

247388

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



247388



รายงานการวิจัย

การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ
Vibrio parahaemolyticus และ *Vibrio vulnificus* โดยตรงในหอยนางรม
บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

Multiplex polymerase chain reaction for direct detection of
Vibrio parahaemolyticus and *Vibrio vulnificus*
in oysters from Angsila, Chonburi Province

สุดาร์ตน์ สวนจิตร และอภิรดี ปิณฑนภาคย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

600252614

247388



ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



247388

รายงานการวิจัย

การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ

Vibrio parahaemolyticus และ *Vibrio vulnificus* โดยตรงในหอยนางรม

บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

Multiplex polymerase chain reaction for direct detection of

Vibrio parahaemolyticus and *Vibrio vulnificus*

in oysters from Angsila, Chonburi Province

สุดารัตน์ สวนจิตร และอภิรดี ปลั้นธนภาคย์



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
ปีงบประมาณ 2552 มหาวิทยาลัยบูรพา คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่านที่
อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอขอบคุณ คุณสุริย์พร เอี่ยมศรี คุณณัฐวิ ชั่งชัย และคุณขวัญฤทัย แสงโนราช ที่ช่วย
ในการเก็บตัวอย่างและศึกษาในห้องปฏิบัติการงานงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดาร์ตน์ สวนจิตร
อภิรดี ปิณฑนภากย์

กรกฎาคม 2554

บทคัดย่อ

247388

การสำรวจการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ใน หอยนางรมสดแกะเปลือก จำนวนทั้งหมด 160 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากร้านค้าบริเวณชายฝั่งทะเล เทศบาลตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553 โดยใช้ เทคนิคมัลติเพล็กซ์ จำนวนตัวอย่างที่เก็บแต่ละเดือนมีจำนวน 20-40 ตัวอย่าง ยีนเป้าหมายที่ใช้ ในการตรวจสอบคือยีน *tl* สำหรับบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด ยีน *tdh* สำหรับบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (*tdh*⁺) และยีน *vvh* สำหรับบ่งชี้ *V. vulnificus* ทั้งหมด พบว่า หอยนางรมสดแกะเปลือกที่นำมาตรวจสอบมีการปนเปื้อนมากที่สุด (100 เปอร์เซ็นต์) ในเดือน เมษายนและพฤษภาคม และมีปริมาณการปนเปื้อนลดลงเล็กน้อยในเดือนมิถุนายน (85 %) สำหรับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (*tdh*⁺) พบมีการปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างหอยนางรม 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.4 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ตรวจพบ การปนเปื้อนของ *V. vulnificus* เฉพาะในเดือนมิถุนายนเท่านั้น โดยพบจำนวน 4 ตัวอย่าง (20 เปอร์เซ็นต์) จากหอยนางรมจำนวน 20 ตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาในเดือนนี้ การตรวจพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*⁺ และ *V. vulnificus* แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงในการที่จะทำให้ เกิดการติดเชื้อในคนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับหอยนางรมรวมทั้งผู้บริโภค

คำสำคัญ: ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์, มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์, หอยนางรม

Vibrio parahaemolyticus, *Vibrio vulnificus*

ABSTRACT

247388

The occurrence of two *Vibrio* species including *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in unshelled raw oyster samples from the coastal area of the Ang-Sila municipality, Chonburi province was investigated by multiplex PCR analysis. A total of 160 samples of raw oyster were randomly collected from retailers during January to June, 2010. Twenty to forty samples were taken monthly for the analysis. Multiplex PCR targeted *tl* and *tdh* for the identification of total and virulent strains of *V. parahaemolyticus*, respectively, and *vvh* for *V. vulnificus* was performed to determine the bacterial absence and presence. *V. parahaemolyticus* was detected in all oyster samples (100 %) in April and May, and slightly decreased in June (85 %). The presence of virulent-associated *tdh* gene of *V. parahaemolyticus* was also detected, but only from 9.4 % of total samples. The presence of *V. vulnificus* was only observed in four samples in June (20 %). Our data demonstrate that *V. parahaemolyticus* is ubiquitous in raw oyster and the occurrence of *tdh*⁺ strains as well as *V. vulnificus* may have possible health implications for consumers and people who are often exposed to raw oyster on a daily basis.

Keywords: Multiplex Polymerase Chain Reaction, Multiplex PCR, Raw oyster

Vibrio parahaemolyticus, *Vibrio vulnificus*

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง.....	ง
สารบัญภาพ.....	จ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	4
รายละเอียดเกี่ยวกับ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4
รายละเอียดเกี่ยวกับ <i>Vibrio vulnificus</i>	11
รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	18
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	22
วัสดุอุปกรณ์	22
วิธีการทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
บทที่ 5 อภิปราย สรุป และข้อเสนอแนะ.....	32
อภิปรายผลการทดลอง.....	32
สรุปผลการทดลอง.....	38
ข้อเสนอแนะ.....	38
เอกสารอ้างอิง.....	39
ภาคผนวก	44
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	45
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี และบัฟเฟอร์.....	46

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>V. parahaemolyticus</i>	6
2-2	คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>V. vulnificus</i>	12
2-3	คุณสมบัติบางประการของ <i>V. vulnificus</i> ทั้ง 3 ไบโอดีไทป์.....	16
3-1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>V. vulnificus</i>	23
3-2	องค์ประกอบของปฏิกิริยामัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>tl, tdh</i> และ <i>vvh</i>	26
4-1	การปนเปื้อนของ <i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>V. vulnificus</i> ในตัวอย่างหอยนางรม สดแกะเปลือกที่จำหน่ายบริเวณชายทะเลอ่างศิลา เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์	29
4-2	จำนวนไอโซเลทของ <i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>V. vulnificus</i> ที่คัดแยกได้จาก หอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายจากร้านค้าบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2553	31

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะของ <i>V. parahaemolyticus</i> (แฟลกเจลลาเส้นเดียว)	4
2-2 ลักษณะของ <i>V. parahaemolyticus</i> (แฟลกเจลลารอบเซลล์).....	5
2-3 ลักษณะโคโลนีของ <i>V. parahaemolyticus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar.....	5
2-4 ลักษณะโคโลนีของ <i>V. vulnificus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar.....	11
2-5 ลักษณะของ <i>V. vulnificus</i>	11
4-1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>tl</i> , <i>tdh</i> ของ <i>V. parahaemolyticus</i> และยีน <i>vvh</i> ของ <i>V. vulnificus</i> ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคดีพีแอลพีซีอาร์	28
4-2 การปนเปื้อนของ <i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>V. vulnificus</i> ในตัวอย่างหอยนางรม ที่เก็บจากร้านค้าบริเวณชายทะเลอ่างศิลา ระหว่างเดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2553 เมื่อตรวจสอบโดยใช้เทคนิคดีพีแอลพีซีอาร์	30