ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246172

รายงานวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อวิบริโอ คลอลีรีในแหล่งน้ำโดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีอิมมูโนวิทยา

Development of *V. cholerae* detection in aquatic environment by multiplex PCR compared with culture method and immunology

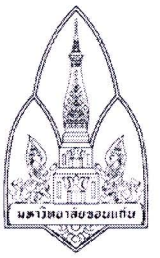
โดย

คณะผู้วิจัย จุฬาพรรณ อิ้งจะนิล
จริยา ชมวารินทร์
วิเศษ นามวาท
อรวรรณ แจ่มจันทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2553
ชุดโครงการการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วง
โดยเทคนิค multiplex PCR และการศึกษาคุณสมบัติสารพิษ
และเอนไซม์ของเชื้อวิบริโอ คลอลีรี เพื่อเพิ่ม คุณภาพชีวิต

b00251905

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246172



รายงานวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อวิบริโอ คลอลีรีในแหล่งน้ำโดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีอิมมูโนวิทยา

Development of *V. cholerae* detection in aquatic environment by multiplex PCR compared with culture method and immunology

โดย

คณะผู้วิจัย จุฬาพรรณ อิ้งจะนิล

จริยา ชมวารินทร์

วิเศษ นามวาท

อรวรรณ แจ่มจันทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2553

ชุดโครงการการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วง

โดยเทคนิค multiplex PCR และการศึกษาคุณสมบัติสารพิษ

และเอนไซม์ของเชื้อวิบริโอ คลอลีรี เพื่อเพิ่ม คุณภาพชีวิต

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อวิบริโอ คลอลีรีโอหนึ่งในน้ำ โดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีทางอิมมูโนวิทยา

จุฬาพรรณ อิ้งจะนิล[1] จริยา ชมวารินทร์[1] วิเศษ นามวาท[1] อรวรรณ แจ่มจันทร์[2]

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, [2] สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 ขอนแก่น

246172

บทคัดย่อ

Vibrio cholerae O1/O139 เป็นเชื้อสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงอย่างแรง มีแหล่งอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ซึ่งในการแยกเชื้อจากแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นไปได้ยาก วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ 1) พัฒนา multiplex PCR และ multiplex RT-PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตและเป็น toxigenic *V. cholerae* โดยเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี direct fluorescent monoclonal antibody (DFA) 2) ตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* O1/O139 ในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ใช้ในการอุปโภคและบริโภคในจังหวัดขอนแก่น 3) การศึกษาถึงผลของ pre-PCR condition ต่อการตรวจหาเชื้อ โดยศึกษาผลของการกรองและไม่กรองและการ enrichment ในการพัฒนาการตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR มีการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนต่างๆได้แก่ outer membrane protein (*OmpW*), cholera toxin (*ctxA*), toxin co-regulated pilli (*tcpA*), *rfb* ที่จำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม O1 และ O139 ผลการวิจัยพบว่าความไวในการตรวจด้วย multiplex PCR เท่ากับ 15.7 cfu /PCR ในขณะที่ multiplex RT-PCR เท่ากับ 1.13×10^5 cfu /PCR และเมื่อตรวจด้วยวิธี uniplex PCR พบว่าอยู่ระหว่าง 1-8 cfu/PCR และ uniplex RT-PCR พบว่าอยู่ระหว่าง 10^3-10^4 cfu/PCR การตรวจโดยวิธี DFA มีความไว 10^2 cfu/ml ผลการตรวจตัวอย่างน้ำจำนวน 55 ตัวอย่าง ตรวจพบว่าเป็น *V. cholerae* O1 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียง 3 ตัวอย่าง (5.45%) ขณะที่ 21 ตัวอย่าง (38.18%) ตรวจพบโดยวิธี multiplex PCR 10 ตัวอย่าง (18.27%) ตรวจพบโดยวิธี multiplex RT-PCR 13 ตัวอย่าง (23.63%) ตรวจพบโดยวิธี DFA ผลของการศึกษา pre-PCR condition ต่อการตรวจหาเชื้อพบว่า 34 ตัวอย่าง (61.8%) ที่ผ่านการกรองและ enrichment เป็นเวลา 6 ชม.ก่อนทำ PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* ขณะที่ 11 ตัวอย่าง (20 %) สามารถตรวจพบเชื้อได้โดยไม่ผ่านการกรอง จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า วิธี multiplex PCR เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจหา เชื้อ *V. cholerae* เพราะสามารถตรวจหาเชื้อได้มากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี multiplex RT-PCR มีประโยชน์ในการตรวจหาเชื้อ toxigenic *V. cholerae* ที่มีชีวิตอยู่ ในสิ่งแวดล้อมด้วย

คำสำคัญ : วิบริโอ คลอลีรี, multiplex PCR, multiplex RT-PCR, DFA

Development detection of *Vibrio cholerae* in aquatic environment by multiplex PCR compared with culture method and immunology

Chulapan Engchanil[1], Chariya Chomvarin[1], Wises Namwat[1] Orawan jamjane[2]

[1] DEPARTMENTS OF MICROBIOLOGY FACULTY OF MEDICINE, KHON KAEN UNIVERSITY

[2] THE OFFICE OF COMMUNICABLE DISEASE CONTROL, REGION 6, KHON KAEN, THAILAND

Abstract

246172

Toxigenic *Vibrio cholerae* O1/O139, the causative agent of severe diarrhea, is an inhabitant of the aquatic environment but it is rarely isolated from aquatic environment when using culture method. The objectives of this study were to 1) develope of multiplex PCR assay and multiplex RT-PCR assay for the detection of *Vibrio cholerae* compared with culture method and direct fluorescent antibody (DFA), 2) determine the incidence of *Vibrio cholerae* O1 in aquatic environment in Khon Kaen, and 3) evaluate the effect of different pre-PCR conditions on *V. cholerae* detection including water filtrated and non-filtrated before enrichment. The specific primers targeting genes included the outer membrane protein (*OmpW*), cholera toxin (*ctxA*), toxin co-regulated pilli (*tcpA*), *rfb* specific for O1 and O139. The result showed that the sensitivity of multiplex PCR was 15.7 cfu /PCR while multiplex RT-PCR was 1.13×10^5 cfu /PCR. The sensitivity of uniplex-PCR was 1-8 cfu/PCR while uniplex RT-PCR was 10^3-10^4 cfu/PCR and the sensitivity of DFA was 10^2cfu/ml. Detection of *Vibrio cholerae* by multiplex PCR compared with culture method and immunology (DFA) showed that of the 55 water samples, only 3 (5.45%) were positive for *V. cholerae* O1 by culture method while 21 (38.18%) were positive for *V. cholerae* O1 by multiplex PCR. Ten samples (18.27%) were positive by multiplex RT-PCR while 13 (23.63%) were positive by DFA method. The effect of different pre-PCR condition was shown that 34 (61.8%) of filtrated samples in APW and 11 (20%) of non-filtrated samples before PCR 6 h were positive for *V. cholerae* detection. These findings suggest that the multiplex PCR is an alternative method for detection of *V. cholerae* because it has more sensitivity than culture method. The multiplex RT-PCR is a useful tool for detection of viable cells toxigenic *V. cholerae*.

Keywords: *Vibrio cholerae*, multiplex PCR, multiplex RT-PCR, DFA

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณ 2553 จึงขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นมา ณ. โอกาสนี้

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอนแก่น และ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น (สคร.6 ขอนแก่น) ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือให้การเก็บตัวอย่างน้ำดำเนินการได้สะดวกขึ้น และให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ให้การวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ผู้ดำเนินการวิจัย

27 พฤษภาคม 2554

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		**i**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		**ii**
กิตติกรรมประกาศ		**iii**
สารบัญเนื้อหา		**iv**
สารบัญตาราง		**vi**
สารบัญรูป		**vii**
บทที่ 1 บทนำ		
1.1	ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3	ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4	ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5	ประโยชน์ที่ได้จากโครงการวิจัย	3
1.6	แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีและการวิจัยสู่เป้าหมาย	3
1.7	สถานที่ทำการทดลอง และเก็บข้อมูล	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		
2.1	คุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio cholerae* และการก่อโรค	4
2.2	การวินิจฉัยการติดเชื้อ	5
2.3	เชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ยากหรือเพาะไม่ขึ้น	5
2.4	การระบาดของโรคอุจจาระร่วงอย่างแรงในจังหวัดขอนแก่น	8
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย		
3.1	แบบแผนการวิจัย	10
3.2	ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง	10
3.3	การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากแหล่งน้ำโดยวิธี multiplex PCR, culture และ DFA	11
3.4	การตรวจการมีชีวิตของเชื้อโดยวิธี multiplex RT-PCR	13

3.5 การทดสอบ sensitivity และ specificity ของ multiplex PCR และ multiplex RT-PCR 14

บทที่ 4 ผลการวิจัย อภิปรายและสรุปผล

4.1 ผลการทดสอบ sensitivity และ specificity ของ multiplex PCR และ multiplex RT-PCR 16

4.2 ผลของ Pre-PCR Processing ต่อประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ 19

4.3 ผลการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากแหล่งน้ำโดยวิธีต่างๆ 20

4.4 เปรียบเทียบการพบเชื้อ *Vibrio cholerae* ในแหล่งน้ำจังหวัดขอนแก่นในช่วงที่มีและไม่มีการระบาด 23

4.5 สรุปผลการวิจัย 24

เอกสารอ้างอิง 25

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	Primer sequence และ PCR condition ของ multiplex PCR	12
ตารางที่ 3.2	cDNA reaction component	14
ตารางที่ 3.3	Primer sequence และ PCR condition ของ multiplex RT-PCR	14
ตารางที่ 4.1	ผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* ในสภาวะ Pre- PCR processing ที่แตกต่างกัน	19
ตารางที่ 4.2	สรุปผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae*	20
ตารางที่ 4.3	เปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* โดยวิธีต่างๆ	22

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 4.1	ความไวในการตรวจหาเชื้อโดย M-PCR	16
รูปที่ 4.2	ความไวในการตรวจหาเชื้อโดย MRT-PCR	17
รูปที่ 4.3	การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี multiplex PCR	18
รูปที่ 4.4	กราฟผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* ในแหล่งน้ำจังหวัดขอนแก่น	23