การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

นางสาวกาญจนา ชาหอม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2556 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2013 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS

Miss Kanchana Chahorm

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
โดย	นางสาวกาญจนา ชาหอม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.วรรนิภา เพี้ยนภักตร์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กาญจนา ชาหอม : การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. (DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS) อ .ที่ ป รึ ก ษ า วิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา , 98 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในระบบนิเวศอาหาร โดยเริ่มจากประเมินการใช้ไพรเมอร์ GC567F และ 680R ในการเพิ่ม DNA และ cDNA ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอทั้งหมด 10 สปีชีส์ด้วยวิธีพีซีอาร์ และแยกความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้โพลีอะคลิลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ที่มีเกรเดียนต์ของสารดีเนเจอร์แรนคือยูเรียและฟอร์มาไมด์เข้มข้นร้อยละ 45-70 พบว่าเทคนิคดีจีจีอีสามารถแยกแถบ DNA และ cDNA ของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบ DNA และ cDNA ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้จำนวน 2 คู่ คือ *Vibrio fluvialis* กับ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* เมื่อประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธีในการตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากัน พบว่าเทคนิค PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอได้เพียง 3 สปีชีส์คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* และ *Vibrio alginolyticus* ในขณะที่เทคนิค RT-PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอได้ถึง 5 สปีชีส์ คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* และเมื่อตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอที่มีชนิดและความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกัน (แปรค่าตั้งแต่ 10^2-10^5 CFU/ml) พบว่า PCR-DGGE ตรวจพบแถบ DNA ของวิบริโอสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดสองลำดับแรกในกลุ่ม ในขณะที่ RT-PCR-DGGE ตรวจพบแถบ cDNA ของวิบริโอสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์แตกต่างกันได้ถึงห้าลำดับแรกในกลุ่ม ดังนั้นจึงเลือกเทคนิค RT-PCR-DGGE สำหรับประเมินการใช้งานต่อไป เมื่อประเมินผลของสภาวะเซลล์ต่อการตรวจพบวิบริโอด้วยเทคนิคดังกล่าว ได้แก่ สภาวะเซลล์สมบูรณ์ (VC) เซลล์บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง (IVC) และเซลล์บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งที่ผ่านการ pre-enrichment (PIVC) พบว่าตรวจพบแถบ cDNA ของเซลล์จากทุกสภาวะได้ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเซลล์ของ *Plesiomonas shigelloides* ภายใต้ สภาวะ IVC และ PIVC ปรากฏแถบ cDNA มากกว่า 1 แถบ เมื่อประเมินการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE สำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยเติมเซลล์ *Vibrio parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างอาหารที่ปราศจากเชื้อ พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/g และให้ผลที่เป็นไปในแนวทางเดียวกับวิธีมาตรฐาน (FDA-BAM, 2004) และเมื่อประยุกต์ใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเชื้อวิบริโอในอาหาร จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่ารูปแบบของวิบริโอที่ตรวจพบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานร้อยละ 100 จำนวน 3 ตัวอย่าง ร้อยละ 75 จำนวน 1 ตัวอย่าง ร้อยละ 50 จำนวน 6 ตัวอย่าง และให้ผลไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน จำนวน 4 ตัวอย่าง

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556

5471914023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS: RT-PCR-DGGE / VIBRIO SPP.

KANCHANA CHAHORM: DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS. ADVISOR: ASST. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 98 pp.

The aim of this research was to evaluate the feasibility of an application of PCR-DGGE and RT-PCR-DGGE techniques for detection of *Vibrio* species in the ecosystem of foods. Primers GC567F and 680R were initially evaluated for amplification of DNA and cDNA of ten references *Vibrio* species by PCR method. The GC-clamp PCR amplicons were separated according to their sequences by the DGGE using 10% (w/v) polyacrylamide gel with a denaturing gradient from 45 to 70% of urea and formamide. The results showed that DNA and cDNA band of *Vibrio* species could be separated by DGGE technique. Two pair of *Vibrio* species, which could not be differentiated on gel were *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* and *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*. Apparently, DNA and cDNA amplicons of all ten *Vibrio* species separated by PCR-DGGE and RT-PCR-DGGE method gave the same migratory patterns on DGGE gel. For the detection limit evaluation, in the community of 10 reference strains containing the same viable population, distinct DNA bands of 3 species; *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio alginolyticus* were consistently observed by PCR-DGGE technique. Furthermore, 5 species; *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio fluvialis* consistently observed by RT-PCR-DGGE technique. In the community containing different viable population decreasing from 10^2 to 10^5 CFU/ ml. PCR-DGGE analysis only detected the two most prevalent species, while RT-PCR-DGGE detected the five most prevalent species. Therefore, RT-PCR-DGGE technique was selected for further evaluation. RT-PCR-DGGE technique were evaluated in detection of various *Vibrio* cell conditions such as viable cell (VC), injured cells from frozen (IVC) and injured cells from frozen with pre-enrichment (PIVC). It was found that cDNA band of all cell conditions gave the same migratory patterns excepted that multiple cDNA bands of *Plesiomonas shigelloides* under IVC and PIVC conditions were found. When RT-PCR-DGGE was evaluated in detection of *Vibrio parahaemolyticus* spiked food samples, it could detect *Vibrio parahaemolyticus* in food containing at least 10^2 CFU/g. The results obtained also corresponded to standard method (FDA-BAM, 2004). When RT-PCR-DGGE was applied in detection of *Vibrios* in fourteen food samples, the vibrio profiles were detected, which were 100 % similar to the standard method (observed in 3 samples), 75% and 50% observed in 1 and 6 samples, respectively and totally different (0%) observed in 4 samples.

Department: Food Technology Student's Signature .....

Field of Study: Food Technology Advisor's Signature .....

Academic Year: 2013

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางการแก้ไขปัญหา ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงความกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง และ ดร.วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัย, โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา รหัสโครงการ FW1015B ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง DGGE with Dcode Universal Mutation Detection System และศูนย์ฉายรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง VITEK 2 System สำหรับตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ น้องและเพื่อนๆปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวชาหอมทุกท่านที่ได้สั่งสอนให้ผู้วิจัยมีความอดทน ให้กำลังใจ และห่วงใยพร้อมทั้งสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญภาพ ..... ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 4
2.1 *Vibrio* spp. 4
2.2 ลักษณะทั่วไปและการก่อโรคของ *Vibrio* spp. 5
2.2.1 *Vibrio parahaemolytucus* 5
2.2.2 *Vibrio cholerae* 5
2.2.3 *Vibrio vulnificus* 6
2.2.4 *Vibrio* spp. สายพันธุ์อื่นๆ 6
2.3 วิธีการจำแนกเชื้อ *Vibrio* spp. 7
2.3.1 วิธีมาตรฐาน 7
2.3.1.1 Selective plating 7
2.3.1.2 Most probable number (MPN) 8
2.3.2 วิธีทางเลือก 10
2.3.2.1 Biochemical identification test kit 10
2.3.2.2 Dry rehydratable film method 11
2.3.2.3 Chromogenic medium 14
2.3.2.4 Immunoassay 14
2.3.2.5 Nucleic acid hybridization 15
2.4 Polymerase chain reaction (PCR) 19
2.4.1 Nested PCR 20
2.4.2 Multiplex PCR 20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.5 การตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR 23
2.5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Agarose Gel Electrophoresis) 23
2.5.2 พอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 25
2.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตผลพีซีอาร์ 26
2.6.1 Sequencing analysis 26
2.6.2 DNA banding pattern 26
2.7 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 27
2.7.1 หลักการของ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 27
2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบนิเวศอาหาร 28
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย 30
3.1 วัสดุ เครื่องมือ/อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 30
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ 30
3.1.2 เครื่องมือ/อุปกรณ์ 30
3.1.3 สารเคมี 31
3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 32
3.1.5 สายพันธุ์จุลินทรีย์ 33
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 34
3.2.1 ศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp. 34
3.2.1.1 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน 34
3.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ (DNA/RNA extraction) 34
3.2.1.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) 35
3.2.1.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (agarose gel electrophoresis) 35
3.2.1.5 การแยกความแตกต่างของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 36
3.2.2 ประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp. 36

หน้า

3.2.2.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1 36
3.2.2.2 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 2..... 38
3.2.3 ศึกษาผลของสภาวะของเซลล์ของเชื้อวิบริโอต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE39
3.2.4 ประเมินวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร..... 40
3.2.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหาร 42
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 44
4.1 การศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp..... 44
4.2 การประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธี PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp..... 50
4.3 การประเมินผลของสภาวะของเซลล์ของวิบริโอต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE..... 55
4.4 การประเมินวิธี RT-PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร..... 58
4.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหาร..... 60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 71
5.1 สรุปผลการทดลอง..... 71
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 72
รายการอ้างอิง 74
ภาคผนวก..... 80
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี 81
ภาคผนวก ข การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (DNA and RNA extraction) 84
ภาคผนวก ค การประกอบเจลพอลิอะคลิลาไมด์..... 89
ภาคผนวก ง วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5) 93
ภาคผนวก จ วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อวิบริโอด้วยเครื่อง VITEK ®2 system..... 94
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา 95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 98

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม Vibrionaceae ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล 12
ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ 16
ตารางที่ 2.3 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้อะกาโรสเจลที่มีปริมาณอะกาโรสต่างๆกัน 24
ตารางที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของพอลิอะคลิลาไมด์เจลในการแยกดีเอ็นเอ 26
ตารางที่ 3.1 การสร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอโดยการผสมเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แบบที่ 1 เพื่อประเมิน detection limit ของวิธี PCR-DGGE 38
ตารางที่ 3.2 การสร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอโดยการผสมเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แบบที่ 2 เพื่อประเมิน detection limit ของวิธี PCR-DGGE 39
ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างอาหารและแหล่งที่ซื้อ 43
ตารางที่ 4.1 การเตรียมเซลล์สร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1 และ 2 สำหรับใช้ในการประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของเทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE 51
ตารางที่ 4.2 การตรวจพบแถบดีเอ็นเอของชุมชนวิบริโอแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ที่ตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE 53
ตารางที่ 4.3 การตรวจพบแถบอาร์เอ็นเอของชุมชนวิบริโอแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ที่ตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE 54
ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบผลการตรวจ เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เติมในตัวอย่างปลาหมึกปลอดเชื้อโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน 60
ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน 64
ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ % homology ของวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และวิบริโอที่ตรวจพบด้วยวิธีมาตรฐาน 69
ตารางที่ ก.1 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 6.5 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 82
ตารางที่ ก.2 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 8 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 82

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง หน้า

ตารางที่ ก.3 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 10 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 83
ตารางที่ ฉ.1 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างปลาหมึกแช่แข็งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ 95
ตารางที่ ฉ.2 ผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธีมาตรฐาน 96

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

ภาพที่ 2.1 วิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีมาตรฐาน MPN9
ภาพที่ 2.2 เครื่อง VITEK ®2 system 11
ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนในการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค RT-PCR 22
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของอะกาโรสเจล 24
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของพอลิอะคลิลาไมด์เจล 25
ภาพที่ 4.1 แสดงผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 45
ภาพที่ 4.2 แถบดีเอ็นเอบนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 8 46
ภาพที่ 4.3 แถบดีเอ็นเอบนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 46
ภาพที่ 4.4 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 48
ภาพที่ 4.5 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอบนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (PCR-DGGE) 49
ภาพที่ 4.6 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอที่สภาวะเซลล์สมบูรณ์ (VC) บนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE) 56
ภาพที่ 4.7 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอ เซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) บนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE) 57
ภาพที่ 4.8 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอ ที่เซลล์ที่อยู่ในสภาวะเซลล์บาดเจ็บแต่ผ่านขั้นตอนการทำ pre-enrichment (PIVC) บนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE) 57
ภาพที่ 4.9 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (VP) ที่เติมลงในตัวอย่าอาหารในจำนวนเชื้อแตกต่างกัน บนอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.8 59
ภาพที่ 4.10 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (VP) ที่เติมลงในตัวอย่างอาหารในจำนวนเชื้อแตกต่างกันบนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 59
ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารชุดที่ 1 บนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE) 62
ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารชุดที่ 2 บนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE) 63

ภาพ หน้า

ภาพที่ 4.13 ไฟโลจีเนติกทรี (phylogenetic tree) ของเชื้อกลุ่มวิบริโอ 68
ภาพที่ ค.1 Spacer และ plate clamps 89
ภาพที่ ค.2 การประกอบกระจก 89
ภาพที่ ค.3 การประกอบกระจกเข้ากับฐานของ casting stand 90
ภาพที่ ค.4 การสร้างเจลพอลีอะคลิลาไมด์ (casing gel) 90
ภาพที่ ค.5 การประกอบเจลเข้ากับ sandwich core 91
ภาพที่ ค.6 แสดงการประกอบครื่อง Dcode ™ ที่พร้อมใช้งาน 91
ภาพที่ ง.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5) 93
ภาพที่ จ.1 เครื่อง VITEK 2 ® system 94
ภาพที่ จ.2 การ์ดสำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ (GN card) 94

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

Vibrio spp. จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งประกอบด้วย 4 จีนัส คือ Aeromonas Photobacterium Plesiomonas และ Vibrio เชื้อในจีนัสวิบริโอมีมากกว่า 30 สปีชีส์และมีสปีชีส์ที่เป็นเชื้อก่อโรคในอาหารมากถึง 11 สปีชีส์ (US Food and Drug Administration, 2004; สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Vibrio* spp.ในน้ำและอาหารทะเลซึ่งทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal) และโรคอหิวาต์ ได้แก่ ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข รายงานว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ. 2540-2545 ตามลำดับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) ตั้งแต่ปี 2544-สิงหาคม 2549 จากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสโลหิตซึ่งเกิดจากเชื้อ *Vibrio vulnificus* รวม 56 คน (ศรีวรรณา หัทยานานนท์ et al., 2549) ในปี 2553 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Vibrio cholerae* ทั่วประเทศรวม 295 ราย อัตราป่วย 0.47 ต่อประชากรแสนคน เสียชีวิต 2 ราย อัตราป่วยตายร้อยละ 0.68 ซึ่งนับเฉพาะผู้ป่วยที่รับการรักษาที่สถานบริการทางการแพทย์และสาธารณสุข (สุชาดา จัมทสิริยากร, 2553) นอกจากนี้มักพบการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลซึ่งส่งผลต่ออุตสาหกรรมอาหารส่งออก โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งสดแช่เยือกแข็ง ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกเป็นอันดับต้นๆในกลุ่มสินค้าเกษตรของไทย (กระทรวงพาณิชย์, 2555) ดังนั้นแบคทีเรียจึงถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการกำหนดมาตรฐานอาหาร ซึ่งมาตรฐานอาหารตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 ระบุว่าอาหารดิบประเภทเนื้อสดของสัตว์น้ำแช่เย็นหรือแช่แข็ง และอาหารพร้อมบริโภคประเภทอาหารดิบที่เตรียมหรือปรุงในสภาพที่พร้อมบริโภคจะต้องไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio cholerae* ในตัวอย่าง 25 กรัม (กระทรวงสาธารณสุข. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) และมาตรฐานการส่งออกประเทศญี่ปุ่นกำหนดต้องไม่พบการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่าง 25 กรัม สำหรับอาหารสดแช่เยือกแข็งพร้อมบริโภค (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.กรมประมง.กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ, 2554) ดังนั้นเมื่อพบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในผลิตภัณฑ์เกินมาตรฐานที่กำหนด สินค้าจะถูกส่งกลับทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจรวมถึงส่งผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือในเรื่องมาตรฐานการผลิตอาหารของประเทศ ดังนั้นวิธีการควบคุมคุณภาพด้านการผลิตอาหารปลอดภัยโดยเฉพาะประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอเพื่อใช้ในการควบคุมจุดวิกฤต (critical control point) ในสายการผลิตอาหารจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

ในปัจจุบันวิธีในการตรวจสอบวิบริโอในอาหารยังคงใช้วิธีดั้งเดิมที่ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ หลายขั้นตอน ได้แก่ pre-enrichment,selective enrichment, selective plating, biochemical test และ serological test (US Food and Drug Administration, 2004) ซึ่งใช้เวลานานถึง 7-10 วัน นอกจากนี้บางสปีชีส์ในกลุ่มนี้ก็ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ (non culturable bacteria) ซึ่งอาจเกิดจากสมบัติเฉพาะตัวหรือลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเองหรือเกิดจากการบาดเจ็บของเซลล์จากกระบวนการแปรรูปจึงอาจทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ครอบคลุมทุกสปีชีส์และไม่สามารถประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบนิเวศอาหารได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว ที่ซึ่งสามารถประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียได้อย่างครอบคลุมมากขึ้น เช่น การใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction : PCR, พีซีอาร์) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบในหลอดทดลอง และได้มีการพัฒนาเทคนิค ให้สามารถตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่มีชีวิตในระบบนิเวศอาหาร ได้แก่ เทคนิค Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) ซึ่งขั้นตอนสำคัญของเทคนิค RT-PCR เริ่มต้นโดยการสกัด RNA จากเซลล์แบคทีเรียแล้วใช้ RNA เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา reverse transcriptase เพื่อสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) จากนั้นใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นจึงวิเคราะห์สมบัติของผลิตผลพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้เพื่อระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถทำได้ด้วยเทคนิคที่หลากหลาย (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ and มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536)

การวิเคราะห์ผลิตผลจากพีซีอาร์สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยส่วนใหญ่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ (DNA banding pattern) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างและทำให้เป็นเชื้อที่มีบริสุทธิ์แล้วเท่านั้น ส่วนเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติของสารพันธุกรรมของเชื้อโดยไม่ต้องทำขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดจากตัวอย่างอาหารโดยตรงด้วยไพรเมอร์จำเพาะและนำผลิตผลจากพีซีอาร์ที่ได้มาระบุชนิดของแบคทีเรียได้โดยตรงด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เบสด้วยกระแสไฟฟ้าและอาศัยตัวกลางเป็นเจล โดยจะแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เบสต่างกันได้แม้ว่าขนาดความยาวของดีเอ็นเอจะเท่ากัน ซึ่งอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ ซึ่งเรียกว่า “denaturants” โดยดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เบสต่างกันจะถูกทำลายพันธะด้วยสาร denaturants และเคลื่อนที่ไปในตัวกลางในเวลาแตกต่างกัน จึงสามารถแยกแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียต่างชนิดหรือแม้กระทั่งต่างสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถระบุชนิดโดยการเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่สร้างจากแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียมาตรฐานที่ผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ภายใต้สภาวะเดียวกัน (Muyzer and Smalla, 1998; Gafan and Spratt, 2005) จากหลักการดังกล่าวได้มีการนำเทคนิค PCR-DGGE มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารหลายชนิด เช่น แบคทีเรียแลคติกในกิมจิ (Lee et al., 2005) ยีสต์ใน

ระบบนิเวศขององุ่น (Prakitchaiwattana et al., 2004) และ *Vibrio vulnificus* ในหอยกาบ (Wang and Levin, 2006) เป็นต้น และมีการนำเทคนิค RT-PCR-DGGE มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เช่น การตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ที่อยู่ในสภาวะ viable but non culturable (Coutard et al., 2005) ตรวจสอบความหลากหลายของยีสต์ในไวน์ (Mills et al., 2002) และการตรวจสอบการปนเปื้อนของยีสต์และราในโยเกิร์ต (Bleve et al., 2003) เป็นต้น

การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการระบุชนิดของเชื้อวิบริโอ ได้แก่การใช้เทคนิคDGGE ในการตรวจสอบและหาปริมาณประชากรเชื้อวิบริโอ โดยทดสอบกับเชื้อวิบริโอมาตรฐาน 7 สปีชีส์ และตัวอย่างน้ำทะเล โดยใช้ไพรเมอร์ G567F และ 680R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอได้ และเมื่อใช้ denaturing gradient (urea และ formamide) ความเข้มข้น 45-70% สามารถตรวจหาเชื้อและแยกแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอแต่ละ สปีชีส์ออกจากกันได้ ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) มีค่าประมาณ 180 เซลล์ต่อตัวอย่างที่นำมาสกัด (Eiler and Bertilsson, 2006) มีรายงานการใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างน้ำจากหาดสนและหาดฤษี แต่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ 27F กับ 1492R และ GC567F กับ 680R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio aestuarianus*, *Vibrio neptunius*, *Vibrio brasiliensis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio tubiashii* และ *Vibrio sinaloensis* และสามารถแยกแถบดีเอ็นเอของทุกเชื้อออกจากกันได้ด้วยเทคนิค DGGE ที่ซึ่งใช้สภาวะเดียวกันกับงานวิจัยแรก (Thongchankeaw et al., 2011)

จากรายงานดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาวิธีดังกล่าวให้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจากลดขั้นตอนการทำ enrichment, selective plating รวมถึงการยืนยันผลโดยการทดสอบทางชีวเคมี อย่างไรก็ตามเนื่องจากยังไม่มีรายงานถึงการประเมินประสิทธิภาพของวิธีดังกล่าวในเรื่องของ ความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไวของวิธีในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอทั้งในรูปแบบเชื้อบริสุทธิ์และในระบบนิเวศอาหาร รวมถึงวิธีดังกล่าวยังไม่สามารถบ่งชี้สภาวะและการมีชีวิตของเซลล์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพและการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอโดยมุ่งเน้นการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตในระบบนิเวศอาหาร

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 *Vibrio* spp.

Vibrio spp. จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ประกอบด้วย 4 จีนัส คือ Aeromonas Photobacterium Plesiomonas และ Vibrio เชื้อในจีนัส Vibrio มีมากกว่า 30 สปีชีส์ เป็นแบคทีเรีย แกรมลบ (gram negative) รูปร่างท่อนตรงหรือโค้ง (curved rod) ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) บางชนิดเป็นพวกที่ต้องการเกลือในการเจริญ (obligate halophillic) ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8.0 ถึง 8.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส (Bhunia, 2008) ซึ่งสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคนและพบบ่อยในอาหารทะเลได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus* ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โดยจะแสดงอาการอุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้อาเจียน อาจมีไข้และบางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน *Vibrio cholerae* ทำให้เกิดโรคอหิวาต์ ซึ่งมีอาการท้องเดิน มีลักษณะเป็นน้ำซาวข้าว อาเจียนโดยไม่คลื่นไส้ อาจมีอาการเป็นลม หน้ามืด จนถึงหมดสติซึ่งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ *Vibrio vulnificus* สามารถก่อโรคได้ 3 ลักษณะ คือ กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ การติดเชื้อที่บาดแผล และติดเชื้อในกระแสโลหิต (ศรีวรรณา หัทยานานนท์ et al., 2549) *Vibrio mimicus* ทำให้เกิดอาการท้องร่วง คลื่นไส้อาเจียน และปวดท้อง *Vibrio fluvialis* ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อนี้จะเกิดอาการท้องร่วง อาเจียน ปวดในช่องท้อง ถ่ายท้องประมาณ 10-15 ครั้งต่อวัน *Vibrio alginolyticus* ทำให้เกิดอาการป่วยที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารและมักทำให้เกิดอาการติดเชื้อทางแผลและตา มักพบการระบาดมากในฤดูร้อนเป็นต้น

ในประเทศไทยมีการรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอเช่น การศึกษาอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงร่วมกับชนิดของอาหารที่รับประทาน พบว่ามีสาเหตุมาจากการรับประทานปูแสมดองเค็ม ปลาทะเล กุ้งทะเล ลูกชิ้นปลาทะเล และหอยแมลงภู่ (บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ et al., 2527) มีการศึกษาปริมาณ *Vibrio parahaemolyticus* ในหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยงตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบว่ามีค่าสูงกว่ามาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งกำหนดค่ามาตรฐานอาหารทะเลพร้อมบริโภคดิบ ต้องไม่พบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม (ทัศวรรณ ขาวสีจาน et al., 2550) นอกจากนี้ยังมีรายงานเรื่องการอยู่รอด*ของ* *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร พบว่า เมื่อนำกุ้งเก็บที่อุณหภูมิ 3, 7, 10 และ 18 องศาเซลเซียส ปริมาณของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ลดลงแต่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 8 วัน ในหอยนางรมที่วางตามชั้นจำหน่ายอาหารอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้อย่างน้อย 3 สัปดาห์

และสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เช่นเดียวกับในซูริมิ (surimi) ที่เก็บที่ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน จะมีปริมาณเชื้อลดลงและสามารถเพิ่มจำนวนได้อีกเมื่อวางที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Chung et al., 1994) นอกจากนี้พบว่าในประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และเกาหลี ก็มีรายงานการติดเชื้อจาก *Vibrio parahaemolyticus* หลังจากที่บริโภคอาหารทะเล ทั้งนี้ปัจจุบันอาหารทะเลดิบกำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ซึ่งอาจส่งผลให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อและเกิดอาการอาหารเป็นพิษมากขึ้น (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.กระทรวงสาธารณสุข, 2548)

2.2 ลักษณะทั่วไปและการก่อโรคของ *Vibrio* spp.

2.2.1 *Vibrio parahaemolytucus*

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือโค้ง ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophil) เจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 7.5-8.5 มีฟลาเจลล่าเพียง 1 เส้น อยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง (Polar flagella) และสามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลวจัดเป็นพวก Facultative anaerobe และเป็นพวกที่ชอบเกลือต้องการเกลือในการเจริญ (obligate halophillic) สามารถเจริญได้ดีในช่วงความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 2-3 เนื่องจากโซเดียมอิออนมีความจำเป็นต่อการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ จึงมักพบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในแหล่งน้ำที่มีความเค็มรวมทั้งผิวและอวัยวะที่เป็นเครื่องในของสัตว์น้ำเค็มทั่วๆไป (Lake et al., 2003) *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการรับประทานสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนเชื้อนี้ อาการของโรคที่พบคือ ปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ มีไข้เล็กน้อย อาจเกิดอาการภายใน 2-3 วัน (Twedt, 1989) และมีรายงานว่าพบ *Vibrio parahaemolyticus* มีการปนเปื้อนในน้ำทะเลและอาหารมากที่สุด (Su and Liu, 2007)

2.2.2 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae เป็นแบคทีเรียพวก non-halophilic สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศและสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า พบได้ทั่วไป เช่น น้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำทะเล มักพบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของน้ำเสียและพื้นดินที่มีการนำของเสียมาทิ้ง *Vibrio cholerae* แบ่งย่อยได้ 93 ซีโรกรุ๊ป มีเพียง 2 ซีโรกรุ๊ปเท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง คือ ซีโรกรุ๊ป O1 และ O139 ส่วนซีโรกรุ๊ปที่เหลือรวมเรียกว่า

Vibrio cholerae non O1/O139 แต่สามารถก่อให้เกิด โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) และการติดเชื้อทางบาดแผล (Wounded infection) ได้เช่นกัน *Vibrio cholera*e สร้างสารพิษที่เรียกว่า คอเรลล่าทอกซิน (Cholerae toxin) จัดเป็นเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อนและกรด เชื้อ *Vibrio cholerae* ทำให้เกิดโรคในคนเท่านั้น การก่อให้เกิดโรคได้เชื้อจะต้องมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะอาหารและไปเจริญเติบโตที่ผิวของลำไส้ และสร้างสารพิษออกมาและทำให้เยื่อบุลำไส้หลั่งสารจำพวกน้ำออกมา ทำให้เกิดอาการท้องร่วงและร่างกายขาดน้ำและแร่ธาตุ (Madden et al., 1989)

2.2.3 *Vibrio vulnificus*

แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ติดสีกรมลบ เป็นพวกที่ชอบเกลือ (obligate halophillic) เจริญในสภาวะที่มีเกลืออยู่ระหว่างร้อยละ 1-3 พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลและสัตว์ทะเล มีการแพร่กระจายในทุกฤดูกาล พบมากในช่วงฤดูร้อน สามารถก่อโรคโดยการติดเชื้อทางบาดแผล (Wound infection) เชื้อสามารถลุกลามอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดเนื้อเยื่ออักเสบ ผิวหนังมีอาการบวม ร้อน แดง เจ็บปวด อาจกลายเป็นอาการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Septicemia) และเชื้อยังสามารถเข้าสู่กระแสโลหิตโดยผ่านทางเยื่อบุทางเดินอาหารจาก การรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือผ่านทางบาดแผลจากการติดเชื้อที่บาดแผลนั้นเอง มีอาการไข้ หนาวสั่น อ่อนเพลีย ความดันโลหิตต่ำ อาจมีอาการอุจจาระร่วง อาเจียน และทำให้เกิดอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ จากการรับประทานอาหารทะเลดิบ (Oliver, 1989; Chiang and Chuang, 2003; Lee et al., 2005; Izumiya et al., 2011)

2.2.4 *Vibrio* spp. สายพันธุ์อื่นๆ

Vibrio mimicus มักพบการปนเปื้อนในน้ำ อาหารทะเล เช่น หอยนางรม ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยภายใน 24 ชั่วโมง โดยเกิดอาการท้องร่วง คลื่นไส้อาเจียน และปวดท้อง (Campos et al., 1996) *Vibrio fluvialis* พบครั้งแรกโดยแยกได้จากอุจจาระผู้ป่วย ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อนี้จะเกิดอาการท้องร่วง อาเจียน ปวดในช่องท้อง ถ่ายท้องประมาณ 10-15 ครั้งต่อวัน อาการป่วยคล้ายกับการเจ็บป่วยเนื่องจากเชื้อวิบิโอสายพันธุ์อื่นๆ มักพบการปนเปื้อนในหอยนางรมดิบ กุ้งปลา *Vibrio alginolyticus* มักพบการปนเปื้อนในอาหารทะเลและน้ำทะเล ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารและมักทำให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผลและตา พบการระบาดมากในฤดูร้อน (Oliver and Kaper, 1997) *Vibrio harveyi* เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในน้ำเค็ม ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในการเลี้ยงกุ้ง และเป็นสาเหตุของโรคกุ้งเรืองแสง หรือโรคเพชรพลอย ซึ่งเป็นอันตรายต่อกุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งก้ามกราม โดย *Vibrio harveyi* จะอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของ

กุ้ง เชื้อ *Vibrio harveyi* จะแพร่กระจายออกมาสู่แหล่งน้ำและเมื่อแม่กุ้งวางไข่เชื้อ *Vibrio harveyi* จะติดออกมากับไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเค็ม พีเอชและอุณหภูมิมีผลต่อการระบาดของแบคทีเรียชนิดนี้ อาการของกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่ากุ้งอ่อนแอ ไม่ว่ายน้ำ ไม่กินอาหาร ตัวขุ่นขาว หรือสังเกตได้ในเวลากลางคืนที่ไม่มีแสง จะเห็นแสงสีเขียวลอยขึ้นตามการขึ้นลงของกุ้ง (Pizzutto and Hirst, 1995; Chrisolite et al., 2008)

2.3 วิธีการจำแนกเชื้อ *Vibrio* spp.

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบวิบริโอที่ปนเปื้อนในอาหารหรือผลิตภัณฑ์ มีทั้งวิธีเชิงปริมาณ (Quantitative) และเชิงคุณภาพ (Qualitative) ซึ่งวิธีที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาใช้ยังคงเป็นวิธีดังเดิมที่ประกอบด้วย ขั้นตอน pre-enrichment, selective enrichment, selective plating, biochemical test และ serological test (US Food and Drug Administration, 2004) ซึ่งใช้เวลานานถึง 7-10 วัน และบางสปีชีส์ก็ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (non culturable bacteria) ในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งอาจเป็นสมบัติเฉพาะตัวของเชื้อเองหรืออาจเกิดจากการบาดเจ็บของเซลล์จากกระบวนการแปรรูป เช่น การใช้ความร้อน การแช่แข็ง และการใช้ความดัน เป็นต้น จึงมีผลทำให้ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวทั้งที่โดยแท้จริงแล้วมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในตัวอย่างอาหาร จึงเป็นข้อกำจัดประการหนึ่งของวิธีดั้งเดิมส่งผลให้ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ครอบคลุมทุกสปีชีส์จึงทำให้ไม่สามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบนิเวศอาหารได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียได้อย่างครอบคลุมมากขึ้น วิธีการที่ใช้ในการตรวจวิบริโอมีดังต่อไปนี้

2.3.1 วิธีมาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.1.1 Selective plating

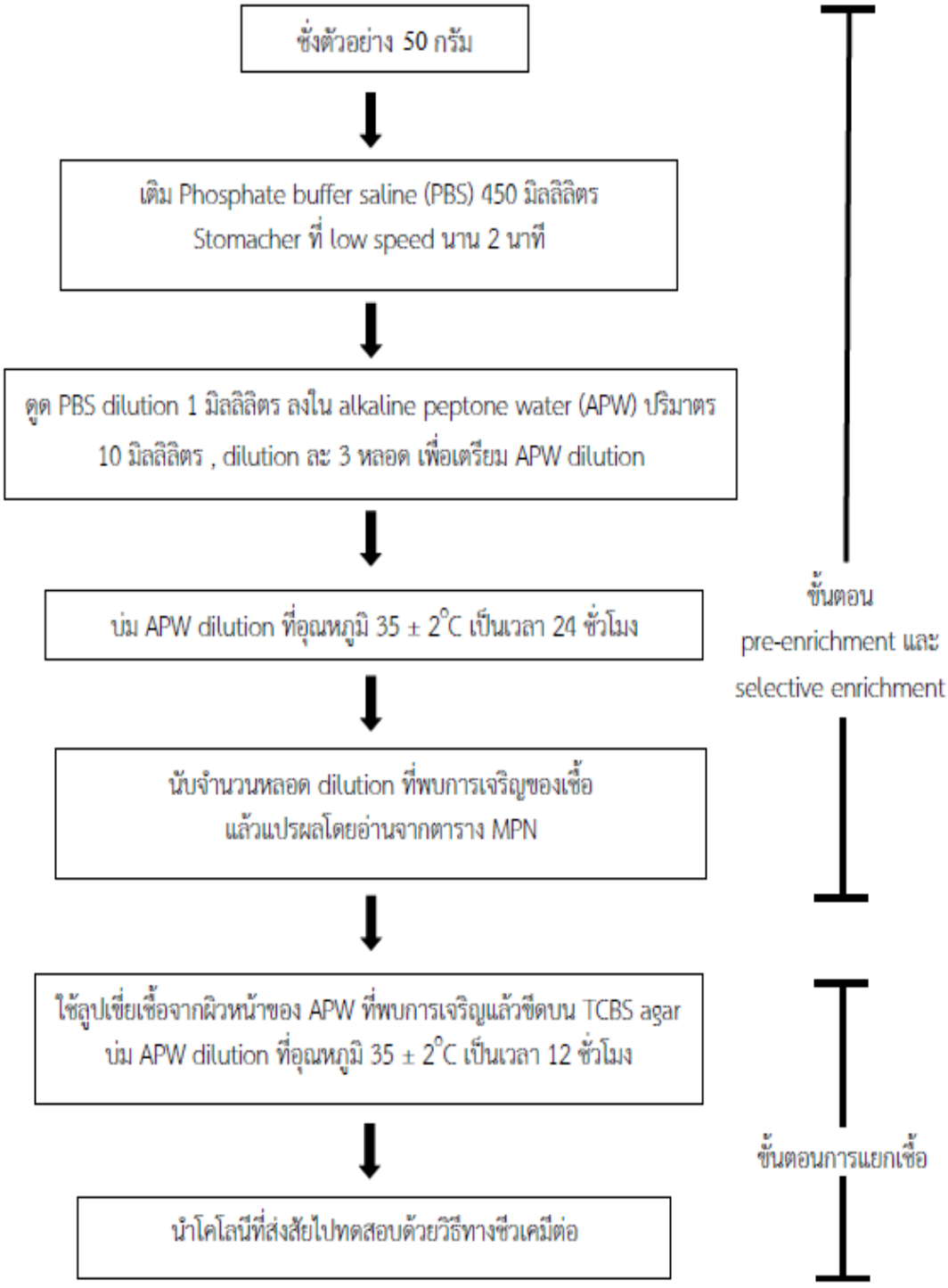
เป็นวิธีการตรวจสอบวิบริโอที่ใช้ประเมินระดับการปนเปื้อนซึ่งเป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative) โดยองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US Food and Drug Administration, 2004) โดยวิธีการนี้เริ่มจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ pre-enrichment โดยในขั้นตอนนี้จะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บฟื้นตัวและเพิ่มจำนวน ทำให้โอกาสในการตรวจพบในอาหารมีมากขึ้น จากนั้นจะเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งแบบ selective plating โดยใช้ Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS agar) ซึ่งมีคุณสมบัติ selective differential plating เพื่อแยกโคโลนี จากนั้นนำโคโลนีที่สงสัยไปตรวจยืนยันด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นต้น การ

ตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะใช้เวลานานกว่า 5 วันจึงจะทราบผลการตรวจสอบ ซึ่งเป็นข้อด้อยของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบอื่นๆดังจะกล่าวต่อไป

2.3.1.2 Most probable number (MPN)

วิธี MPN เป็นวิธีการตรวจสอบวิบริโอที่ใช้ประเมินระดับการปนเปื้อนซึ่งเป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณ (Quantitative) โดยองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US Food and Drug Administration, 2004) กำหนดให้วิธี MPN เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจระดับการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 2.1 วิธีการนี้เริ่มจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ pre-enrichment และ selective enrichment โดยในขั้นตอนนี้จะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บฟื้นตัวและเพิ่มจำนวน ทำให้โอกาสในการตรวจพบในอาหารมีมากขึ้น นับจำนวนหลอดที่พบการเจริญของเชื้อและเทียบผลกับตาราง MPN จากนั้นนำหลอดที่พบการเจริญของเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งแบบ selective plating โดยใช้ Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS agar) ซึ่งมีคุณสมบัติ selective differential plating เพื่อแยกโคโลนี จากนั้นนำโคโลนีที่สงสัยไปตรวจยืนยันด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่นการเจริญในเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ การสร้างสาร hemolysin และคุณสมบัติทางแอนติเจน เป็นต้น การตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะใช้เวลานานกว่า 5 วันจึงจะทราบผลการตรวจสอบ ซึ่งเป็นข้อด้อยของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบอื่นๆดังจะกล่าวต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 2.1 วิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีมาตรฐาน MPN

ที่มา : ดัดแปลงจาก US Food and Drug Administration (2004)

2.3.2 วิธีทางเลือก

คือ วิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อทำให้การทดสอบทำได้อย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่เป็นวิธีทางการค้า และบางวิธีก็ได้รับการรับรองพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการต่างๆดังต่อไปนี้

2.3.2.1 Biochemical identification test kit

Biochemical identification test เป็นชุดทดสอบที่ผลิตเพื่อทำให้การวิเคราะห์ทางชีวเคมีทำได้ง่ายขึ้น เป็นการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อเพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ดูลักษณะการใช้สารอาหาร การหมัก หรือการใช้น้ำตาล รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆเพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนก เชื้อวิบริโอแสดงดังตารางที่ 2.1 นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาและออกแบบชุดทดสอบเพื่อลดระยะเวลาและเพิ่มความสะดวกในการตรวจทางชีวเคมี เช่น ชุดทดสอบ API และ เครื่องจำแนกจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEK®2 system บริษัท Biomerieux (แสดงดังภาพที่ 2.2) ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีที่จำแนก (Identification) จีนัสและสปีชีส์ของแบคทีเรีย โดยอาศัยความสามารถในการใช้สารอาหารที่แตกต่างกัน และอ่านผลการเปลี่ยนแปลงสีและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยผลการทดสอบที่ได้สามารถเทียบเคียงได้กับวิธีการดั้งเดิมและประหยัดเวลามากกว่า ยกตัวอย่างเช่นเครื่องจำแนกจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEK®2 system ซึ่งเป็นชุดทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียซึ่งประกอบด้วยการ์ดที่ภายในบรรจุ biochemical substrate เมื่อเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่อยู่ในรูปสารละลาย (suspension) และใส่ลงในแผ่นการ์ด VITEK®2system หลังจากนั้นจึงนำการ์ดเข้าไปบ่มในตู้และเครื่องอ่าน (incubator/reader) ของเครื่อง เครื่องจะอ่านค่าการดูดกลืนแสงทุกๆชั่วโมงจากช่องบรรจุสับสเตรทซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาหรือการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละช่อง และรายงานผลภายใน 4-12 ชั่วโมง (ขึ้นกับชนิดของเชื้อ) ซึ่งข้อจำกัดของการใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีชนิดดังกล่าวคือก่อนการใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีจำเป็นต้องทำการแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ก่อน และทำการจำแนกจากรูปร่างและการติดสีด้วยการย้อมแกรม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกใช้ชุดทดสอบให้เหมาะสม ซึ่งวิธีนี้ได้รับการรับรองให้เป็นวิธีมาตรฐานหมายเลข AOAC2011 (Pincus; Boer and Beumer, 1999)

ภาพที่ 2.2 เครื่อง VITEK ®2 system

2.3.2.2 Dry rehydratable film method

Dry rehydratable film method เป็นวิธีที่ดัดแปลงโดยอาศัยหลักการ agar plating ที่ประกอบด้วยสารอาหารที่แห้งที่เคลือบลงบนแผ่นฟิล์มพร้อมกับสารที่ทำให้อาหารละลายได้ในน้ำเย็น เมื่อเติมตัวอย่างที่เป็นของเหลวลงไป สารอาหารที่แห้งจะละลายออกมาเป็นอาหารให้จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโตได้หลังจากที่บ่มเชื้อ ข้อดีของวิธีการนี้คือประหยัดแรงงานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและประหยัดพื้นที่ในการบ่มเชื้อและการเก็บเพลทและโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อดังกล่าวโดยไม่ต้องทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Boer and Beumer, 1999; Kodaka et al., 2009b) ซึ่ง Dry rehydratable film สำหรับตรวจวิบริโอได้แก่ Complact Dry ของบริษัท NISSUI ประทศญี่ปุ่น ปัจจุบันมีการพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำหรับ *Vibrio parahaemolyticus* เพียงชนิดเดียวและยังไม่มีชุดทดสอบสำหรับวิบริโอสปีชีส์อื่นๆ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ครอบคลุมทุกสปีชีส์และไม่สามารถประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบนิเวศอาหารได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม Vibrionaceae ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล

Biochemical characteristics of human pathogenic Vibrionaceae commonly encountered in seafood*											
	V. algi-nolyticus	*V. cholerae*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V.hollisae*	*V. metschni kovii*	*V. mimicus*	*V. parahae-molyticus*	*V.vulnificus*	*A. hydro-philia***	*P.shigel-loides***
TCBS agar	Y	Y	Y	Y	NG	Y	G	G	G	Y	G
mCPC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
CC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
AGS	KA	Ka	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA	KK	nd
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Omithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lysine decarboxylase	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
Growth in (W/V) 0 % NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Growth in (W/V) 3 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in (W/V) 6 % NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Growth in (W/V) 8 %NaCl	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Growth in (W/V) 10%NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	+	V	-	nd	V	+	+	+	V	+

*Adapted from Elliot *et al.*(31), ** *Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides*

Abbreviations: TCBS, thiosulfate-citrate-bile dalt-sucrose; mCPC, modified cellobiose –polymyxin B-colistin; AGS, arginine-glucose slant;

Y = yellow NG = no or poor growth S = susceptible nd = not done G = green V = variable among strains R = resistant P = purple V = variable KK = Slant alkaline / Butt alkaline KA = Slant alkaline / Butt acidic

Ka = Slant alkaline / Butt slightly acidic

ที่มา : (Bacteriological analytical manual (BAM); USFDA, 2004)

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม Vibrionaceae ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล (ต่อ)

Biochemical characteristics of human pathogenic Vibrionaceae commonly encountered in seafood*												
		V. algi-nolyticus	*V. cholerae*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V.hollisae*	*V. metschni kovii*	*V. mimicus*	*V. parahae-molyticus*	*V.vulnificus*	*A. hydro-philia***	*P.shigel-loides***
Acid From :	Sucrose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	V	-
	D-Cellobiose	-	-	+	-	-	-	-	V	+	+	-
	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-
	Arabinose	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V	-
	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-
	D-Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	-
	ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	Voges-Proskauer	+	V	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Sensi-tivity to :	10 µg O/129	R	S	R	R	nd	S	S	R	S	R	S
	150 µg O/129	S	S	S	S	nd	S	S	S	S	R	S
	Gelatinase	+	+	+	+		+	+	+	+	+	-
	Urease	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-

*Adapted from Elliot *et al.*(31), ** *Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides*

Abbreviations: TCBS, thiosulfate-citrate-bile dalt-sucrose; mCPC, modified cellobiose –polymyxin B-colistin; AGS, arginine-glucose slant;

Y = yellow NG = no or poor growth S = susceptible nd = not done G = green V = variable among strains R = resistant P = purple V = variable KK = Slant alkaline / Butt alkaline KA = Slant alkaline / Butt acidic

Ka = Slant alkaline / Butt slightly acidic

ที่มา : (Bacteriological analytical manual (BAM); USFDA, 2004)

2.3.2.3 Chromogenic medium

อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromogenic medium พัฒนาขึ้นโดยการใช้อาหารที่มีการเติมสารที่ทำให้เกิดสี (Chromogenic) เพื่อใช้ตรวจนับจำนวนและแยกชนิดของเชื้อได้โดยตรงบนจานเพาะเชื้อ โดยไม่ต้องแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ก่อนเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ สารประกอบเหล่านี้จะเปลี่ยนเป็นสีที่ชัดเจนเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ส่วนมากสารประกอบที่ทำให้เกิดสีจะเป็นพวก Phenol derivative (Manafi, 1996) ยกตัวอย่างเช่น CHOMagar Vibrio (CV) (Hara-Kudo et al., 2001) ซึ่งมีคุณสมบัติในการจำแนก *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Vibrio cholera*e และ *Vibrio alginolyticus* โดยอาศัยสมบัติในการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งย่อยซับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้โคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นสีม่วง และโคโลนีของ *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio cholerae* จะมีสีเขียวอมฟ้า ส่วนโคโลนีของ *Vibrio alginolyticus* จะไม่มีสี และพบว่า Chromogenic medium มีความจำเพาะและถูกต้องในการตรวจสอบเชื้อกลุ่มวิบริโอมากกว่า TCBS agar (Hara-Kudo et al., 2001; Blanco-Abad et al., 2009) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังต้องยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ทางชีวเคมี และเป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพเท่านั้นและไม่สามารถประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบนิเวศอาหารได้อย่างสมบูรณ์

2.3.2.4 Immunoassay

ใช้หลักการของระบบภูมิคุ้มกันหรือปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจหาจุลินทรีย์และสารพิษที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น เทคนิค ELISA โดยอาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้สารบางอย่างเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้น โดยนำสารไปติดฉลากบนแอนติเจนหรือแอนติบอดี สารที่ติดฉลากอาจจะเป็นสารกัมมันตรังสี เอนไซม์ หรือสารเรืองแสงเป็นต้น การจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีจะมีลักษณะเหมือนแซนวิช โดยส่วนใหญ่แอนติบอดีตัวแรกจะถูกตรึงไว้กับหลอดที่ทำด้วย polystyrene ของ microtiter plate เมื่อเติมตัวอย่างที่มีเชื้อหรือแอนติเจนลงไปในหลอด และบ่มเพื่อให้แอนติเจนกับแอนติบอดีจับกัน หลังจากนั้นล้างเพื่อให้สารอื่นๆที่ไม่จับกับแอนติบอดีถูกล้างออกไป หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากหรือที่เรียกว่าคอนจูเกท (conjugate) แล้วบ่มไว้ช่วงเวลาหนึ่งเพื่อให้จับกับแอนติบอดีที่ยังไม่จับกับแอนติเจนจากตัวอย่าง แล้วจึงล้างเพื่อให้คอนจูเกทที่ไม่ติดกับแอนติเจนหลุดออกและเติมด้วยสับสเตรทเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่งค่าที่วัดได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง ถ้ามีเอนไซม์อยู่สับสเตรทจะถูกเลี่ยนไปเป็นสารที่เกิดสีหรือสารเรืองแสง ซึ่งจากหลักการดังกล่าวได้มีการพัฒนาเป็นชุดทดสอบ ELISA ของบริษัท Bio Threat *Alert* สำหรับตรวจ *Vibrio cholerae* ข้อดีของวิธีการนี้ คือเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ให้ผลเร็ว และแม่นยำ ข้อจำกัดคือ ชุดทดสอบดังกล่าวยังมีเฉพาะชุดทดสอบเชื้อ *Vibrio cholerae* เท่านั้น ยังไม่มีชุดทดสอบสำหรับวิบริโอสปีชีส์อื่นๆ และชุดทดสอบ

ELISA นี้สามารถตรวจเชื้อได้ตั้งแต่ 10^3-10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการตรวจหาเชื้อโรคในอาหารโดยตรงจึงไม่สามารถทำได้เพราะต้องทำการเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลวก่อนอย่างน้อย 16-24 ชั่วโมง ก่อนที่ทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบดังกล่าว (Boer and Beumer, 1999; Odumeru and León-Velarde, 2012)

2.3.2.5 Nucleic acid hybridization

Nucleic acid hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจสอบจุลินทรีย์โดยอาศัยการจับกันระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอของจุลินทรีย์เป้าหมายกับโพรบดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับของกรดนิวคลีอิคเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (complementary base) โดยทั่วไปโพรบดีเอ็นเอจะมีความยาวประมาณ 15-30 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งความจำเพาะของวิธีการนี้จะขึ้นอยู่กับลำดับของกรดนิว-คลีอิคบนโพรบ (Boer and Beumer, 1999) โดยหลักการจะใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเรืองแสงไปตรวจหาจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารซึ่งถ้าในอาหารมีจุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ก็จะเกิดการจับกันระหว่าง probe กับดีเอ็นเอของจุลินทรีย์เป้าหมาย วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง มีการนำหลักการนี้ไปใช้ในการพัฒนาวิธี direct plating เพื่อตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร (Depaola et al., 2003; Raghunath et al., 2008) แล้วติดตามการจับกันของดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การทำ colony lift, hybridization และ colorimetric detection วิธีเหล่านี้ประกอบด้วยหลายขั้นตอนและจำเป็นต้องใช้ทักษะและความเชี่ยวชาญในการปฏิบัติงาน ซึ่งจะใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 1-2 วัน และการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบ นอกจากนี้ยังไม่มีการพัฒนาชุดทดสอบสำหรับวิบริโอสปีชีส์อื่นๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ

1. Most probable number (MPN)	
หลักการ	เป็นวิธีการตรวจสอบวิบริโอที่ใช้ประเมินระดับการปนเปื้อนซึ่งเป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณ (Quantitative) ประกอบด้วยขั้นตอน pre-enrichment, selective enrichment, selective plating และทดสอบทางชีวเคมี
เชื้อวิบริโอที่วิเคราะห์ได้	*Vibrio parahaemolyticus*
Reference	วิธีมาตรฐาน US Food and Drug Administration, 2004
ตัวอย่างงานวิจัย	Blanco-Abad et al. (2009) Hara-Kudo et al. (2001)
2. Selective plating	
หลักการ	เป็นวิธีการตรวจสอบวิบริโอที่ใช้ประเมินระดับการปนเปื้อนซึ่งเป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพ(Qualitative) ประกอบด้วยขั้นตอน selective enrichment, selective plating และทดสอบทางชีวเคมี
เชื้อวิบริโอที่วิเคราะห์ได้	*Vibrio cholelae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio fluvialis, Vibrio mimicus,* *Vibrio alginolyticus, Vibrio harveyi, Vibrio furnissii, Vibrio vulnificus* *Plesiomonas shigelloides, Aeromonas hydrophila* เป็นต้น
Reference	วิธีมาตรฐาน US Food and Drug Administration, 2004
ตัวอย่างงานวิจัย	Blanco-Abad et al. (2009) Hara-Kudo et al. (2001) Messelhäusser et al. (2010) Thongchankeaw et al. (2011)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ (ต่อ)

3. Biochemical identification test kit เช่น API และ VITEK® 2 system	
หลักการ	เป็นการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อเพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ดูลักษณะการใช้สารอาหาร การหมัก หรือการใช้น้ำตาล รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆเพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ โดยนำโคโลนีของเซลล์ที่ทำการแยกให้ได้เซลล์ที่ บริสุทธิ์ นำมาทดสอบทางชีวเคมีและเทียบผลกับฐานข้อมูล
เชื้อวิบริโอที่วิเคราะห์ได้	*Vibrio cholelae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio fluvialis, Vibrio mimicus, Vibrio alginolyticus, Vibrio harveyi, Vibrio furnissii, Vibrio vulnificus Plesiomonas shigelloides, Aeromonas hydrophila* เป็นต้น
Reference	วิธีมาตรฐาน AOAC 2011.17
ตัวอย่างงานวิจัย	Nakashima et al. (2007) Park et al. (2003) Kadkhoda et al. (2012)
4. Dry rehydratable film method เช่น Compact dry	
หลักการ	วิธีที่ดัดแปลงโดยอาศัยหลักการ agar pour plate ประกอบด้วยขั้นตอน selective enrichment, selective plating และ ทดสอบทางชีวเคมี
เชื้อวิบริโอที่วิเคราะห์ได้	*Vibrio parahaemolyticus* (มี test kit)
Reference	วิธีทางเลือก
ตัวอย่างงานวิจัย	Kodaka et al. (2009a)
5. Chromogenic medium	
หลักการ	ใช้อาหารที่มีการเติมสารที่ทำให้เกิดสี (Chromogenic) เพื่อใช้ตรวจนับจำนวนและแยกชนิดของเชื้อได้โดยตรงบนจานเพาะเชื้อ โดยไม่ต้องแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ก่อนเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ สารประกอบเหล่านี้จะเปลี่ยนเป็นสีที่ชัดเจนเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ประกอบด้วยขั้นตอน selective enrichment, selective plating และทดสอบทางชีวเคมี
เชื้อวิบริโอที่วิเคราะห์ได้	*Vibrio cholelae, Vibrio parahaemolyticus Vibrio fluvialis* และ *Vibrio alginolyticus*
Reference	วิธีทางเลือก
ตัวอย่างงานวิจัย	Messelhäusser et al. (2010) Thongchankeaw et al. (2011) Nakashima et al. (2007)

ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ (ต่อ)

6. Immunoassay เช่น ELISA	
หลักการ	ใช้หลักการของระบบภูมิคุ้มกันหรือปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจหาจุลินทรีย์และสารพิษที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ประกอบด้วยขั้นตอน selective enrichment และทดสอบด้วยชุดทดสอบ
เชื้อวิบริโอที่วิเคราะห์ได้	*Vibrio cholerae* (มี test kit) *Vibrio* spp.
Reference	วิธีทางเลือก
ตัวอย่างงานวิจัย	Robertsona et al. (1998) Romestand et al. (1993) (Tuteja et al., 2007)
7. Nucleic acid hybridization	
หลักการ	หลักการจะใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเรืองแสงไปตรวจหาจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารซึ่งถ้าในอาหารมีจุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ ก็จะเกิดการจับกันของ probe กับดีเอ็นเอของจุลินทรีย์เป้าหมาย
เชื้อวิบริโอที่วิเคราะห์ได้	*Vibrio spp.*
Reference	วิธีทางเลือก
ตัวอย่างงานวิจัย	Raghunath et al. (2008) (Depaola et al., 2003)

จากตารางจะเห็นได้ว่าวิธีการในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอที่กล่าวมาทุกวิธีจะต้องมีขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ (culture cell) ก่อน เพื่อแยกจุลินทรีย์เป้าหมายให้เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) และทำให้บริสุทธิ์ก่อนทำไปทดสอบเพื่อระบุชนิดต่อไป ซึ่งวิธีการที่กล่าวมาใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่ต่ำกว่า 5 วัน ใช้แรงงานคนมาก ต้องทำการเลี้ยงเซลล์ก่อนซึ่งเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของเชื้อ และบางสปีชีส์ก็ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ (non culturable bacteria) จึงทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ครอบคลุมทุกสปีชีส์และไม่สามารถประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบนิเวศอาหารได้อย่างครอบคลุมดังนั้นจึงได้มีผู้สนใจพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอในอาหารโดยไม่ต้องทำการเลี้ยงเซลล์ก่อน เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจโดยอาศัยหลักการของวิธี PCR based method โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.4 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction หรือพีซีอาร์ (PCR) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ) ในหลอดทดลอง (in vitro) หลักการพื้นฐานของพีซีอาร์จะเลียนแบบกระบวนการ DNA replication โดยปริมาณของสารพันธุกรรมที่สังเคราะห์ด้วยพีซีอาร์จะเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าในทุกๆรอบของปฏิกิริยา ซึ่งในการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมจำเป็นต้องมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template), thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), oligonucleotide primers และ บัฟเฟอร์ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารพันธุกรรมจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันและในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (Somma and Querci, 2006; Joshi and D, 2010; วัชรี อัตถทิพพหลคุณ and มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536) คือ

- ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ความร้อนจะทำให้สายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยวสองสาย (two single strands) โดยแต่ละสายจะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิด DNA replication

- ขั้นตอน Primer annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่ได้ออกแบบให้จำเพาะในลักษณะเป็นสายดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่จะสังเคราะห์ (annealing sites) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ (primer) ที่ได้ออกแบบ

- ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งทำหน้าทีนำนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆไปเข้าคู่แบบคู่สมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์ (5' ⟶ 3' extension) เอนไซม์จะเคลื่อนที่ไปตามความยาวของสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ไปเรื่อยๆจนได้ดีเอ็นเข้าคู่สมบูรณ์ ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เทคนิคพีซีอาร์ได้มีการพัฒนาและดัดแปลงให้มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ) ได้สูงขึ้นทั้งในเรื่องของปริมาณและความจำเพาะ ไม่จำกัดชนิดของสารพันธุกรรมที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ ลดปัญหาและอุปสรรคที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ปรับปรุงและลดขั้นตอนการปฏิบัติงานให้ง่ายและรวดเร็วขึ้น ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์ที่ได้มีการพัฒนาดัดแปลงได้แก่

2.4.1 Nested PCR

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐาน โดยใช้ไพเมอร์ 1 คู่ กับดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างซึ่งมีดีเอ็นเออื่นๆปนอยู่เป็นจำนวนมาก และมีผลทำให้ผลิตผลที่ได้มีจำนวนน้อยจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ทั้งนี้เกิดจากมีดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการจำนวนมากจึงขัดขวางไพรเมอร์ให้มีโอกาสจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายน้อยลงและมีผลิตผลของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ (nonspecific products) เกิดขึ้นจำนวนมาก ในขณะที่ผลิตผลของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการกลับมีน้อยลง ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงพีซีอาร์พื้นฐานเพื่อให้สามารถเพิ่มผลิตผลดีเอ็นเอที่ต้องการให้มากขึ้นและลดจำนวนผลิตผลที่ไม่ต้องการให้เหลือน้อยที่สุด โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Nested PCR ซึ่งเป็นวิธีการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยเริ่มจากการทำพีซีอาร์ปกติโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ก่อน โดยทั่วไปมักใช้ external primer เมื่อได้ผลิตผลพีซีอาร์แล้วจึงนำผลิตผลที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ด้วยไพรเมอร์คู่ที่ 2 ซึ่งใช้ internal primer ซึ่งข้อดีของวิธีการนี้คือได้จำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการและมีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่ข้อเสียคือต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ถึง 2 ครั้ง และอาจมีการปนเปื้อนจากการดูดสารละลายจากหลอดหนึ่งมายังอีกหลอดหนึ่ง (Somma and Querci, 2006; Shi et al., 2010; วัชรี อัตถทิพพหลคุณ and มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536; สุดสาย ตรีวานิช and สายพิณ ทานัชฌาสัย, 2546) ซึ่งจากเทคนิคดังกล่าวได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อวิบริโอในอาหารและน้ำทะเล โดยไพรเมอร์ที่ใช้คือ 27F, 1492R และ GC567F, 680R (Eiler and Bertilsson, 2006; Messelhäusser et al., 2010; Thongchankeaw et al., 2011)

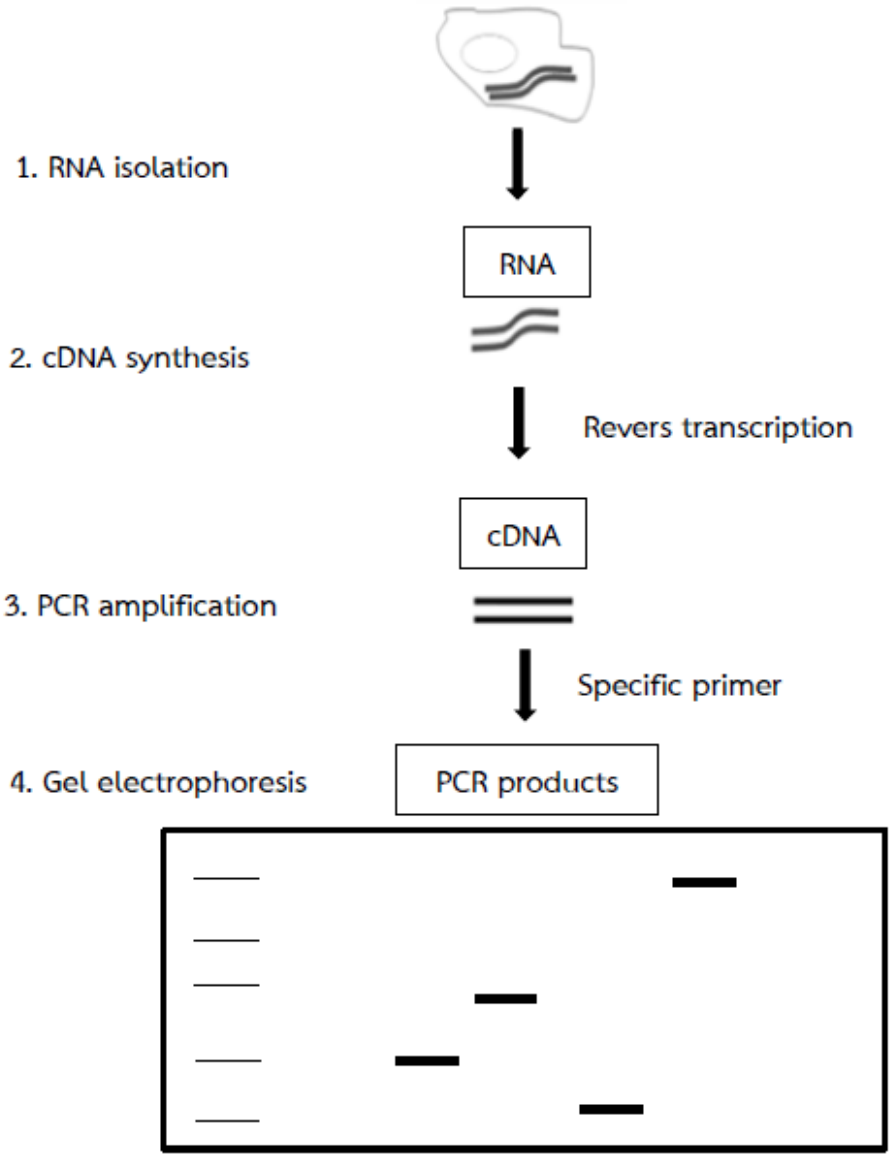
2.4.2 Multiplex PCR

เทคนิค Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานโดยให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการได้หลายชนิดมากขึ้น โดยการใช้ไพรเมอร์หลายคู่ และทำปฏิกิริยาพร้อมกันปฏิกิริยาเดียวกัน โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ต้องมีการออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เป็นคู่สมกันและให้ผลิตผลที่มีขนาดแตกต่างกัน เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ผลิตผลเหล่านั้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis ได้ ข้อจำกัดสำหรับเทคนิค Multiplex PCR คือต้องมีการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้สามารถเพิ่มจำนวนผลิตผลดีเอ็นเอได้ทุกเป้าหมายที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน ได้มีการรายงานการนำเทคนิค Multiplex PCR มาประยุกต์ใช้กับงานหลายชนิด เช่น การตรวจการหายไปของยีน (gene deletion) การตรวจหา mutant alleles (Somma and Querci, 2006; Shi et al., 2010; วัชรี อัตถทิพพหลคุณ and มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536; สุดสาย ตรีวานิช and สายพิณ ทานัชฌาสัย, 2546) มีรายงานการใช้ในการตรวจสอบ *Vibrio* spp. ในตัวอย่างหอยนางรมที่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวเพียงแค่ 10^1-10^2 CFU/g โดยต้องทำการ pre-enrichment เป็นเวลา 8 ชั่วโมงก่อน (Bej et al., 1999)

2.4.3 Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

เทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานคือต้องใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทำให้ไม่สามารถแยกได้ว่าดีเอ็นเอที่ได้เป็นดีเอ็นเอของเซลล์ที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิต ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาในการใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ และเนื่องจากเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอได้แก่ in situ hybridization มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์ 10-100 โมเลกุลใน 1 เซลล์ได้ แต่เป็นเทคนิคที่มีความยุ่งยาก ไม่สามารถตรวจตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้ ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวซึ่งเทคนิคที่มีความไวสูงและทำได้รวดเร็วคือเทคนิคที่เรียกว่า Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) ซึ่งขั้นตอนในการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค RT-PCR แสดงดังภาพที่2.3 เริ่มต้นจากการสกัดอาร์เอ็นเอแล้วใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับการทำปฏิกิริยา Reverse transcription เพื่อทำการสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) จากนั้นใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์มาเพื่อเพิ่มขยายตำแหน่งที่สนใจบน cDNA นั้น ผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้สามารถตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis ได้ (Adrover et al., 2010b) แต่เทคนิคนี้ก็ยังมีข้อจำกัดคืออาร์เอ็นเอเป็นสารที่เสียคุณสมบัติได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอ การสกัดอาร์เอ็นเอต้องทำหลายขั้นตอนและต้องมีขั้นตอน Reverse transcriptionเพื่อสังเคราะห์ cDNA และเกิดการปนเปื้อนของเอนไซม์ ribonuclease ได้ง่าย ดังนั้นในการวิจัยจะต้องทำภายใต้สภาวะที่เคร่งครัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องสวมถุงมือทุกครั้งและเปลี่ยนบ่อยๆ และน้ำที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ส่วนข้อดีของเทคนิค RT-PCR คือไม่มีการรบกวนจากนิวคลีโอไทด์อื่นๆ สามารถตรวจวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตได้ ความไวสูงและทำได้รวดเร็ว จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยหลายชนิดเช่น ใช้ในการตรวจหาผลิตผลของยีน (gene transcripts) ในสิ่งมีชีวิตที่มีปริมาณของอาร์เอ็นเอน้อยๆ สามารถตรวจวิเคราะห์ผลิตผลของยีนได้พร้อมกันหลายๆชนิด ใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของอาร์เอ็นเอที่สนใจได้ (Daavis et al., 1986; Berger and Kimmel, 1987; Shi et al., 2010; วัชรี อัตถทิพพหลคุณ and มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนในการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค RT-PCR

ที่มา: ดัดแปลงจาก Adrover et al. (2010a)

2.5 การตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR

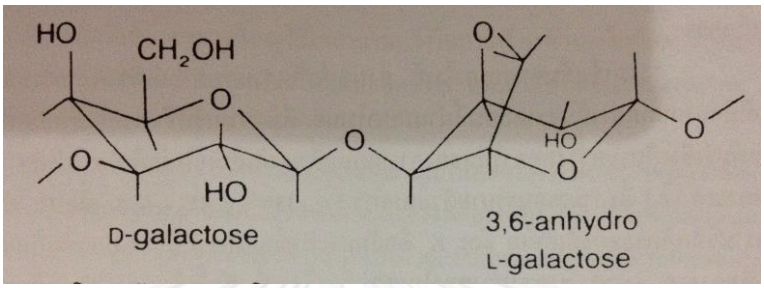
การตรวจผลิตผลพีซีอาร์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของผลิตผลพีซีอาร์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้วิเคราะห์ได้เพียงปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแต่ไม่สามารถระบุขนาดของดีเอ็นเอได้ (Saulnier et al., 2009) วิธี High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นวิธีการใช้เครื่อง HPLC ตรวจวัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ ion exchange column ซึ่งผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้สามารถนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้โดยตรงโดยไม่ต้องแยกสารพันธุกรรมก่อนและสามารถวัดได้ทั้งผลิตผลพีซีอาร์ทั้งที่ติดฉลากและไม่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แต่ในส่วนนี้ต้องวัดการเรืองแสงที่ปลดปล่อยออกมา ส่วนการวัดขนาดผลิตผลพีซีอาร์จะใช้การเติมสารมาตรฐานลงไป (internal standard) เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ (Hoshino et al., 1998; Ortiz et al., 1998) และวิธี Gel Electrophoresis เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไปเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว โดยการทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า ซึ่งสารที่มีประจุ ขนาด และรูปทรงต่างกันจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ในตัวกลางได้ระยะทางที่แตกต่างกัน ในการตรวจวิเคราะห์ผลิตผลพีซีอาร์จะต้องคำนึงถึงขนาดของผลิตผลที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ หากเป็นผลิตผลที่มีขนาดใหญ่จะใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นตัวกลาง แต่ถ้าผลิตผลมีขนาดเล็กจะใช้พอลิอะคลิลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) เป็นตัวกลาง จากนั้นเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวแน่นอน (DNA marker) ตรวจสอบผลโดยการย้อมแถบเจลด้วย ethidium bromide หรือ SYBR Green ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ทำให้มองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนภายใต้แสงยูวี สามารถตรวจสอบแถบที่มีดีเอ็นเอเพียง 1-10 นาโนกรัม และสารมารถนำแถบดีเอ็นนี้ไปทำการศึกษาต่อ เช่นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงการโคลนนิ่งต่างๆได้ (Madden et al., 1989; Westermeier et al., 2001; อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545) แต่ข้อจำกัดของอะกาโรสเจลเจลอิเล็กโตรโฟริซีสหรือพอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีสคือไม่สามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันหรือเท่ากันออกจากกันได้ สามารถบอกได้เพียงแต่ว่ามีขนาดของดีเอ็นเอเท่าไรเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแน่นอน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Agarose Gel Electrophoresis)

อะกาโรสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ได้จากการสกัดสาหร่ายทะเล มีโครงสร้างดังภาพที่ 2.4 สามารถใช้วิเคราะห์ผลิตผลพีซีอาร์ที่มีขนาดล็กมากประมาณ 10-500 คู่เบส การเตรียมอะกาโรสเจลทำได้โดยหลอมอะกาโรสเจลในบัฟเฟอร์จนกระทั่งได้สารละลายใส โปร่งแสง หลังจากนั้นเทสารละลายอะกาโรสเจลลงในแม่พิมพ์ ปล่อยให้แข็งตัว จากนั้นก็สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลิตผลพีซีอาร์โดยวางเจลไว้ในบัฟเฟอร์และทำให้เกิดสนามไฟฟ้าตลอดเจล ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นกลางก็จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ทำให้เราสามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้ ซึ่ง

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลได้แก่ ขนาดโมเลกุลและโครงสร้างของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของอะกาโรส แสดงดังตารางที่ 2.3 ความต่างศักย์และองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ เป็นต้น



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของอะกาโรสเจล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Westermeier et al. (2001)

ตารางที่ 2.3 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้อะกาโรสเจลที่มีปริมาณอะกาโรสต่างๆกัน

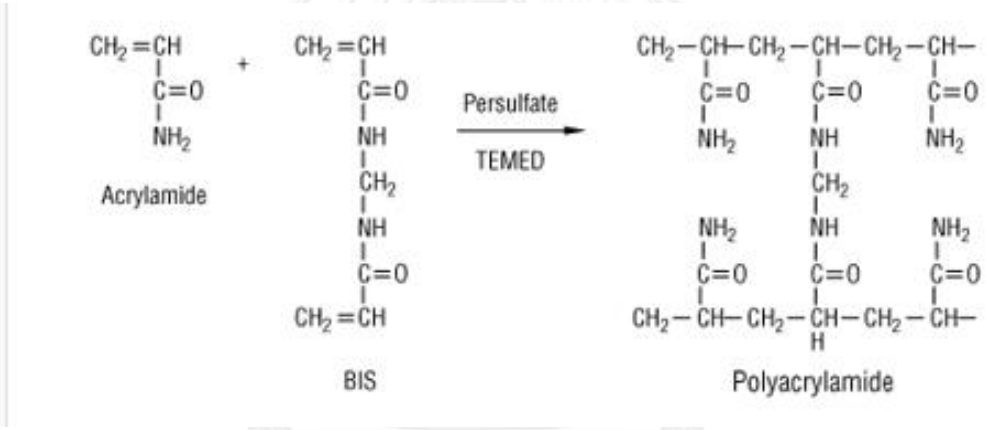
ปริมาณอะกาโรสในเจล (% w/v)	ช่วงการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอ (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sambrook et al. (1989)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5.2 พอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

พอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีสเป็นวิธีการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก(50-1,000 bp) โดยพอลิอะคลิลาไมด์เป็นเจลที่เกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization reaction) ของอะคลิลาไมด์ (acrylamide) และบิสอะคลิลาไมด์ (bis-acrylamide) ไปเป็นสายยาวของพอลิอะคลิลาไมด์ ดังภาพที่ 2.5 โดยจะมีลักษณะเป็นตาข่ายร่างแห ความเข้มข้นของอะคลิลาไมด์จะเป็นตัวกำหนดความยาวของพอลิอะคลิลาไมด์ ในขณะที่บิสอะคลิลาไมด์เป็นตัวกำหนดขนาดของการเชื่อมโยงของตาข่ายร่างแห ซึ่งความเข้มข้นของสารทั้งสองจะเป็นตัวกำหนดขนาดของช่องว่างภายในโมเลกุลของพอลิอะคลิลาไมด์เพื่อใช้ในการแยกขนาดดีเอ็นเอดังแสดงในตารางที่ 2.4 นอกจากนี้ยังมีการเติม TEMED และ ammonium persulfate ลงในสารละลายเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization reaction) ในขณะที่มีการเตรียมเจลพอลิอะคลิลาไมด์ ซึ่งพอลิอะคลิลาไมด์เจลเหมาะกับการวิเคราะห์ผลิตผลพีซีอาร์ที่มีขนาดเล็ก



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของพอลิอะคลิลาไมด์เจล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Westermeier et al. (2001)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของพอลิอะคลิลาไมด์เจลในการแยกดีเอ็นเอ

% Polyacrylamide gel	ขนาดของดีเอ็นเอที่เหมาะสมการแยก (pb)
6	300-1,000
8	200-400
10	100-300

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bio-Rad. (2010)

2.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตผลพีซีอาร์

2.6.1 Sequencing analysis

เป็นวิธีการวิเคราะห์ลำดับของเบสของดีเอ็นเอแล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุว่าคือดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะต้องทำการเลี้ยงเซลล์ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) และนำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ก่อนจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับของเบส (Prakitchaiwattana et al., 2004; Thompson et al., 2004; Eiler and Bertilsson, 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6.2 DNA banding pattern

การตรวจสอบผลิตผลพีซีอาร์หรือแถบดีเอ็นเอ โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการจำแนกสายพันธ์ของจุลินทรีย์ โดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางสายพันธ์ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ศึกษารูปแบบแถบดีเอ็นเอของวิบริโอได้แก่วิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Zhaoa et al., 2011) วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Yang et al., 2008) วิธี Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Thompson et al., 2007b) ซึ่งก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวจะต้องทำการเลี้ยงเซลล์และทำการแยกเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) ก่อนแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ต่อ

มีการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยไม่ต้องทำการเลี้ยงเซลล์ก่อน แต่ทำการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากตัวอย่างโดยตรง และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้แก่ วิธีการ PCR-DGGE ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

2.7 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

2.7.1 หลักการของ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เป็นเทคนิคที่สามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยการใช้กระแสไฟฟ้าโดยอาศัยตัวกลางเป็นพอลิอะคลิลาไมด์เจล โดยสามารถแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวของดีเอ็นเอเท่ากันแต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เบสต่างกันได้ เนื่องจากอาศัยความแตกต่างของสัดส่วนความเข้มข้นของสารยูเรียและฟอร์มาไมด์ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturant) โดยส่วนบนของเจลจะมีความเข้มข้นน้อยและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆไปสู่ส่วนล่างของเจลที่มีความเข้มข้นมาก ซึ่งความเข้มข้นหรือปริมาณของคู่เบส G-C ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละคู่ที่แตกต่างกันนี้ทำให้การเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นเจลแตกต่างกันด้วย จึงสามารถมองเห็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลต่างกัน (D. Ercolini, 2004) ดังนั้น DGGE จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถแยกดีเอ็นเอที่สนใจได้แม้ดีเอ็นเอดังกล่าวจะมีลำดับเบสต่างกันเพียงหนึ่งตำแหน่งก็ตาม นอกจากนี้ยังสามารถตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไปได้สำหรับในการศึกษาเชิงลึก คุณภาพของ DGGE ขึ้นอยู่กับคุณภาพของพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการศึกษา โดยพีซีอาร์ที่ได้ควรเป็นดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ มีขนาดที่เหมาะสม และมีปริมาณเพียงพอ จุดเด่นของเทคนิค DGGE คือไม่ต้องทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ก่อนทำให้ประหยัดเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอได้โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค DGGE จะต้องได้ปริมาณดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะที่มี GC clamp ที่ปลายสาย 5’ ของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อทำหน้าที่เป็น high melting domain บนสายดีเอ็นเอทำให้ไม่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยวเมื่อเคลื่อนที่บนเจล เมื่อได้ PCR amplicon แล้วจึงนำไปวิเคราะห์รูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนเจล polyacrylamide โดยอาศัยปริมาณคู่เบส G-C ที่แตกต่างกันบนสายดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดการเคลื่อนที่ในความเข้มข้นของสาร denaturant ที่ต่างกัน (Muyzer และคณะ, 1993)

2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบนิเวศอาหาร

การใช้เทคนิค DGGE เริ่มขึ้นจากการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในดิน (Muyzer และคณะ, 1993) ต่อมาจึงมีการเริ่มมีการประยุกต์ใช้ในการติดตามประชากรจุลินทรีย์ในอาหาร เช่น ชีส (Ercolini และคณะ, 2001b; 2002) และไส้กรอก (Cocolin และคณะ, 2000;2001a) รวมไปถึงอาหารหมักชนิดอื่นๆ โดยเทคนิค DGGE สามารถใช้ได้กับสายดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 200 bp สูงสุดไม่เกิน 500 bp เท่านั้น (Muyzerand Smalla, 1998) สามารถศึกษาแบคทีเรียในตัวอย่างได้โดยตรง เป็นการลดปัญหาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหาร (non-culturable) ได้ และสามารถประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างครอบคลุมมากขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่ สะดวก รวดเร็ว และไม่ยุ่งยาก จากหลักการดังกล่าวได้มีการนำเทคนิค PCR-DGGE มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารหลายชนิด เช่น แบคทีเรียแลคติกในกิมจิ (Lee et al., 2005) ยีสต์ในระบบนิเวศขององุ่น (Prakitchaiwattana et al., 2004) เป็นต้น และมีการนำเทคนิค RT-PCR-DGGE มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เช่น ตรวจสอบความหลากหลายของยีสต์ในไวน์ (Mills et al., 2002) และการตรวจสอบการปนเปื้อนของยีสต์และราในโยเกิร์ต (Bleve et al., 2003) เป็นต้น

การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการระบุชนิดของเชื้อวิบริโอ ได้แก่การใช้เทคนิคDGGE ในการตรวจสอบและหาปริมาณประชากรเชื้อวิบริโอ โดยทดสอบกับเชื้อวิบริโอมาตรฐาน 7 สปีชีส์ และตัวอย่างน้ำทะเล โดยใช้ไพรเมอร์ G567F และ 680R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอได้ และเมื่อใช้ denaturing gradient (urea และ formamide) ความเข้มข้น 45-70% สามารถตรวจหาเชื้อและแยกแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอแต่ละ สปีชีส์ออกจากกันได้ ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) มีค่าประมาณ 180 เซลล์ต่อตัวอย่างที่นำมาสกัด (Eiler and Bertilsson, 2006) มีรายงานการใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างน้ำจากหาดสนและหาดฤษี แต่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ 27F กับ 1492R และ GC567F กับ 680R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio aestuarianus*, *Vibrio neptunius*, *Vibrio brasiliensis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio tubiashii* และ *Vibrio sinaloensis* และสามารถแยกแถบดีเอ็นเอของทุกเชื้อออกจากกันได้ด้วยเทคนิค DGGE ที่ซึ่งใช้สภาวะเดียวกันกับงานวิจัยแรก (Thongchankeaw et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ PCR-DGGE ในการตรวจสอบ *Vibrio vulnificus* ในหอยกาบพบว่าในตัวอย่างหอยกาบที่ไม่ผ่านการ pre-enrichment มีค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) มีค่าประมาณ $1x10^2$ CFU/กรัม ส่วนในตัวอย่างหอยกาบที่ผ่านการ pre-enrichment เป็นเวลา 5 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR มีค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ ประมาณ 1 CFU/กรัม (Wang and Levin, 2006) ส่วนการนำเทคนิค RT-PCR-DGGE มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของ *Vibrio* spp.

ที่มีชีวิต มีเพียงรายงานเรื่องการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ที่อยู่ในสภาวะ viable but non culturable โดยตรวจสอบยีนในตำแหน่ง *16S-23S* rDNA ยีน *rpoS, tdh1*และ *tdh2* พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่อยู่ในสภาวะ viable but non culturable ได้โดยวิธี RT-PCR และสามารถตรวจพบเฉพาะที่ตรวจสอบจากยีนในตำแหน่ง *16S-23S* rDNA และยีน *rpoS* เท่านั้น (Coutard et al., 2005)

มีรายงานการนำหลักการนี้มาใช้ในการการตรวจสอบและหาปริมาณประชากร *Vibrio* spp โดยศึกษาเชื้อ *Vibrio* spp. มาตรฐาน 7 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ GC567F และ 680R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Vibrio* spp.ได้ และการใช้ denaturing gradient (urea และ formamide) 45-70% สามารถตรวจหาเชื้อและแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของ *Vibrio* spp. ออกจากกันได้ (Eiler และ Bertilsson, 2006) และจากการศึกษาความหลากหลายของ *Vibrio* spp. จากน้ำทะเลบริเวณอ่าวสนและอ่าวฤษีของเกาะตะลุเตาโดยวิธี Nested PCR-DGGE ใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1472R ในการทำ PCR รอบที่ 1 และทำ PCR รอบที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ GC567F และ 680R พบว่าการวิเคราะห์ความหลากหลายของ *Vibrio* spp. ด้วยเทคนิค PCR-DGGE จากตัวอย่างน้ำบริเวณอ่าวสนและอ่าวฤษีตรวจพบเชื้อ *Vibrio harveyi, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio proteolyticus, Vibrio aestuarianus, Vibrio neptunius*, *Vibrio brasiliensis*, *Vibrio hepatarius, Vibrio harveyi, Vibrio alginolyticus*, *Vibrio tubiashii* และ*Vibrio sinaloensis* (Thongchankeaw et al., 2011) จากงานวิจัยที่กล่าวมาจะเห็นว่า การใช้วิธี PCR-DGGE ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. เป็นวิธีการที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธี Cultural method และสามารถตรวจวิบริโอได้ครอบคลุมหลายสปีชีส์ โดยไม่ต้องทำการเลี้ยงเซลล์ก่อน จึงเป็นวิธีที่มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ เครื่องมือ/อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. Microcentrifuge 1.5 ml, Hygon, USA
2. PCR tube 0.2 ml, M
3. Pipette tip 0.01 ml, Corning Incorporated, USA
4. Pipette tip 0.2 ml, Corning Incorporated, USA
5. Pipette tip 1 ml, Corning Incorporated, USA
6. 15x90 mm. plastic petri dish, Eurotubo® Deltalab, Spain
7. VITEK®2 GN cards, BIOMERIEUX, France

3.1.2 เครื่องมือ/อุปกรณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. Autoclave, SS320 Tomy, USA
2. Balance, AB 204 Mettler Todledo, Switzerland
3. Balance, RP 310S Satorious, Germany
4. Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
5. Colony counter, Gallenkamp, Germany
6. Cryo box, SPL Life Sciences, Korea
7. DGGE with Dcode ™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, USA
8. Freezer, SF-C95, Sanyo, Japan
9. Gel documentation, Model InGenious L, Synegne, United Kingdom

10. Hot-air oven, Binder, Germany
11. Laminar flow hood, BVT 123 Issco, USA
12. Microwave, R-246 Sharp, Japan
13. Microwave, MS2127CW LG, Korea
14. Micropipette P10, Gilson, France
15. Micropipette P200, Gilson, France
16. Micropipette P200, Gilson, France
17. Micropipette P1000, Gilson, France
18. PCR rank, SPL Life Sciences, Korea
19. pH meter, Cyberscan 1000, USA
20. Power supply, Model EPS 301, GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, USA
21. Refrigerator, MR-F33X-DS Mitsubishi, Japan
22. Spectrophotometer, V-530, Jasco, USA
23. Vortex mixer, Lab-line Instrument Inc., USA
24. VITEK® 2 system, BIOMERIEUX, France

3.1.3 สารเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. ชุดน้ำยาสำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR), Fermentas, USA
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit), HyYield TM Genomic DNA Mini Kit, YBG100, RBC, Taiwan
3. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction kit), Thermo Scientific, GeneJET RNA Purification Kit, USA
4. ชุดสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis kit), Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, USA
5. ไพรเมอร์ (primer), 1st Base, Singapore
6. Agarose powder, Axygen, USA

7. Disodium ethylenediaminetetra acetate (EDTA), Anala® , England
8. DNA Ladder, GenRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas, USA
9. Ethanol, analytical grad, Mallinckrodt Chemicals, Netherlands
10. Ethidium bromide, Bio basic Inc., Canada
11. Glacial acetic acidTris base, Ultra pure, Molecular biology grade, Research Organics, Inc., USA
12. Urea, Bio basic Inc., Canada
13. Formamide, Bio basic Inc., Canada
14. TEMED, Bio basic Inc., Canada
15. Ammonium persulfate, Bio basic Inc., Canada
16. TAE buffer
17. 40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1), Bio basic Inc., Canada
18. Loading dye, Bio basic Inc., Canada

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. CHOMagar Vibrio (CV), Merck, Germany
2. Peptone Bacteriological, Himedia, India
3. Tryptic soy agar, Merck, Germany
4. Tryptic soy broth, Merck, Germany
5. Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar), Merck, Germany
6. Sodium choride

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.5 สายพันธุ์จุลินทรีย์

1. *Vibrio cholerae* DMST 15778 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
2. *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
3. *Vibrio fluvialis* ATCC 33809 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
4. *Vibrio mimicus* ATCC 33653 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
5. *Vibrio alginolyticus* DMST 1480 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
6. *Vibrio harveyi* 639 (ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย)
7. *Vibrio furnissii* ATCC 35016 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
8. *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
9. *Plesiomonas shigeloides* ATCC 14029 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
10. *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
11. *Escherichia coli* ATCC 25922 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
12. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
13. *Bacillus cereus* ATCC 6633 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
14. *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
15. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp.

3.2.1.1 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

นำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่มอื่นที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อTryptic soy broth จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (US Food and Drug Administration, 2004)

3.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ (DNA/RNA extraction)

- การสกัดดีเอ็นเอ

ดูดเชื้อที่เตรียมตามข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR-DGGE โดยใช้ชุดสกัด HyYield ™ Genomic DNA Mini Kit ตามวิธีใช้ที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข.1) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปด้วยเทคนิค PCR-DGGE

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- การสกัดอาร์เอ็นเอ

ดูดเชื้อที่เตรียมตามข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ตามวิธีใช้ที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข.2) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

อ้างอิงจากรายงานของ Thompson et al. (2004) และ Eiler and Bertilsson (2006) ปฏิกิริยาจะประกอบด้วยรีเอเจนท์ดังนี้

1. 1x taq buffer with KCl
2. 0.2 mM dNTPs
3. 1 µM GC567F (forward primer) (5'CGCCCGCCGCGCCCCGCGC CCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT3')
4. 1 µM 680R (reverse primer) (5'GAATTCTACCCCCCTCTACA G3')
5. 2 mM MgCl2
6. 1.25 U taq DNA polymerase
7. DNA template 20 ng
8. Water, nuclease-free

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ

1. Initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	8	นาที
2. Denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	1	นาที
3. Annealing	อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส	3	นาที
4. Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1	นาที
5. Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	4	นาที

ทำข้อ 2) ถึงข้อ 4) ซ้ำเป็นจำนวน 35 รอบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.1.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (agarose gel electrophoresis)

เตรียมแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 (W/V) (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก.) แยกผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis (Sci-plas, Model HU13L, United Kingdom) โดยนำแผ่นเจลอะกาโรสวางใน electrophoresis tank ที่บรรจุ 1XTAE buffer (pH 8.0) นำผลิตผล PCR ซึ่งผสมกับสารละลายสี (loading dye) ในอัตราส่วนผลิตภัณฑ์ PCR 2 ไมโครลิตรต่อ loading dye 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุม แล้วแยกด้วย

กระแสไฟฟ้าภายใต้สภาวะความต่างศักดิ์ไฟฟ้าคงที่ 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่นเจลอะกาโรสไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation เปรียบเทียบกับ DNA marker

3.2.1.5 การแยกความแตกต่างของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

เตรียมพอลีอะคริลาไมด์เจลโดยแปรความเข้มข้นของเจลเป็นร้อยละ 6.5, 8 และ 10 โดยใช้เกรเดียนต์ (gradient) ของยูเรียและฟอร์มาไมด์ที่ความเข้มข้นจากร้อยละ 45–70 ตามรายงานของThompson et al. (2004) และ Eiler and Bertilsson (2006) ผสมสารเคมีสำหรับใช้ทำ DGGE และบรรจุในกระจกตามวิธีการบรรจุเจลสำหรับการทำ DGGE (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก. และ ค.) วิเคราะห์โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายสี (Loading Dye) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แยกแถบดีเอ็นเอบนเจลภายใต้สภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมแปร์ อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงด้วยเครื่อง DCode Universal Mutation Detection System นำแผ่นเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation เปรียบเทียบรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานบนอะคริลาไมด์เจลที่แปรความเข้มข้นเป็นร้อยละ 6.5, 8 และ 10 คัดเลือกความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ทำให้เห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐานที่ชัดเจนที่สุดและนำมาใช้ตลอดการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2 ประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp.

3.2.2.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1

ชุมขนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 1 คือชุมชนที่มีชนิดของ *Vibrio* spp. แตกต่างกันแต่มีจำนวนเซลล์เท่ากัน โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอ จำนวน 10 สปีชีส์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ

35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water ร้อยละ 1(W/V) จนได้จำนวนเชื้ออยู่ในระดับ 10^1-10^5 CFU/ml ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer โดยทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างอาหารโดยการ Spread plate โดยใช้อาหารวุ้น Tryptic soy agar ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาทั้งในระบบที่ใช้ดีเอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE) และอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

- การสกัดดีเอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE)

สร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยดูดเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น (มีจำนวนเชื้อเท่ากัน) ผสมตามคอลัมน์ A-E ตามตารางที่ 3.1 ทำการเตรียมชุมชนของเชื้อที่มีความเข้มข้นเชื้อละ 10^1 CFU/ml (ตามคอลัมน์ A) โดยดูดเชื้อกลุ่มวิบริโอลำดับที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้ง จากนั้นดูดเชื้อกลุ่มวิบริโอลำดับที่ 2 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge เดิมนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้ง ทำเช่นเดิมโดยดูดเชื้อกลุ่มวิบริโอลำดับที่ 3-10 เมื่อครบทั้ง 10 ลำดับแล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัด DNA เพื่อใช้ในการทำ PCR-DGGE โดยใช้ชุดสกัด HyYield ™ Genomic DNA Mini Kit โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปด้วยเทคนิค PCR-DGGE จากนั้นทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้นแต่เตรียมเชื้อที่มีความเข้มข้นเชื้อละ 10^2 ถึง10^5 CFU/ml (ตามคอลัมน์ B-E) ตามตารางที่ 3.1

- การสกัดอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

สร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอเช่นเดียวกับการเตรียม สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE โดยผสมเชื้อกลุ่มวิบริโอตามคอลัมน์ A-E ตามตารางที่ 3.1 แต่เปลี่ยนจากการสกัดดีเอ็นเอเป็นการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดThermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บ complementary DNA (cDNA) ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปด้วยเทคนิค PCR-DGGE

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.1 การสร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอโดยการผสมเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แบบที่ 1 เพื่อประเมิน detection limit ของวิธี PCR-DGGE

ลำดับที่	*Vibrio* species	Population mixtures (CFU/ml)				
		A	B	C	D	E
1	*Vibrio cholelae*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
2	*Vibrio parahaemolyticus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
3	*Vibrio fluvialis*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
4	*Vibrio mimicus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
5	*Vibrio alginolyticus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
6	*Vibrio harveyi*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
7	*Vibrio furnissii*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
8	*Vibrio vulnificus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
9	*Plesiomonas shigelloides*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
10	*Aeromonas hydrophila*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5

นำดีเอ็นเอ และ cDNA ที่เตรียมได้มาเพิ่มจำนวน ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ตามข้อ 3.2.1.3 และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (electrophoresis) จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2.2 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 2

ชุมขนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 2 คือชุมชนที่มีทั้งชนิดของ *Vibrio* spp. และจำนวนเซลล์แตกต่างกัน โดยผสมเชื้อกลุ่มวิบริโอที่ตรวจพบจากการสร้างชุมชน*ของ* Vibrio spp. แบบที่ 1 ตามคอลัมน์ F-J ตามตารางที่ 3.2 โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอที่ตรวจพบจากการสร้างชุมชนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water

ร้อยละ 1(W/V) จนได้จำนวนเชื้ออยู่ในระดับ 10^2-10^5 CFU/ml ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer โดยทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างอาหารโดยการเกลี่ยสารละลายเชื้อ (Spread plate) โดยใช้อาหารวุ้น Tryptic soy agar ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาทั้งในระบบที่ใช้ดีเอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE) และอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE) และทำการสกัดดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และ cDNA ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้ และแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้เหมือนกับการเตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 1

ตารางที่ 3.2 การสร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอโดยการผสมเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แบบที่ 2 เพื่อประเมิน detection limit ของวิธี PCR-DGGE

ลำดับที่	*Vibrio* species	Population mixtures (CFU/ml)				
		F	G	H	I	J
1	ชนิดที่ 1 ที่พบ	10^5	10^5	10^4	10^5	10^3
2	ชนิดที่ 2 ที่พบ	10^4	10^5	10^4	10^4	10^3
3	ชนิดที่ 3 ที่พบ	10^3	10^4	10^3	10^4	10^3
4	ชนิดที่ 4 ที่พบ	10^2	10^4	10^3	10^3	10^2
5	ชนิดที่ 5 ที่พบ	10^2	10^3	10^2	10^3	10^2

3.2.3 ศึกษาผลของสภาวะของเซลล์ของเชื้อวิบริโอต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE

3.2.3.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpmเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแปรสภาวะของเชื้อเป็น 3 สภาวะทำการทดลอง 3 ซ้ำ คือ

1. เซลล์สมบูรณ์ (Viable cell (VC)) : เก็บเซลล์โดยดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปสกัดอาร์เอ็นเอทันที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. เซลล์บาดเจ็บ (Injured cell (IVC)) : เก็บเซลล์โดยดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ

3. เซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (Injured, cell + pre-enrichment (PIVC)) : เก็บเซลล์โดยดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpmเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอทันที

3.2.3.2 สกัดอาร์เอ็นเอและทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น complementary DNA (cDNA) ตามข้อ 3.2.1.2 นำcomplementary DNA (cDNA) ที่เตรียมได้มาเพิ่มจำนวน complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ตามข้อ 3.2.1.3

3.2.3.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยเจลอิเล็คโตโฟริซีส (electrophoresis) ข้อ 3.2.1.4 จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีอาร์ (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ตามสภาวะที่เลือกจากข้อ 3.2.1.5

3.2.4 ประเมินวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร

3.2.4.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์

เตรียม *Vibrio parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างอาหารโดยเลี้ยงเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มาเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water ร้อยละ 1(W/V) จนได้จำนวนเชื้ออยู่ในระดับ 10^2-10^9 CFU/ml ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer โดยทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างอาหารโดยการเกลี่ย(Spread plate) สารละลายเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส

3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

นำปลาหมึกแช่แข็งซื้อจากซุปเปอร์มาเก็ต จำนวน 1,000 กรัม ลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 200 ppm เป็นเวลา 15 นาที สะเด็ดน้ำออกให้หมด แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 2,000 มิลลิลิตรนาน 5 นาที สะเด็ดน้ำออกให้หมด (วราภา มหากาญจนกุล et al., 2544) จากนั้นตรวจสอบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดย แบ่งมาทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยชั่งตัวอย่าง 50±1 กรัม เติม Peptone water ร้อยละ1 (W/V) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ตีตัวอย่างด้วยเครื่องตบอาหาร (Stomacher) ที่ 200 rpm 1 นาที และเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อแต่ละ dilution ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารวุ้น Tryptic soy agar เกลี่ยสารละลายของตัวอย่าง (Spread plate) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4.3 การเตรียมตัวอย่างอาหารปนเปื้อนเชื้อที่ระดับต่างๆ

ชั่งตัวอย่างปลาหมึกที่เตรียมจากข้อ 3.2.4.2 จำนวน 25±1 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) เติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จากที่เตรียมในข้อ 3.2.4.1 แต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ให้มีระดับความเข้มข้นของเชื้อสุดท้าย 10^1-10^5 CFU/ กรัม ทิ้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที (วราภา มหากาญจนกุล et al., 2544) จากนั้นเติม Alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีตัวตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher ที่ 200 rpm 1 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- การตรวจโดยวิธี RT-PCR-DGGE

นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 3.2.4.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอสกัดอาร์เอ็นเอและทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น cDNA ตามข้อ 3.2.1.2 นำ cDNA ที่เตรียมได้มาเพิ่มจำนวนดี cDNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ตามข้อ 3.2.1.3 และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE

- การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน Bacteriological analytical manual Chapter 5 (BAM; USFDA, 2004: online)

นำตัวอย่างอาหารใน Alkaline peptone water (APW) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปนำตัวอย่างที่บ่มไว้มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นลักษณะของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และรายงานผลเป็นพบ/ไม่พบ ในตัวอย่าง 25 กรัม

3.2.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารจำนวน 14 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆตามรายละเอียดดังตารางที่ 3.3 ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 25±1 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) เติม Alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher ที่ 200 rpm 1 นาที

- การตรวจโดยวิธี RT-PCR-DGGE

นำตัวอย่างหลังตบด้วยเครื่องตบอาหาร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บในหลอด Microcentrifuge สกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA ตามข้อ 3.2.1.2 เพิ่มจำนวน cDNA ตามข้อ 3.2.1.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (electrophoresis) ข้อ 3.2.1.4 จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ตามข้อ 3.2.1.5

- การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน Bacteriological analytical manual Chapter 5 (BAM; USFDA, 2004: online)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

นำตัวอย่างอาหารใน Alkaline peptone water (APW) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปนำเชื้อที่บ่มไว้มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ตรวจสอบผลโดยดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสุ่มโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHOMagar Vibrio (CV) จากนั้นสุ่มโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemistry) โดยใช้ระบบ VITEK®2 system ซึ่งประกอบด้วยการย้อมแกรมเพื่อเลือกการ์ดที่เหมาะสม และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีด้วยการ์ดสำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (GN card) แล้ววิเคราะห์ผลด้วยใช้เครื่อง VITEK®2 system (วิธีการตามภาคผนวก จ.) และรายงานผลเป็นพบ/ไม่พบ ในตัวอย่าง 25 กรัม

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างอาหารและแหล่งที่ซื้อ

ตัวอย่างอาหาร	แหล่งที่ซื้อ
1. ปลาหมึก (สด)	ซุปเปอร์มาเก็ต
2. เนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง)	ซุปเปอร์มาเก็ต
3. เนื้อปลาเก๋าแล่ (แช่แข็ง)	ซุปเปอร์มาเก็ต
4. ปลาหมึก (แช่แข็ง)	ซุปเปอร์มาเก็ต
5. หนวดปลาหมึก (สด)	ตลาดสด
6. ปลาหมึกกล้วย (สด)	ตลาดสด
7. กุ้งขาว (สด)	ตลาดสด
8. ปลาทู (สด)	ตลาดสด
9. กุ้งแม่น้ำ (สด)	ตลาดสด
10. เนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง)	ตลาดสด
11. หอยแครง (สด)	ตลาดสด
12. หอยนางรม (สด)	ตลาดสด
13. ปลาแซลมอนแล่ (สด)	ตลาดสด
14. ปลาอินทรีย์แล่ (สด)	ตลาดสด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

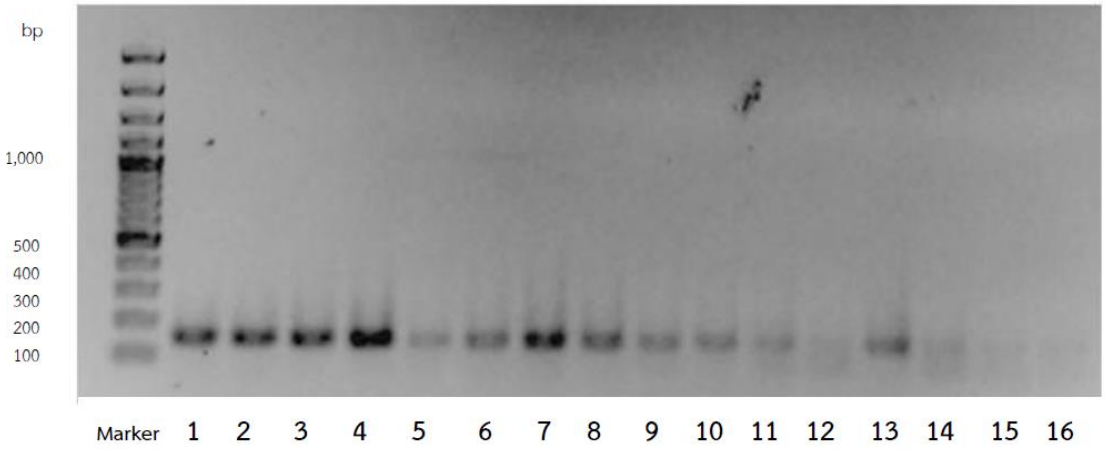
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp.

เนื่องจากปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการตรวจสอบชุมชนของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE ได้แก่ ความจำเพาะของไพร์เมอร์ สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลและความเข้มข้นของสาร denaturant เป็นต้น ดังนั้นในการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวสำหรับใช้ในการตรวจจุลินทรีย์กลุ่มวิบริโอจึงจำเป็นต้องประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย โดยอ้างอิงจากค่าเริ่มต้นจากรายงานของ Thompson และคณะ (2004) และจากรายงานของ Eiler และ Bertilsson (2006) และดัดแปรเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

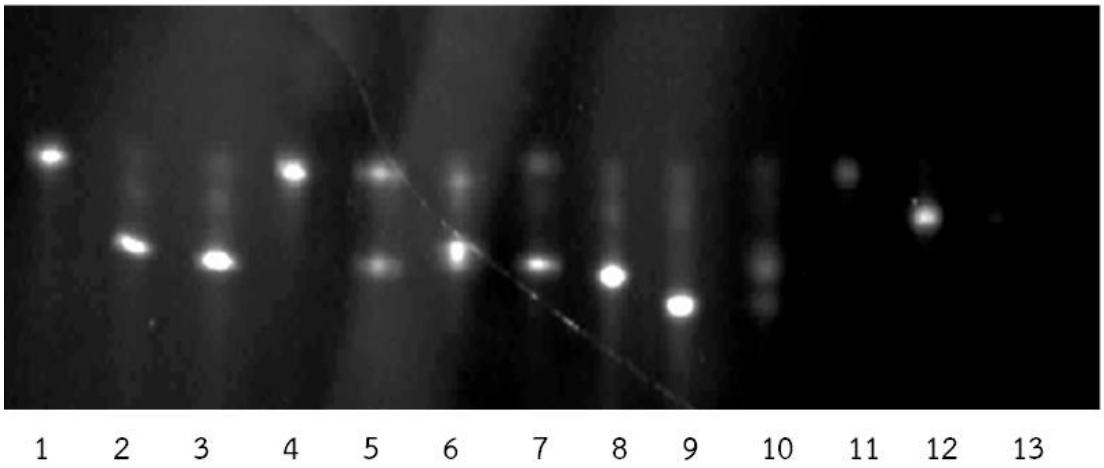
จากการศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ตามสภาวะที่กล่าวในวิธีการทดลอง โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ GC567Fและ680R และใช้โปรแกรมในการทำพีซีอาร์ จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลพีซีอาร์ (PCR amplicon) โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.8 ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอบนเจล ขนาดประมาณ 120 bp ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า จึงระบุได้ว่าไพรเมอร์ GC567Fและ680R สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่มวิบริโอได้ แต่เมื่อตรวจสอบผลิตผลพีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE ที่มีความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5 และความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45-70 (ที่อ้างจากทั้ง 2 งานวิจัย) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอนบนแผ่นเจล (ไม่แสดงผลการทดลอง) ทั้งนี้อาจเกิดจากที่ความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5 มีขนาดของรูพรุนที่ใหญ่เกินไปซึ่งมีรายงานว่าความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5 เหมาะสำหรับการใช้แยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ (300-1,000bp) (Bio-Rad) ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ GC567F และ 680R เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลพีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน มีขนาดเพียง 120 bp แสดงดังภาพที่ 4.1 จึงอาจเคลื่อนที่ผ่านเจลและไม่เกิดเป็นแถบที่สังเกตได้



ภาพที่ 4.1 แสดงผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 1.8

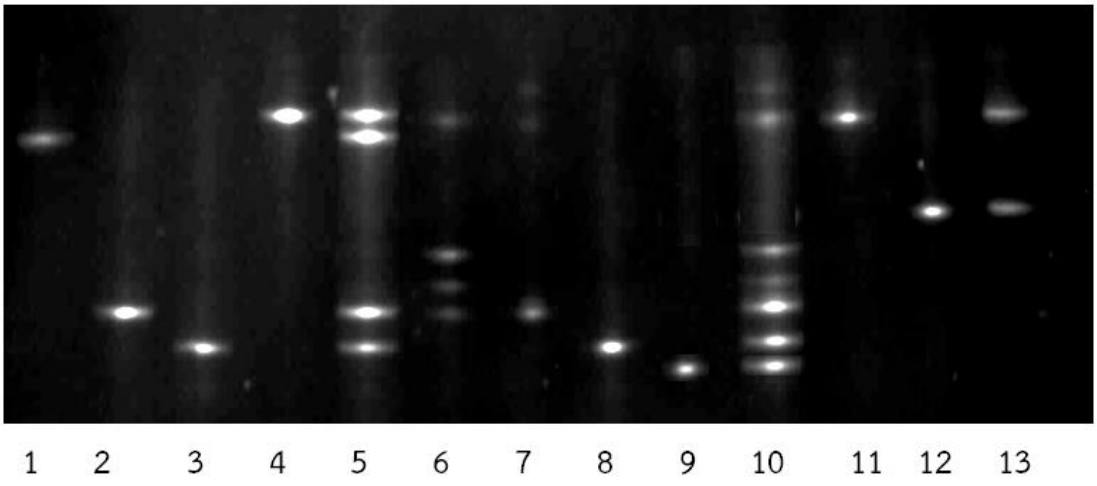
(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae*, 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus*, 3 คือ *Vibrio fluvialis*, 4 คือ *Vibrio mimicus*, 5 คือ *Vibrio alginolyticus*, 6 คือ *Vibrio harveyi,* 7 คือ *Vibrio furnissii*, 8 คือ *Vibrio vulnificus*, 9 คือ *Plesiomonas shigeloides,* 10 คือ *Aeromonas hydrophila*, 11 คือ *Escherichia coli*, 12 คือ *Staphylococcus aureus* , 13 คือ *Salmonella* Typhimurium, 14 คือ *Bacillus cereus*, 15 คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ 16 คือ negative control)

ทั้งนี้ในการเลือกความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลต้องพิจารณาจากขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยกความแตกต่างเป็นหลัก ดังนั้นจึงแปรค่าความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลเป็นร้อยละ 8 และ 10 ตามลำดับ โดยเลือกช่วงจากข้อแนะนำในคู่มือการใช้ของ DGGE with Dcode ™ Universal Mutation Detection System ทั้งนี้ยังคงค่าความเข้มข้นของสาร denaturant เป็นร้อยละ 45-70 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลการแยกผลิตผลพีซีอาร์ระหว่างพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 8 และ 10 แสดงดังภาพที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ พบว่าตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดบนเจลทั้งสองความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจล ร้อยละ 10 แถบดีเอ็นมีความชัดเจนอย่างเห็นได้ชัด จากคู่มือการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE กล่าวว่าที่ความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5, 8 และ 10 เหมาะสำหรับการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300-1,000 bp, 200-400 bp และ 100-300 bp ตามลำดับ ความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดรูพรุนของเจลมีขนาดที่เล็กลงและเหมาะสำหรับใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงด้วย จึงทำให้ความละเอียดในการแยกแถบดีเอ็นเอและความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอมีมากขึ้น ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้นี้จึงเลือกความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ประกอบด้วยเกรเดียนต์ของสาร denaturant ความเข้มข้นร้อยละ 45-70 สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.2 แถบดีเอ็นเอบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 8

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae*, 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus*, 3 คือ *Vibrio fluvialis*, 4 คือ *Vibrio mimicus*, 5 คือ *Vibrio cholera+ Vibrio parahaemolyticus+ Vibrio fluvialis+ Vibrio mimicus,* 6 คือ *Vibrio alginolyticus*, 7 คือ *Vibrio harveyi,* 8 คือ *Vibrio furnissii*, 9 คือ *Vibrio vulnificus*, 10 คือ *Vibrio alginolyticus+ Vibrio harveyi+ Vibrio furnissii+ Vibrio vulnificus*, 11 คือ *Plesiomonas shigeloides,* 12 คือ *Aeromonas hydrophila* และ 13 คือ *Plesiomonas shigeloides+ Aeromonas hydrophila*)



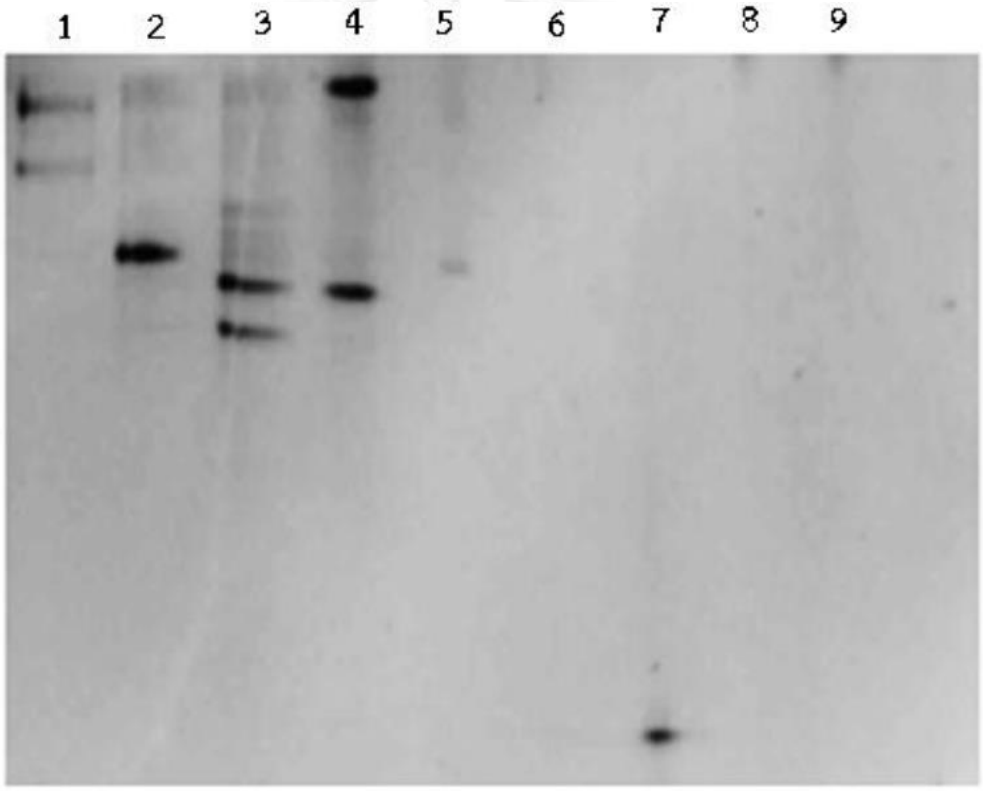
ภาพที่ 4.3 แถบดีเอ็นเอบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae*, 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus*, 3 คือ *Vibrio fluvialis*, 4 คือ *Vibrio mimicus*, 5 คือ *Vibrio cholera+ Vibrio parahaemolyticus+ Vibrio fluvialis+ Vibrio mimicus,* 6 คือ *Vibrio alginolyticus*, 7 คือ *Vibrio harveyi,* 8 คือ *Vibrio furnissii*, 9 คือ *Vibrio vulnificus*, 10 คือ *Vibrio alginolyticus+ Vibrio harveyi+ Vibrio furnissii+ Vibrio vulnificus*, 11 คือ *Plesiomonas shigeloides,* 12 คือ *Aeromonas hydrophila* และ 13 คือ *Plesiomonas shigeloides+ Aeromonas hydrophila*)

เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ GC567F และ 680R กับเชื้อกลุ่มวิบริโอโดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคในอาหารที่ไม่ใช้เชื้อในกลุ่มวิบริโอได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำผลิตผลพีซีอาร์ที่พบมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟรีซีส ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium เท่านั้น ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 120 bp แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE พบว่าพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่ตำแหน่งที่แตกต่างจากเชื้อในกลุ่มวิบริโอ ตามที่ปรากฏใน Lane 7 แสดงดังภาพที่ 4.4 ซึ่งในการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบวิบริโอ ถ้าในตัวอย่างอาหารมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium รวมอยู่กับเชื้อวิบริโอก็จะสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ออกจากเชื้อในกลุ่มวิบริโอได้ นอกจากนี้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (US Food and Drug Administration, 2004) ยังมีขั้นตอนการทำ pre-enrichment ก่อนการวิเคราะห์จึงเป็นการกำจัดเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ไปในส่วนหนึ่งแล้วโอกาสที่จุลินทรีย์ชนิดนี้จะรบกวนระบบการตรวจสอบจึงมีน้อยมาก

เมื่อพิจารณาผลการแยกดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่มวิบริโอทั้ง 10 ชนิด ด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้พอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ประกอบด้วยเกรเดียนต์ของสาร denaturant ความเข้มข้นร้อยละ 45-70 พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน ยกเว้นแถบดีเอ็นเอของวิบริโอ 2 คู่คือ *Vibrio fluvialis* กับ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ที่มีระยะการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกัน (แสดงดังภาพที่ 4.5) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Eiler and Bertilsson (2006) ที่ศึกษาเชื้อในกลุ่มวิบริโอจำนวน7 สปีชีส์คือ *Vibrio mimicus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio anguillarum* พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากวิบริโอทั้งสองชนิดมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันและลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง 16S rDNA มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก (Eiler and Bertilsson, 2006) ซึ่งประเด็นนี้จะอภิปรายรายละเอียดในหัวข้อสุดท้ายหน้าที่ 61 ดังนั้นหากต้องการแยกเชื้อทั้งสองชนิดนี้อาจต้องใช้ดีเอ็นเอตำแหน่งอื่นเช่น atpA gene ที่มีรายงานว่าสามารถแยกความแตกต่างของวิบริโอได้มากกว่า แต่เนื่องจากดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวมีความยาวมากเกินไป (1322bp) (Thompson et al., 2007a) จึงไม่เหมาะกับการแยกด้วยเทคนิค DGGE และต้องใช้เวลาในการประเมินหาตำแหน่งที่เหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตาม จากใช้ 16S rDNA จะเห็นได้ว่าเชื้อวิบริโอที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นจะมีวิบริโอสปีชีส์หนึ่งเป็นเชื้อหลักที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ส่วนอีกสปีชีส์หนึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ค่อยมีรายงานว่าปนเปื้อนในอาหารและไม่มีความสำคัญในเรื่องของการก่อโรคมากนัก ดังนั้นในการใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการตรวจเชื้อวิบริโอสามารถใช้ในการบ่งชี้ถึงโอกาสที่จะพบเชื้อก่อโรคทางอาหารที่สำคัญในตัวอย่าง ได้แก่ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus*

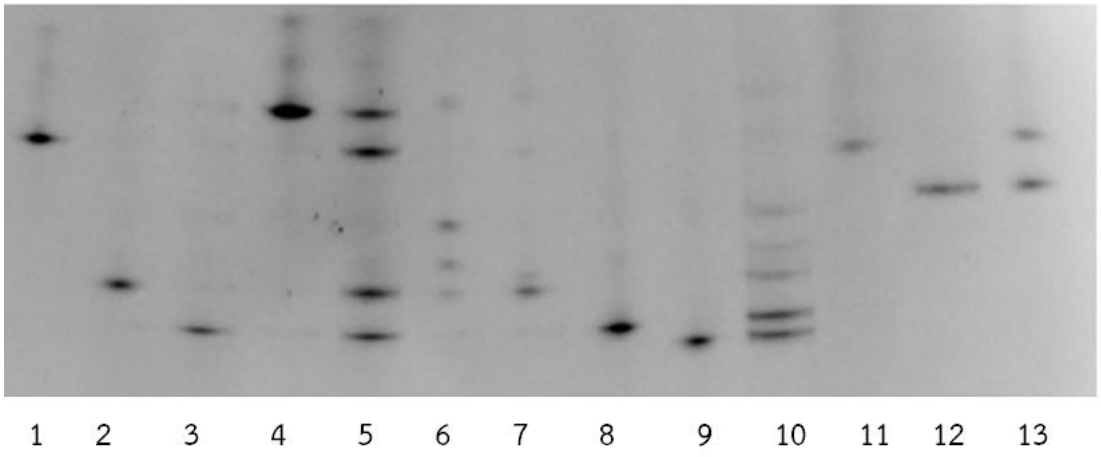
เป็นต้น ยกตัวอย่างเช่นถ้าพบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ก็สามารถบ่งชี้เบื้องต้นได้ว่ามีการปนเปื้อนหรือพบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเพื่อเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วสำหรับในการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบควบคุมคุณภาพด้านความปลอดภัย แต่ในการยืนยันผลยังคงต้องตรวจโดยวิธีมาตรฐานควบคู่ไปด้วยเพื่อนำโคโลนีของเชื้อดังกล่าวมายืนยันผลด้วยการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผลหรืออีกแนวทางหนึ่งคือ นำแถบดีเอ็นเอที่พบบนพอลีอะคริลาไมด์เจลมาทำการโคลน เพิ่มจำนวนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing analysis) เพื่อระบุชนิดของเชื้อต่อไปได้ หรือโดยการหาสภาวะในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ในขั้นตอน Selective enrichment ตัวอย่าง เพื่อมุ่งเน้นเชื้อก่อโรคตามมาตรฐานต่อไปนี้



ภาพที่ 4.4 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae* + *Plesiomonas shigeloides* + *Aeromonas hydrophila,* 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus* + *Vibrio harveyi,* 3 คือ*Vibrio fluvialis* + *Vibrio alginolyticus* + *Vibrio vulnificus,* 4 คือ*Vibrio mimicus* + *Vibrio furnissii*, 5 คือ *Escherichia coli*, 6 คือ *Staphylococcus aureus,* 7 คือ *Salmonella* Typhimurium, 8 คือ *Bacillus cereus* และ 9 คือ *Pseudomonas aeruginosa*)

อย่างไรก็ตามจากการประเมินประสิทธิภาพของ PCR-DGGE โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารโดยตรงนั้น มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้ในการบ่งชี้สภาพการมีชีวิตของเซลล์ (viable cell) ได้ ทั้งนี้ในแง่ของการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารส่วนใหญ่นั้นต้องการระบุการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้นจึงประเมินประสิทธิภาพของวิธีโดยการวิเคราะห์จากอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค Reverse transcriptase – PCR method (RT-PCR-DGGE) ในการศึกษานี้จึงทดลองสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ด้วยชุดสกัด Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟรีซีส และแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DGGE ที่ประเมินได้ ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าจากการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ GC567F และ 680R และแยกความแตกต่างของผลิตผลพีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจาก cDNA นั้นไม่แตกต่างจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอโดยตรง (ไม่แสดงผลการทดลอง)



ภาพที่ 4.5 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae*, 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus*, 3 คือ *Vibrio fluvialis*, 4 คือ *Vibrio mimicus*, 5 คือ *Vibrio cholera + Vibrio parahaemolyticus + Vibrio fluvialis + Vibrio mimicus,* 6 คือ *Vibrio alginolyticus*, 7 คือ *Vibrio harveyi,* 8 คือ *Vibrio furnissii*, 9 คือ *Vibrio vulnificus*, 10 คือ *Vibrio alginolyticus + Vibrio harveyi + Vibrio furnissii + Vibrio vulnificus*, 11 คือ *Plesiomonas shigeloides,* 12 คือ *Aeromonas hydrophila* และ 13 คือ *Plesiomonas shigeloides + Aeromonas hydrophila*)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 การประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธี PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp.

ในอาหารทั่วไปมักมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดและมีการปนเปื้อนในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งในการตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE หรือ RT-PCR-DGGE นั้น ต้องใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจากตัวอย่างอาหารโดยตรงแล้วจึงเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มของจุลินทรีย์เป้าหมาย ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้น ไพรเมอร์จะเข้าไปจับอย่างจำเพาะกับ DNA template ของวิบริโอ โดยดีเอ็นเอของวิบริโอที่มีจำนวนมากในระบบย่อมมีโอกาสที่จะถูกจับด้วยไพรเมอร์มากกว่าดีเอ็นเอของวิบริโอที่มีจำนวนเซลล์น้อย ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้จึงประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของเทคนิค PCR-DGGE หรือ RT-PCR-DGGE ที่สามารถตรวจพบวิบริโอที่มีจำนวนชนิดและจำนวนเซลล์ในระบบที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทดสอบโดยการสร้างชุมชนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มวิบริโอที่มีชนิดและจำนวนเซลล์ในระบบแตกต่างกัน 2 รูปแบบ ได้แก่ ชุมชนแบบที่ 1 คือชุมชนที่มีชนิดของวิบริโอแตกต่างกันแต่มีจำนวนเซลล์เท่ากัน โดยแปรจำนวนเซลล์ในแต่ละชุมชนตั้งแต่ 10^1-10^5 CFU/ml ชุมชนแบบที่ 2 คือชุมชนที่มีชนิดและจำนวนเซลล์ของวิบริโอแตกต่างกัน โดยอ้างอิงวิธีการในการแปรความเข้มข้นจากการศึกษาของ Prakitchaiwattana et al. (2004) แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4.1

จากนั้นสร้างชุมชนแบบที่ 1 คือชุมชนที่มีชนิดของวิบริโอแตกต่างกันแต่มีจำนวนเซลล์เท่ากัน โดยการผสมเซลล์ที่ความเข้มข้นเดียวกันตามตารางที่ 4.1 ผสมเซลล์ที่ความเข้มข้นเดียวกันตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^5 CFU/ml (ตามคอลัมน์ A-E) แล้วสกัดดีเอ็นเอ (สำหรับในระบบ PCR-DGGE) และสกัดอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจเซลล์ที่มีชีวิตและใช้ในระบบ RT-PCR-DGGE) จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 (A-E) และตารางที่ 4.3 (A-E) ตามลำดับ พบว่าเมื่อตรวจสอบชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1 ด้วยเทคนิค PCR-DGGE ที่วิบริโอทุกชนิดมีความเข้มข้นเซลล์ 10^2-10^5 CFU/ml แสดงดังตารางที่ 4.2 (คอลัมน์ B-E) ปรากฏแถบดีเอ็นเอของวิบริโอที่ชัดเจนบนเจล DGGE จำนวน 3 สปีชีส์คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* และ *Vibrio alginolyticus* แสดงดังตารางที่ 4.2 (คอลัมน์ B-E) ส่วนที่ความเข้มข้น 10^1 CFU/ml แสดงดังตารางที่ 4.2 (คอลัมน์ A) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ ในขณะที่เมื่อใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE พบว่าแถบดีเอ็นเอของชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1 ที่มีจำนวนเซลล์ตั้งแต่ 10^2-10^5 CFU/ml เช่นเดียวกัน แต่สามารถตรวจพบแถบของ cDNA ของวิบริโอในชุมชนได้มากถึง 5 ชนิด โดย 3 ชนิดแรกที่พบเหมือนกับที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-DGGE และชนิดที่ 4 และ 5 ที่พบเพิ่มคือ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* แสดงดังตารางที่ 4.3 (คอลัมน์ B-E) ทั้งนี้การที่ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับวิบริโอ 3 สปีชีส์ (PCR-DGGE) และ/หรือ 5 สปีชีส์ (RT-PCR-DGGE) นี้ก่อนทั้งที่มีจำนวนประชากรของเซลล์เท่ากัน อาจเป็นผลมาจากการที่สปีชีส์ที่มีจำนวน rRNA opreron มากกว่าสปีชีส์อื่นๆซึ่งจำนวน rRNA opreron ที่มีเป็นลักษณะของเชื้อในแต่ละเซลล์ (มีฐานข้อมูลเรื่องจำนวน rRNA

opreron ของจุลินทรีย์ที่สามารถสืบค้นได้จาก rRNA opreron database) ทั้งนี้จากผลการศึกษานี้จะเห็นว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถตรวจพบจำนวนชนิดของวิบริโอได้มากกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในขั้นตอนการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase ทำให้ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) มีความบริสุทธิ์สูงกว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์โดยตรง ซึ่งอาจยังมีสิ่งปนเปื้อนอยู่ในโครงสร้างของดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อเพิ่มจำนวนของ cDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จึงส่งผลให้ cDNA สามารถจับกับไพรเมอร์ได้อย่างจำเพาะมากกว่า จึงมีผลทำให้พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอที่ใช้อาร์เอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE มากกว่าแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอที่ใช้ดีเอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE ซึ่งถือเป็นรายงานวิจัยแรกที่พบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE มีความไวในการการตรวจสูงกว่า PCR-DGGE

ตารางที่ 4.1 การเตรียมเซลล์สร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1 และ 2 สำหรับใช้ในการประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของเทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE

***Vibrio* species**	**จำนวนการประมาณจำนวนเซลล์เริ่มต้น (CFU/ml)**	**ค่าความเข้มข้นของเซลล์ CFU/ml (dilution ที่ใช้)**				
		A	B	C	D	E
Vibrio cholelae	1.30×10^9	10 (10^{-8})	10^2 (10^{-7})	10^3 (10^{-6})	10^4 (10^{-5})	10^5 (10^{-4})
Vibrio parahaemolyticus	1.20×10^9	10 (10^{-8})	10^2 (10^{-7})	10^3 (10^{-6})	10^4 (10^{-5})	10^5 (10^{-4})
Vibrio fluvialis	7.70×10^8	10 (10^{-7})	10^2 (10^{-6})	10^3 (10^{-5})	10^4 (10^{-4})	10^5 (10^{-3})
Vibrio mimicus	3.30×10^9	10 (10^{-8})	10^2 (10^{-7})	10^3 (10^{-6})	10^4 (10^{-5})	10^5 (10^{-4})
Vibrio alginolyticus	3.30×10^9	10 (10^{-8})	10^2 (10^{-7})	10^3 (10^{-6})	10^4 (10^{-5})	10^5 (10^{-4})
Vibrio harveyi	1.90×10^8	10 (10^{-7})	10^2 (10^{-6})	10^3 (10^{-5})	10^4 (10^{-4})	10^5 (10^{-3})
Vibrio furnissii	1.50×10^9	10 (10^{-8})	10^2 (10^{-7})	10^3 (10^{-6})	10^4 (10^{-5})	10^5 (10^{-4})
Vibrio vulnificus	6.40×10^8	10 (10^{-7})	10^2 (10^{-6})	10^3 (10^{-5})	10^4 (10^{-4})	10^5 (10^{-3})
Plesiomonas shigelloides	1.80×10^8	10 (10^{-7})	10^2 (10^{-6})	10^3 (10^{-5})	10^4 (10^{-4})	10^5 (10^{-3})
Aeromonas hydrophila	2.20×10^9	10 (10^{-8})	10^2 (10^{-7})	10^3 (10^{-6})	10^4 (10^{-5})	10^5 (10^{-4})

เมื่อศึกษาค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของชุมชนแบบที่ 2 คือชุมชนที่มีชนิดและจำนวนเซลล์ของวิบริโอแตกต่างกัน เมื่อใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการตรวจสอบผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 (คอลัมน์ F-J) พบว่าตรวจพบเชื้อวิบริโอที่มีระดับความเข้มข้นสูงสุดสองลำดับแรกเท่านั้น แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถตรวจพบเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นสูงสุดถึงห้าลำดับแรก ตารางที่ 4.3 (คอลัมน์ G-J)

ดังนั้นจากการประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอด้วยเทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจวิบริโอทุกชนิดที่มีจำนวนเซลล์ในชุมชนมากกว่า 10^1 CFU/ml ขึ้นไป ที่สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Eiler และ Bertilsson (2006) ซึ่งรายงานว่า PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/g อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอด้วยเทคนิค PCR-DGGE เปรียบเทียบกับ RT-PCR-DGGE เป็นครั้งแรกจึงยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องของความไวของเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเชื้อทุกชนิด แต่อาจอภิปรายได้ว่าการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอด้วยการวิเคราะห์คุณสมบัติของอาร์เอ็นเอนั้น จะต้องเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น complementary DNA (cDNA) ซึ่งมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วย DNase)ทำให้ cDNA template มีความบริสุทธิ์สูงกว่า ไพรเมอร์จึงสามารถเข้าจับกับ cDNA ได้อย่างจำเพาะมากขึ้น เมื่อเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แต่ในส่วนของดีเอ็นเอขั้นตอนการสกัดมีการทำให้บริสุทธิ์แต่เป็นการสกัดโดยตรงจากเซลล์จึงอาจทำให้มีสารประเภทฮีสโตนที่จับกับโครงร่างของดีเอ็นเอหลงเหลืออยู่ไปขัดขวางการเข้าจับของไพรเมอร์ทำให้ผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้มีจำนวนที่น้อยกว่าที่ควรจะเป็น (Shi et al., 2010; สุดสาย ตรีวานิช and สายพิณ ทานัชฌาสัย, 2546) และเมื่อทำการแยกผลิตผลพีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE จึงปรากฏแถบดีเอ็นได้จำนวนน้อยกว่าแถบของอาร์เอ็นเอ จึงทำให้เทคนิค RT-PCR-DGGE จึงสามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าและมีความไว (sensitivity) มากกว่าเทคนิค PCR-DGGE ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการนำไปใช้ประเมินประสิทธิภาพในการศึกษาขั้นตอนต่อไป เนื่องจากมีความไวสูงกว่าเทคนิค PCR-DGGE และสามารถใช้ในการระบุสภาวะการมีชีวิตของเซลล์ได้ และที่น่าสนใจคือเมื่อทำการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่าผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกันซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสม่ำเสมอของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR consistency) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเข้าจับของไพรเมอร์เป็นไปในลักษณะ template content oriented โดยจะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่มีความเข้มข้นหรือมีปริมาณมากกว่าเสมอ ซึ่งการเข้าจับแบบนี้จะช่วยให้การประเมินผลการตรวจพบมีความชัดเจนมากขึ้น ทั้งนี้มีรายงานยืนยันว่าชนิดของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายไม่ได้ส่งผลต่อการเข้ากับ template ของไพรเมอร์ แต่ปัจจัยที่มีอิทธิพลหลักคือจำนวนก็อปปี้ของดีเอ็นเอหรือปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) นั่นเอง (Eiler and Bertilsson, 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.2 การตรวจพบแถบดีเอ็นเอของชุมชนวิบริโอแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ที่ตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

Vibrio species	Population mixtures (cfu/ml)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Vibrio cholerae	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^5	10^5	10^4	10^5	10^4
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vibrio parahaemolyticus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Vibrio fluvialis	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Vibrio mimicus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^4	10^3
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vibrio alginolyticus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^3	10^4	10^3
	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Vibrio harveyi	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Vibrio furnissii	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Vibrio vulnificus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Plesiomonas shigelloides	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Aeromonas hydrophila	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					

+ คือตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

– คือตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

ตารางที่ 4.3 การตรวจพบแถบอาร์เอ็นเอของชุมชนวิบริโอแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ที่ตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE

Vibrio species	Population mixtures (cfu/ml)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Vibrio cholerae	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^5	10^5	10^4	10^5	10^3
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vibrio parahaemolyticus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^4	10^3
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vibrio fluvialis	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^3	10^4	10^3
	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Vibrio mimicus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^2	10^4	10^3	10^3	10^2
	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Vibrio alginolyticus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^2	10^3	10^2	10^3	10^2
	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Vibrio harveyi	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Vibrio furnissii	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Vibrio vulnificus	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Plesiomonas shigelloides	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					
Aeromonas hydrophila	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5					
	-	-	-	-	-					

+ คือตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

– คือตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อวิบริโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

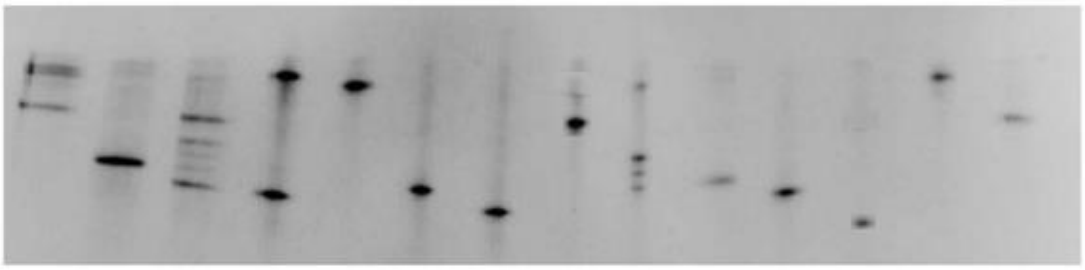
4.3 การประเมินผลของสภาวะของเซลล์ของวิบริโอต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE

เนื่องจากในกระบวนการแปรรูปอาหารมีการใช้ความร้อน ความเย็นและการแช่เยือกแข็งซึ่งปัจจัยเหล่านี้ต่างก็มีผลต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร อาจทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บและส่งผลต่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้เป็นผลลบลวงได้ (false negative) โดยที่ในตัวอย่างอาหารยังคงมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ แต่เนื่องจากเซลล์อยู่ในสภาวะบาดเจ็บจึงไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จึงตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว แต่เมื่ออาหารมีสภาวะเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อหรือเชื้อฟื้นสภาพ เซลล์ก็จะเพิ่มจำนวนและทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียหรืออาจทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธี RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บเนื่องจากกระบวนการแปรรูปอาหาร

ในการทดลองใช้เชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอจำนวน 10 สปีชีส์โดยแปรสภาวะของเชื้อเป็น 3 สภาวะคือ เซลล์สมบูรณ์ (Viable cell; VC) เซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (Injured cell; IVC) และเซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (Injured cell + pre-enrichment; PIVC) เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR-DGGE พบว่าปรากฏแถบ cDNA ของวิบริโอมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์จากทั้ง 3 สภาวะ ไม่แตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 4.6 - 4.8 ยกเว้นเชื้อ *Plesiomonas shigelloides* ที่ซึ่งเมื่อเซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) และเซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (PIVC) จะปรากฏแถบของ cDNA มากกว่า 1 แถบ (multiple band) แสดงดังภาพที่ 4.7 และ 4.8 (Lane 13) ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าการแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) มีผลต่อโครงสร้างอาร์เอ็นเอของเซลล์ของเชื้อ *Plesiomonas shigelloides* โดยอาจทำให้โครงสร้างเกิดการแตกหัก (denaturanted) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ (deformated) จึงมีผลทำให้ไพรเมอร์เข้าจับได้อย่างไม่จำเพาะ แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลของการแช่แข็งต่อโครงสร้างอาร์เอ็นเอของเชื้อดังกล่าว แต่ก็มีการรายงานของ Szaboa and Mackey (1999) เกี่ยวกับผลของความร้อนต่อโครงสร้างของอาร์เอ็นเอของเชื้ออื่นๆ คือ *Salmonella* Eenteritidis เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR-DGGE พบว่าโครงสร้างของอาร์เอ็นเอถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อนซึ่งส่งผลต่อการจับกันของไพรเมอร์กับ cDNA จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี RT-PCR-DGGE นอกจากนี้ผลการทดสอบบ่งชี้ด้วยว่า *Plesiomonas shigelloides* ที่บาดเจ็บและผ่านการ pre-enrichment อาจไม่สร้างอาร์เอ็นเอใหม่ เนื่องจากเซลล์อยู่ในช่วงปรับสภาพให้ฟื้นตัว จึงยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ดังจะเห็นได้จากการยังพบ multiple band ของเซลล์ที่ผ่านการ pre-enrichment

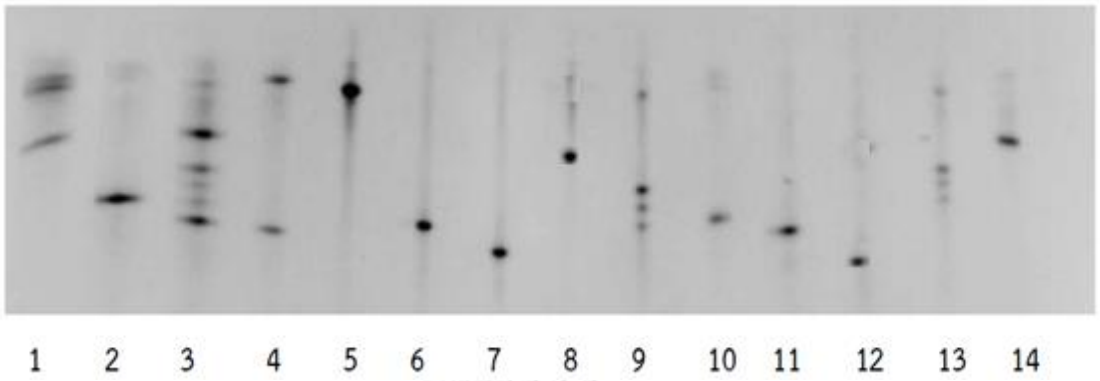
เมื่อพิจารณาแถบของ cDNA ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะเซลล์บาดเจ็บ แต่ผ่านขั้นตอนการทำ pre-enrichment (PIVC) จะเห็นว่าความเข้มของแถบ cDNA มีความเข้ม (intensity) ที่น้อยกว่าแถบ cDNA ของเซลล์สมบูรณ์ (VC) และเซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) แสดงดังภาพที่ 4.8 ทั้งนี้อาจ

เกิดจากความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ในการสกัด โดยเซลล์สมบูรณ์ (VC) และเซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) สกัดจากเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10^8 CFU/ml ที่ทำการบ่ม 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์ที่อยู่ในสภาวะเซลล์บาดเจ็บแต่ผ่านขั้นตอนการทำ pre-enrichment (PIVC) ใช้เซลล์ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 10^8 CFU/ml จำนวน 1 มิลลิลิตร และนำไปแช่เยือกแข็ง จากนั้น pre-enrichment ใน Tryptic soy broth ที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 90 ml และบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เซลล์ที่อยู่ในสภาวะ PIVC จะมีความเข้มข้นของเชื้อที่น้อยกว่าเซลล์เริ่มต้นของเซลล์สมบูรณ์ (VC) และเซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) จึงมีผลให้ความเข้มของแถบ cDNA ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ PIVC มีความเข้ม (intensity) ที่น้อยกว่า ซึ่งในประเด็นนี้ยังเป็นการบ่งชี้ได้ชัดเจนขึ้นว่าเซลล์ที่บาดเจ็บอาจไม่เพิ่มจำนวนในการ pre-enrichment อย่างไรก็ตามสำหรับเชื้อกลุ่มวิบริโอที่เป็นเชื้อที่พบการรายงานว่าทำให้เกิดโรคบ่อยๆได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis* และ *Vibrio alginolyticus* ที่มีสภาวะเซลล์ในทุกรูปแบบยังสามารถปรากฏแถบ cDNA ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงคาดว่าน่าจะสามารถนำวิธี RT-PCR-DGGE ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อวิบริโอกลุ่มนี้ในตัวอย่างอาหารที่ผ่านการแช่แข็งได้



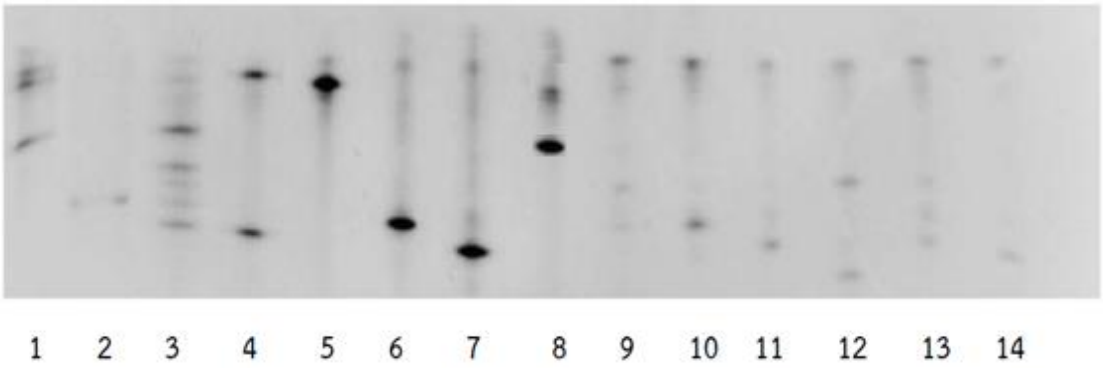
ภาพที่ 4.6 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอที่สภาวะเซลล์สมบูรณ์ (VC) บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae + Plesiomonas shigeloides + Aeromonas hydrophila,* 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus + Vibrio harveyi,* 3 คือ*Vibrio fluvialis + Vibrio alginolyticus + Vibrio furnissii,* 4 คือ*Vibrio mimicus + Vibrio vulnificus,* 5 คือ *Vibrio cholerae*, 6 คือ *Vibrio parahaemolyticus,* 7 คือ *Vibrio fluvialis*, 8 คือ *Vibrio alginolyticus,* 9 คือ *Vibrio mimicus*, 10 คือ *Vibrio harveyi,* 11 คือ *Vibrio furnissii,* 12 คือ *Vibrio vulnificus*, 13 คือ *Plesiomonas shigeloides* และ 14 คือ *Aeromonas hydrophila*)



ภาพที่ 4.7 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอ เซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae + Plesiomonas shigeloides + Aeromonas hydrophila,* 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus + Vibrio harveyi,* 3 คือ*Vibrio fluvialis + Vibrio alginolyticus + Vibrio furnissii,* 4 คือ*Vibrio mimicus + Vibrio vulnificus,* 5 คือ *Vibrio cholerae*, 6 คือ *Vibrio parahaemolyticus,* 7 คือ *Vibrio fluvialis*, 8 คือ *Vibrio alginolyticus,* 9 คือ *Vibrio mimicus*, 10 คือ *Vibrio harveyi,* 11 คือ *Vibrio furnissii,* 12 คือ *Vibrio vulnificus*, 13 คือ *Plesiomonas shigeloides* และ 14 คือ *Aeromonas hydrophila*)



ภาพที่ 4.8 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอ ที่เซลล์ที่อยู่ในสภาวะเซลล์บาดเจ็บแต่ผ่านขั้นตอนการทำ pre-enrichment (PIVC) บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae + Plesiomonas shigeloides + Aeromonas hydrophila,* 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus + Vibrio harveyi,* 3 คือ*Vibrio fluvialis + Vibrio alginolyticus + Vibrio furnissii,* 4 คือ*Vibrio mimicus + Vibrio vulnificus,* 5 คือ *Vibrio cholerae*, 6 คือ *Vibrio parahaemolyticus,* 7 คือ *Vibrio fluvialis*, 8 คือ *Vibrio alginolyticus,* 9 คือ *Vibrio mimicus*, 10 คือ *Vibrio harveyi,* 11 คือ *Vibrio furnissii,* 12 คือ *Vibrio vulnificus*, 13 คือ *Plesiomonas shigeloides* และ 14 คือ *Aeromonas hydrophila*

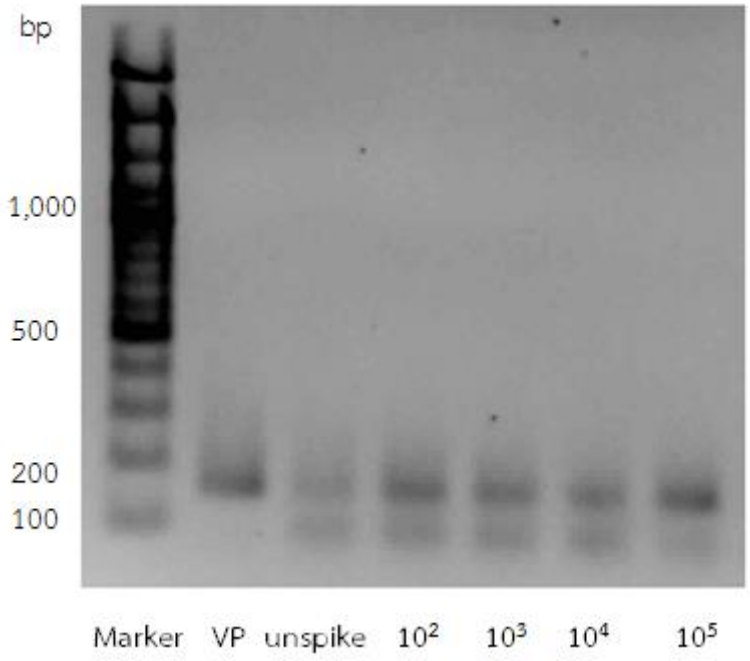
Chulalongkorn University

4.4 การประเมินวิธี RT-PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร

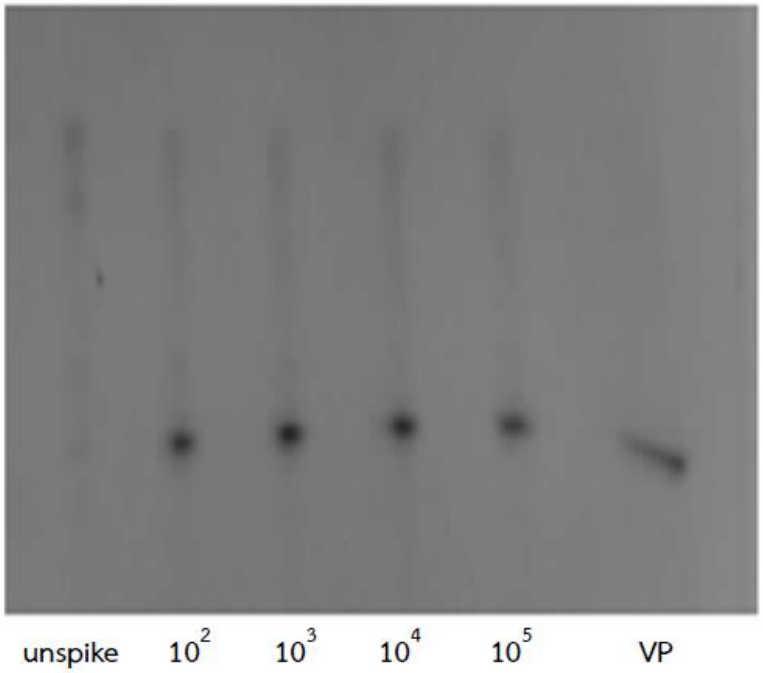
จากการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อวิบริโอด้วยวิธี RT-PCR-DGGE โดยใช้เชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอ พบว่าวิธี RT-PCR-DGGE มีศักยภาพที่จะสามารถนำไปใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อในกลุ่มวิบริโอได้ ดังนั้นจึงได้นำไปประเมินความเป็นไปได้ของวิธี RT-PCR-DGGE ในการตรวจวิบริโอในอาหารเทียบกับวิธีมาตรฐาน (US Food and Drug Administration, 2004) โดยเตรียมตัวอย่างอาหารที่มีการเติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ตั้งแต่ 10^1-10^5 CFU/ml ในการทดลองนี้เลือกใช้ตัวอย่างปลาหมึกแช่แข็งเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากเป็นตัวอย่างอาหารทะเลที่มักพบการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มวิบริโอ และเป็นตัวอย่างอาหารที่เตรียมให้ปราศจากเชื้อได้ง่ายเนื่องจากมีลักษณะผิวที่เรียบ

เมื่อนำตัวอย่างปลาหมึกที่เติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้นเซลล์ที่แตกต่างกัน มาตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าผลการตรวจสอบด้วยทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน กล่าวคือในตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อดังกล่าวตรวจไม่พบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ส่วนตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีระดับความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกัน พบว่าการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานสามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 10^1CFU/กรัม ส่วนการตรวจด้วยวิธี RT-PCR-DGGE สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/กรัม แสดงดังภาพที่ 4.9-4.10 และตารางที่ 4.4 ซึ่งจากผลการทดลองบ่งชี้ ให้เห็นถึงศักยภาพของวิธี RT-PCR-DGGE ที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีในการตรวจเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารที่ง่ายและรวดเร็วได้ ที่น่าสนใจคือรูปแบบแถบ cDNA ที่ปรากฏบนพอลีอะคริลาไมด์เจล แสดงดังภาพที่ 4.10 นั้นมีความเข้มของแถบ cDNA เพิ่มขึ้นตามจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นวิธีนี้อาจสามารถใช้บ่งชี้การปนเปื้อนของวิบริโอแต่ละชนิดในเชิงปริมาณได้โดยอาศัยการเปรียบเทียบความเข้มและความหนาของแถบ cDNA ที่ปรากฏกับ cDNA marker ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน แต่ทั้งนี้ต้องประเมินเรื่องอิทธิพลของจำนวน rRNA operon กับจำนวนประชากรต่อการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น การศึกษาด้วยเทคนิค Qualitative competitive PCR

จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่สามารถตรวจพบ*Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 CFU/กรัม ได้ อย่างไรก็ตามอาจสามารถเพิ่มความไวของวิธีโดยการเพิ่มขั้นตอน pre-enrichment ตัวอย่างเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของเชื้อตั้งต้นให้ถึงระดับที่วิธี RT-PCR-DGGE สามารถตรวจวิเคราะห์ได้



ภาพที่ 4.9 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (VP) ที่เติมลงในตัวอย่าอาหารในจำนวนเชื้อแตกต่างกัน บนอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.8



ภาพที่ 4.10 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (VP) ที่เติมลงในตัวอย่างอาหารในจำนวนเชื้อแตกต่างกันบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบผลการตรวจ เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เติมในตัวอย่างปลาหมึกปลอดเชื้อโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน

จำนวนเซลล์ที่เติม (CFU/ml)	**วิธีมาตรฐาน (BAM Chapter 5,2004)**	**RT-PCR -DGGE**
Unspike	ไม่พบ	ไม่พบ
10^{1}	พบ	ไม่พบ
10^{2}	พบ	พบ
10^{3}	พบ	พบ
10^{4}	พบ	พบ
10^{5}	พบ	พบ

4.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหาร

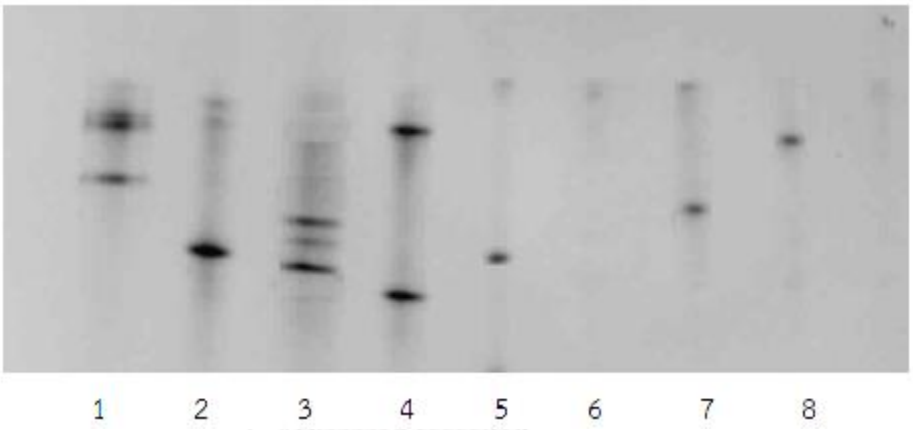
จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยตรงและผ่านการ pre-enrichment ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และวิธีมาตรฐาน (ทำการยืนยันผลโดยการทดสอบโคโลนีที่คัดแยกได้ทางชีวเคมีด้วย VITEK ®2 system โดยการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลจำนวน 14 ตัวอย่าง คือ ปลาหมึก (สด) เนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง) เนื้อปลาเก๋าแล่ (แช่แข็ง) ปลาหมึก (แช่แข็ง) หนวดปลาหมึก (สด) ปลาหมึกกล้วย (สด) กุ้งขาว (สด) ปลาทู (สด) กุ้งแม่น้ำ (สด) เนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง) หอยแครง (สด) หอยนางรม (สด) ปลาแซลมอนแล่ (สด) และปลาอินทรีย์แล่ (สด) เพื่อตรวจหาเชื้อวิบริโอ พบว่าการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐาน (US Food and Drug Administration, 2004) ที่ทำการยืนยันผลโดยการทดสอบโคโลนีที่คัดแยกได้ทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK ®2 system นั้นตรวจพบลักษณะโคโลนีของเชื้อในกลุ่มวิบริโอจำนวน 18 ไอโซเลต และผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK ®2 system แสดงดังภาคผนวก ฉ.

จากการตรวจเชื้อวิบริโอด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE โดยตรงจากตัวอย่างอาหารโดยไม่ผ่านขั้นตอนการ pre-enrichment ผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏแถบ cDNA บนอะกาโรสเจล ทั้งนี้อาจเกิดจากในตัวอย่างอาหารอาจมีเชื้อเริ่มต้นที่ต่ำกว่าระดับที่เทคนิค RT-PCR-DGGE จะสามารถตรวจได้ ดังนั้นในการประยุกต์ใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE จึงเลือกใช้การเพิ่มขั้นตอนการ pre-enrichment ตัวอย่างอาหารที่เตรียมพร้อมกับการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน และระบุชนิดของแถบ cDNA บนพอลีอะคริลาไมด์เจล โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ของเชื้อมาตรฐาน

ซึ่งผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.11 และ ภาพที่ 4.12 พบว่าจากตัวอย่างทั้ง 14 ตัวอย่าง การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 100 จำนวนทั้งสิ้น 3 ตัวอย่างคือเนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง), ปลาหมึก (แช่แข็ง) และปลาอินทรีย์แล่ (สด) โดยตัวอย่างที่ให้ผลสอดคล้องกันคือตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Vibrio cholerae* เพียงเชื้อเดียวจำนวน 1 ตัวอย่าง และอีก 2 ตัวอย่างให้ผลที่สอดคล้องกันคือตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มวิบริโอเหมือนกัน ตัวอย่างที่ตรวจสอบและให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 75 มีจำนวน 1ตัวอย่างคือหอยแครง (สด) ซึ่งวิธีมาตรฐานตรวจพบการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* ในขณะที่ตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE พบทั้ง *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* เหมือนกันแต่พบการปนเปื้อนของเชื้อเพิ่มอีก 1 ชนิดคือ *Vibrio alginolyticus*

ตัวอย่างที่ตรวจสอบและให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 50 จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัวอย่างคือปลาหมึก (สด), หนวดปลาหมึก (สด), ปลาหมึกกล้วย (สด), กุ้งขาว (สด), กุ้งแม่น้ำ (สด) และปลาแซลมอนแล่ (สด) โดยพบว่าผลการตรวจพบการปนเปื้อนของวิบริโอที่ตรงกันมักจะเป็นเชื้อวิบริโอชนิดที่ก่อโรค กล่าวคือเมื่อตรวจด้วยวิธีมาตรฐานพบการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* และเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ก็จะพบการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* เช่นกัน (ในตัวอย่างปลาหมึก (สด), หนวดปลาหมึก (สด) และกุ้งขาว (สด)) ส่วนเชื้ออื่นๆที่พบไม่ตรงกันคือเชื้อที่ไม่ค่อยพบรายงานการปนเปื้อนในอาหาร และ/หรือ เป็นเชื้อที่ไม่ได้นำมาใช้ในการประเมินเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการทดลองนี้ ยกเว้นในตัวอย่างปลาหมึกกล้วย (สด) ที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานพบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio mimicus* แต่เทคนิค RT-PCR-DGGE ตรวจพบการปนเปื้อนของ *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio mimicus* นอกจากนี้มีตัวอย่างที่ทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกันคิดเป็นร้อยละ 50 คือพบ *Vibrio cholerae* ในตัวอย่างกุ้งแม่น้ำ (สด) และพบ *Vibrio fluvialis* ในตัวอย่างปลาแซลมอนแล่ (สด) ส่วนการตรวจพบชนิดเชื้อที่ไม่ตรงกันมี 2 รูปแบบได้แก่ รูปแบบที่ 1 คือตัวอย่างที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอเพิ่มขึ้นอีก 1 ชนิดแต่ตรวจไม่พบด้วยวิธีมาตรฐาน ซึ่งผลลักษณะนี้ตรวจพบในตัวอย่างอาหาร 4 ตัวอย่าง เชื้อวิบริโอที่ตรวจพบการปนเปื้อนเพิ่มเติมโดย RT-PCR-DGGE คือ *Vibrio alginolyticus* และ *Aeromonas hydrophila* รูปแบบที่ 2 คือตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนของวิบริโอที่ตรงกัน 1 ชนิดและทั้งสองวิธีต่างตรวจพบการปนเปื้อนของวิบริโอเพิ่มขึ้นอีกวิธีละ 1 ชนิดที่ต่างกัน ซึ่งรูปแบบที่ 2 นี้พบในตัวอย่างอาหาร 2 ชนิดคือปลาหมึก (สด) ที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานพบเชื้อ *Aeromonas salmonicida* เพิ่ม และปลาหมึกกล้วยสดที่ตรวจพบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เพิ่ม แต่ในขณะที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE พบเชื้อ *Vibrio alginolyticus* เพิ่ม ทั้งนี้วิบริโอที่ตรวจพบการปนเปื้อนด้วยวิธีมาตรฐานส่วนใหญ่เป็นเชื้อวิบริโอที่ไม่ได้นำมาใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการประเมินวิธี RT-PCR-DGGE เช่น *Aeromonas salmonicida*

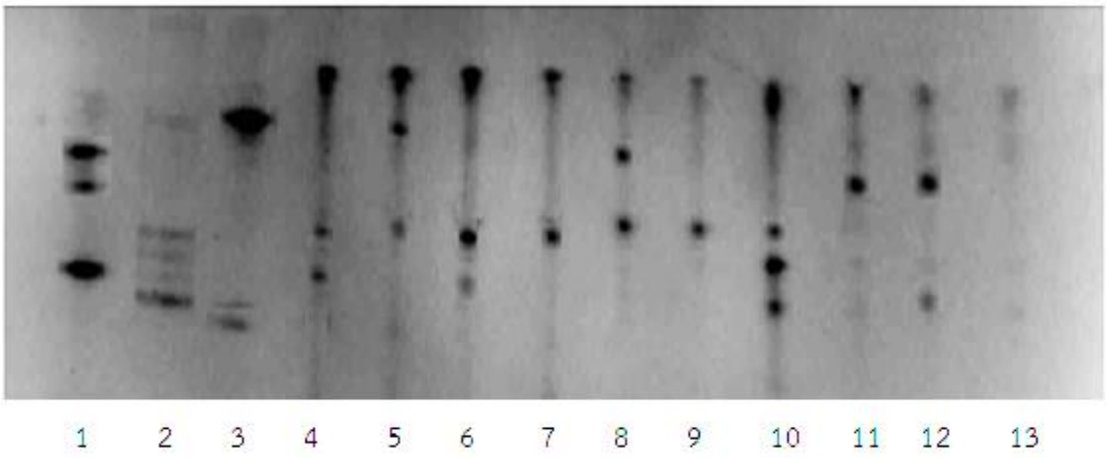
ตัวอย่างที่ผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลไม่ที่สอดคล้องกัน (ร้อยละที่พบตรงกันเท่ากับ 0) จำนวนทั้งสิ้น 4 ตัวอย่างคือเนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง), ปลาทู (สด), เนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง) และหอยนางรม (สด) โดยเชื้อวิบริโอที่พบในแต่ละวิธีคือเชื้อวิบริโอที่มักจะไม่ค่อยพบการรายงานการปนเปื้อนในอาหารได้แก่ *Vibrio alginolyticus* และ *Aeromonas hydrophila* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และ *Morganella morganii* ssp. *morganii* และ *Vibrio metschnikovii* เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน และเชื้อวิบริโอที่ตรวจพบการปนเปื้อนด้วยวิธีมาตรฐานเป็นเชื้อวิบริโอที่ไม่ได้ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการประเมินเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการศึกษานี้



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารชุดที่ 1 บนพอลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae* + *Plesiomonas shigeloides* + *Aeromonas hydrophila,* Lane 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus* + *Vibrio harveyi,* Lane 3 คือ *Vibrio fluvialis* + *Vibrio alginolyticus* + *Vibrio furnissii,* Lane 4 คือ *Vibrio mimicus* + *Vibrio vulnificus,* Lane 5 คือปลาหมึก (สด), Lane 6 คือเนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง), Lane 7 คือเนื้อปลาเก๋าแล่ (แช่แข็ง) และ Lane 8 คือปลาหมึก (แช่แข็ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารชุดที่ 2 บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae + Plesiomonas shigeloides + Aeromonas hydrophila + Vibrio parahaemolyticus + Vibrio harveyi,* Lane 2 คือ*Vibrio fluvialis + Vibrio alginolyticus + Vibrio furnissii,* Lane 3 คือ*Vibrio mimicus + Vibrio vulnificus,* Lane 4 คือหนวดปลาหมึก (สด), Lane 5 คือปลาหมึกกล้วย (สด), Lane 6 คือกุ้งขาว (สด), Lane 7 คือปลาทู (สด), Lane 8 คือกุ้งแม่น้ำ (สด), Lane 9 คือเนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง), Lane 10 คือหอยแครง (สด), Lane 11 คือหอยนางรม (สด), Lane 12 คือ เนื้อปลาแซลมอนแล่ (สด) และ Lane 13 คือ ปลาอินทรีย์แล่ (สด)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่างอาหาร	วิธีการตรวจ		ร้อยละของชนิดเชื้อที่พบตรงกัน
	Conventional method (BAM,2004)	RT-PCR –DGGE (pre-enrichment)	
1. ปลาหมึก (สด)	*Vibrio parahaemolyticus* (95%) *Aeromonas salmonicida* (95%)	*Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio alginolyticus*	50
2. เนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง)	Not detected	Not detected	100
3. เนื้อปลาเก๋าแล่ (แช่แข็ง)	*Morganella morganii ssp morganii* (95%)	*Vibrio alginolyticus*	0
4. ปลาหมึก (แช่แข็ง)	*Vibrio cholerae* (96%)	*Vibrio cholerae*	100
5. หนวดปลาหมึก (สด)	*Vibrio parahaemolyticus* (90%)	*Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio alginolyticus*	50
6. ปลาหมึกกล้วย (สด)	*Vibrio parahaemolyticus* (94%) *Vibrio mimicus* (99%)	*Vibrio alginolyticus* *Vibrio mimicus*	50
7. กุ้งขาว (สด)	*Vibrio parahaemolyticus* (99%)	*Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio alginolyticus*	50

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	วิธีการตรวจ Conventional method (BAM,2004)	RT-PCR –DGGE (pre-enrichment)	ร้อยละของชนิดเชื้อที่พบตรงกัน
8. ปลาทู (สด)	*Morganella morganii ssp morganii* (99%)	*Vibrio alginolyticus*	0
9. กุ้งแม่น้ำ (สด)	*Vibrio cholerae* (98%)	*Vibrio cholerae* ' *Vibrio alginolyticus*	50
10. เนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง)	*Vibrio metschnikovii* (88%)	*Vibrio alginolyticus*	0
11. หอยแครง (สด)	*Vibrio parahaemolyticus* (91%) *Vibrio fluvialis* (96%)	*Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio fluvialis* ' *Vibrio alginolyticus*	75
12. หอยนางรม (สด)	Not detected	*Aeromonas hydrophila*	0
13. ปลาแซลมอนแล่ (สด)	*Vibrio fluvialis* (94%)	*Vibrio fluvialis* *Aeromonas hydrophila*	50
14. ปลาอินทรีย์แล่ (สด)	Not detected	Not detected	100
Time (day)	**7-10**	**2**	

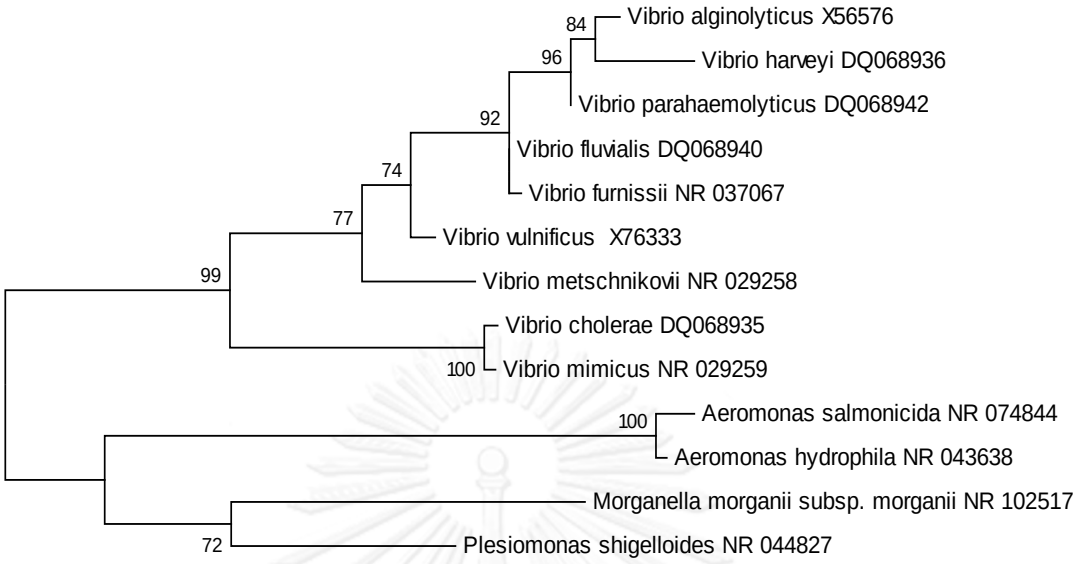
จากการเปรียบเทียบการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน พบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE มีแนวโน้มที่ตรวจพบจำนวนชนิดของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารได้มากกว่า โดยในส่วนที่พบว่าชนิดของเชื้อวิบริโอที่พบในตัวอย่างอาหารที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่ตรงกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานนั้นส่วนใหญ่คือเชื้อวิบริโอที่ไม่ค่อยมีการรายงานการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารและเป็นเชื้อวิบริโอที่ไม่ได้ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในขั้นตอนการพัฒนาวิธีดังกล่าว อย่างไรก็ตามเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE สำหรับตรวจสอบวิบริโอในอาหารให้ครอบคลุมมากขึ้นควรต้องนำเชื้อวิบริโอสปีชีส์อื่นๆมาใช้เป็นจุลินทรีย์มาตรฐานสำหรับเป็น DNA marker ในการศึกษานี้จึงประเมินความเป็นไปได้ของวิธีในการแยกวิบริโอสปีชีส์อื่นๆเพิ่มเติมโดยการนำนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA ของวิบริโอมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์ที่ใช้ในการทดลองนี้และที่ตรวจพบเพิ่มเติมในตัวอย่างอาหาร (*Vibrio metschnikovii, Morganella morganii* ssp. *morganii* และ *Aeromonas salmonicida*) จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechology (NCBI) ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST) มาตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม โดยการสร้างแผนภูมิไฟโลจีเนติกทรี (phylogenetic tree) ตามวิธี Two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ Maximum Likelihood method (http://www.geneious.com/features/phylogenetic-tree-building) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985) โดยใช้โปรแกรม Maga 6 (Tamura et al., 2013) และการวิเคราะห์ %homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ 16S rRNA เดียวกันของเชื้อทุกชนิดสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธี

จากการวิเคราะห์ไฟโลจีเนติกทรี (phylogenetic tree) และ% homology แสดงดังภาพที่ 4.13 และตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบผลกับรูปแบบแถบดีเอ็นเอบนพอลีอะคริลาไมด์เจล พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความสอดคล้องกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของวิบริโอแต่ละชนิด กล่าวคือแถบดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่บนพอลีอะคริลาไมด์เจลอยู่ในตำแหน่งเดียวกันหรือใกล้เคียงกันจะเป็นวิบริโอที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันบนไฟโลจีเนติกทรี ได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกันมาก เมื่อประเมิน % homology พบว่าทั้ง 3 สปีชีส์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันถึง 99 % homology ในทำนองเดียวกันกับ *Vibrio fluvialis* และ *Vibrio furnissii* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันบนไฟโลจีเนติกทรีมีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกัน 99 % homology เช่นเดียวกันกับกลุ่มแรก ซึ่งกลุ่มของ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio mimicus* ก็มีผล

เป็นไปในทำนองเดียวกัน ที่ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกัน 99 % homology

ในขณะที่วิบริโอสปีชีส์อื่นๆที่มีแถบดีเอ็นเอแตกต่างออกไปอย่างเห็นได้ชัด ได้แก่ *Vibrio vulnificus, Aeromonas hydrophila* และ*Plesiomonas shigelloides* จะเป็นเชื้อที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมต่างกลุ่มกัน และพบว่าวิบริโอเหล่านี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA เหมือนกับสปีชีส์อื่นๆน้อยกว่า 99 (90-98) ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อวิบริโอที่ตรวจพบในอาหารเพื่อเป็นแนวทางในการนำมาพัฒนาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) ได้แก่ *Vibrio metschnikovii*, *Aeromonas salmonicida* และ *Morganella morganii ssp morganii* พบว่าทั้ง 3สปีชีส์มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมแตกต่างจากวิบริโอ 10 สปีชีส์แรก และในทั้ง 3 สปีชีส์เองก็มีความแตกต่างทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมกัน และเมื่อพิจารณา % homology ของนิวคลีโอไทด์ (บนพื้นที่ 16s RNA ตำแหน่งที่เข้าจับด้วย GC567F และ 680R) พบว่าทั้ง 3 สปีชีส์ มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกับวิบริโอ 10 สปีชีส์แรกเพียง 91-98 % homology และภายใน 3 สปีชีส์ ก็มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกันเพียง 91 % homology

จากผลการประเมินดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์น่าจะสามารถแยกด้วยวิธี RT-PCR-DGGE ได้ โดยเมื่อประเมินจาก % homology แล้วคาดว่าแถบดีเอ็นเอของทั้ง 3 สปีชีส์น่าจะเคลื่อนบนพอลีอะคริลาไมด์เจล ได้แตกต่างกันและแถบดีเอ็นเอของทั้ง 3 สปีชีส์ก็น่าจะไม่ตรงกับแถบดีเอ็นเอของวิบริโอมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาใช้เชื้อทั้ง 3 สปีชีส์เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ต่อไป นอกจากนี้จากผลการประเมินดังกล่าวยังสามารถมาใช้ในการอภิปรายผลของการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารด้วย RT-PCR-DGGE นั้นสามารถบอกได้ว่าการที่ตรวจพบเชื้อ*Vibrio metschnikovii, Aeromonas salmonicida* และ *Morganella morganii ssp morganii* ด้วยวิธีมาตรฐานแต่ตรวจไม่พบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่ได้เกิดจากการที่แถบดีเอ็นเอของทั้ง 3 สปีชีส์ซ้อนทับหรือแยกไม่ได้จากเชื้อวิบริโอมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์ แต่น่าจะเกิดจากจำนวนประชากรของเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหารมีจำนวนประชากรน้อยกว่าเชื้อวิบริโอสปีชีส์อื่นๆที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนพอลีอะคริลาไมด์เจล และ/หรือมีจำนวนประชากรหลังผ่านการ pre-enrichment มีจำนวนน้อยกว่าค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของเทคนิค RT-PCR-DGGE ดังนั้นแนวทางในการพัฒนาการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ให้ครอบคลุมเชื้อวิบริโอ นอกเหนือจากการพัฒนา DNA marker ของสปีชีส์อื่นๆ เพิ่มเติมแล้ว หากต้องการศึกษาเชื้อจำเพาะ อาจต้องออกแบบไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนของวิบริโอชนิดจำเพาะที่ต้องการ หรือการเพิ่มขั้นตอน selective enrichment สำหรับเชื้อที่ต้องการก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่พัฒนาได้



ภาพที่ 4.13 ไฟโลจีเนติกทรี (phylogenetic tree) ของเชื้อกลุ่มวิบริโอ

ที่มา: Tamura et al. (2013)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ % homology ของวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และวิบริโอที่ตรวจพบด้วยวิธีมาตรฐาน

	V. alginolyticus	*V.parahaemolyticus*	*V. mimicus*	*V. cholerlae*	*V. harveyi*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V. vulnificus*	*V. metschnikovii*	*Plesiomonas shigelloides*	*A. hydrophila*	*A. salmonicida*	*Morgenella morganii ssp morganii*
V. alginolyticus	100	99	95	95	98	98	99	98	96	93	90	90	92
V. parahaemolyticus	99	100	95	95	99	99	99	99	97	94	91	91	92
V. mimicus	95	95	100	99	95	95	96	96	95	92	91	91	92
V. cholerlae	95	95	99	100	95	95	96	96	95	92	91	91	92
V. harveyi	98	99	95	95	100	98	98	97	96	93	91	91	92
V. fluvialis	98	99	95	95	98	100	99	99	97	94	91	91	93
V. furnissii	99	99	96	96	98	99	100	99	97	94	91	91	93
V. vulnificus	98	99	96	96	97	99	99	100	98	93	91	91	92
V. metschnikovii	96	97	95	95	96	97	97	98	100	93	91	91	91
Plesiomonas shigelloides	93	94	92	92	93	94	94	93	93	100	92	92	94
A. hydrophila	90	91	91	91	91	91	91	91	91	92	100	99	91
A. salmonicida	90	91	91	91	91	91	91	91	91	92	99	100	91
Morgenella morganii ssp morganii	92	92	92	92	92	93	93	92	91	94	91	91	100

จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถนำไปพัฒนาประสิทธิภาพต่อไปได้และมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกในการระบุการปนเปื้อนของวิบริโอในอาหารได้ โดยในส่วนที่พบแถบของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นสามารถระบุชนิดต่อไปได้ทำได้การโคลน (Cloning) และตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดได้ หรืออาจใช้ร่วมกับวิธีมาตรฐานเพื่อตรวจสอบเบื้องต้นแล้วยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานต่อไปในกรณีที่พบเชื้อก่อโรคที่สำคัญและต้องการรับรองผล (Certificate) เมื่อพิจารณาข้อได้เปรียบในการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ประเด็นแรกคือด้านเวลา พบว่าการตรวจเชื้อวิบริโอด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 1-2 วัน ก็สามารถระบุชนิดของวิบริโอที่ปนเปื้อนในอาหารได้ ในขณะที่วิธีดั้งเดิมใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน ดังนั้นRT-PCR-DGGE จึงเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับเป็นวิธีที่รวดเร็วและสามารถใช้ในการตรวจสอบเพื่อควบคุมจุดวิกฤต (critical control point) ในระบบการควบคุมความปลอดภัยทางอาหาร และ/หรือเพิ่มประสิทธิภาพของระบบประกันคุณภาพในสายการผลิตอาหาร

ประเด็นที่สองด้านราคา เมื่อประเมินราคาต่อหน่วยการวิเคราะห์พบว่าการตรวจเชื้อวิบริโอด้วยวิธีมาตรฐานและการยืนยันผลด้วยการทดสอบทางด้านชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK®2 system เพื่อยืนยันผลต่อ 1 โคโลนีราคารวมทั้งสิ้นประมาณ 2,000 บาท ดังนั้นถ้ามีโคโลนีที่ส่งสัยมากกว่า 1 โคโลนี ก็จะทำให้ราคาเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว ดังนั้นหากโคโลนีที่สงสัยมีจำนวนมากและไม่ใช่จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญจะทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากร หากมีวิธีคัดเลือกเบื้องต้นก็จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ ส่วนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR-DGGE ต่อครั้งที่ทำการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้ครั้งละ 14 ตัวอย่าง ราคาประมาณ 2,500 บาท และสามารถระบุชนิดของวิบริโอที่ปนเปื้อนได้อย่างน้อย 5 สปีชีส์ในเวลาเดียวกัน

ประเด็นที่สามด้านความปลอดภัย เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นวิธี Cultural independent ที่ซึ่งไม่ต้องมีการเพาะเลี้ยงเซลล์จึงช่วยลดความเสี่ยงของการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการและลดโอกาสการปนเปื้อนในสายการผลิตได้ ประเด็นสุดท้ายด้านการใช้แรงงาน เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถดำเนินการได้อย่างรวดเร็วจึงใช้แรงงานในการดำเนินการน้อยกว่าวิธีมาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะของ PCR-DGGEโดยอ้างอิงจากค่าเริ่มต้นจากรายงานของ Thompson และคณะ (2004) และจากรายงานของ Eiler และ Bertilsson (2006) พบว่าสภาวะที่สามารถใช้เพื่อเป็นวิธีในการตรวจสอบเชื้อวิบริโอคือใช้ไพรเมอร์ GC567Fและ680R ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและใช้ความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 10 ที่ผสมสารดีเนเจอร์แรน (denaturant) (ยูเรียและฟอร์มาไมด์) เข้มข้นร้อยละ 45-70 พบว่าเทคนิค DGGE สามารถแยก DNA และ cDNA ของเชื้อกลุ่มวิบริโอออกจากกันได้ โดยมีลักษณะของแถบ DNA และ cDNA (migration pattern) ที่ไม่แตกต่างกันจำนวน 2 คู่ คือ *Vibrio fluvialis* กับ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบด้วยวิธี PCR-DGGE กับ RT-PCR-DGGE พบว่าสามารถแยก DNA amplicons และ cDNA amplicons ของวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ได้ไม่แตกต่างกัน และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium ออกจากเชื้อในกลุ่มวิบริโอได้

เมื่อประเมินความไวของวิธีในการตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากันพบว่าระบบ PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอเพียง 3 สปีชีส์คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, และ *Vibrio alginolyticus* ขณะที่ระบบ RT-PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอ 5 สปีชีส์ คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* และเมื่อตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอที่มีชนิดและความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกัน (แปรค่าตั้งแต่ 10^2-10^5 CFU/ml) พบว่า PCR-DGGE ตรวจพบ DNA ของสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดสองลำดับแรกในกลุ่ม ในขณะที่ RT-PCR-DGGE ตรวจพบ cDNA ของ สปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์แตกต่างกันได้ถึงห้าลำดับแรกในกลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง PCR-DGGE กับ RT-PCR-DGGE พบว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยการใช้อาร์เอ็นเอ (RT-PCR-DGGE) มีความไว (sensitivity) และสามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยการใช้ ดีเอ็นเอ (PCR-DGGE) ดังนั้นจึงเลือกวิธี RT-PCR-DGGE สำหรับประเมินการตรวจสอบเชื้อวิบริโอต่อไป

เมื่อประเมินการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเซลล์วิบริโอที่สภาวะต่างๆ คือ เซลล์สมบูรณ์(VC) เซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ(IVC) และเซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (PIVC) พบว่า สามารถตรวจหา cDNA ของเซลล์ทั้งสามสภาวะได้ไม่แตกต่างกัน และเมื่อตรวจสอบวิบริโอที่เติมลงในตัวอย่างอาหาร พบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานและสามารถตรวจหาเชื้อวิบริโอในอาหารได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/g ขึ้นไปและเมื่อนำวิธีดังกล่าวมาตรวจสอบชุมชนวิบริโอในตัวอย่างอาหารพบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE มีแนวโน้มที่ตรวจพบจำนวนชนิดของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารได้มากกว่า โดยในส่วนที่พบว่าชนิดของเชื้อวิบริโอที่พบในตัวอย่างอาหารที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่ตรงกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานนั้นส่วนใหญ่คือเชื้อวิบริโอที่ไม่ค่อยมีการรายงานการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารและเป็นเชื้อวิบริโอที่ไม่ได้ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในขั้นตอนการพัฒนาวิธีดังกล่าว

5.2 ข้อเสนอแนะ

เทคนิค RT-PCR-DGGE เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่มีศักยภาพที่สามารถนำ ไปพัฒนาต่อเพื่อให้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ โดยอาจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจลเทียบกับความเข้มข้นของเซลล์ที่ระดับต่างๆ และจากข้อด้อยของเทคนิค RT-PCR-DGGE ที่ไม่สามารถตรวจได้ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 CFU/กรัม ได้ อาจจะสามารถแก้ไขได้โดยการทำขั้นตอน pre-enrichment ตัวอย่างก่อนเหมือนการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ให้ถึงระดับที่เทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ($\geq 10^2$ CFU/กรัม) ในส่วนของเชื้อกลุ่มวิบริโอที่พบแถบของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นถ้าต้องการทราบว่าคือเชื้อวิบริโอสปีชีส์ใดก็อาจทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากแผ่นเจลแล้วนำมาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะทำให้ทราบว่าคือเชื้อวิบริโอสปีชีส์ใด หรืออีกวิธีคือทำการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานควบคู่ไปด้วยและทำการยืนยันผลอีกครั้งด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีก็ได้เช่นกัน

แนวทางในการพัฒนาต่ออาจนำแถบดีเอ็นเอไประบุชนิดของเชื้อโดยการโคลน (Cloning) และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือทำการเปลี่ยนตำแหน่งที่มี discriminatory มากกว่าและพัฒนาให้มีขนาดที่เหมาะสมกับการแยกด้วยเทคนิค DGGE นอกจากนี้อาจเพิ่มขั้นตอน selective enrichment เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไม่ต้องการ และมีเฉพาะเชื้อเป้าหมายหรือถูกกำหนดในมาตรฐาน

การใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว แม่นยำ ประหยัดเวลาและสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบเพื่อควบคุมจุดวิกฤต (critical control point) หรือประกันคุณภาพในสายการผลิตอาหาร เนื่องจากไม่ต้องทำการ enrichment การทำ selective plating การยืนยันผลโดยการทดสอบทางชีวเคมี และการทดสอบ serological test อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวต้องทำการศึกษา

Chulalongkorn University

เพิ่มเติมทางด้าน ความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไวของวิธีในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ โดยเพิ่มชนิดของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้นเพื่อพัฒนาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานและใช้ในการเปรียบเทียบและศึกษาความหลากหลายของเชื้อกลุ่มวิบริโอในระบบนิเวศต่างๆต่อไปในรูปแบบของการทำ full validation และวิธีการดังกล่าวยังสามารถที่จะนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อเป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆต่อไปได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Compact Dry “Nissui” VP For *Viblio parahaemolyticus*. Nissui Pharmaceutical Co.Ltd, Japan.

Adrover, M. et al. 2010a. Characterization of specific cDNA background synthesis introduced by reverse transcription in RT-PCR assays. Biochimie 92: 1839-1846.

Adrover, M. F. et al. 2010b. Characterization of specific cDNA background synthesis introduced by reverse transcription in RT-PCR assays. Biochimie 92: 1839-1846.

Bej, A. K. et al. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh. Journal of microbiological methods: 215-225.

Berger, S. L., and A. R. Kimmel. 1987. Guide to molecular cloning technique. Mehods Enzymol 152: 215-304.

Bhunia, A. K. 2008. Foodborn microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. West Lafayette, Indiana : Springer.

Bio-Rad. The DCode™ Universal Mutation Detection System. In: Bio-Rad (ed.). p 11-28, U.S.

Blanco-Abad, V., J. Ansede-Bermejo, A. Rodriguez-Castro, and J. Martinez-Urtaza. 2009. Evaluation of different procedures for the optimized detection of Vibrio parahaemolyticus in mussels and environmental samples. International journal of food microbiology 129: 229-236.

Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. 2003. Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products. Applied and Environmental Microbiology 69: 4116-4122.

Boer, E. d., and R. Beumer. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. International journal of food microbiology 50: 119-130.

Campos, E. et al. 1996. *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. Applied and Environmental Microbiology 62: 1141–1144.

Chiang, S.-R., and Y.-C. Chuang. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. Journal of Microbiological Immunology Infection 36: 81-88.

Chrisolite, B. et al. 2008. Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. Aquaculture 275: 13-19.

Chung, W. H., C. L. Li, and Y. C. Ming. 1994. Survival of Psychrotrophic Vibrio mimicus, Vibrio fluvialis and Vibrio parahaemolyticus in Culture Broth at Low Temperatures. Journal of Food Protection 57: 607-610.

Coutard, F., M. Pommepuy, S. Loaec, and D. Hervio-Heath. 2005. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. Journal of applied microbiology 98: 951-961.

Daavis, L. G., M. D. Dibner, and J. F. Batteyb. 1986. Basic Methods in Molecularbiology. Elsevier Science Pubishing . New York.

Depaola, A., J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, and D. W. Cook. 2003. Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. Applied and Environmental Microbiology 69: 1521-1526.

Eiler, A., and S. Bertilsson. 2006. Detection and quantification of Vibrio populations using denaturant gradient gel electrophoresis. Journal of microbiological methods 67: 339-348.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Gafan, G. P., and D. A. Spratt. 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGEGE) An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. FEMS Microbiology Letters 253: 303-307.

Hara-Kudo, Y. et al. 2001. Improved method for detection of Vibrio parahaemolyticus in seafood. Applied and Environmental Microbiology 67: 5819-5823.

Hoshino, K. et al. 1998. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. FEMS Immunology & Medical Microbiology 20: 201-207.

Izumiya, H. et al. 2011. Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. Molecular and cellular probes 25: 174-176.

Joshi, M., and D. J. D. 2010. Popymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. International Journal of Biomedical Research 5: 81-97.

Kadkhoda, K., H. Adam, M. W. Gilmour, and G. W. Hammond. 2012. Nontoxigenic *Vibrio cholerae* Septicemia in an Immunocompromised Patient. Case reports in infectious diseases 2012: 698746.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.

Kodaka, H., H. Teramura, S. Mizuochi, M. Saito, and H. Matsuoka. 2009a. Evaluation of the Compact Dry VP method for screening raw seafood for total *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot 72: 169-173.

Kodaka, H., H. Teramura, S. Mizuochi, M. Saito, and H. Matsuoka. 2009b. Evaluation of the Compact Dry VP method for screening raw seafood for total *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot 72: 169-173.

Lake, R., A. Hudson, and P. Cressey. 2003. Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood Christchurch: Institute of Environmental Science & Research Limited.

Lee, J.-S. et al. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. International journal of food microbiology 102: 143-150.

Madden, J. M., B. A. McCardell, and J. G. Morris. 1989. *Vibrio cholerae.* Foodborne Bacterial Pathogens. p 525-542. Marcel Dekker, New York.

Manafi, M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. International Journal Food Microbiology 31: 45-58.

Messelhäusser, U. et al. 2010. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. International journal of food microbiology 142: 360-364.

Mills, D. A., E. A. Johannsen, and L. Cocolin. 2002. Yeast Diversity and Persistence in Botrytis Affected Wine Fermentations. Applied and Environmental Microbiology 68: 4884-4893.

Muyzer, G., and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73: 127-141.

Nakashima, Y. et al. 2007. A Chromogenic Substrate Culture Plate for Early Identification of *Vibrio vulnificus* and Isolation of Other Marine *Vibrios*. Annals of Clinical & Laboratory Science 37: 330-334.

Odumeru, J. A., and C. G. León-Velarde. 2012. Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen. InTech China, China.

Oliver, J. D. 1989. *Vibrio vulnificus.* Foodborne Bacterial Pathogens. p 569-600. Marcel Dekker, New York.

Oliver, J. D., and J. B. Kaper. 1997. *Vibrio* species. Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers. p 228-264, USA.

Ortiz, E., G. Estrada, and P. M. Lizandi. 1998. PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons. Molecular and Cellular Probe 12: 219-226.

Park, T. et al. 2003. Misidentification of Aeromonas veronii biovar sobria as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. Lett Appl Microbiol 37: 349-353.

Pincus, D. H. Microbial Ientification using the BoMérieux VTEK® 2 System, bioMérieux, Inc. USA.

Pizzutto, M., and R. G. Hirst. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to Penaeus monodon larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. Diaeases of Aquatic Organiams 21: 61-68.

Prakitchaiwattana, C. J., G. H. Fleet, and G. M. Heard. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS yeast research 4: 865-877.

Raghunath, P., S. Acharya, A. Bhanumathi, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 2008. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. Food microbiology 25: 824-830.

Robertsona, P. A. W., H. S. Xub, and B. Austin. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. Journal of microbiological methods 34: 31-39.

Romestand, B., A. Dragesco, G. Breuil, F. Coste, and G. Bouix. 1993. An ELISA technique for rapid diagnosis of *vibriosis* in sea bass Dicentrarchus labrax. Diseases of Aquatic Organisms 15: 137-143.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Saulnier, D., S. D. Decker, and P. Haffner. 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. Journal of microbiological methods 77: 191-197.

Shi, X.-M., F. Long, and B. Suo. 2010. Molecular methods for the detection and characterization of foodborne pathogens. Pure and Applied Chemistry 82: 69-79.

Somma, M., and M. Querci. 2006. Session 6: The Polymerase Chain Reaction (PCR) The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms.

Su, Y. C., and C. Liu. 2007. Vibrio parahaemolyticus: a concern of seafood safety. Food microbiology 24: 549-558.

Szaboa, E. A., and B. M. Mackey. 1999. Detection of *Salmonella enteritidis* by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). International journal of food microbiology 51: 113-122.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Thompson, C. C., F. L. Thompson, A. C. P. Vicente, and J. Swings. 2007a. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 2480-2484.

Thompson, F. L., I. Cleenwerck, J. Swings, J. Matsuyama, and T. Iida. 2007b. Genomic diversity and homologous recombination in *Vibrio parahaemolyticus* as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and multilocus sequence analysis (MLSA). Microbes and Environments 22: 373-379

Thompson, J. R. et al. 2004. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. Applied and Environmental Microbiology 70: 4103-4110.

Thongchankeaw, U. et al. 2011. Diversity of *Vibrio* spp. at the Andaman Tarytao Island Thailand. Asian Journal of Biotechnology 3: 530-539.

Tuteja, U., S. Kumar, J. Shukla, J. Kingston, and H. V. Batra. 2007. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. Journal of medical microbiology 56: 1340-1345.

Twedt, R. M. 1989. *Vibrio parahaemolyticus.* Foodborne Bacterial Pathogens. p 543-568. Marcel Dekker, New York.

US Food and Drug Administration. 2004. Bacteriological Analytical Manual. http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm Accessed 10 March 2012.

Wang, S., and R. E. Levin. 2006. Rapid quantification of *Vibrio vulnificus* in clams (Protochaca staminea) using real-time PCR. Food microbiology 23: 757-761.

Westermeier, R. et al. 2001. Electrophoresis in Practice. WILEY-VCH, Germany.

Yang, Z. Q. et al. 2008 Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. International journal of food microbiology 125: 279-285.

Zhaoa, F., D. q. Zhoua, H. h. Caoa, L. p. Maa, and Y. h. Jiang. 2011. Distribution, serological and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish in the eastern coast of China. Food Control 22: 1095-1100.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.กระทรวงสาธารณสุข. 2548. โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ คู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. http://webdb.dmsc.moph.go.th/ Accessed 17 เมษายน 2555.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.กรมประมง.กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. 2554. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางจุลชีววิทยา. www.fisheries.go.th/quality/Std%20micro.html Accessed 20 มกราคม 2555.

กระทรวงพาณิชย์. 2555. สินค้าส่งออกสำคัญ 10 อันดับแรก : สินค้าหมวดเกษตรกรรม. http://www2.ops3.moc.go.th Accessed 30 มกราคม 2556.

กระทรวงสาธารณสุข, ศ. ก. 2550. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. http://webdb.dmsc.moph.go.th Accessed 17 เมษายน 2555.

กระทรวงสาธารณสุข.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร.

ทัศวรรณ ขาวสีจาน, สุวรรณา ภาณุตระกูล, and ศิริโฉม ทุ่งเก้า. 2550. การประเมินความเสี่ยงในการได้รับเชื้อกลุ่มวิบริโอจากการบริโภคหอยนางรม จากแหล่งเลี้ยงหอยนางรม ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. In: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. p 263-270.

บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ, องุ่น เกียรติวุฒิ, and ศุภกิจ อังคศุภากร. 2527. โรคติดต่อระหว่างคนและสัตว์. บัณฑิตการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร.

วราภา มหากาญจนกุล, ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, and วชิราภรณ์ เทียมพันธ์. 2544. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในผักใบ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. p 410-416. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, and มนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. โรงพิมพ์เรือนแก้ว, กรุงเทพมหานคร.

ศรีวรรณา หัทยานานนท์, กฤษณา ภูริกิตติชัย, กรองแก้ว ศุภวัฒน์, and ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ. 2549. มหันตภัยจากเชื้อ *Vibrio vulnificus*. http://www.dmsc.moph.go.th Accessed 17 เมษายน 2555.

สุชาดา จัมทสิริยากร. 2553. อหิวาตกโรค (Cholera). สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2552. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. p 114-116. โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึกในพระบรมราชูอุปถัมภ์, นนทบุรี.

สุดสาย ตรีวานิช, and สายพิณ ทานัชฌาสัย. 2546. การประยุกต์ใช้ PCR และ Biosensor สำหรับการตรวจสอบอันตรายในอาหาร. โรงพิมพ์สุทธิสารการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. โรงพิมพ์ตระกูลไทย, พิษณุโลก.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

ก. 1 การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ละลาย Disodium ethylenediaminetetra acetate (EDTA) 46.5 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า pH 8.0 ด้วย Sodium hydroxide (pellet) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ก. 2 การเตรียม 50X TAE buffer (pH 8.3) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ละลาย Tris base 60.5 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน (deionize water) 100 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid ปริมาตร 14.275 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า pH 8.3 ด้วย 1M Sodium hydroxide (NaOH) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ก. 3 การเตรียม 1 X TAE buffer (pH 8.3) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ปิเปต 50 X TAE buffer (pH 8.3) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ก. 4 10% (w/v) Ammonium persulphate solutions

ชั่ง Ammonium persulphate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

ก. 5 อะกาโรสเจล (Agarose gel) ร้อยละ 1.8 (w/v)

ละลายผงอะกาโรส (agarose powder) 1.8 กรัม ต่อ 1 X TAE buffer (pH8.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจนผงอะกาโรสละลายหมด สังเกตสารละลายที่ได้จะใส รอจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทใส่พิมพ์ที่เตรียมไว้ และทิ้งไว้ให้เย็น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ก.1 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 6.5 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70

สารเคมี	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 70
40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1)	16.25 ml	16.25 ml
50XTAE buffer	2.00 ml	2.00 ml
Formamide	18.00 ml	28.00 ml
Urea	18.90 ml	29.40 ml
Distilled water	too 100.00 ml	too 100 ml

ตารางที่ ก.2 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 8 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70

สารเคมี	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 70
40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1)	20.00 ml	20.00 ml
50XTAE buffer	2.00 ml	2.00ml
Formamide	18.00 ml	28.00 ml
Urea	18.90 ml	29.40 ml
Distilled water	too 100 ml	too 100 ml

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ก.3 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 10 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70

สารเคมี	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 70
40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1)	25.00 ml	25.00 ml
50XTAE buffer	2.00 ml	2.00 ml
Formamide	18.00 ml	28.00 ml
Urea	18.90 ml	29.40 ml
Distilled water	too 100 ml	too 100 ml

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (DNA and RNA extraction)

ข. 1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ตามวิธีของ HyYield ™ Genomic DNA Mini kit protocol book, RBC, Taiwan

วัสดุอุปกรณ์

1. Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
2. Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร, RBC, Taiwan
3. GB Column, RBC, Taiwan
4. Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, Hygon, USA
5. Micropipette P1000, Gilson, France
6. Pipette tip ขนาด 1 มิลลิลิตร, Corning, USA
7. Water bath, GFL, Germany

สารเคมี

1. Elution buffer, RBC, Taiwan
2. Ethanol ร้อยละ 99 (W/V)
3. GB buffer, RBC, Taiwan
4. GT buffer, RBC, Taiwan
5. Wash buffer, RBC, Taiwan
6. W1 buffer, RBC, Taiwan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ขั้นตอนการสกัด

1. เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth (NB) ที่ผสมเกลือ (NaCl) ร้อยละ 1 (W/V) เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
2. ปิเปตสารละลายของเชื้อ (suspension) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. นำตะกอนที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด HyYield ™ Genomic DNA Mini kit (YBG100, RBC, Taiwan) โดยเติม GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ Vortex mixer เพื่อละลายตะกอน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
4. เติม GB buffer อีก 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าทุก 3 นาที พร้อมกับนำ Elution buffer ไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการชะดีเอ็นเอ (DNA elution)
5. เติม Ethanol ร้อยละ 96-100 (w/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างและผสมให้เข้ากันทันที ด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที ในกรณีที่มีตะกอนเกิดขึ้น Micropipette เพื่อทำให้ตะกอนแตกตัว
6. นำ GB column เข้าประกอบกับ Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายผสมทั้งหมดในข้างต้นใส่ลงใน GB Column ปิดฝา GB Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
7. เปลี่ยน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร อันใหม่ แล้วเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน GB Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
8. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม Wash buffer (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน GB Column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
9. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ Column matrix แห้ง
10. นำ GB Column ประกอบเข้ากับ Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ เติม Elution buffer ที่ให้ความร้อนแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปิเปตให้โดนตรงกลางของ Column matrix บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 นาที เพื่อให้ Column matrix ดูดซับ Elution buffer
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อเป็นการชะดีเอ็นเอที่ติดอยู่บน Column matrix ให้ลงมาอยู่ในหลอด MicroCentrifuge
12. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข. 2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) ตามวิธีของ Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit, USA และ สังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis kit) ตามวิธีของ Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

วัสดุอุปกรณ์

1. Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
2. Collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร,
3. Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร,
4. RNA Purification Column,
5. Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, Hygon, USA
6. Micropipette P1000, Gilson, France
7. Pipette tip ขนาด 1 มิลลิลิตร, Corning, USA
8. Water bath, GFL, Germany

สารเคมี

1. Lysis buffer, GeneJet, USA
2. Proteinase K, GeneJet, USA
3. Wash buffer 1, GeneJet, USA
4. Wash buffer 2, GeneJet, USA
5. Water, nuclease-free, GeneJet, USA

ขั้นตอนการสกัด

1. เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth (NB) ที่ผสมเกลือ (NaCl) ร้อยละ 1 (W/V) เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
2. ปิเปตสารละลายของเชื้อ (suspension) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
3. นำตะกอนที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด GeneJET RNA Purification Kit (YBG100 RBC Taiwan) โดยเติม TE buffer (เติม lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 mg/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ vortex mixer เพื่อผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. เติม Lysis buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (เติม DTT) ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วย Votex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
5. เติม Ethanol ร้อยละ 96-100 (w/v) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างและผสมให้เข้ากันทันที ด้วย Micropipette
6. นำสารละลายผสมทั้งหมดในข้างต้นใส่ลงใน GeneJET RNA Purification Column ที่ใส่อยู่ใน Collection tube นำ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpmเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารออกและนำ Purification Column ใส่กลับไปใน Collection tube อันเดิม ทำซ้ำอีกครั้ง
7. ย้าย GeneJET RNA Purification Column ใส่ลงใน Collection tube อันใหม่ปริมาตร 2 แล้วเติม Wash buffer 1 (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1นาที
8. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง แล้วเติม Wash buffer 2 (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง แล้วเติม Wash buffer 2 (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
10. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง นำ GeneJET RNA Purification Column ประกอบเข้ากับ Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ เติม Water, nuclease-free ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปิเปตให้โดนตรงกลางของ GeneJET RNA Purification Column
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpmเป็นเวลา 1 นาที เพื่อเป็นการชะอาร์เอ็นเอที่ติดอยู่บน Column ให้ลงมาอยู่ในหลอด MicroCentrifuge
12. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การกำจัดดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอ

1. เติม อาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร (1ไมโครกรัม), 10x reaction buffer with $MgCl_2$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, DNase I (RNase-free) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated Water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร
2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. เติม EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมแลล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
4. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

ข. 3 การสังเคราะห์ cDNA สำหรับ RT-PCR

1. ละลายสารละลายต่างๆและเก็บไว้ในน้ำแข็ง
2. เติมสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทดลอง (MicroCentrifuge) total RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (0.1 ng-5µg), random hexamer primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ water (nucleases-free) ปริมาตร 9 ไมโครลิตร
3. ควรทำ Positive control cDNA โดยเติม Control GAPDH RNA (50 ng/µl) ปริมาตร 2 µl แทน Total RNA
4. ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นลงทันทีโดยวางในน้ำแข็ง
5. จากนั้นเติมสารต่อไปนี้
6. 5 x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
7. RiboLock RNase Inhibitor (20u/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
8. 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
9. RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
10. ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
11. บ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 5 นาที
12. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 สัปดาห์ หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 2 เดือน

Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค

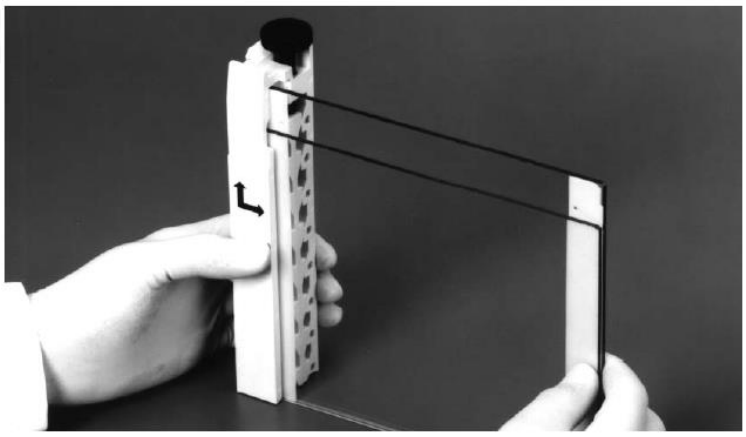
การประกอบเจลพอลิอะคลิลาไมด์

DGGE with Dcode ™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, USA

1. ล้างกระจก spacer และ combs ด้วย 95% alcohol ห้ามใช้สบู่หรือน้ำยาทำความสะอาด และห้ามขัดถูผึ่งให้แห้ง แล้วจึงประกอบชุดกระจกโดยสวมถุงมือในทุกขั้นตอน

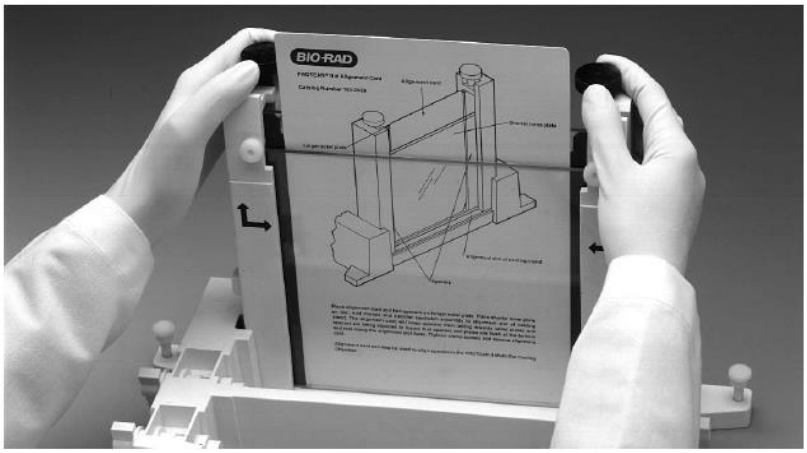
ภาพที่ ค.1 Spacer และ plate clamps

2. ประกอบกระจกโดยวางกระจกแผ่นใหญ่ไว้ด้านล่าง จากนั้นวาง spacer ไว้บนกระจกทั้งสองข้างและวางกระจกแผ่นเล็กไว้ด้านบน นำกระจกที่ประกอบไว้ใส่ไปใน plate clamps และหมุนเกลียวให้แน่นพอที่จะสามารถยึดกระจกได้



ภาพที่ ค.2 การประกอบกระจก

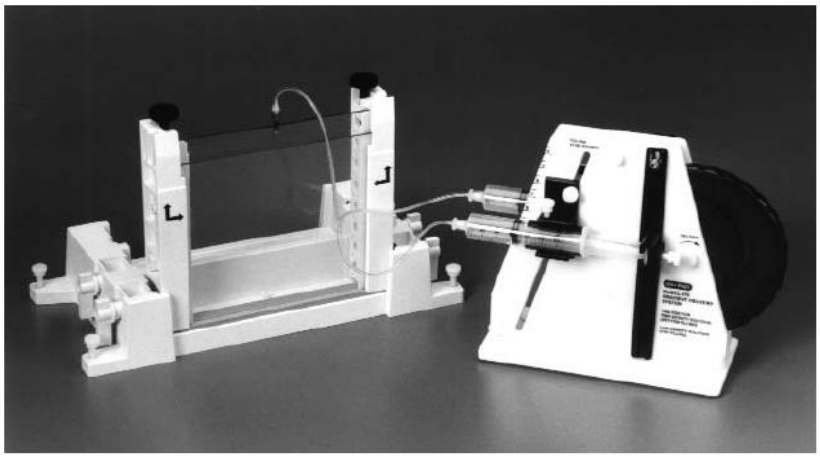
3. วางฟองน้ำลงบน casting stand แล้วล็อคกระจกเข้ากับฐานของ casting stand



ภาพที่ ค.3 การประกอบกระจกเข้ากับฐานของ casting stand

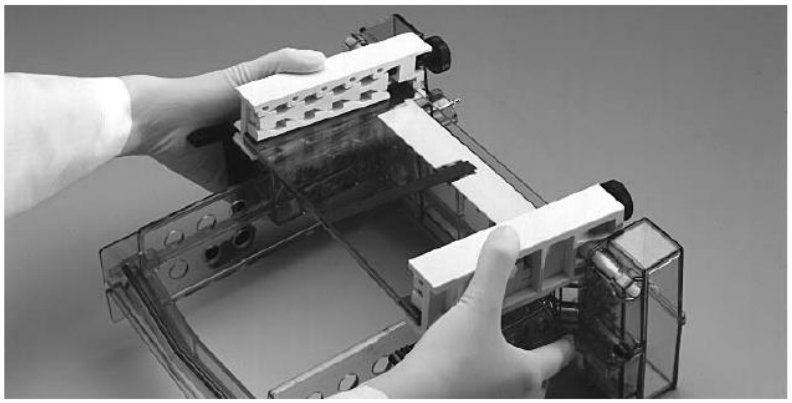
4. นำสารละลายเจล (gel solution) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 ความเข้มข้นละ 16 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม TEMED ปริมาตร 14.4 ไมโครลิตร และ 10% ammonium persulfate ปริมาตร 144 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และใช้ไซริงค์ดูดสารละลายที่เตรียมไว้ และประกอบเข้ากับชุด gradient delivery system

5. จากนั้นค่อยๆปล่อยสารละลายเจลลงในชุดกระจกที่ประกอบไว้ เสียบ comb ลงตรงกลาง ทิ้งเจลให้แข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง



ภาพที่ ค.4 การสร้างเจลพอลีอะคลิลาไมด์ (casing gel)

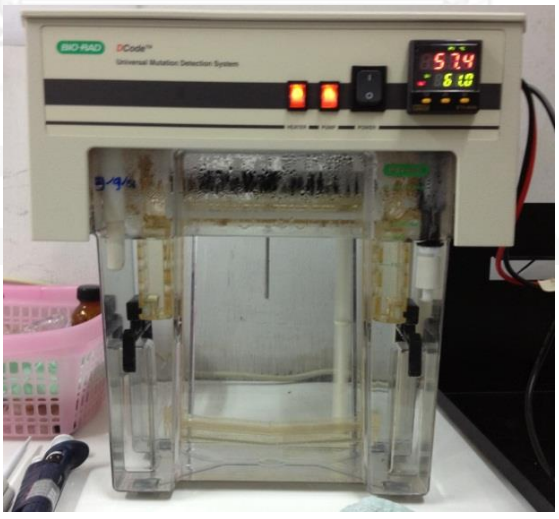
5. เมื่อเจลแข็งตัวให้ดึง comb ออก และนำชุดกระจกที่มีเจลอยู่ประกอบเข้ากับ sandwich core



ภาพที่ ค.5 การประกอบเจลเข้ากับ sandwich core

6. นำ sandwich core ที่ประกอบไว้ ใส่ลงใน electrophoresis tank ที่บรรจุ running buffer (1XTAE buffer) ซึ่งให้ความร้อนไว้ล่วงหน้าแล้วที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส

7. นำผลิตภัณฑ์ PCR ผสมกับสารละลายสี (Loading Dye) อัตราส่วน 2:1 ใส่ลงในหลุมบนเจล และวิเคราะห์ผลิตผลพีซีอาร์ภายใต้สภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมแปร์ อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงด้วยเครื่องเครื่อง DCode Universal Mutation Detection System



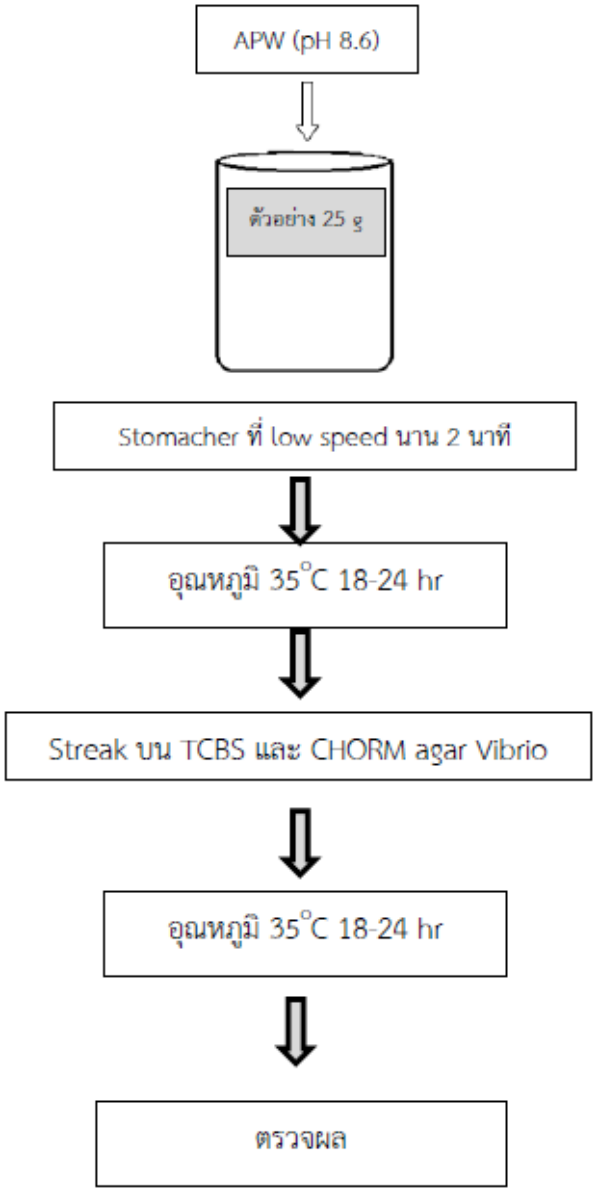
ภาพที่ ค.6 แสดงการประกอบครื่อง Dcode ™ ที่พร้อมใช้งาน

8. แกะแผ่นเจลออกจากกระจก จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง

วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5)



ภาพที่ ง.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bacteriological Analytical Manual Online (BAM online); USFDA, 2004

ภาคผนวก จ

วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อวิบริโอด้วยเครื่อง VITEK ®2 system

ภาพที่ จ.1 เครื่อง VITEK 2 ® system

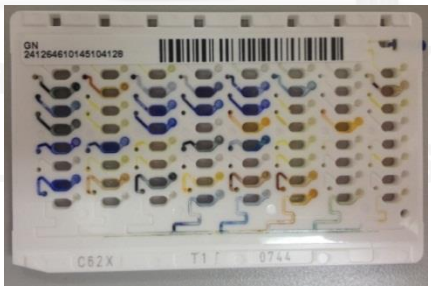
1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อที่ได้ โดยการย้อมแกรม เชื้อวิบริโอที่ต้องการทดสอบจะต้องเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) รูปร่างท่อนตรงหรือโค้ง (curved rod) ไม่สร้างสปอร์

2. ใช้น้ำเกลือ 0.45 % ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด

3. เขี่ยโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อที่แยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว ใส่ลงในหลอดน้ำเกลือที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

4. วัดค่าความขุ่นของสารละลายเชื้อด้วยเครื่อง McFarland ให้มีค่าความขุ่นประมาณ 0.5-0.63 McFarland

5. นำสารละลายเชื้อที่ได้และการ์ดสำหรับเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ (GN) ใส่ลงในช่องของถาดสำหรับใส่การ์ด (cassette) และนำเข้าเครื่อง



ภาพที่ จ.2 การ์ดสำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ (GN card)

6. จากนั้นเครื่องจะทำการบ่มสารละลายเชื้อและอ่านผล เทียบกับฐานข้อมูลเพื่อแปรผลว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ตารางที่ ฉ.1 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างปลาหมึกแช่แข็งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

Replication	Dilution			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
สรุป พบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด น้อยกว่า 100 CFU/ml				

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฉ.2 ผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่างอาหาร	ตัวแทนไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ		ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK ® 2
		TCBS agar	CHOMagar Vibrio	
1. ปลาหมึก (สด)	S1-1	สีเขียวใส	Not detect	-
	S1-2	ใส ตรงกลางดำ	Not detect	-
	S1-3	สีเหลืองขุ่น	สีชมพูอ่อน	*Aeromonas salmonicida* (95%)
	S1-4	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (95%)
2. เนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง)	S2-1	สีเขียวใส	Not detect	-
	S2-2	สีเหลืองใส	Not detect	-
3. เนื้อปลาเก๋าแล่ (แช่แข็ง)	S3-1	สีเขียวใส	สีชมพูอ่อน	*Morganella morganii ssp morganii* (95%)
	S3-2	สีเหลืองใส	สีครีม	*Morganella morganii ssp morganii* (93%)
	S3-3	ใส ตรงกลางดำ	Not detect	-
4. ปลาหมึก (แช่แข็ง)	S5-1	สีเหลืองขุ่น (เล็ก)	สีน้ำเงิน	*Vibrio cholerae* (96%)
	S5-2	สีเหลืองขุ่น (ใหญ่)	สีน้ำเงิน	*Vibrio cholerae* (97%)
5. หนวดปลาหมึก (สด)	S6-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (90%)
	S6-2	สีเหลืองใส	Not detect	-
6. ปลาหมึกกล้วย (สด)	S7-1	สีเขียวขุ่น (ใหญ่)	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (94%)
	S7-2	สีเขียวขุ่น (เล็ก)	สีน้ำเงิน	*Vibrio mimicus* (99%)
7. กุ้งขาว (สด)	S8-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (99%)
	S8-2	สีเขียวใส	Not detect	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฉ.2 ผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ตัวแทนไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ		ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK ® 2
		TCBS agar	CHOMagar Vibrio	
8. ปลาทู (สด)	S9-1	สีเหลืองใส	Not detect	-
	S9-2	สีเขียวขุ่น	สีชมพูอ่อน	*Morganella morganii ssp morganii* (99%)
9. กุ้งแม่น้ำ (สด)	S10-1	สีเหลืองขุ่น	สีน้ำเงิน	*Vibrio cholerae* (98%)
	S10-2	สีเหลืองใส	Not detect	
10. เนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง)	S11-1	สีเหลืองขุ่น	สีครีม	*Vibrio metschnikovii* (88%)
	S11-2	สีเขียวใส	Not detect	-
11. หอยแครง (สด)	S12-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (91%)
	S12-2	สีเหลืองขุ่น	สีชมพู	*Vibrio fluvialis* (96%)
12. หอยนางรม (สด)	S13-1	สีใส	Not detect	-
	S13-2	เขียวตรงกลางดำ	Not detect	-
13. ปลาแซลมอนแล่ (สด)	S14-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio fluvialis* (94%)
	S14-2	สีเหลืองใส	Not detect	-
14. ปลาอินทรีย์แล่ (สด)	S15-1	สีเขียวใส	Not detect	-
	S15-2	สีเหลืองใส	Not detect	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกาญจนา ชาหอม เกิดเมื่อวันที่ 14 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดชัยนาท สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เมื่อปีการศึกษา 2550 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

Chahorm, K. and Prakitchaiwattana, C. 2013. Detection of Vibrio spp. using PCR - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. In 5 th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (poster presentation), 21-23 August 2013 at the Centara Hotel and Convention Centre Khon Kean Thailand.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University