บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

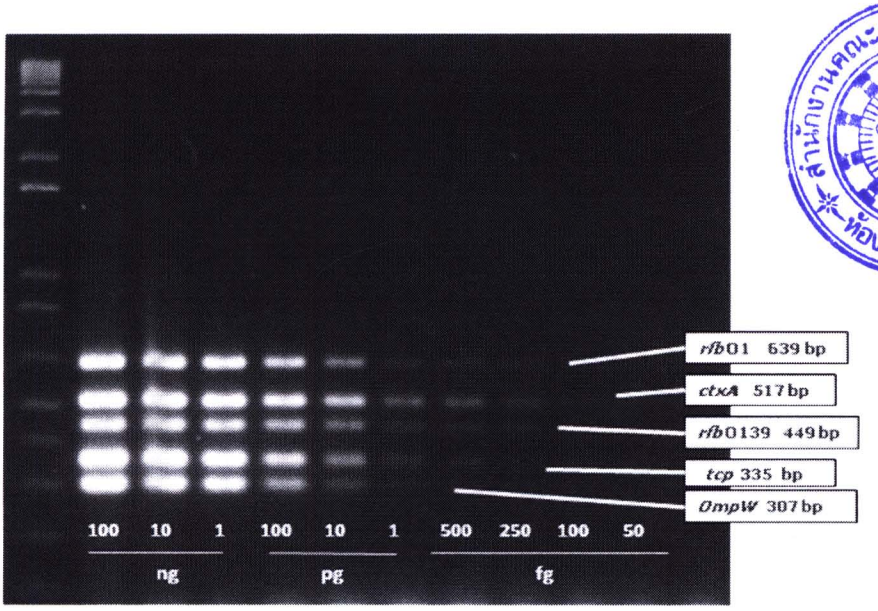
4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensivity) และความรวดเร็ว ในการตรวจหาเชื้อ *V.cholerae* โดยวิธี multiplex PCR และ multiplex RT-PCR

4.1.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity

ในการทดสอบความจำเพาะ (specificity) พบว่า primer ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะกับเชื้อ *V. cholerae*

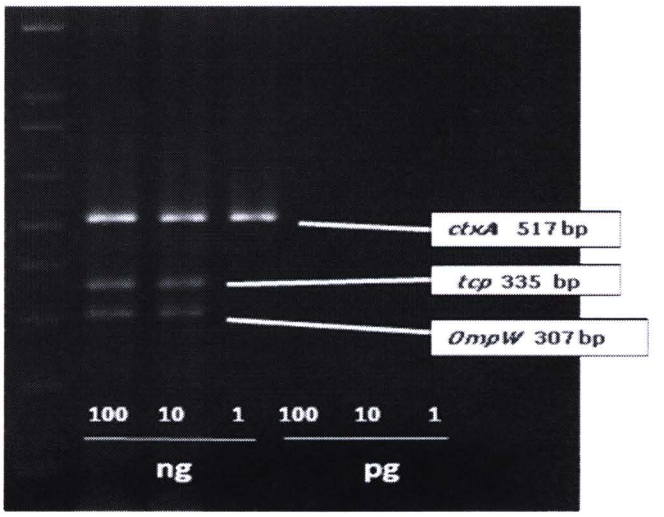
4.1.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

ส่วนการทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อโดยวิธีเจือจาง template DNA พบว่า ความไวของ multiplex PCR เท่ากับ 15.7 cfu /PCR ในขณะที่ความไวของ uniplex PCR พบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 1-8 cfu/PCR โดยยีนที่มีความไวที่สุดคือ *ctxA* การทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจหายีน *ompW*, *ctxA* และ *tcp* โดยวิธี RT- PCR ในการตรวจหาเชื้อ พบว่า ความไวของ multiplex RT- PCR เท่ากับ 1.13×10^5 cfu /PCR ในขณะที่ความไวของ uniplex PCR พบว่า อยู่ในช่วงระหว่าง 10^3-10^4 cfu/PCR โดยยีนที่มีความไวที่สุดคือ *ctxA*



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

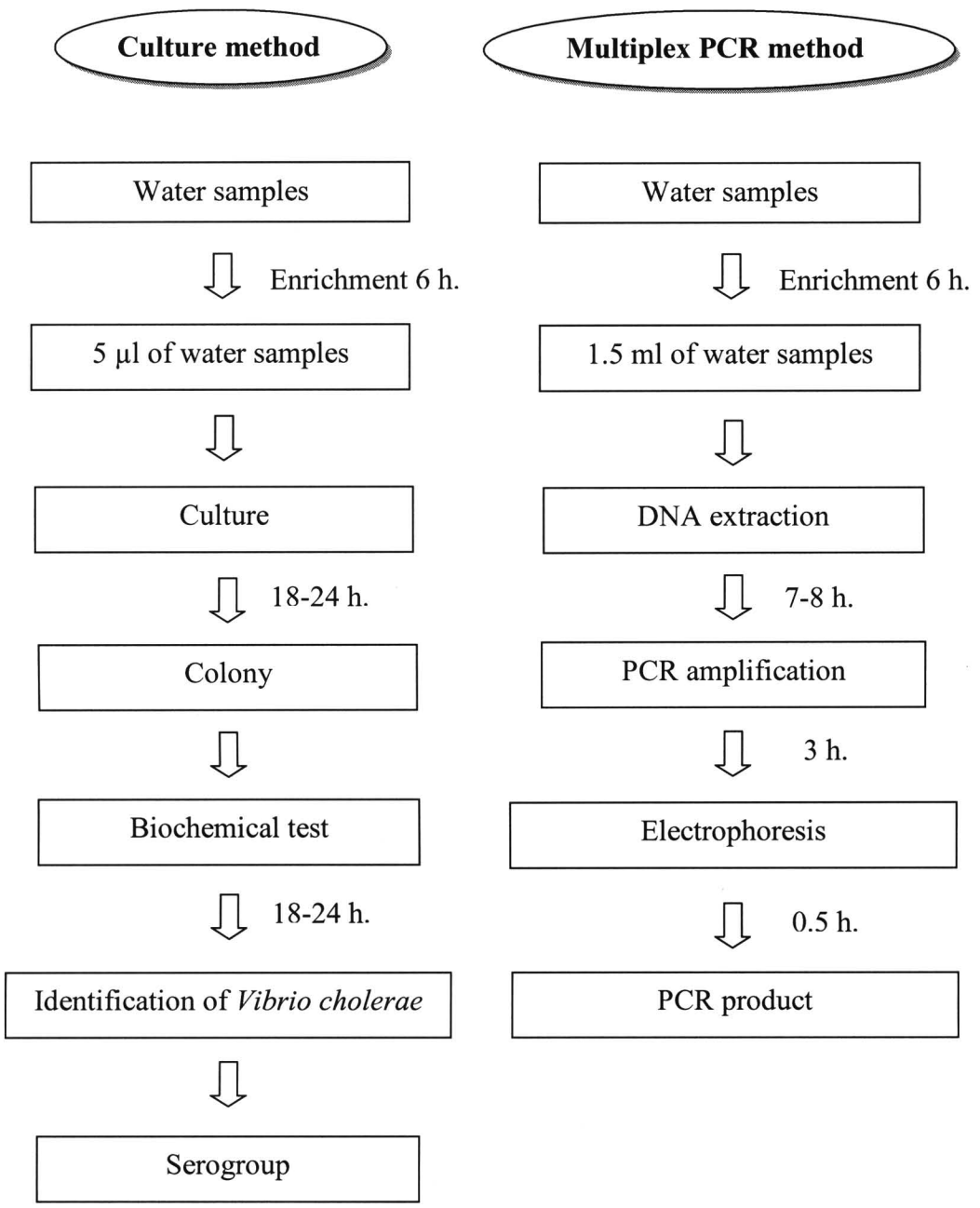
รูปที่ 4.1 ความไวในการตรวจหาเชื้อโดย M-PCR. Lanes 1-10 ;DNA template 100 ng - 50 fg, ตามลำดับ, Lane 11; negative control.



รูปที่ 4.2 ความไวในการตรวจหาเชื้อโดย MRT-PCR. Lanes 1-6 ;cDNA template 100 ng -1pg, ตามลำดับ. Lane 7; negative control of RT และ lane 8; negative control of RT-PCR.

4.1.3 ความรวดเร็วในการตรวจเชื้อเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเชื้อและการตรวจโดยวิธี PCR

การเปรียบเทียบเป็นไปดังแผนผังในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี multiplex PCR

4.2 ผลของ Pre-PCR processing ที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae*

ตารางที่ 4.1: ผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* ในสภาวะ Pre- PCR processing ที่แตกต่างกัน

Condition	No. of samples (%)		
	Positive		Negative
	0 h	6 h	
Filtrates in APW before PCR (n = 55)	0 (0)	34 (61.8)	21 (38.2)
Non- filtrates in APW before PCR (n = 55)	0 (0)	11 (20)	44 (80)

เนื่องจาก Pre-PCR processing เป็นขั้นตอนที่มีผลต่อการตรวจหาเชื้ออีกทั้งยังช่วยลดจำนวนสารบางชนิดในตัวอย่างที่อาจมีผลยับยั้งหรือรบกวนขั้นตอนการทำ PCR (42) ในการศึกษานี้จึงมีการเปรียบเทียบสภาวะ Pre PCR processing ที่แตกต่างกันระหว่าง filtrates และ non-filtrates ที่ 0 และ 6 ชม. โดยการทำ MPCR พบว่า จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่มีการ filtrate สามารถตรวจพบเชื้อได้ 34 ตัวอย่าง (61.8%) ในขณะที่ตัวอย่าง non-filtrate สามารถตรวจพบได้เพียง 11 ตัวอย่าง (20%) เท่านั้น (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้ตัวอย่างเกือบทั้งหมดสามารถตรวจพบเชื้อได้เมื่อมีการ enrichment เนื่องจากการกรองตัวอย่างน้ำเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อจำนวนน้อยที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมและการ enrichment เป็นการสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยเฉพาะเมื่อมีปริมาณเชื้อจำนวนน้อยในสิ่งแวดล้อมรวมถึงยังลดปริมาณสารบางชนิดที่อาจมีผลยับยั้งหรือรบกวนขั้นตอนการทำ PCR (42) สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า ประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR จะเท่ากับ 22% เมื่อตัวอย่างไม่ผ่านขั้นตอนการ enrichment ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านทั้งการกรองและการ enrichment พบตัวอย่างที่มีเชื้อเท่ากับ 37% (11) นอกจากนี้พบว่าการ enrichment 6 ชม.มีประสิทธิภาพเพียงพอสามารถตรวจพบเชื้อได้ส่งผลให้เกิดความรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อมากยิ่งขึ้น เมื่อเทียบกับบางการศึกษาที่มีการ enrichment 12 ชม. (62) อีกทั้งวิธีการดังกล่าวยังเป็นวิธีที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหาเชื้อ (23, 40, 49, 62) ดังนั้นวิธีการกรองตัวอย่างและการ enrichment เป็นขั้นตอน Pre-PCR processing ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อโดยวิธี multiplex PCR ได้

4.3 การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากแหล่งน้ำโดยวิธี multiplex PCR, multiplex RT-PCR, culture และ DFA

ตารางที่ 4.2: สรุปผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae*ในตัวอย่างน้ำ 55 ตัวอย่าง

Strains	No. of *V. cholerae* positive sample (%)							
	Culture	PCR		Total PCR	RT-PCR		Total RT-PCR	DFA O1
		Multiplex	Uniplex		Multiplex	Uniplex		
V. cholerae O1	3 (5.45)	18 (32.73)	3 (5.45)	21 (38.18)	6 (10.91)	4 (7.27)	10 (18.18)	13 (23.63)
V. cholerae O139	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-	-
V. cholerae non-O1	15 (27.27)	19 (34.54)	-	19 (34.54)	5 (9.09)	5 (9.09)	10 (18.18)	-

จากข้อมูลตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาพบว่า ในการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* จากตัวอย่างน้ำทั้งหมด 55 ตัวอย่างในจังหวัดขอนแก่น สามารถตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง (72.73%) กลุ่มที่เป็น O1 และกลุ่ม non-O1 จำนวน 21 ตัวอย่าง (38.18%) และ 19 ตัวอย่าง (34.54%) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการตรวจเชื้อโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture), multiplex PCR, multiplex RT-PCR และ DFA พบว่า multiplex PCR เป็นวิธีที่สามารถตรวจพบเชื้อทั้งกลุ่มที่เป็น O1 และกลุ่ม non-O1 ได้มากที่สุด รองลงมาคือ วิธี DFA และ multiplex RT-PCR ในขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) ประมาณ 27.27% สามารถตรวจพบกลุ่ม non-O1 ในขณะที่กลุ่ม O1 สามารถตรวจพบได้เพียง 3 ตัวอย่าง (5.45%) เท่านั้น

วิธี multiplex PCR มีการตรวจหายีนทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ ยีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio cholerae* คือ *ompW* (307 bp) ยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ (virulence gene) คือ *ctxA* (517 bp) และ *tcpA* (335 bp) และยีนที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ O1 และ O139 คือ *rfb*O1 (639 bp) และ *rfb*O139 (449 bp) ผลการตรวจหายีนพบว่า 100% เป็นเชื้อ *V. cholerae* O1ไม่พบ *V. cholerae* O139 เลย เชื้อ *V. cholerae* O1 มียีน *ctxA*, *tcpA* และ *rfb*O1 แสดงถึงการปนเปื้อนของเชื้อ toxigenic *Vibrio cholerae* ในแหล่งน้ำ ขณะที่เชื้อกลุ่ม non-O1 ไม่พบยีนดังกล่าวจึงเป็นเชื้อ non-toxigenic *Vibrio cholerae* สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า *Vibrio cholerae* O1 และ O139 ส่วนใหญ่มียีน *ctxA* และ *tcp* แต่เชื้อกลุ่ม non-O1/non-O139 ไม่พบ virulence gene ดังกล่าว (11, 62) พบแต่เพียง *toxR* และ *hlyA* เท่านั้น (62) อย่างไรก็ตามกลุ่มเชื้อ non-O1/non-O139 มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด sporadic

gastroenteritis (47, 54, 58) ดังนั้นกลุ่มเชื้อเหล่านี้จึงควรให้ความสำคัญในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคด้วย

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อโดยวิธี multiplex PCR เทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) พบว่า วิธีการเพาะเลี้ยงสามารถตรวจพบเชื้อกลุ่ม O1 จากตัวอย่างได้เพียง 3 ตัวอย่าง (5.45%) เท่านั้น ในขณะที่วิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้ถึง 32.73% ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อในกลุ่มดังกล่าวเมื่อเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะไม่เหมาะสม เช่น มีสารอาหารขาดแคลน (17) หรืออุณหภูมิลดลงจากภาวะปกติ (71) เชื้อสามารถเข้าสู่สภาวะ viable but non-culturable (VBNC) ได้ ในสภาวะนี้เชื้อยังคงมีชีวิตแต่จะไม่สามารถเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (51, 52, 74) มีการศึกษาพบว่า ภาวะ VBNC เป็นภาวะที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อในสิ่งแวดล้อม (37) ภาวะดังกล่าวเมื่อใช้วิธีการตรวจหาเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงจะสามารถตรวจพบเชื้อ O1ในสิ่งแวดล้อมได้เท่ากับ 0.34 - 7% (29) (11) ทำให้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นข้อจำกัดของการตรวจหาเชื้อกลุ่ม O1 ในสิ่งแวดล้อม (1) ดังนั้น multiplex PCR จึงเป็นวิธีที่เหมาะสม ถูกต้อง รวดเร็วและเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

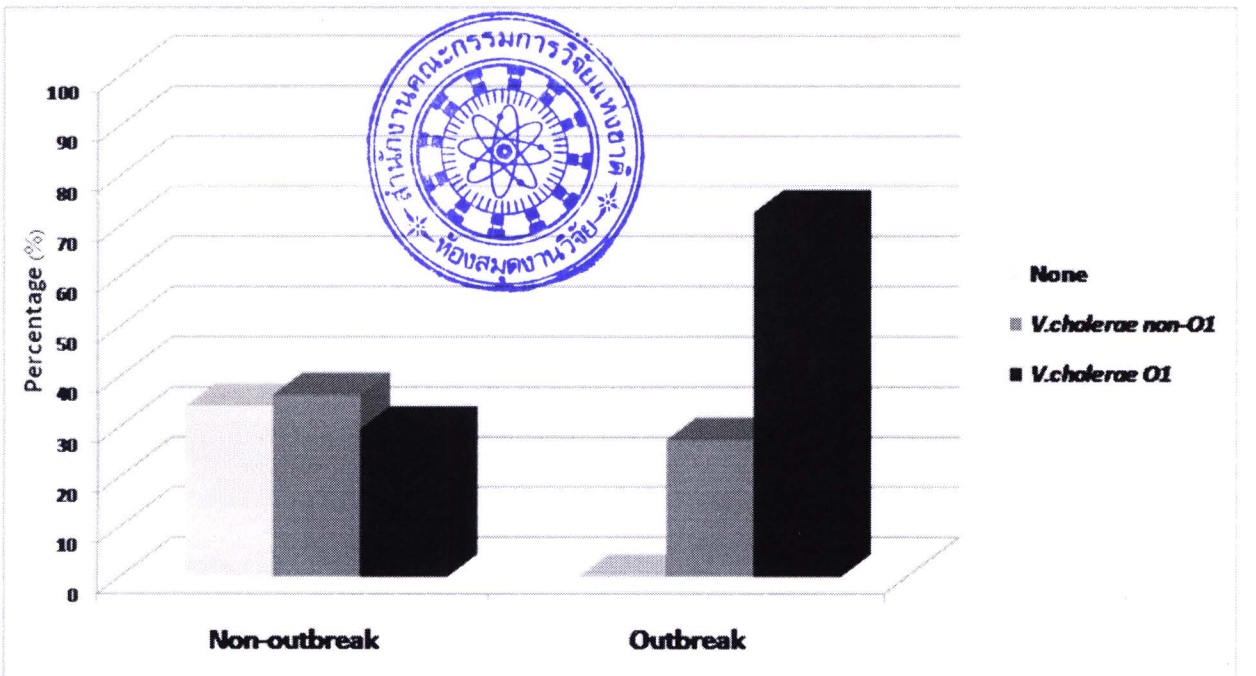
ในขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเทียบกับวิธี DFA พบว่าวิธี DFA สามารถตรวจพบเชื้อได้ถึง 23.63% ซึ่งสูงกว่าการตรวจด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจด้วย DFA เป็นวิธีที่สามารถตรวจเชื้อที่มีชีวิตในสิ่งแวดล้อมทั้งที่เพาะเลี้ยงได้ (culturable cells) และเพาะเลี้ยงไม่ได้หรือ VBNC cells (4, 7, 9, 25, 26, 69) สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า วิธี DFA สามารถตรวจเชื้อได้ถึง 64.27 % (29) และ 70.37% (4) เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยง อีกทั้งวิธีตรวจดังกล่าวยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อกับแพลงตอนหรือสัตว์น้ำขนาดเล็ก (7) (31) และการสร้าง biofilm ของเชื้อในสิ่งแวดล้อมด้วย (1)

ตารางที่ 4.3: เปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* โดยวิธีต่างๆในตัวอย่างน้ำ 55 ตัวอย่าง

Strains	Method for detection										Positive sample (%)
	Culture	Multiplex PCR					DFA	RT-PCR			
		ompW	*ctxA*	*tcpA*	*rfb*O1	*rfb*O139		*ompW*	*ctxA*	*tcpA*	
V. cholerae O1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	3 (5.45)
	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7 (12.73)
	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	3 (5.45)
	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	8 (14.54)
V. cholerae non-O1	+	+	-	-	-	-	ND	+	-	-	10 (18.18)
	+	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	9 (16.36)

นอกจากนี้ในการตรวจหาความมีชีวิตของเชื้อโดยวิธี DFA และ multiplex RT-PCR จากข้อมูลตารางที่ 4.3 พบว่า วิธี DFA สามารถตรวจพบเชื้อที่มีชีวิตได้ 13 ตัวอย่าง (23.63%) ซึ่งมากกว่าการตรวจด้วยวิธี multiplex RT-PCR อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจเชื้อที่มีชีวิตด้วย multiplex RT-PCR สามารถตรวจพบยีนที่ใช้ในการก่อโรคได้ในคราวเดียวกันด้วยซึ่งเป็นข้อจำกัดของวิธี DFA เมื่อพิจารณาข้อมูลในตารางที่ 4.3 พบว่า ประมาณ 18.2% ของเชื้อ *V.cholerae* O1ที่ตรวจพบในแหล่งน้ำโดยเป็นเชื้อที่ยังมีชีวิตและมียีนที่จำเป็นต่อการก่อโรคอยู่ ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของเชื้อในแหล่งน้ำต่างๆ ซึ่งจะเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ ดังนั้น การตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* จากแหล่งน้ำโดยวิธี DFA และmultiplex RT-PCR อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

4.4 เปรียบเทียบการพบ เชื้อ *Vibrio cholerae* ในแหล่งน้ำจังหวัดขอนแก่นในช่วงที่มีการระบาดและไม่มีการระบาด



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 4.4: กราฟผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* ในแหล่งน้ำจังหวัดขอนแก่น

จากการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ช่วงเดือน เม.ย. 2553 - ม.ค. 2554 ทั้งหมดจำนวนทั้งสิ้น 55 ตัวอย่าง ครอบคลุมทั้งช่วงที่โรคอหิวาตกโรคมีการระบาด (oubreak) และช่วงที่ไม่มีการระบาด (non-oubreak) ผลการศึกษาพบว่า ช่วงที่ไม่มีการระบาดของโรคมีตัวอย่างทั้งสิ้น 44 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *V .cholerae* กลุ่ม O1 และ non-O1 จำนวน 13 ตัวอย่าง (29.5%) และ 16 ตัวอย่าง (36.4%) ตามลำดับ ตรวจไม่พบเชื้อ 15 ตัวอย่าง (34.1%) ในขณะที่ช่วงที่มีการระบาดของโรคคือช่วงเดือนตุลาคมมีตัวอย่างทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อกลุ่ม O1 จำนวน 8 ตัวอย่างหรือ 72.7% และกลุ่ม non-O1 จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือ 27.3% ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม O1 และ non-O1ในแหล่งน้ำตั้งแต่เดือนเมษายนเป็นต้นมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีการระบาดคือเดือนตุลาคม สามารถตรวจพบเชื้อกลุ่ม O1 สูงถึง 72.7% สอดคล้องกับข้อมูลระบาดวิทยาของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่นที่มีการรายงานถึงสถานการณ์อหิวาตกโรคตั้งแต่ 1 พ.ค.- 15 ต.ค. ว่ามีผู้ป่วย 153 ราย (34) เมื่อมีการสอบสวนโรคพบว่า สาเหตุการระบาดของโรคส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานก้อยกุ้งซึ่งเป็นอาหารที่ทำจากกุ้งฝอยดิบ ที่มาของแหล่งกุ้งฝอยบางส่วนคือแหล่งน้ำสาธารณะที่มีประชาชนทำการประมงในบริเวณนั้นและเมื่อนำมาตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ

โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม O1 ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อซึ่งมีความสัมพันธ์กับช่วงการแพร่ระบาดของโรค

4.5 สรุปผลการวิจัย

จากการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* ในแหล่งน้ำด้วยวิธี multiplex PCR และ multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) และวิธีทางอิมมูโนวิทยารวมถึงการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะ Pre-PCR condition ที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาพบว่า multiplex PCR เป็นวิธีที่สามารถตรวจพบเชื้อกลุ่ม O1ได้มากที่สุดสามารถตรวจพบเชื้อได้ 21 ตัวอย่าง (38.18%) ในขณะที่ multiplex RT-PCR สามารถตรวจเชื้อที่มีชีวิตในแหล่งน้ำได้ 10 ตัวอย่าง (18.27%) ส่วนวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) และ DFA สามารถตรวจพบเชื้อกลุ่ม O1 ได้ 3 ตัวอย่าง (5.45%) และ 13 ตัวอย่าง (23.63%) เท่านั้น นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบสภาวะ Pre-PCR condition พบว่า 34 ตัวอย่าง (61.8%) ที่ผ่านการกรองและ enrichment เป็นเวลา 6 ชม.ก่อนทำ PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* ในขณะที่ 11 ตัวอย่าง (20 %) สามารถตรวจพบเชื้อได้โดยไม่ผ่านการกรอง ดังนั้นในการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* จากแหล่งน้ำโดยวิธี multiplex PCR และ multiplex RT-PCR จึงเป็นวิธีที่มีความไว ถูกต้อง และรวดเร็ว เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคอหิวาต์อย่างมีประสิทธิภาพ