCGACAGCAGCA-ACTGGGCAGATGAACATGG
F2	645	663	19	59.90	-3.73	-4.74	0.53	GTAAGTGCGCTTGCTGAGT
F1c	704	725	22	65.76	-4.67	-4.33	0.50	TTGGTTTCGAAGCGGGCAACAA
B2	779	797	19	59.19	-5.84	-5.05	0.53	ACTGGGCAGATGAACATGG
B1c	736	757	22	65.04	-4.85	-6.65	0.55	GAGGTTAAAGCCGACAGCAGCA

4.15 นำลำดับเบสของ LAMP primer ชุดที่เลือก เข้าโปรแกรม Blast ของ NCBI เพื่อตรวจสอบความจำเพาะ



บรรณานุกรม

U. S. Food and Drug Administration. BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. Retrieved from http:// www.fda.gov/Food/FoodScience Research/ LaboratoryMethods/ucm109656.htm (access 14 December 2015).

Elsevier Editorial System(tm) for Food Control

Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCONT-D-16-01553

Title: Most-probable-number loop-mediated isothermal amplification technique for detection and enumeration of total coliforms and Escherichia coli in drinking water and vegetables

Article Type: Research Paper

Keywords: coliforms; Escherichia coli; loop-mediated isothermal amplification; microbial quality; MPN; rapid method

Corresponding Author: Dr. Pimonsri Mittraparp-arthorn, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Prince of Songkla University

First Author: Chonnikan Tongphrom

Order of Authors: Chonnikan Tongphrom; Pimonsri Mittraparp-arthorn, Ph.D.; Wilawan Charernjiratrakul; Mitsuaki Nishibushi ; Varaporn Vuddhakul

Abstract: Total coliforms and Escherichia coli are bacterial indicators used in microbiological examination of drinking water and foods to indicate the possible of fecal contamination which led to ensure the public health safety. In this study, we developed most-probable-number loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) method for examination of total coliforms and E. coli in drinking water and vegetables. The LAMP assay was performed using two sets of specific primers, lacZ and uidA, for identification of total coliforms and E. coli, respectively. The lacZ-LAMP was able to detect all members of the coliform group. In addition, uidA-LAMP was successfully detected all E. coli strains tested. The detection limit of LAMP for total coliforms and E. coli was 1 CFU/reaction. In spiked samples, presumptive evaluation by MPN-LAMP method could detect E. coli at the concentration of 1 CFU/100 ml and 5 CFU/g in water and vegetables, respectively. Analyzing 33 drinking water and 46 raw vegetable samples, the results obtained by MPN-LAMP method were in agreement with the MPN technique for total coliforms detection. However, MPN-LAMP had better sensitivity than conventional MPN technique on E. coli detection. No false-negative results were observed in all samples. Thus, this method can be used as an alternative test for rapid examination of total coliforms and E. coli in food industry.

Suggested Reviewers: Asim Kumar Bej Ph.D.
Professor of Biology, Department of Biology, University of Alabama at Birmingham
abej@uab.edu
Dr. Bej has published numerous research and review articles about molecular diagnostics of food-borne pathogens.

No conflict of interest exists.

Betty H. Olson Ph.D.

Professor, Department of Civil & Environmental Engineering, University of California, Berkeley
bholson@uci.edu
Dr.Olson is interested in molecular applications for optimizing biological processes in wastewater treatment, environmental health, and drinking water microbiology.

No conflict of interest exists.

Ronald M. Atlas Ph.D.
Professor, Department of Biology, University of Louisville
ronald.@louisville.edu

July 14, 2016

Dear Dr. Campbell-Platt,

We are pleased to submit our manuscript entitled "Most-probable-number loop-mediated isothermal amplification technique for detection and enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in drinking water and vegetables" for consideration as a research article for publication in *Food Control*.

For public health food safety, recent method used for total coliforms and *E. coli* detection and enumeration is the Most Probable Number (MPN) technique. MPN is excellent but require a lot of time, labor intensive, confirmed results often require several days of analysis, lack of specificity and poor detection of slow-growing bacteria. MPN-LAMP method developed in this study is rapid, highly specific, more sensitive and less labor than that of the MPN technique. The detection limit of LAMP for total coliforms and *E. coli* was 1 CFU/reaction. MPN-LAMP method could detect *E. coli* at the concentration of 1 CFU/100 ml and 5 CFU/g in water and vegetables, respectively.

We believe our findings would appeal to a broad audience who involved in food safety and process control.

This manuscript has not been previously published elsewhere and is not under consideration by any other journal. All authors approved the manuscript and this submission. To the best of our knowledge, no conflict of interest exists to any authors listed in this manuscript.

The research reported in this manuscript has been funded by the Thailand Research Fund with partial supports from the Faculty of Science Research Fund, and Prince of Songkla University.

Sincerely,

Pimonsri Mittraparp-arthorn, Ph.D.
Corresponding author, on behalf of co-authors

Highlights

- The detection limit of LAMP for total coliforms and *E. coli* was 1 CFU/reaction.
- The sensitivity of MPN-LAMP was 1 CFU/100 ml of water and 5 CFU/g of vegetables.
- MPN-LAMP had better sensitivity than MPN technique on *E. coli* detection.
- MPN-LAMP is more rapid, specific, sensitive, and less labor than MPN technique.

*Manuscript
Click here to view linked References

Most-probable-number loop-mediated isothermal amplification technique for detection and enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in drinking water and vegetables

Chonnikan Tongphrom [a,b], Pimonsri Mittraparp-arthorn [a,b,*], Wilawan Charernjiratrakul [a], Mitsuaki Nishibushi [c], Varaporn Vuddhakul [a,b]

[a] Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

[b] Food Safety and Health Research Unit, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

[c] Division of Human-Nature Dynamics, Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

*Contact information for the corresponding author:

Pimonsri Mittraparp-arthorn, Ph.D.

Email: pimonsri.m@psu.ac.th

Telephone number: +6674288314

Fax number: +6674446661

Abstract

Total coliforms and *Escherichia coli* are bacterial indicators used in microbiological examination of drinking water and foods to indicate the possible of fecal contamination which led to ensure the public health safety. In this study, we developed most-probable-number loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) method for examination of total coliforms and *E. coli* in drinking water and vegetables. The LAMP assay was performed using two sets of specific primers, *lacZ* and *uidA*, for identification of total coliforms and *E. coli*, respectively. The *lacZ*-LAMP was able to detect all members of the coliform group. In addition, *uidA*-LAMP was successfully detected all *E. coli* strains tested. The detection limit of LAMP for total coliforms and *E. coli* was 1 CFU/reaction. In spiked samples, presumptive evaluation by MPN-LAMP method could detect *E. coli* at the concentration of 1 CFU/100 ml and 5 CFU/g in water and vegetables, respectively. Analyzing 33 drinking water and 46 raw vegetable samples, the results obtained by MPN-LAMP method were in agreement with the MPN technique for total coliforms detection. However, MPN-LAMP had better sensitivity than conventional MPN technique on *E. coli* detection. No false-negative results were observed in all samples. Thus, this method can be used as an alternative test for rapid examination of total coliforms and *E. coli* in food industry.

Keywords: coliforms; *Escherichia coli*; loop-mediated isothermal amplification; microbial quality; MPN; rapid method

1. Introduction

Coliforms are Gram-negative, facultative anaerobic rod-shaped bacteria that ferment lactose to produce acid and gas within 48 hours at 35°C (Rompré, Servais, Baudart, de-Roubin, & Laurent, 2002), and are normally detected in diverse environments (e.g., soil or vegetation) (Geldreich, Kenner, & Kabler, 1964; Tate, 1978). As reported previously, *Klebsiella* sp. (50.9%), *Citrobacter* sp. (20.4%), and *E. coli* (11.7%) were the common total coliforms isolated from rural drinking water (Ramteke, Bhattacharjee, Pathak, & Kalra, 1992). *E. coli* is associated with fecal material of humans and other warm-blooded animals (Dombek, Johnson, Zimmerley, & Sadowsky, 2000). Total coliforms and *E. coli* are the most common indicator group tested for monitoring of microbial quality in water, foods and other food products. In several countries, *E. coli* is not accepted in drinking water, fresh produce, or any processed foods (De Oliveira, De Souza, Bergamini, & De Martinis, 2011; Wei, Hwang, & Chen, 2006). The specific guidelines and regulations depend on the type of analysed foods.

A standard method recommended for total coliforms and *E. coli* detection and enumeration is the Most Probable Number (MPN) technique (Eckner, 1998). However, it is time consuming, requiring 4 to 6 days before the presence of coliforms in drinking water could be confirmed. Therefore, rapid culture methods based on specific enzyme activity detection of those bacteria have been developed to examine water and food samples (Maheux et al., 2015). However, they are expensive and time consuming.

PCR-based methods have been developed to increase the rapidity and specificity of coliforms detection without cultivation and confirmation steps (Bej, DiCesare, Haff, & Atlas, 1991; Bej, McCarty, & Atlas, 1991). Primers based on the *lacZ* gene have been used for the detection of coliforms. For specific detection of *E. coli*, *malB* gene coded for a maltose transport protein was developed, cross reaction was demonstrated in *Shigella* and *Salmonella* (Bej, Steffan, DiCesare, Haff, & Atlas, 1990). Therefore, primers targeted to the *uidA* gene encoding β-D-glucuronidase

(GUD) was developed with specific detection of *E. coli* (Martins et al., 1993; Tsai, Palmer, & Sangermano, 1993). Despite its specificity, it is difficult to use PCR for the quantification of bacteria in sample because of the presence of PCR inhibitors in samples (Hill et al., 2008).

A novel nucleic acid-based method known as the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has been developed (Notomi et al., 2000). This technique is less interference by inhibitory substances than PCR, and its amplification can be achieved by using a simple heating block or waterbath. In addition, LAMP technique is easy to perform, generates rapid and easily interpretable results because positive reaction develops turbidity which can be detected by the naked eyes. This method has been developed into commercial kits to detect many food-borne pathogens, including *Salmonella*, *Legionella*, *Listeria*, verotoxin-producing *E. coli*, and *Campylobacter* (Mori, Nagamine, Tomita, & Notomi, 2001), and is used for diagnosis of *E. coli* infection with high sensitivity and specificity (Hill et al., 2008; Yano, Ishimaru, & Hujikata, 2007). Therefore, combining the conventional MPN technique with LAMP assay would benefit people for detection and enumeration of food-borne pathogen. The objective of this study was to evaluate MPN-LAMP method to detect and enumerate the total coliforms and *E. coli* in drinking water and vegetables.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains

The bacterial strains used in this study including 34 coliforms, 8 non-coliforms, and 4 non-enteric bacteria (Table 1). *E. coli* ATCC25922 was used for determination of LAMP sensitivity and specificity, and for the inoculation of spiked water and vegetable samples.

2.2 LAMP primers design

In this study, primers specific to *lacZ* and *uidA* were used in LAMP assay for detection of total coliforms and *E. coli*, respectively (Table 2). They were designed with Primer Explorer V4 from Eiken Chemical, Co. Ltd., Japan.

2.3 LAMP assay

The *lacZ*-LAMP and *uidA*-LAMP assays were performed using 25-µl reaction mixture consisted of a 1× ThermoPol reaction buffer (20 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgSO_4$, 0.1% TritonX-20, pH8.8 at 25 °C), 1.6 µM each of FIP and BIP, 0.2 µM each of F3 and B3, 1.4 mM of dNTPs, 8 mM of $MgSO_4$, 8 U of *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, USA), and 1.5 µl of DNA template. The reaction mixtures of *lacZ*-LAMP and *uidA*-LAMP were incubated in a conventional heating block (Major Science, USA) for 60 min at 65 or 64°C, respectively. A non-DNA containing negative control was used to ensure no amplification from the reaction mixture alone. In this work, for rapid visualization of the LAMP reaction, Pico Green (Sigma-Aldrich, USA) was added to the reaction mixture after the amplification and green fluorescence indicated the positive LAMP reaction (Carnevale et al., 2015). The LAMP amplification products were confirmed by electrophoresis using 1.5% agarose gel, the positive samples revealed a ladder-like pattern on the gel.

2.4 Specificity of the LAMP assay

To determine the specificity of LAMP assay, coliforms, non-coliforms and non-enterobacteriaceae bacteria were evaluated (Table 1). LAMP product was confirmed by PCR amplification using LAMP outer primers F3 and B3 (Table 2). The amplification products obtained were purified, and nucleotide sequence were analyzed (Macrogen, Korea).

2.5 Sensitivity of the LAMP assay

To evaluate the LAMP sensitivity, *E. coli* ATCC25922 was grown overnight at 35°C in Tryptic Soy Broth (TSB). Cells were harvested, washed and resuspended in normal saline. The cell suspension was adjusted to give a cell density of approximately 10^8 CFU/ml using 0.5 McFarland Standard. Then, 10-fold serially diluted bacteria ranging from 10^8 CFU/ml to extinction were prepared and subjected to DNA extraction by boiling method before performing LAMP assay.

2.6 Spiked water and vegetable samples

Drinking water samples were collected from a public water dispenser and lettuce vegetable was purchased from a local market. Any naturally contaminated bacteria in water samples were removed by filtered through a 0.45 µm membrane filter (Sartorius Stedim Biotech, Germany). For lettuce sample, 100 g of lettuce were decontaminated by 200 ppm of sodium hypochloride as previously described (Goularte et al., 2004). For the inoculation of samples, an overnight culture of *E. coli* ATCC25922 was diluted and adjusted to a 0.5 McFarland standard (10^8 CFU/ml) in normal saline. Ten-fold dilutions were performed to obtain a range of bacterial concentrations between 1-10^2 CFU/ml. One milliliter of the dilutions was added to 100 ml drinking water or was inoculated into 25 g of vegetable and homogenized for 2 min with 225 ml of phosphate buffered. Bacterial CFU were confirmed by plating the inoculating cultures on Tryptic Soy Agar supplemented with 1% NaCl and incubated overnight at 37^{o}C. All experiments were done in triplicate.

All spiked samples were subsequently evaluated by MPN technique and MPN-LAMP method as described in the schematic diagram shown in Fig. 1.

2.7 Evaluation of MPN-LAMP method for the detection of total coliforms and E. coli in drinking water and vegetable samples

A total of 33 drinking water samples were randomly collected from public water dispensers in various areas of Hat Yai, Songkhla. They were transported, and stored in strict accordance with the guidelines described by standard methods (APHA, 2012)

In this study, 46 vegetable samples were purchased from local market, and were analyzed immediately upon their arrival at the laboratory. The samples consisted of raw leafy salad vegetables, herbs and others (52%, 44% and 4%, respectively) (data not shown). A 25-g portion of the samples was mixed with 225 ml of phosphate buffered in sterile bag and was homogenized using a stomacher for 2 minute before assay (Fig 1).

2.8 Most Probable Number (MPN) technique and MPN-LAMP method

The enumeration of total coliforms and *E. coli* in drinking water, MPN technique was performed using a 10-tube MPN test as described by U.S. Environmental Protection Agency (EPA) standards (APHA, 2012). For vegetable samples, a 3-tube MPN test was performed as described in Bacteriological Analytical Manual (BAM) (FDA, 2002).

For MPN-LAMP evaluation, positive presumptive MPN tubes that exhibited gas formation were subjected to LAMP assay (Fig. 1). Briefly, 1 ml of culture taken from positive tube were boiled and 2 µl of DNA template supernatant was directly used for LAMP assay as described above.

Specificity and sensitivity of MPN and MPN-LAMP were compared. Specificity was defined as the (number of samples negative by both techniques)/(number of samples negative by both techniques + number of samples positive by MPN-LAMP but negative by MPN), and sensitivity was defined as the (number of samples positive by both techniques)/(number of samples positive by both techniques + number of samples positive by MPN but negative by MPN-LAMP) (Kongrueng et al., 2015).

3. Results

3.1 Specificity and sensitivity of the LAMP assay

For specificity of *lacZ*-LAMP assay, all *E. coli* strains, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, and *Shigella* spp. were positive. None of amplification product was observed from *Salmonella* and non-enteric bacteria (Table 1). In the *uidA*-LAMP, all 29 *E. coli* isolates and *Shigella* spp. were positive whereas other bacteria were negative. Confirmation of amplification products by sequencing revealed no false positive detected in both *lacZ*- and *uidA*-LAMP assay.

The sensitivity was evaluated with *E. coli* ATCC25922 strain. The *lacZ*- and *uidA*-LAMP amplifications could detect as low as 1 viable *E. coli* cell per reaction (as determined from the plate counts).

3.2 Evaluation of MPN-LAMP method in spiked water and vegetable samples

The sensitivity of MPN technique and MPN-LAMP method was compared in artificially inoculate samples. In spiked water, MPN-LAMP method were able to detect *E. coli* at the lowest inoculum level (1 CFU/100 ml), which correlated to the results of MPN technique. The detection limit of both methods was 5 CFU/g in spiked vegetables.

3.3 Evaluation of MPN-LAMP method for the detection of total coliforms and E. coli in drinking water and vegetable samples

The efficiency of MPN-LAMP method was performed in drinking water and vegetable samples to evaluate its application in water and food analysis. The sensitivity and specificity of the MPN-LAMP methods for the detection of total coliforms and *E. coli* were compared to MPN. A total of 79 samples were determined, and correlation between MPN and MPN-LAMP methods was demonstrated in total coliforms detection of all samples (Table 3). There were no differences in MPN

183 values of total coliforms obtained by both methods (Table 4). For *E. coli* detection, where 54 samples
184 were found to be positive by MPN-LAMP, only 43 samples were deemed positive by MPN (Table 3).
185

186 **4. Discussion**

187 Conventional culture-based methods for detection and enumeration of bacteria in water and
188 foods are laborious and time consuming. Recently, LAMP assay has been developed for detection
189 many food-borne pathogens, however, this technique cannot enumerated the number of cells in the
190 sample (Hill et al., 2008). For examination of microbiological quality of drinking water and foods,
191 the concentration of pathogens must be evaluated to be in the permission limit. Therefore, a
192 combined culture-based MPN method and LAMP assay (MPN-LAMP) was developed in this study.
193 In this study, all coliforms including *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Serratia* were
194 detected by *lacZ*-LAMP assay. Moreover, the *uidA*-LAMP assay did not generate a LAMP product
195 from all other bacteria, except *E. coli* and *Shigella* spp. These results are in agreement with those
196 from other studies which demonstrate that *E. coli* and *Shigella* share high level of DNA similarity,
197 and could not be differentiated by PCR-based methods (Bej, DiCesare et al., 1991). In MPN-LAMP
198 developed in this study, *Shigella* was successfully distinguished from *E. coli* on the basis of a
199 presumptive MPN reaction. Thus, our developed assay has good specificity.

200 The sensitivity of MPN-LAMP for bacterial detection in samples was higher than that of
201 reported by previous studies. In this study, LAMP assay was sufficient to detect a single *E. coli* cell
202 per reaction in pure culture. The MPN-LAMP method was able to detect *E. coli* at 1 CFU/100 ml in
203 water, and 5 CFU/g vegetables. Previous reports showed that the detection limit of LAMP assay to
204 detect Shiga toxin-producing *E. coli* using Shiga toxin genes, other virulence genes, and O-antigen
205 gene clusters is between 1 to 20 cells per reaction in pure culture, and 10^3 to 10^4 CFU/g in vegetables
206 (Wang, Yang, Qu, Meng, & Ge, 2014). A study used LAMP to detect enterotoxigenic *E. coli* from
207 raw milk could detect 547 CFU/ml of the pathogen (Yang et al., 2014).

Comparative testing between MPN technique and MPN-LAMP method were carry out in drinking water and vegetable samples collected from various sources. Of the 79 samples tested, there were 11 samples (14%) in which MPN technique and MPN-LAMP method tests differed for *E. coli* detection. False negative were detected by MPN technique since *E. coli* were recovered from positive presumptive tubes of false-negative samples, and confirmed by 16S rRNA sequencing. False-negative results of MPN observed in this study may be due to the reasons that some strains of *E. coli* are failed to grown in *E. coli* (EC) broth which were used in conventional MPN technique (Baylis, 2008). In previous study, the *uidA*-PCR has been demonstrated to be more sensitive for *E. coli* detection than culture-based detection method (Bej, McCarty et al., 1991). Failure to detect *E. coli* could lead to a significant error in examination of water and food quality. This result demonstrated that MPN-LAMP method was highly specific and more sensitive than the MPN technique. The reliable of MPN technique for *E. coli* detection can be enhanced when MPN technique is combined with LAMP assay. Moreover, MPN-LAMP method significantly reduced the total times for detection and enumeration of total coliforms and *E. coli* from 4-6 days for MPN to less than 2 days.

5. Conclusion

This study demonstrated that MPN-LAMP method provides rapid and reliable results for the detection and enumeration of total coliforms and *E. coli* in both drinking water and vegetables. This combined method may therefore be considered as a useful tool for application in food industry.

Acknowledgments

This work was supported by a research grant from the Thailand Research Fund under Contract No. TRG5680055. Partial supports from the Faculty of Science Research Fund, and Prince of Songkla University are gratefully acknowledged.

References

APHA, American Public Health Association. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (22nd ed.). Washington, D.C: American Public Health Association.

Baylis, C. (2008). Growth of pure cultures of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media. *Journal of Applied Microbiology, 105*(5), 1259-1265.

Bej, A. K., DiCesare, J. L., Haff, L., & Atlas, R. M. (1991). Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. *Applied and Environmental Microbiology, 57*(4), 1013-1017.

Bej, A. K., McCarty, S. C., & Atlas, R. (1991). Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Applied and Environmental Microbiology, 57*(8), 2429-2432.

Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L., & Atlas, R. M. (1990). Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(2), 307-314.

Carnevale, M. L., Roche, P. J., Najih, M., Paliouras, M., Beitel, L. K., & Trifiro, M. A. (2015). A rapid diagnostic method for *E. coli* serogroups responsible for gastro-intestinal diseases using loop-mediated isothermal amplification. *Analytical Methods, 7*(1), 287-295.

De Oliveira, M. A., De Souza, V. M., Bergamini, A. M. M., & De Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control, 22*(8), 1400-1403.

Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., & Sadowsky, M. J. (2000). Use of repetitive dna sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(6), 2572-2577.

257 Eckner, K. F. (1998). Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the
258 Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia*
259 *coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern
260 Sweden. *Applied and Environmental Microbiology, 64*(8), 3079-3083.
261 FDA. (2002). *Bacteriological analytical manual [online]* Available at
262 http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm.
263 Geldreich, E. E., Kenner, B., & Kabler, P. (1964). Occurrence of coliforms, fecal coliforms, and
264 streptococci on vegetation and insects. *Applied Microbiology, 12*(1), 63-69.
265 Goularte, L., Martins, C., Morales-Aizpurua, I., Destro, M., Franco, B., Vizeu, D., Hutzler, B., &
266 Landgraf, M. (2004). Combination of minimal processing and irradiation to improve the
267 microbiological safety of lettuce (*Lactuca sativa*, L.). *Radiation Physics and Chemistry*,
268 *71*(1), 157-161.
269 Hill, J., Beriwal, S., Chandra, I., Paul, V. K., Kapil, A., Singh, T., Wadowsky, R. M., Singh, V.,
270 Goyal, A., & Jahnukainen, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid
271 detection of common strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology, 46*(8),
272 2800-2804.
273 Kongrueng, J., Tansila, N., Mitraparp-arthorn, P., Nishibuchi, M., Vora, G. J., & Vuddhakul, V.
274 (2015). LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic
275 necrosis disease in shrimp. *Aquaculture International*, *23*(5), 1179-1188.
276 Maheux, A. F., Dion-Dupont, V., Bouchard, S., Bisson, M.-A., Bergeron, M. G., & Rodriguez, M. J.
277 (2015). Comparison of four β-glucuronidase and β-galactosidase-based commercial culture
278 methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms in water. *Journal of Water and*
279 *Health, 13*(2), 340-352.
280 Martins, M., Rivera, I., Clark, D., Stewart, M., Wolfe, R., & Olson, B. (1993). Distribution of *uidA*
281 gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the

expression of β-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide media. *Applied and Environmental Microbiology, 59*(7), 2271-2276.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 289*(1), 150-154.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research, 28*(12), e63-e63.

Ramteke, P., Bhattacharjee, J., Pathak, S., & Kalra, N. (1992). Evaluation of coliforms as indicators of water quality in India. *Journal of Applied Bacteriology, 72*(4), 352-356.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., & Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods, 49*(1), 31-54.

Tate, R. L. (1978). Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols. *Applied and Environmental Microbiology, 35*(5), 925-929.

Tsai, Y.-L., Palmer, C. J., & Sangermano, L. R. (1993). Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology, 59*(2), 353-357.

Wang, F., Yang, Q., Qu, Y., Meng, J., & Ge, B. (2014). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification suite for the rapid, reliable, and robust detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in produce. *Applied and Environmental Microbiology, 80*(8), 2516-2525.

Wei, Q.-K., Hwang, S.-L., & Chen, T.-R. (2006). Microbiological quality of ready-to-eat food products in Southern Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis, 14*(1), 68-73.

Yang, W., Song, X., Wang, J., Li, Z., Ji, M., & Li, Y. (2014). Detection methods for milk pathogenic bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *Bioscience Trends, 8*(6), 316-321.

Yano, A., Ishimaru, R., & Hujikata, R. (2007). Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Microbiological Methods, 68*(2), 414-420.

311 **Tables**

312 **Table 1**

313 Bacteria used in this study and specificity of LAMP primers.

Bacteria	No. of tested isolates	No. positive for	
		lacZ-LAMP	*uidA*-LAMP
Coliforms (*n*=34)			
Escherichia coli ATCC25923 (positive control)	1	+	+
E. coli	28	+	+
Citrobacter freundii	1	+	–
Enterobacter aerogenes	1	+	–
Enterobacter cloacae	1	+	–
Klebsiella pneumoniae	1	+	–
Serratia marcescens	1	+	–
Non-coliforms (*n*=8)			
Salmonella enterica	4	–	–
Shigella spp.	4	+	+
Non-Enterobacteriaceae (*n*=4)			
Aeromonas spp.	2	–	–
Plesiomonas shigelloides	1	–	–
Pseudomonas aeruginosa	1	–	–

314

315

316 **Table 2**

317 LAMP target genes and primers used in this study.

Target gene	Primer	Sequence (5’ to 3’)
lacZ	F3	ACCATCGTCTGCTCATCCA
	B3	TTAAACTGCACACCGCCG
	FIP	CAAGCCGTTGCTGATTCGCGTTTTTGACCTGACCATGCAGAGG
	BIP	CCGTTCAGCAGCAGCAGACCTTTTACGCTGATTGAAGCAGAAGC
uidA	F3	CCAGAGGTGCGGATTCAC
	B3	CGATATCACCGTGGTGACG
	FIP	ACTGCGTGATGCGGATCAACAGTTTTCACTTGCAAAGTCCCGCTAG
	BIP	CTGACATCACCATTGGCCACCATTTTGTCGCGCAAGACTGTAACC

318

Table 3

Specificity and sensitivity of MPN-LAMP compared to MPN for total coliforms and *E. coli* detection.

MPN-LAMP result	MPN result		Total	Specificity (%)	Sensitivity (%)
	Positive	Negative			
Total coliforms					
Positive	59	0	59	100	100
Negative	0	20	20		
Total	59	20	79		
Escherichia coli					
Positive	43	11*	54	69	100
Negative	0	25	25		
Total	43	36	79		

* *E. coli* was detected from presumptive tubes by cultivation on Eosin Methylene blue agar and was confirmed by 16S rRNA sequencing

Table 4

Discrepancies between MPN technique and MPN-LAMP method for total coliforms and *E. coli* detection.

Samples (*n*)	MPN value				MPN-LAMP value			
	<1.1	1.1-10^2	10^2-10^4	10^4-10^6	<1.1	1.1-10^2	10^2-10^4	10^4-10^6
Total coliforms								
Drinkingwater (33)	20	13	–	–	20	13	–	–
Vegetables (46)	–	8	28	10	–	8	28	10
E. coli								
Drinking water (33)	27	6	–	–	20	13	–	–
Vegetables (46)	–	31	13	2	–	29	14	3

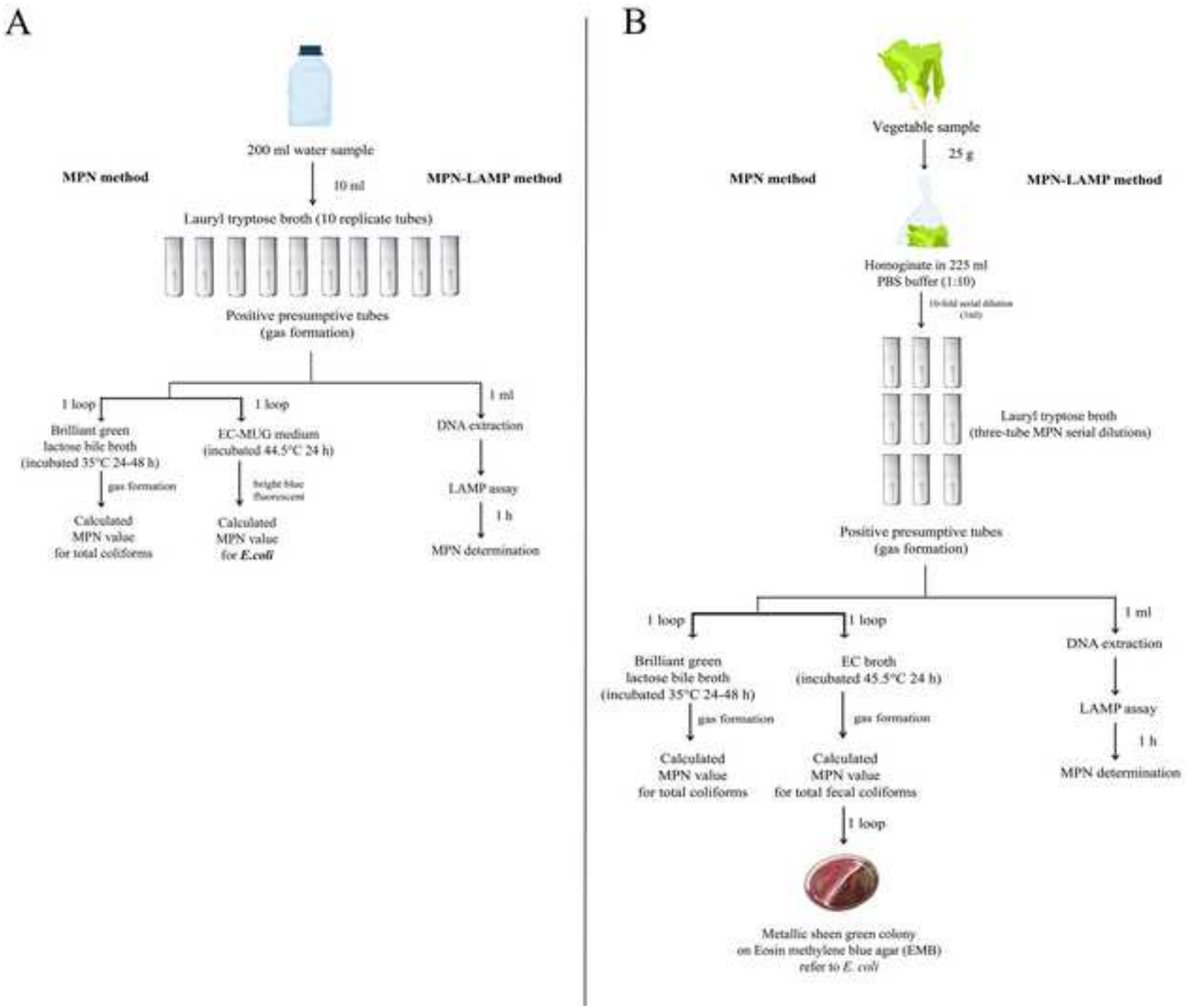
330 **Figure**
331

332 **Fig. 1.** Schematic representative of MPN technique and MPN-LAMP method for analyses of total
333 coliforms and *Escherichia coli* in drinking water (A) and vegetables (B).

334

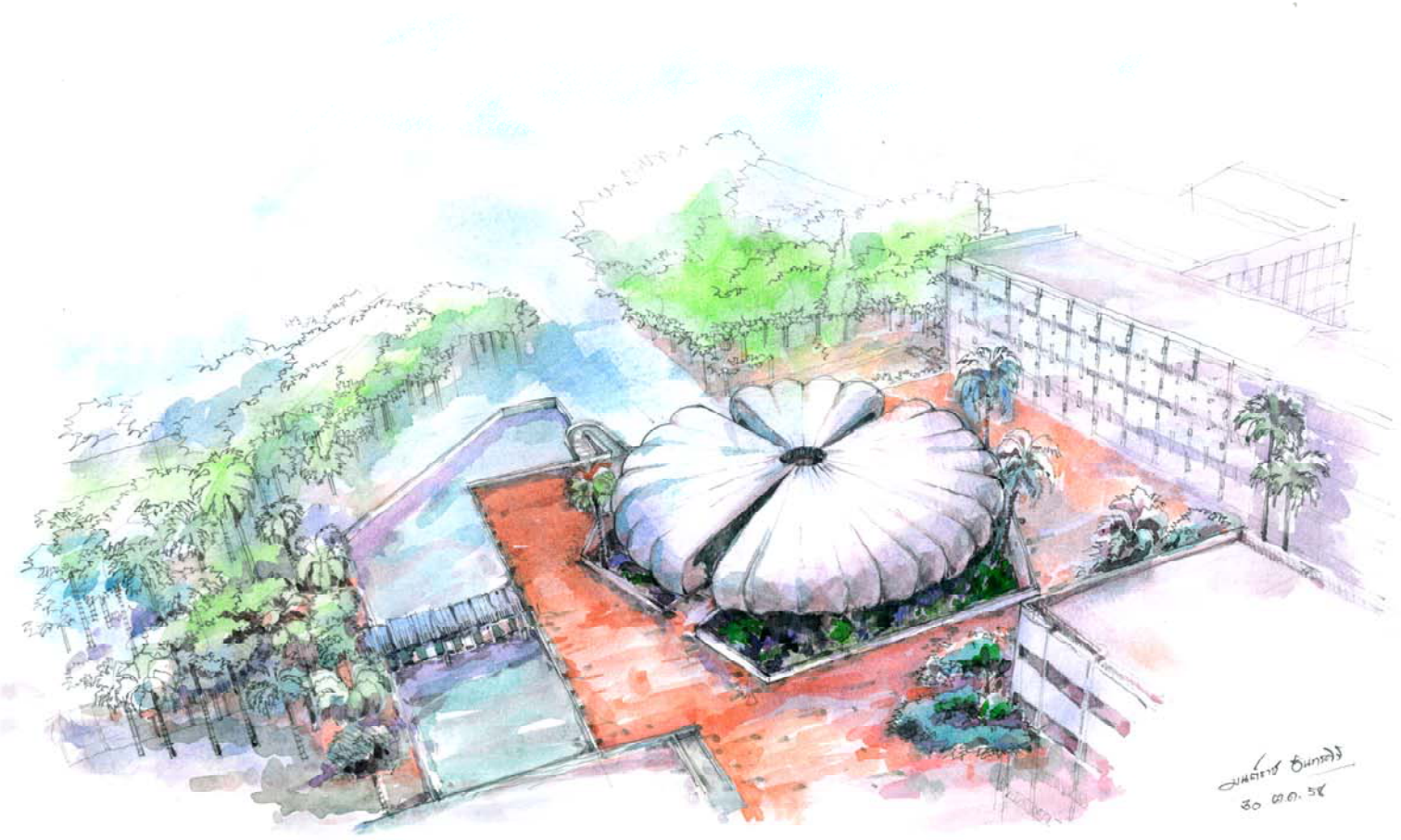
Figure

Click here to download high resolution image



1st Joint Seminar in Science and Technology for ASEAN Community (STAC) : BETTER TOGETHER

1-2 August 2016



FACULTY OF SCIENCE
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY, THAILAND
WWW.SC.PSU.AC.TH

T4-O4

Detection of total coliforms and *Escherichia coli* in raw leafy vegetables

Chonnikan Tongphrom[1,2], Pimonsri Mittraparp-arthorn[1,2]*, Wilawan Charernjiratrakul[1], Varaporn Vuddhakul[1,2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand*
[2]*Food Safety and Health Research Unit, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand*

*e-mail: pimonsri.m@psu.ac.th

Abstract:

Recently, people become more attentive to searching for healthier diets. Despite the health benefits from vegetables, the outbreaks caused by food-borne pathogens associated with the consumption of raw vegetables, particularly of leafy salad vegetables, have increased worldwide. In this study, 24 samples of lettuce, green oak and cabbage were purchased from local markets in Hat Yai, Songkhla, Thailand. Each sample was tested for the presence of total coliforms and *Escherichia coli* using the most probable number (MPN) method. Total coliforms were detected in all samples ranged from 3.6 to 4.6 x 10^4 MPN/g. *E. coli* was detected more than 50% of the samples, and was more frequently detected in lettuce samples. It was found that cabbage was the least contaminated by these organisms. In conclusion, this study indicated the risk related to consumption of contaminated vegetables by detecting bacterial indicators.

T4-O4P

Detection of total coliforms and *Escherichia coli* in raw leafy vegetables

Chonnikan Tongphrom[1,2], Pimonsri Mittraparp-arthorn[1,2]*, Wilawan Charernjiratrakul[1], Varaporn Vuddhakul[1,2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand*
[2]*Food Safety and Health Research Unit, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand*

*e-mail: pimonsri.m@psu.ac.th

Abstract:

Recently, people become more attentive to searching for healthier diets. Despite the health benefits from vegetables, the outbreaks caused by food-borne pathogens associated with the consumption of raw vegetables, particularly of leafy salad vegetables, have increased worldwide. In this study, 24 samples of lettuce, green oak and cabbage were purchased from local markets in Hat Yai, Songkhla, Thailand. Each sample was tested for the presence of total coliforms and *Escherichia coli* using the most probable number (MPN) method. Total coliforms were detected in all samples ranged from 3.6 to 4.6 x 10^4 MPN/g. *E. coli* was detected more than 50% of the samples, and was more frequently detected in lettuce samples. It was found that cabbage was the least contaminated by these organisms. In conclusion, this study indicated the risk related to consumption of contaminated vegetables by detecting bacterial indicators.

1. Introduction

Recently, the prevalence of food-borne pathogens has gained much attention worldwide. Consumption of raw leafy vegetables, especially ready-to-eat salads has grown rapidly, and has resulted in increased food-borne outbreaks [1, 2, 3]. Contamination of raw vegetables with pathogens normally occurs via human or animal feces, the environment or through processing, handling and storage [4, 5, 6, 7]. Therefore, microbiological examination is required for public health safety.

It is difficult, time-consuming, and expensive to detect for specific pathogens directly in food samples [8]. Therefore, coliform bacteria, particularly *Escherichia coli*, are used as indicator organisms for the determination of water and food hygiene [9, 10]. Coliform bacteria are members of the family *Enterobacteriaceae* [11]. These bacteria are defined as lactose fermenting, gram-negative, rod shaped, such as *Escherichia, Enterobacter, Klebsiella*, and *Citrobacter* [12]. They are usually not pathogenic to humans, and are naturally present in plants and soil [13, 14]. *E. coli*, one of the coliform bacteria, is considered to be more closely associated with fecal contamination from warm blood animals than other coliforms [15]. It is also known as a fecal coliform or thermotolerant coliform because of its ability to ferment lactose sugar in a special medium at an elevated incubation temperature [16]. The standard technique used in routine laboratory for detection and enumeration of total coliforms and *E. coli* is the Most Probable Number (MPN) technique [17, 18, 19]. This technique is based on the bacterial fermentation of lactose with gas formation in 24 to 48 h [20].

This study was aimed at evaluating the microbiological indicators, including total coliforms and *E. coli*, in raw vegetables sold in local markets in Hai Yai, Songkhla, Thailand, using MPN technique. The results obtained from this study should be used for a public health warning.

2. Experimental Section

2.1 Media

Lauryl tryptose broth, EC broth, Eosin methylene blue agar (EMB) (Difco™, Detroit, Mich., USA), Brilliant green lactose broth (BGLB) (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the enumeration of total coliform bacteria and *E. coli* by Most Probable Number technique.

2.2 Sample collection

Twenty-four raw vegetable samples including lettuces, green oak and cabbages were collected during the period from March to May 2016 from local markets in Hat Yai, Songkhla, Thailand. These samples were analyzed in the laboratory immediately after collection.

2.3 Sample preparation

A 25-g sample of each vegetable was mixed with 225 ml of phosphate buffer in a sterile plastic bag, homogenized in a stomacher for 2 minutes, and diluted in 10-fold serial dilutions.

2.4 Enumeration of *E. coli* and total coliform bacteria by MPN technique

The three-tube MPN method was conducted according to the method described in the Bacteriological Analytical Manual (BAM) [21].

Presumptive phase: one ml of each dilution was inoculated into lauryl sulfate tryptose broth and incubated at 35ºC± 0.5ºC for 24-48 h. After incubation, 1 ml samples from the positive tubes which showed growth and gas formation were selected for the confirmed phase.

Confirmed phase: A loopful of suspension from all positive tubes from the presumptive phase were transferred to brilliant green lactose broth (BGLB) and EC broth. Tubes were incubated at 35ºC for 24-48 h, and 45.5ºC for 24 h, for BGLB broth and EC broth, respectively. All positive tubes from BGLB broth and EC broth that showed growth and gas formation indicated the presence of total coliforms and fecal coliforms, respectively. MPN values were calculated using the MPN index table.

Completed phase: A loopful of tubes from EC broth were streaked on EMB agar and incubated at 35ºC for 24 h. Colonies that showed metallic sheen green were identified as *E. coli*.

3. Results & Discussion

3.1 Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* on vegetable samples

In this study, we evaluated 24 leafy salad vegetables for the presence of total coliforms and *E. coli*. Total coliforms were detected in all samples in the range of 3.6 to 4.6 x 10^4 MPN/g (Table 1). High amounts of total coliform contamination indicate a risk for human consumption [7]. The detection of total coliforms was correlated with the previous report which demonstrated that total coliforms were detected in 96.4% of lettuces [22]. EU commission regulation (No. 2073/2005) reported that ready-to-eat vegetables are defined as normal habitats for all coliforms [23]. Microbial contamination of these vegetables may be due to contaminated water used for irrigation, fertilizer from animal wastes, contaminated transport containers, storage conditions, and inappropriate product handling [24, 25, 7, 26]. *E. coli* was detected in all vegetables samples in the range of <3.0 to 4.6 x 10^4 MPN/g (Table 2). Most of MPN *E. coli* obtained in this study was lower than the finding of Dhiraputra et al. (2005) which demonstrated that 59.6% of fresh vegetables including romaine lettuce, onion, parsley, celery and tomato were contaminated with *E. coli* >1.1x10^3 MPN/g [27]. In Brazil, leafy vegetables contained *E. coli* contamination ranging from 10 to 10^6 MPN/g [26].

Table 1. The detection of total coliforms in raw leafy vegetables by Most Probable Number technique

Vegetable (*n*)	MPN value of total coliforms (minimum-maximum : MPN/g)				
	0-10	**10-10^2**	**10^2-10^3**	**10^3-10^4**	**10^4-10^5**
Lettuce (8)	-	-	1 ($4.2x10^2$)	5 ($1.1 - 4.6x10^3$)	2 ($1.1 - 4.6x10^4$)
Green oak (8)	-	3 (15 - 23)	2 ($1.5 - 7.5x10^2$)	1 ($2.0x10^3$)	2 ($1.1 - 1.5x10^4$)
Cabbages (8)	2 (3.6 - 9.2)	2 (23 - 43)	2 ($4.2 – 4.6x10^2$)	1 ($1.1x10^3$)	1 ($1.1x10^4$)

n: number of sample

We demonstrated that a total of 5 lettuce and 3 green oak samples contained *E. coli* exceeding the permissible limits (10^2 MPN/g) as regulated by the Ministry of Public Health, Thailand [28]. In cabbages, the highest MPN value of *E. coli* was 23 MPN/g, and most of the cabbage samples contained *E. coli* <3.0 MPN/g (Table 2). Lettuces were found to be contaminated with higher numbers of total coliforms and *E. coli* than green oak and cabbages. Cabbages were the least contaminated by total coliforms and *E. coli* (Table 1, 2).

The variation in bacterial counts in each type of vegetable may be due to several reasons. For example, insecticides were heavily used on cabbages to control vegetable pests [29]. In addition, the result may be due to the removal of external parts of the cabbage before preparation of the samples. Xu and Warriner (2005) described that the leafy nature of lettuces provides more surface area for microbial contamination [29]. Leifert et al. (2008) suggested that the different bacterial concentrations on each type of ready-to-eat vegetable may be due to the specific use of animal manure-based fertilizer [30].

Table 2. The detection of *Escherichia coli* in raw leafy vegetables by Most Probable Number technique

Vegetable (*n*)	MPN value of *Escherichia coli* (minimum-maximum : MPN/g)				
	0-10	**10-10^2**	**10^2-10^3**	**10^3-10^4**	**10^4-10^5**
Lettuce (8)	2 (3.6 – 9.2)	1 (27)	2 ($2.4 – 6.4x10^2$)	2 ($1.1 – 1.5x10^3$)	1 ($4.6x10^4$)
Green oak (8)	4 (<3.0 – 9.2)	1 (23)	1 ($2.4x10^2$)	2 ($1.1 – 2.9x10^3$)	-
Cabbages (8)	7 (<3.0 – 3.6)	1 (23)	-	-	-

n : number of sample

Moreover, cutting or trimming vegetables at the harvest step can affect bacterial growth due to the release of the essential substrate from plants [31]. Despite the fact that vegetables cultivated in soil can easily be contaminated with food-borne pathogens, animals such as birds and insects have reportedly transferred the pathogen during the harvest [32].

4. Conclusion

We conclude that total coliforms and *E. coli* are highly prevalent in local vegetable markets from Hat Yai, Songkhla. A better handling process of the vegetables,, especially the raw plants, is needed. To improve the quality of ready-to-eat vegetable products,more information must be given to field workers, distributors, and people who handle vegetables. For consumers, washing vegetables with water might help to reduce the number of harmful bacteria, and the risk of food-borne illness.

Acknowledgments

This study was financially supported by a research grant from the Graduate School, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand.

References

1. Heaton, J.; Jones, K., *Journal of applied microbiology* **2008,** *104* (3), 613-626.
2. Kozak, G.; MacDonald, D.; Landry, L.; Farber, J., *Journal of Food Protection*® **2013,** *76* (1), 173-183.
3. Herman, K.; Hall, A.; Gould, L. *Epidemiology and Infection* **2015,** *143* (14),3011-3021.
4. European Commission. "Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw." **2002**.
5. Beuchat, L. R. *Microbes and Infection* **2002,** *4* (4), 413-423.
6. Aycicek, H.; Oguz, U.; Karci, K. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **2006,** *209* (2), 197-201.
7. Rapanello, E.; Fuzihara, T. O.; Nunes, S. M.; Daros, V. d. S. M. G.; Savignano, L. V. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)* **2009,** *68* (1), 83-90.
8. Stevens, M.; Ashbolt, N.; Cunliffe, D., *NHMRC, Biotext Pty Ltd, Canberra* **2003**.
9. Barbosa, L.; Ribeiro, L.; Lavezzo, L.; Barbosa, M.; Rossi, G.; Amaral, L., *Letters in applied microbiology* **2016,** *62* (5), 372-378.
10. Castro-Ibáñez, I.; López-Gálvez, F.; Gil, M. I.; Allende, A., *Food Control* **2016,** *59*, 841-848.
11. Buckley, R.; Clough, E.; Warnken, W.; Wild, C. *Water Research* **1998,** *32* (6), 1852-1856.
12. Ishii, S.; Sadowsky, M. J. *Microbes and Environments* **2008,** *23* (2), 101-108.
13. Von Sperling, M., *Water Intelligence Online* **2007,** *6*, 9781780402086.
14. Paruch, A. M.; Mæhlum, T., *Ecological Indicators* **2012,** *23*, 140-142.
15. Gruber, J. S.; Ercumen, A.; Colford Jr, J. M., *PloS one* **2014,** *9* (9), e107429.
16. Hamilton, W. P.; Kim, M.; Thackston, E. L. *Water Research* **2005,** *39* (20), 4869-4878.
17. Oblinger, J.; Koburger, J. *Journal of Milk and Food Technology (JMFT)* **1975,** *38* (9), 540-545.
18. Peeler, J.; Houghtby, G.; Rainosek, A. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, DC* **1992**, 105-120.
19. Suwansonthichai, S.; Rengpipat, S. *International Journal of Food Microbiology* **2003,** *81* (2), 113-121.
20. Eckner, K. F., *Applied and Environmental Microbiology* **1998,** *64* (8), 3079-3083.
21. Feng, P.; Weagant, S. D.; Grant, M. A.; Burkhardt, W., *Bacteriological Analytical Manual (BAM), Chapter4,* **2002,** Available from: URL: http:// www.fda.gov/Food/FoodScience Research/LaboratoryMethods/ ucm064948.htm.
22. Greve, J. D.; Zietlow, M. S.; Miller, K. M.; Ellingson, J. L., *Journal of Food Protection*® **2015,** *78* (9), 1729-1732.
23. European Commission Regulation (EC) No. 2073/2005, *Official Journal of the European Union* **2005**.
24. Landgraf, M., *São Paulo: Atheneu*

1996, 27-31.
25. Brackett, R., *Postharvest Biology and Technology* **1999,** *15* (3), 305-311.
26. De Oliveira, M. A.; De Souza, V. M.; Bergamini, A. M. M.; De Martinis, E. C. P., *Food Control* **2011,** *22* (8), 1400-1403.
27. Dhiraputra, C.; Tiensasitorn, C.; Techachaiwiwat, W.; Jirapanakorn, N.; Kachintorn, K.; Danchaivijitr, S., *J Med Assoc Thai* **2005,** *88* (10), S42-8.
28. Standards for Food Microbiology for Foods, *Department of Medical Science, Ministry of Public Health of Thailand*, **2010**, Available from: http:// dmsc2.dmsc.moph. go.th/webroot/BQSF/ File/VARITY/dmscguideline.pdf
29. Xu, J.; Warriner, K., *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005,** *85* (14), 2397-2400.
30. Leifert, C.; Ball, K.; Volakakis, N.; Cooper, J., *Journal of applied microbiology* **2008,** *105* (4), 931-950.
31. Suthiluk, P.; Saranwong, S.; Kawano, S.; Numthuam, S.; Satake, T., *International journal of food science & technology* **2008,** *43* (1), 160-165.
32. Selma, M. V.; Luna, M. C.; Martínez-Sánchez, A.; Tudela, J. A.; Beltrán, D.; Baixauli, C.; Gil, M. I., *Postharvest Biology and Technology* **2012,** *63*(1), 16-24.