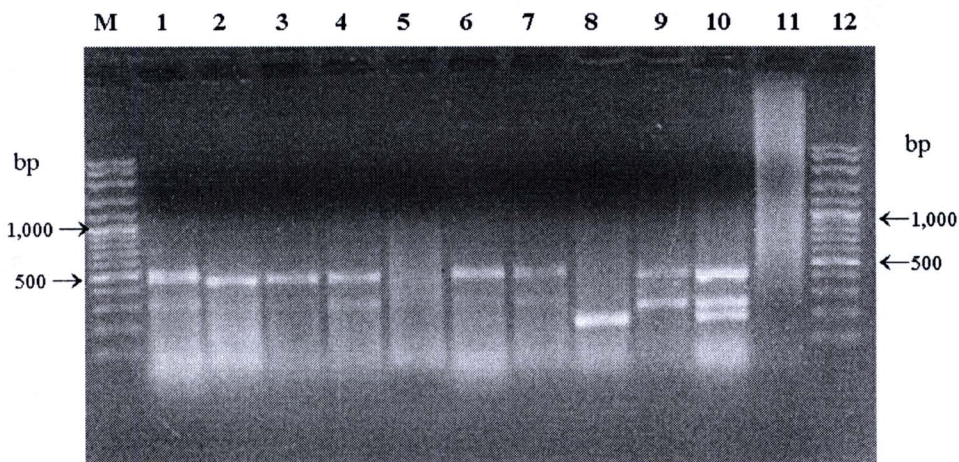


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม โดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมสดแกะเปลือก ซึ่งเก็บตัวอย่างจากร้านค้าบริเวณชายทะเลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ภายหลังการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใน Alkaline peptone water (APW) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* คือ *tl* นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีน *tdh* เป็นเป้าหมายสำหรับบ่งชี้การมีอยู่ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่สร้างโปรตีน TDH ส่วนยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* คือ *vvh* ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนเป้าหมายทั้งสามดังกล่าวมีขนาด 450, 269 และ 205 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *tl*, *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ เลน M คือ 100 bp sharp DNA Marker เลน 1-7 คือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ได้จากการตรวจสอบตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บจากร้านค้าต่าง ๆ เลน 8 คือ ชุดควบคุมเชิงบวกซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. vulnificus* DMST 19346 เป็นแม่แบบ เลน 9 คือ ชุดควบคุมเชิงบวกซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 15285 เป็นแม่แบบ เลน 10 คือชุดควบคุมเชิงบวกซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 เป็นแม่แบบ เลน 11 คือชุดควบคุมเชิงลบซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

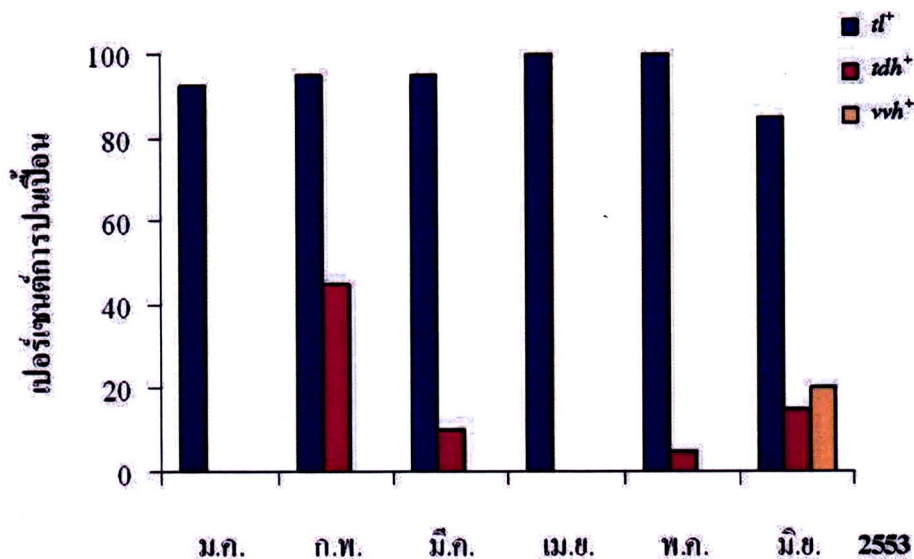
จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 6 เดือน ในช่วงระหว่างเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 โดยเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ มีจำนวนตัวอย่างเดือนละ 40 ตัวอย่าง ส่วนเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน มีตัวอย่างเดือนละ 20 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 160 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างหอยนางรมส่วนใหญ่มีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* โดยมีการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทุกเดือน ดังแสดงในตารางที่ 4-1 นอกจากนี้ยังพบการปรากฏอยู่ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่มียีน *tdh* ในหอยนางรมที่เก็บมาศึกษาในเดือนกุมภาพันธ์ (9/40) มีนาคม (2/20) พฤษภาคม (1/20) ในขณะเดียวกัน การศึกษาครั้งนี้ตรวจพบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในหอยนางรมจำนวน 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาในเดือนมิถุนายน โดยที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิดนี้ในเดือนอื่น ๆ ที่เก็บตัวอย่างมาศึกษา

ตารางที่ 4-1 การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมสด และเปลือกที่จำหน่ายบริเวณชายทะเลอ่างศิลา เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

เดือน (พ.ศ. 2553)	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีนเป้าหมาย		
		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>
		<i>tl</i>	<i>tdh</i>	<i>vvh</i>
มกราคม	40	37	0	0
กุมภาพันธ์	40	38	9	0
มีนาคม	20	19	2	0
เมษายน	20	20	0	0
พฤษภาคม	20	20	1	0
มิถุนายน	20	17	3	4
รวม	160	151 (94.4 %)	15 (9.4 %)	4 (2.5 %)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน ซึ่งคำนวณจากการปรากฏผลบวกของยีนเป้าหมายที่ใช้บ่งชี้แบคทีเรียแต่ละชนิดในปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จากการตรวจสอบจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 160 ตัวอย่าง

จากผลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างหอยนางรมสดแกะเปลือกที่นำมาศึกษา มีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ก่อนข้างสูง โดยอยู่ในช่วง 92.5-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-2) โดยในเดือนเมษายนและพฤษภาคม ตรวจพบการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้ในทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคซึ่งมียีน *tdh* ตรวจพบในตัวอย่างหอยนางรม 22.5, 10, 5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนกุมภาพันธ์ มีนาคม พฤษภาคมและมิถุนายน ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษารั้งนี้ตรวจพบ *V. vulnificus* เฉพาะตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาในเดือนมิถุนายนเท่านั้น (20 เปอร์เซ็นต์) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน ประมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 160 ตัวอย่าง ที่ศึกษาในช่วงระยะเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 4-2 การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บจากร้านค้าบริเวณชายทะเลอ่างศิลา ระหว่างเดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2553 เมื่อตรวจสอบโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ *il*⁺ บ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด *tdh*⁺ บ่งชี้ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคซึ่งมียีน *tdh* และ *vvh*⁺ บ่งชี้ *V. vulnificus* ทั้งหมด

2. การแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จาก enrichment culture

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากหอยนางรมใช้ตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใน Alkaline peptone water (APW) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปจืดแยกเชื้อบนอาหาร TCBS คัดเลือกโคโลนีสีเขียว (และ/หรือสีเหลือง ในกรณีที่มีโคโลนีสีเขียวน้อยกว่าสีเหลือง หรือมีเฉพาะโคโลนีสีเหลืองปรากฏอยู่เท่านั้น) นำโคโลนีที่คัดเลือกมาทดสอบยืนยันบนอาหาร CHROMagar™ *Vibrio* (CHROMagar) และ T₁N₄ medium มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหาร T₁N₄ มาตรวจสอบ รวมทั้งทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิเดส จากนั้นนำมายืนยันด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ในการศึกษารั้งนี้ได้คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *V. parahaemolyticus* รวมทั้งหมด 396 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อที่คัดแยกได้เหล่านี้ถูกนำมาตรวจยืนยันอีกครั้งโดยเทคนิค PCR นอกจากนี้พบว่าไม่สามารถแยกสายพันธุ์ *tdh*⁺ ได้จากตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจสอบโดย PCR เป็นบวกต่อยีน *tdh* (ตารางที่ 4-2) ในทำนองเดียวกัน การศึกษารั้งนี้ไม่สามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจสอบโดย PCR เป็นบวกต่อยีน *vvh*

ตารางที่ 4-2 จำนวนไอโซเลทของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่คัดแยกได้จากหอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายจากร้านค้าบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2553

เดือน	จำนวนไอโซเลท		
	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>
	<i>tl</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁻	<i>tl</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺	<i>vvh</i> ⁺
มกราคม	101	0	0
กุมภาพันธ์	77	0	0
มีนาคม	69	0	0
เมษายน	87	0	0
พฤษภาคม	48	0	0
มิถุนายน	14	0	0
รวม	396	0	0