สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ในหอยนางรม และสภาพแวดล้อมชายฝั่งทะเลเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

โดย

นางสุดารัตน์ สวนจิตร
นางสาวอภิรดี ปิลันธนภาคย์
นางสาวสุรีย์พร เอี่ยมศรี
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

18 พ.ค. 2552
254690
เริ่มบริการ
19 ส.ค. 2552

ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2550-2551
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
เมษายน 2552

หัวข้อวิจัย การตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ในหอยนางรมและสภาพแวดล้อมชายฝั่งทะเลเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

(Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Associated with Oyster and Coastal Environment in the Eastern Thailand by Multiplex Polymerase Chain Reaction)

หัวหน้าโครงการ นางสุดารัตน์ สวนจิตร

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีงบประมาณ 2550-2551

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการที่อาศัยพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* จากหอยนางรม โดยในปฏิกิริยาสามารถตรวจแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้พร้อมกันยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ *tl* (thermolabile hemolysin gene) และ *tdh* (thermostable direct hemolysin gene) ส่วนการตรวจสอบ *V. vulnificus* ใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hemolysin/ cytolysin หรือ *vvh* เป็นยีนเป้าหมาย ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวเท่านั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ และอุณหภูมิสำหรับการลงเกาะของไพร์เมอร์บนดีเอ็นเอแม่แบบคือ 63 องศาเซลเซียส จากการศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบจากเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในหอยนางรม พบว่าการใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ร่วมกับการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ให้ผลการดำเนินปฏิกิริยาค่อนข้างดี ความไวของเทคนิคในการตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงจากตัวอย่างหอยนางรมคือ 100 CFU ต่อกรัม และเมื่อเพิ่มขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อในหอยนางรมก่อนการทำ PCR พบว่าเทคนิคนี้มีความไวของการตรวจสอบสูงได้สูงขึ้น (1 CFU ต่อกรัม) เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้จริงโดยเปรียบเทียบกับวิธีตรวจสอบมาตรฐาน ซึ่งมีค่าความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวของการตรวจสอบ 96-100 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* แทนวิธีดั้งเดิมได้ ซึ่งสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วกว่า ซึ่งมีประโยชน์ในการลดปัญหาการเจ็บป่วยหรือการตายที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้

คำสำคัญ วิบริโอ หอยนางรม พีซีอาร์

Abstract

This study was aimed to develop PCR-based technique for the detection of two *Vibrio* species, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, in oyster. Multiplex reaction was optimized using several sets of primers and subsequently three primer pairs were selected including those targeting genes encoded thermolabile hemolysin (*tl*) and thermostable directed hemolysin (*tdh*) of *V. parahaemolyticus* as well as the one encoded hemolysin/ cytolysin (*vvh*) of *V. vulnificus*. No amplification of other *Vibrio* species or non-*Vibrio* bacteria was evident, suggesting a high specificity of detection by this method. According to the optimization of the simultaneous amplification reaction, the concentration of $MgCl_2$ component and annealing temperature of the PCR cycle were proved to be satisfied at 3.0 mM and 63 $^{\circ}$C, respectively. Protocol for bacterial DNA template preparation was a great of concern, especially from oyster samples. After trial analyses, crude extraction method using SDS-Proteinase K lysis solution followed by isopropanol DNA precipitation was adopted. This protocol guaranteed the success of amplification reaction and reproducibility as determined by yields of PCR products. The sensitivity of direct detection of both targeted organisms in spiked oyster samples was shown as 100 CFU/g. This sensitivity was improved to 1 CFU per gram of oyster tissue homogenate in 6-hour enriched culture. Validation analysis of the developed multiplex PCR revealed that this technique could be highly approved with the values of relative accuracy, specificity and sensitivity of greater than 95 % (96-100 %), and it is applicable. The rapid, sensitive, and specific detection of both clinically important bacteria in oyster would be beneficial in reducing illnesses and deaths caused by these pathogens.

Keywords *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, oyster, PCR

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง ..... ข

สารบัญภาพ ..... ค

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา 5

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง 41

บทที่ 4 ผลการทดลอง 60

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 76

เอกสารอ้างอิง 85

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 95

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี และบัฟเฟอร์ 97

ภาคผนวก ค การทำอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส 100

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ลักษณะทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*	7
2-2	ลักษณะทางชีวเคมีของ *V. vulnificus*	18
2-3	คุณสมบัติบางประการของ *V. vulnificus* 3 ไบโอไทป์	20
3-1	แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	41
3-2	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*	43
3-3	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์	45
3-4	ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์	46
3-5	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์	47
3-6	ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการศึกษา	47
3-7	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *tl* และ *tdh*	57
3-8	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *vvh*	58
3-9	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *tl*, *tdh*, และ *vvh*	58
3-10	ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการศึกษา	59
4-1	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tl*, *tdh*, *vvh*, *vvhA* และ *toxR*	60
4-2	การตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมโดยตรง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจมาตรฐาน (วิธี MPN)	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	(ก) เซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่มีแฟลกเจลลาแบบ monotrichous (ข) เซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่มีแฟลกเจลลาแบบ lophotrichous	6
2-2	โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar	6
2-3	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β-hemolysis บนอาหาร Wagatsuma agar	12
2-4	การย้อมติดสีแกรมลบ และรูปร่างท่อนของ *V. vulnificus*	16
2-5	เซลล์ *V. vulnificus* ที่มีแฟลกเจลลาแบบ polar-sheathed flagellum	16
2-6	(ก)โคโลนี *V. vulnificus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (ข)โคโลนี *V. vulnificus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCPC agar	17
2-7	สูตรโครงสร้างของ Sodium dodecyl sulfate (SDS)	27
2-8	กลไกการทำงานของ detergent ในการทำให้เซลล์แตก	28
2-9	สูตรโครงสร้างของ Triton X-100	28
2-10	สูตรโครงสร้างของ CTAB	29
2-11	ขั้นตอนการแยกโปรตีนออกโดย Phenol	29
4-1	ความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* DMST 15285	62
4-2	ความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* DMST 19346	63
4-3	ความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* DMST 19346 และ *V. parahaemolyticus* DMST 15285	64
4-4	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมตกตะกอนดีเอ็นเอและด้วยวิธีการสกัดดีเอบริสุทธิ์	66
4-5	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมตกตะกอนดีเอ็นเอและด้วยวิธีการสกัดดีเอบริสุทธิ์	67

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4-6	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และ *vvh* ของ *V. vulnificus* ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมตกตะกอนดีเอ็นเอและด้วยวิธีการสกัดดีเอบริสุทธิ์.....	68
4-7	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* โดยการใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ ในการทดลองมีการเติมเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างหอยนางรมปริมาณต่าง ๆ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution.....	69
4-8	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* โดยการใช้เทคนิค PCR ในการทดลองมีการเติมเซลล์ของ *V. vulnificus* ลงในตัวอย่างหอยนางรมปริมาณต่าง ๆ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution เมื่อศึกษาความไวของเทคนิค PCR.....	70
4-9	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมที่เติมเชื้อทั้งสองชนิดในปริมาณต่าง ๆ.....	71
4-10	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมเมื่อนำตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ก่อนการทำปฏิกิริยา PCR.....	72
4-11	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* ในหอยนางรมเมื่อนำตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ก่อนการทำปฏิกิริยาPCR.....	73
4-12	อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมโดยใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ ภายหลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลาต่าง ๆ.....	74

บทที่ 1
บทนำ

พื้นที่ชายฝั่งทะเลของประเทศไทยในเขตภาคตะวันออกมีความโดดเด่นในด้านการเป็นพื้นที่อุตสาหกรรมและสถานที่ท่องเที่ยวทางทะเล นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของอาหารทะเลที่สำคัญ อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งที่พบในพื้นที่แถบนี้คือการพบแบคทีเรียก่อโรคในสกุล *Vibrio* โดยเฉพาะ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อหลังการบริโภคอาหารทะเล โดย *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบหรืออาหารเป็นพิษ (Park *et al.*, 2004) การได้รับเชื้อชนิดนี้มักมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารดิบ หรืออาหารที่ผ่านการให้ความร้อนไม่เพียงพอ หรืออาหารที่ปรุงสุกแล้วแต่มีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้เข้าไปอีก อาหารที่มักพบการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้ส่วนมากเป็นอาหารทะเล ซึ่งการนำมาประกอบอาหารบางประเภทไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนอย่างเพียงพอ ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสสูงที่จะได้รับเชื้อชนิดนี้เข้าสู่ร่างกายและเกิดอาการของโรคตามมา ผู้ได้รับเชื้อมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน และอุจจาระร่วงแบบเป็นน้ำจนถึงขั้นรุนแรงเป็นเลือดได้ ส่วน *V. vulnificus* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) ซึ่งผู้ป่วยอาจมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ การติดเชื้อเกิดขึ้นผ่านทางบาดแผล (wound infection) ที่สัมผัสกับน้ำทะเล หรือจากการบริโภคอาหารทะเลดิบ ๆ โดยเฉพาะหอยนางรม (Strom and Paranjpye, 2000; Harwood, Gandhi, and Wright, 2004)

เนื่องจากการพบแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ในน้ำทะเลหรือในสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น หอยนางรม ไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำทางจุลินทรีย์ประเภท fecal indicator ดังนั้นการตรวจสอบให้มีความเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของแบคทีเรียจึงมีความสำคัญเป็นอันดับแรกสำหรับหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบโดยตรงเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยของอาหารและสภาพแวดล้อมทางทะเล การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เพื่อการเฝ้าระวังการระบาดของโรคนั้น แต่เดิมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี (Wong, 2003) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวต้องใช้เวลาหลายวันจึงจะทราบผล ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการติดตามและการเฝ้าระวัง อีกทั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะหลายประการที่คล้ายคลึงกัน (Harwood *et al.*, 2004) ดังนั้นในการตรวจสอบโดยวิธีแบบดั้งเดิมนั้นจำเป็นต้องยืนยันด้วยการตรวจสอบปฏิกิริยาชีวเคมีหลายชนิดไม่เช่นนั้นอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ ในปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคการตรวจสอบในระดับอณูพันธุศาสตร์เข้ามาใช้ เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือ PCR ซึ่งมีความจำเพาะและความไวในการตรวจสอบสูง รวมทั้งใช้เวลาในการตรวจสอบไม่นาน อย่างไรก็ตามการนำเทคนิค PCR เข้ามาใช้ในการตรวจสอบ

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างจริง เช่น อาหารหรือน้ำทะเลนั้นมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น มีการปนเปื้อนของสารยับยั้ง (inhibitor) ในดีเอ็นเอที่เตรียมขึ้นจากตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งสามารถเข้ายับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ ซึ่งปัจจัยนี้มักแปรผันตามชนิดของตัวอย่างที่ตรวจสอบ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น การออกแบบไพร์เมอร์ให้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ และการปรับสภาวะของการดำเนินปฏิกิริยา PCR ให้มีความเหมาะสม ซึ่งนำไปสู่ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและกระบวนการตรวจสอบโดยรวม

การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว จากรายงานการศึกษามีผู้ใช้ยีนเป้าหมายต่าง ๆ ได้แก่ ยีน 23S rRNA ซึ่งเป็นข้อมูลสำหรับการสร้าง 23S rRNA (Arias, Garay and Aznar, 1995) ยีน *gyrB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ DNA gyrase (subunit B) (Venkateswaran, Dohmoto, and Harayama, 1998) และยีน *toxR* ซึ่งควบคุมการสร้าง transmembrane DNA-binding regulatory protein ซึ่งพบในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* (Provenzano, Schuhmacher, Barker, and Klose, 2000) นอกจากนี้ยังมียีน *tl*, *tdh* และ *trh* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง thermolabile hemolysin, thermostable direct hemolysin (TDH) และ TDH-related hemolysin (TRH) ตามลำดับ (Tada *et al.*, 1992; Bej *et al.*, 1999) ในขณะที่การตรวจสอบ *V. vulnificus* มีการใช้ยีนต่าง ๆ เป็นยีนเป้าหมาย เช่น ยีน *vvhA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง hemolysin (Harwood *et al.*, 2004) ยีน *toxR* (Takahashi, Hara-Kudo, Miyasaka, Kumagai, and Konuma, 2005) ยีน 16S rRNA (Kim and Jeong, 2001; Maugeri, Carbone, Fera, and Gugliandolo, 2006; Vickery, Nilsson, Strom, Nordstrom, and DePaola, inpress) และยีน *gyrB* (Kumar, Parvathi, Karunasagar, and Karunasagar, 2006) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม ซึ่งมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางในพื้นที่ชายฝั่งทะเล เขตภาคตะวันออกและเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งประชาชนในพื้นที่และนักท่องเที่ยว ซึ่งหอยนางรมที่วางจำหน่ายในร้านค้าท้องถิ่นนั้นไม่ได้มีการควบคุมคุณภาพด้านต่าง ๆ รวมทั้งด้านจุลินทรีย์ อีกทั้งการบริโภคหอยนางรมนั้นส่วนใหญ่นิยมรับประทานดิบ ๆ ดังนั้นผู้บริโภคจึงมีโอกาสได้รับเชื้อสูงมาก ยีนเป้าหมายที่ตรวจสอบโดยวิธีนี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจได้พร้อมกันจากปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งคาดว่าเทคนิคที่พัฒนาได้นี้จะเอื้อประโยชน์ต่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวในหอยนางรมได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม

ความสำคัญของการศึกษา

ได้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ที่สมบูรณ์เพื่อตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม

สมมติฐานของการศึกษา

1. ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *toxR* และ *vvhA* มีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* มีความจำเพาะต่อเชื้อ
2. การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยใช้ยีนเป้าหมาย 4 ยีน คือ *tl, tdh, toxR* และ *vvhA* สามารถดำเนินปฏิกิริยาพร้อมกันได้
3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมและอุณหภูมิในขั้นตอน annealing มีผลต่อประสิทธิภาพของการดำเนินปฏิกิริยา PCR
4. เทคนิค PCR ที่ใช้มีความไวของการตรวจสอบในเชื้อบริสุทธิ์สูง
5. ในหอยนางรมมีปัจจัยที่สามารถรบกวนหรือยับยั้งการดำเนินปฏิกิริยา PCR ได้
6. ความไวของเทคนิค PCR ในตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมขึ้นอยู่กับคุณภาพดีเอ็นเอแม่แบบ
7. การเพิ่มความไวของการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมทำได้โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนดำเนินปฏิกิริยา PCR
8. เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมมีความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานดั้งเดิม (การเพาะแยกเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี) ซึ่งสามารถยอมรับให้นำไปใช้จริงได้

ขอบเขตการศึกษา

ปีที่ 1 ทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ในการเพิ่มปริมารยีน *tl* และ *tdh* จาก *V. parahaemolyticus* และยีน *toxR* และ *vvhA* จาก *V. vulnificus* โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ทั้งในสกุล *Vibrio* และสกุลอื่น ๆ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำเนินปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ โดยศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของแมกนีเซียมและอุณหภูมิในขั้นตอน annealing

จากนั้นศึกษาความไวของการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมจากเชื้อบริสุทธิ์

ปีที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่เติมลงในตัวอย่างหอยนางรม เลือกวิธีที่เหมาะสมซึ่งทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีที่สามารถนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ได้ โดยพิจารณาจากปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นจากนั้นศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม โดยการเติมเชื้อในปริมาณต่าง ๆ ลงในตัวอย่างหอยนางรม สกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบโดย PCR ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนการตรวจสอบโดย PCR เพื่อเพิ่มความไวของการตรวจสอบ และการวิเคราะห์ค่าการยอมรับของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม โดยพิจารณาจากค่าความแม่นยำ ความจำเพาะและความไว ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

สถานที่ทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ 5 ตอน คือ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Vibrio parahaemolyticus*
2. รายละเอียดเกี่ยวกับ *V. vulnificus*
3. รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอ
4. ปัจจัยที่ควรพิจารณาสำหรับการใช้เทคนิค PCR ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *V. parahaemolyticus*

1.1 ข้อมูลพื้นฐาน *V. parahaemolyticus*

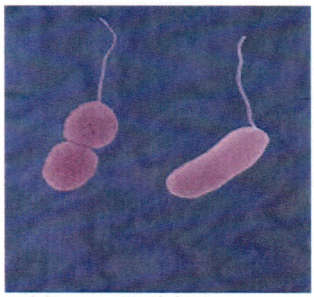
1.1.1 สัณฐานวิทยา

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่บริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเลโดยมีรายงานพบการแพร่ระบาด *V. parahaemolyticus* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1950 ที่ประเทศญี่ปุ่น (FDA, 2000) เชื้อนี้จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบ รูปท่อนหรือโค้ง มีความยาวตั้งแต่ 1-3 ไมครอน กว้าง 0.4 - 0.6 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์ (Hui, 1994) สร้างแคบซูล ซึ่งเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ (Guvenner and McCarter, 2003) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาหนึ่งเส้นที่อยู่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์ (monotrichous flagellum) ดังภาพที่ 2-1 ก อย่างไรก็ตามพบว่าบางสายพันธุ์พบแฟลกเจลลาแบบรอบเซลล์ (lophotrichous) (Humada *et al.*, 2007) (ภาพที่ 2-1 ข)

1.1.2 สรีรวิทยา

V. parahaemolyticus สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เป็นเชื้อที่ไวต่ออุณหภูมิต่ำ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 10 - 44 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญ โดยระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วงความเข้มข้น 2- 4 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 1- 8 เปอร์เซ็นต์และไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระดับของ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 7.5 – 8.6 แต่สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4.8 – 11.0 และเจริญได้ในอาหารที่มีค่า water activity (a_w) ในช่วง 0.948 - 0.992 (New Zealand Food Safety Authority, nd) *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar ให้โคโลนีสีเขียวเนื่องจากไม่มีการหมักย่อยน้ำตาลซูโครส (ภาพที่ 2-2)

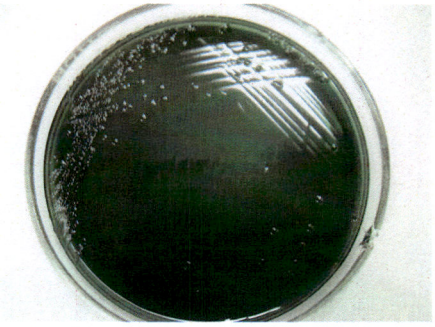
(ก)



(ข)

ภาพที่ 2-1 (ก) เซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่มีแฟลกเจลลาแบบ monotrichous
(ข) เซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่มีแฟลกเจลลาแบบ lophotrichous
(ที่มา:EHA Consulting Group, nd; Genome Information Research Center, 2002)

โคโลนีมีขนาด 0.5 – 2.0 มิลลิเมตร โคโลนีมีลักษณะกลมนูน ผิวหน้าโคโลนีเรียบเป็นมัน (Hui, 1994) ลักษณะและสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus* แสดงในตารางที่ 2-1



ภาพที่ 2-2 โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

ตารางที่ 2-1 ลักษณะทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*

ลักษณะทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Motility	+
Growth in :	
0 % NaCl	-
3 % NaCl	+
6 % NaCl	+
8 % NaCl	+
10 % NaCl	-
Acid production from:	
Lactose	-
Arabinose	+
Cellobiose	-
Mannose	+
Sucrose	-
Decarboxylase:	
Lysine	+
Arginine	-
Growth at 42 °C	+
Oxidase	+
ONPG	-
Voges-Proskauer	-
Sensitivity to	
10 μg 0/129	resistant
150 μg 0/129	susceptible
Gelatinase	+
Urease	variable

(ที่มา: Kaysner and DePaola, 2001)

1.1.3 ถิ่นอาศัย

V. parahaemolyticus แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1950 โดย Fujino T. จากผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษในเมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น ที่บริโภค Shirasu (อิโนะอุเอะ ฟูจิโอะ และสุวิมล กีรติพิบูล, 2546) พบการแพร่กระจายของเชื้อนี้ตามบริเวณชายฝั่งทะเล น้ำทะเลและในดินตะกอน (Dileep *et al*., 2003) โดยพบว่าหากน้ำทะเลมีอุณหภูมิสูงเกินกว่า 20 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้เจริญอย่างรวดเร็ว ในฤดูร้อนพบแบคทีเรียนี้ในน้ำทะเลค่อนข้างมาก ในฤดูหนาวตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลน้อย แต่สามารถพบเชื้อได้ในดินตะกอน (อิโนะอุเอะ ฟูจิโอะ และสุวิมล กีรติพิบูล, 2546) นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายของเชื้อในอาหารทะเล เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ เป็นต้น ซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อที่สำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคอาหารเป็นพิษของเชื้อนี้ และมีรายงานว่าฤดูร้อนพบเชื้อในอาหารทะเลปริมาณที่สูงกว่าทุกฤดู (Lee *et al*, 2008)

1.1.4 *V. parahaemolyticus* กับการเกิดโรค

โรคอาหารเป็นพิษจาก *V. parahaemolyticus* เป็นความผิดปกติที่ลำไส้ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการถ่ายอุจจาระเป็นน้ำและมีอาการปวดท้องร่วมด้วย บางรายมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีไข้และปวดศีรษะ บางครั้งอาจพบมีอาการอุจจาระร่วงคล้ายที่เกิดจากเชื้อบิด คือมีมูกปนเลือดในอุจจาระ มีไข้สูงและตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวได้เป็นจำนวนมากโดยทั่วไปเป็นโรคที่พบว่ามีอาการรุนแรงปานกลางในช่วงระยะเวลา 1-7 วัน และมักไม่พบมีการติดเชื้อไปที่ระบบอื่นหรือมีผู้ป่วยเสียชีวิต การวินิจฉัยโรคนี้สามารถตรวจยืนยันได้โดยการแยกเชื้อจากอุจจาระของผู้ป่วยหรือพบเชื้อมากกว่า 10^5 CFU ต่อกรัม จากอาหารที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุ (มักพบได้บ่อยในอาหารทะเล) วิธีการแพร่เชื้อเกิดขึ้นโดยการรับประทานอาหารทะเลดิบ ๆ หรือปรุงไม่สุกพอ หรืออาหารอื่นที่มีการปะปนกันกับอาหารทะเลหรือล้างด้วยน้ำทะเลที่มีเชื้อปนอยู่ แบคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งปริมาณเชื้อที่ก่อโรคได้มีปริมาณตั้งแต่ 10^6 เซลล์ และเชื้อมีระยะฟักตัวโดยปกติอยู่ในช่วง 12-24 ชั่วโมง แต่อาจพบได้ตั้งแต่ 4 ถึง 96 ชั่วโมง (Department of Food Technology and Nutrition, Mahasarakham University, 2007)

<u>ปัจจัยในการก่อโรค (virulence factor)</u>

โดยทั่วไปแล้วร้อยละ 98-99 ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อมและอาหาร (environmental strain) เป็นเชื้อที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคนได้ ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย (clinical strain) ซึ่งมีปัจจัยสำคัญในการก่อโรคได้แก่ ความสามารถในการสร้างโปรตีน Thermostable direct hemolysin (TDH) และ TDH-related hemolysin (TRH)

Pathogen Island (PAIs)

Pathogen Island (PAIs) พบครั้งแรกในจีโนมของ *E. coli* สายพันธุ์ก่อโรคและพบในเชื้ออื่น ๆ หลายสายพันธุ์ ซึ่งรูปแบบของ PAIs เป็นเอกลักษณ์เฉพาะกับความสามารถก่อโรคของเชื้อนั้น ๆ PAIs เป็นบริเวณหนึ่งบนโครโมโซม ที่ยาวตั้งแต่ 10 ถึง 200 kb ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ บริเวณนี้เป็นที่รวมของกลุ่มยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ โดยจุดเริ่มต้นของการเกิด PAIs สันนิษฐานว่าเกิดจากการเชื่อมรวมของพลาสมิดหรือฟาจส์กับโครโมโซม หรือการได้รับคอนจูเกทีพทรานส์โพซอน (conjugative transposon) Thompson, Austin, and Swings (2006) กล่าวว่าจากการศึกษาแผนทียีนของ *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 (ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค) พบ PAIs อยู่บนโครโมโซม 2 (โครโมโซมเล็ก) มีความยาวประมาณ 80 kb ซึ่งประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการย่อยสลายเม็ดเลือด (hemolysin) การสร้างท็อกซิน การสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ การสร้างเยื้อหุ้มเซลล์ และ tryp III secretion system (TTSS) เป็นต้น ซึ่งบริเวณนี้สามารถนำมาใช้พัฒนาการบ่งชี้ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อได้ (Thompson, Austin, and Swings, 2006)

Thermostable direct hemolysin (TDH)

Thermostable direct hemolysin (TDH) เป็นโปรตีนที่จัดว่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ควบคุมโดยยีน *tdh* ที่อยู่บนโครโมโซม 2 (โครโมโซมเล็ก) ในบริเวณกลุ่มยีน type III secretion system (TTSS) โดยพบว่าประมาณร้อยละ 90 ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกา ยุโรปและเอเชียมียีนนี้อยู่ (DePaola *et al*, 2003) โดยสามารถตรวจสอบจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า (β- hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma agar เรียกลักษณะดังกล่าวว่า Kanagawa phenomenon (Hamada *et al.,* 2007) และสามารถตรวจสอบโดยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น ตรวจสอบโดยปฏิกิริยา PCR และ DNA probe โดยอาศัยยีน *tdh* เป็นยีนเป้าหมาย โปรตีน TDH มีน้ำหนักโมเลกุล 42,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 ซับยูนิต (Hui, 1994) สามารถแสดงคุณสมบัติได้หลายชนิดคือ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) ภาวะเป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxic) การตายในหนูทดลอง (mouse lethal) และพิษจากลำไส้ (enterotoxicity) แต่กลไกของการเกิดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ได้มีข้อสันนิษฐานว่าการเกิด hemolysis มีสาเหตุมาจากหลายขั้นตอนร่วมกันกล่าวคือ TDH ที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถจับกับ G_{T1} ganglioside receptor บนผิวเม็ดเลือดแดงทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hamada *et al.,* 2007) และพบว่าการทำงานของ TDH จะมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นถ้ามี Ca^{2+} และ microvilli (Hui, 1994)

TDH-related hemolysin (TRH)

พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่มีความสามารถในการก่อโรคบางสายพันธุ์ผลิตโปรตีน TRH ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้โดยมียีน *trh* เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนชนิดนี้ (DePaola *et al*, 2003) จากรายงานของ Shirai *et al.*(1990) ได้ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *trh* ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 215 ไอโซเลท พบว่ามี 52 (24.3

เปอร์เซ็นต์) ไอโซเลท ที่พบยีน *trh* การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนนี้ทำได้จากการทดสอบทางชีวเคมีของปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส (urease test) ที่ให้ผลบวก ซึ่งเป็นการทดสอบเชิงความสัมพันธ์ ไม่ใช่การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน แต่สามารถทดสอบความสามารถในการผลิต TRH โดยตรงจากชุดทดสอบทางอิมมูโนวิทยา (immunological kit) นอกจากนี้สามารถตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *trh* โดยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น การใช้ปฏิกิริยา PCR และ DNA probe

1.2 การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียในกลุ่มฮาโลไฟล์ (halophiles) พบได้ในน้ำชายฝั่งทะเล บริเวณปากแม่น้ำและสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น การบริโภคอาหารทะเลที่ดิบหรือผ่านความร้อนเพียงเล็กน้อยทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อและเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ, 2549) การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สามารถทำได้ 2 วิธีคือ วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารจำเพาะและยืนยันผลโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

1.2.1 การเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีนี้สามารถทำได้ดังขั้นตอนต่อไปนี้ (FDA, 2004)

1.2.1.1 การเตรียมสารละลายเจือจางตามวิธี MPN

ชั่งตัวอย่าง 50 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เติม Phosphate buffer saline (PBS) 450 มิลลิลิตร ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่างความเร็วสูง เป็นเวลา 2 นาที สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 10^{-1} แล้วเตรียมสารละลายตัวอย่างเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} หรือมากกว่าด้วยสารละลาย PBS กรณีเป็นหอยให้ใช้ 12 ตัวใส่ในถุง Stomacher เติม PBS น้ำหนักเท่ากันตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่างด้วยความเร็วสูง เป็นเวลา 2 นาที นำมา 20 กรัม มาเติม PBS 80 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 10^{-1} เตรียมสารละลายตัวอย่างเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} หรือมากกว่าด้วย PBS ปิเปตตัวอย่างความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี Alkaline peptone water (APW) 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

1.2.1.2 การเขี่ยเชื้อลงอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) เพื่อดูลักษณะโคโลนี

นำลูบเขี่ยเชื้อจากส่วนบนลดจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ APW ที่มีการเจริญของเชื้อ ขีดแยกเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* จะมีสีเขียวขุ่น กลม

ขนาด 2-3 มิลลิเมตร นำเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าวขีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_1 agar ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์

1.2.1.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

(1) การทดสอบการใช้อาร์จินีน

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวบน T_1N_1 agar มาเขี่ยบน slant และแทงลง butt ของ Arginine glucose slant (AGS) ที่มีเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง *V. parahaemolyticus* จะให้ผล K/A ไม่สร้างแก๊สและ H_2S

(2) การทดสอบการเคลื่อนที่

ใช้เข็มเขี่ยถ่ายเชื้อจาก AGS ที่มีเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วแทงลง butt ของ Motility test medium ลึกประมาณ 5 เซนติเมตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* สามารถเคลื่อนที่ได้จึงแสดงให้เห็นการเจริญนอกแนวปลูกเชื้อ

(3) การทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ

ใช้เข็มเขี่ยถ่ายเชื้อจาก AGS ที่มีเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์แล้วมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว T_1N_0, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 และ T_1N_{10} ซึ่งมีเกลือ NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ ปิดฝาหลวม ๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผลอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 ขุ่นเนื่องจากมีการเจริญของ *V. parahaemolyticus* แต่ T_1N_0 และ T_1N_{10} ไม่ขุ่น

(4) การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase

เขี่ยเชื้อที่ให้ผลบวกตามลักษณะข้างต้น ไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase โดยเขี่ยเชื้อจาก T_1N_1 agar ป้ายลงบนกระดาษกรองที่ชุบสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ *N,N,N,N* Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochoride โดย *V. parahaemolyticus* ให้ผลบวก สีของกระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายใน 10 วินาที

(5) การตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะเซลล์

เขี่ยเชื้อจาก T_1N_1 agar ลงบนสไลด์นำไปย้อมสีแกรม จากนั้นตรวจสอบลักษณะเซลล์และการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ *V. parahaemolyticus* มีลักษณะรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์และติดสีแกรมลบ

(6) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ด้วย API 20E

เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมี ตามลักษณะข้างต้นจาก T_1N_1 agar ที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ด้วย API 20E diagnostic strips and reagents (BioMerieux Vitek, Inc.) โดยดำเนินการตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด การแปลผล *V. parahaemolyticus* ให้ผลทดสอบชีวเคมีตามลักษณะดังกล่าวและเมื่อ

ทดสอบด้วย API 20E diagnostic strips and reagents ให้ผลเป็น *V. parahaemolyticus* ไม่น้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ถ้าน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ทำการทดสอบเพื่อยืนผลอีก โดยใช้เชื้อจาก T_1N_1 agar และผู้ทำการทดสอบเดิม

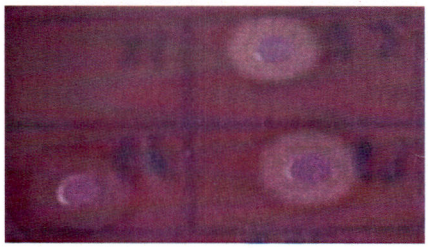
1.2.1.4 การรายงานผล

นับจำนวนหลอดของแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* แล้วนำจำนวนหลอดไปเปิดเทียบกับตาราง MPN 3:3:3 รายงานผลเป็น MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง (FDA, 2004)

1.2.1.5 การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค

(1) ความสามารถในการสร้าง TDH

เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_1 agar มาเลี้ยงบนอาหาร Wagatsuma agar จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่มีความสามารถในการสร้าง TDH ให้ผลบวกโดยเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า (β-hemolysis) รอบโคโลนี แสดงดังภาพที่ 2-3 (Ottaviani *et al.*, 2005)



ภาพที่ 2- 3 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β-hemolysis บนอาหาร Wagatsuma agar (ที่มา: ศรีวรรณ หัทยานานนท์, ม.ป.ป.)

(2) ความสามารถในการสร้าง TRH

เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_1 agar มาเลี้ยงบนอาหาร Christensen's urea agar ที่เติมเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ โดย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่มีความสามารถในการสร้าง TRH ให้ผลบวกของกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity) โดยเปลี่ยนสีอาหารจากสีชมพูเป็นสีม่วง (Ottaviani *et al.*, 2005)

1.2.2 การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยอาศัยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

การศึกษาถึงการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ขององค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกาเสนอแนะการตรวจ *V. parahaemolyticus* ในหนังสือ Bacteriological Analytical Manual โดยใช้วิธี MPN เพื่อนับจำนวนเชื้อนี้จากตัวอย่าง (อาหารทะเลหรือน้ำทะเล) ควบคู่กับการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามที่กล่าวมาข้างต้น แต่วิธีดังกล่าวมีความไม่สะดวกและตรวจสอบได้ยากถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณที่ต่ำ ส่วนกรณีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคจะทดสอบบนอาหาร Wagatsuma agar ซึ่งการเตรียมอาหารชนิดนี้ต้องใช้เลือดคน หรือเลือดกระต่ายที่ใหม่เพื่อเตรียมอาหารและผลของการทดสอบมักให้ผลบวกปลอมได้ ดังนั้นจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาจึงให้ความสำคัญที่นำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการตรวจ *V. parahaemolyticus* เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและมีความไวสูง (Deepanjali, Kumar, Karunasagar, and Karunasagar, 2005) เทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* โดยทั่วไปได้แก่ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการทำไฮบริไดเซชันของกรดนิวคลิอิก

1.2.2.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

เทคนิค PCR มีวัตถุประสงค์ที่ต้องการและเพิ่มขยายยีนที่ต้องการ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลองซึ่งอาศัยหลักการเลียนแบบธรรมชาติ อาศัยไพร์เมอร์ในการจับจุดเริ่มต้นในสายดีเอ็นเอต้นแบบและมีเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ การทำปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอแม่แบบ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ไพร์เมอร์อย่างน้อย 1 คู่ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตทั้งสี่ชนิด แมกนีเซียมและบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ในการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* นั้นพบได้ในหลายงานวิจัย ซึ่งอาศัยยีนเป้าหมายเพื่อการเพิ่มปริมาณที่แตกต่างกัน โดย Kim, Okuda, Malsumoto, and Takahashi (1999) กล่าวว่า การเลือกใช้ยีนเป้าหมายที่เหมาะสมควรเลือกบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์และเป็นบริเวณที่สามารถนำไปใช้ในการแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้ โดยในระยะแรกยีนที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA, rRNA) ซึ่งในแบคทีเรียนิยมใช้ยีน 16S rRNA แต่พบปัญหาว่ายีนดังกล่าวของ *V. parahaemolyticus* มีความคล้ายคลึงกันมากกับเชื้อในสกุลเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่นลำดับนิวคลีโอไทด์ของของยีน 16S rRNA ของ *V. parahaemolyticus* มีความคล้ายคลึงกับ *V. alginolyticus* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (Kim *et al.*, 1999) และประกอบกับยีนนี้มีอัตราของการเกิดวิวัฒนาการ ในระดับที่ต่ำ โดยยีน 16S rRNA มีอัตราการแทนที่คู่เบส 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 50 ล้านปี (Venkateswaran *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มที่

ประกอบด้วยเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ๆ (Kim *et al.*, 1999) เช่น *V. parahaemolyticus* ที่เป็นเป้าหมายของการศึกษานี้

จากปัญหาดังกล่าว Yamamoto and Harayama (1995) เสนอให้นำยีน *gyrB* ซึ่งเป็นยีนสำหรับการผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ซับยูนิต B ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ยีนดังกล่าวนี้มีอัตราของการวิวัฒนาการสูงกว่ายีน 16S rRNA กล่าวคือการเปลี่ยนแปลงของเบสในยีนนี้เกิดขึ้นในอัตรา 0.7-0.8 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 1 ล้านปี (Kasai, Ezaki, and Harayama, 2000) ยีน *gyrB* จึงมีความเหมาะสมมากกว่าในการนำมาใช้ในการจัดจำแนกและตรวจสอบแบคทีเรียที่มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก ๆ โดยมีงานวิจัยของ Venkateswaran, Dohmoto, Harayama (1998) ซึ่งออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gyrB* เพื่อใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยเทคนิค PCR พบว่าไพร์เมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะที่สามารถบ่งบอก *V. parahaemolyticus* ได้

นอกจากการนำยีน *gyrB* มาใช้แล้ว Kim *et al.* (1999) นำเสนอการใช้ยีน *toxR* ซึ่งเป็นบริเวณ regulatory gene ของ cholera toxin operon ซึ่งพบในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เช่น *V. cholerae*, *V. fisheri*, *V. parahaemolyticus* เป็นต้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *toxR* ใน *Vibrio* แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง เช่น ยีน *toxR* ใน *V. parahaemolyticus* กับ *V. cholerae* มีความคล้ายคลึงกันเพียง 52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยเทคนิค PCR ที่มีเป้าหมายเป็นยีน *toxR* จึงสามารถออกแบบไพร์เมอร์ให้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ (Kim *et al.*, 1999)

นอกจากยีนต่าง ๆ ดังได้กล่าวแล้ว Bej *et al.* (1999) รายงานการใช้ยีน thermolabile hemolysin (*tl*) เพื่อตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* โดยยีนบริเวณนี้มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* เท่านั้น ส่วนในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคนิยมใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อโดยตรง คือยีน *tdh* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง thermostable direct hemolysin (TDH) และยีน *trh* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง TDH-related hemolysin (TRH) โดยท็อกซินทั้งสองชนิดเป็นปัจจัยสำคัญต่อการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* (Bilung *et al.*, 2005)

1.2.2.2 เทคนิคไฮบริไดเซชันของกรดนิวคลิอิก (Nucleic acid hybridization)

เทคนิคไฮบริไดเซชันอาศัยหลักการของการจับคู่ของเบสที่เป็นคู่สมกันของกรดนิวคลีอิกสายเดี่ยวสองสายที่มาจากต่างแหล่งกัน โดยที่กรดนิวคลิอิกสายหนึ่งเป็นโมเลกุลเป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบ ในขณะที่กรดนิวคลิอิกอีกสายหนึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลติดตามหรือที่เรียกว่าโพรบ (probe) ซึ่งถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อโมเลกุลเป้าหมาย (สุดารัตน์ สวนจิตร, 2547) โมเลกุลของโพรบอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอก็ได้โดยได้ถูกติดฉลากไว้ด้วย

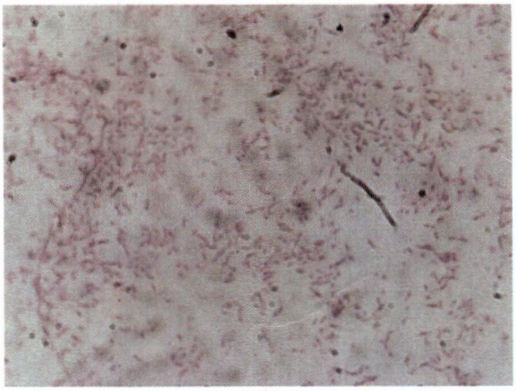
สารกัมมันตภาพรังสี เช่น ^{32}P หรือ ^{35}S หรือโพรบอาจถูกติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีก็ได้ เช่น ไบโอติน (biotin) ไดโกซิจินิน (digoxigenin) หรือ ฟลูออเรสซิน (fluorescein) (สุดารัตน์ สวนจิตร, 2547) ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันในหลายงานวิจัยใช้โพรบที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน *tl* (McCarthy, DePoala, Cook, Kaysner and Hill, 1999) ในขณะการตรวจสอบสายพันธุ์ก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ มักใช้โพรบที่มียีนเป้าหมายเป็น *tdh* และ/หรือ *trh* (Nishibuchi, Ishibashi, Takeda and Kaper, 1985; Nishibuchi, Hill, Zon, Payne, and Keper, 1986; Lee, Chen, Liu, and Su, 1992; Tada *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992) โดยมีการพัฒนาโพรบเพื่อตรวจสอบยีนดังกล่าว โดยทำในลักษณะของ colony hybridization (Nishibuchi *et al.*, 1985; Banerjee, Pandian, Todd, and Farber, 2002) หรือ dot blot hybridization (Yamamoto *et al.*, 1992) ทำให้สามารถตรวจสอบจำนวนไอโซเลทได้มากในแต่ละครั้ง

2. รายละเอียดเกี่ยวกับ *V. vulnificus*

2.1 ข้อมูลพื้นฐาน *V. vulnificus*

2.1.1 สัณฐานวิทยา

V. vulnificus จัดเป็นแบคทีเรียทะเลและสามารถก่อโรคในมนุษย์ (Thompson, Austin, and Swings, 2006) จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae (Dobel, Palludan, and Jensen, nd) *V. vulnificus* ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างท่อนหรือโค้ง ไม่สร้างสปอร์ (Mahon and Manuselis, 1995) ดังภาพที่ 2-4 สามารถสร้างแคบซูลชนิดซึ่งเป็นสารประกอบชนิดพอลิแซคคาไรด์ (capsular polysaccharide; CPS) ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบในสายพันธุ์ก่อโรค (Thompson, Austin, and Swings, 2006) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบชนิดที่อยู่ที่ขั้วของเซลล์ (polar-sheathed flagellum) (Dalsgaard, nd) ดังภาพที่ 2-5



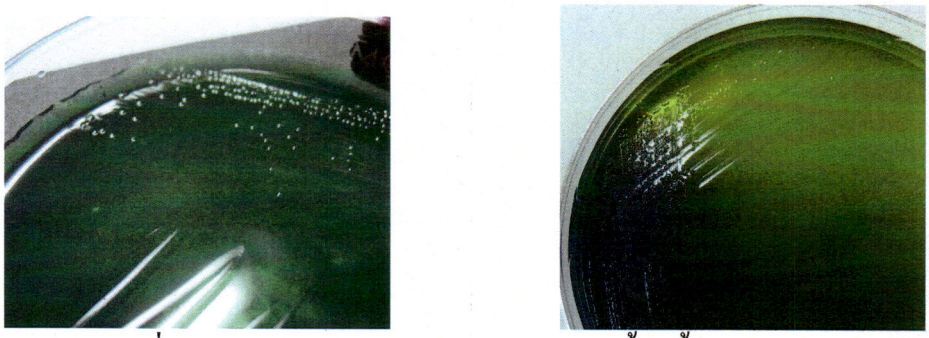
ภาพที่ 2-4 การย้อมติดสีแกรมลบ และรูปร่างท่อนของ *V. vulnificus*

ภาพที่ 2-5 เซลล์ *V. vulnificus* ที่มีแฟลกเจลลาแบบ polar-sheathed flagellum (ที่มา: FDA and the Center for Food Safety and Applied Nutrition, nd)

2.1.2 สรีรวิทยา

V. vulnificus สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Dalsgaard, nd) เจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 8 - 43 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญ โดยระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วงความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 0.5- 6.0 เปอร์เซ็นต์ระดับของ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 7.8 แต่สามารถเจริญและอยู่รอดได้ในช่วง pH 4 - 10 และเจริญได้ในอาหารที่มีค่า water activity (a_w) ในช่วง 0.960 - 0.997 (New Zealand Food Safety Authority, nd) *V. vulnificus* สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar ให้โคโลนีสีเขียวเช่นเดียวกับ *V. parahaemolyticus* เนื่องจากไม่มีการหมักย่อยน้ำตาลซูโครส (ภาพที่ 2-6 ก) และสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCPC agar ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลเซลโลไบโอส (cellobiose) ยาปฏิชีวนะ polymysin B และยาปฏิชีวนะ colistin ซึ่งเป็นอาหารชนิดคัดเลือกที่พัฒนาสำหรับตรวจและคัดแยก *V. vulnificus* พบว่าให้โคโลนีสีเหลืองซึ่งแตกต่างจาก *V. parahaemolyticus* ที่ให้โคโลนีสีม่วง (Harwood, Gandhi, and Wright, 2004) (ภาพที่ 2-6 ข) ลักษณะและสมบัติทางชีวเคมีของ *V. vulnificus* แสดงในตารางที่ 2-2

(ก) (ข)



ภาพที่ 2-6 (ก)โคโลนี *V. vulnificus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar
(ข)โคโลนี *V. vulnificus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCPC agar

ตารางที่ 2-2 ลักษณะทางชีวเคมีของ *V. vulnificus*

ลักษณะทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Motility	+
Growth in :	
0 % NaCl	-
3 % NaCl	+
6 % NaCl	+
8 % NaCl	-
10 % NaCl	-
Acid production from:	
Lactose	+
Arabinose	-
Cellobiose	+
Mannose	+
Sucrose	-
Decarboxylase:	
Lysine	+
Arginine	-
Growth at 42 °C	+
Oxidase	+
ONPG	+
Voges-Proskauer	-
Sensitivity to	
10 μg 0/129	susceptible
150 μg 0/129	susceptible
Gelatinase	+
Urease	-

(ที่มา: Kaysner and DePaola, 2001)

2.1.3 ถิ่นอาศัย

V. vulnificus เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลบริเวณชายฝั่งทะเล ได้แก่ น้ำทะเล สัตว์น้ำ และดินตะกอน นอกจากนี้ยังพบปนเปื้อนได้ตามอาหารทะเลดิบ (Wang and Levin, 2006) ผู้ป่วยสามารถได้รับเชื้อจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ เช่น หอยนางรม หรือได้รับเชื้อทางบาดแผลที่สัมผัสกับเชื้อในแหล่งน้ำ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันที่ดีควรหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารทะเลดิบโดยเฉพาะหอยนางรม การสัมผัสน้ำทะเลและน้ำกร่อยเมื่อมีบาดแผล (ศรีวรรณา หัทยานานนท์, กฤษณา ภูริกิตติชัย, กรองแก้ว ศุภวัฒน์ และ ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ, 2549) และนอกจากคนแล้วยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถก่อโรคในปลาไหลได้ด้วย (Thompson, Austin, and Swings, 2006)

2.1.4 *V. vulnificus* กับการเกิดโรคในคน

V. vulnificus แยกได้ครั้งแรกในปี 1964 โดย The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ของประเทศสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตามในเบื้องต้นที่แยกเชื้อได้มีการบ่งชี้เชื้อผิดพลาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* (Harwood, Gandhi and Wright, 2004) เมื่อในปี 1976 CDC ได้จัดจำแนกเป็นวิบริโอชนิดใหม่ คือ *V. vulnificus* โดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่นในสกุลเดียวกันคือจากความสามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส (Lactose) (ไม่สร้างก๊าซ) น้ำตาลซาลิซิน (salicin) และน้ำตาลเซลโลไบโอส (cellobiose) (Thompson, Austin, and Swings, 2006)

V. vulnificus ในปัจจุบันพบว่าสามารถแบ่งแยกได้ 3 ไบโอไทป์ (biotype) โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ คุณสมบัติของ Lipopolysaccharide (LPS) ชนิดของโฮสต์ที่เชื้อก่อโรคและความแตกต่างในระดับพันธุกรรม ซึ่งลักษณะของ *V. vulnificus* ทั้ง 3 ไบโอไทป์แสดงดังตารางที่ 2-3

<u>ไบโอไทป์ 1</u>

V. vulnificus ไบโอไทป์ 1 ที่พบส่วนใหญ่ก่อโรคในมนุษย์ องค์ประกอบของเซลล์ส่วนที่เป็น LPS มีความซับซ้อนซึ่งพบว่ามีความหลากหลายมากในแต่ละไอโซเลทที่พบ อย่างไรก็ตามได้มีการแบ่งกลุ่มของ LPS ที่พบใน *V. vulnificus* ไบโอไทป์ 1 ออกเป็นอย่างน้อย 5 กลุ่ม ตามผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Thompson, Austin, and Swings, 2006)

<u>ไบโอไทป์ 2</u>

ในปี 1982 มีรายงานการแยกเชื้อ *V. vulnificus* ไบโอไทป์ 2 ซึ่งก่อให้เกิดโรคในปลาไหลที่เพาะเลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น (Linkous and Oliver, 1999) ลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างจากไบโอไทป์ 1 คือปฏิกิริยาการทดสอบ indole, ornithine decarboxylase และ mannitol fermentation ให้ผลลบและไม่สามารถเจริญได้ที่ 42 องศาเซลเซียส (Thompson, Austin, and Swings, 2006)

การก่อโรคของ *V. vulnificus* ไบโอไทป์ 2 พบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังในทะเล โดยเฉพาะปลาไหล และ LPS ที่พบในเชื้อไบโอไทป์นี้มีเพียง 1 ชนิด ซึ่งทำให้สามารถจัดจำแนกเป็นเชื้อไบโอไทป์นี้เป็นซีโรกรุ๊ป E (Gulig, Bourdage, and Starks, 2005)

ไบโอไทป์ 3

ในปี ค.ศ. 1999 ได้มีรายงานการพบ *V. vulnificus* ไบโอไทป์ 3 โดยทุกไอโซเลทแยกได้ในประเทศอิสราเอลจากผู้ป่วยที่เกิดบาดแผลหลังการสัมผัสกับปลา *Tilapia* ลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างจากไบโอไทป์ 1 และ 2 คือ ปฏิกิริยาการทดสอบ citrate และ o-nitrophenly-β-D-galactopyranoside ให้ผลลบ ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซาลิซิน น้ำตาลเซลโลไบโอส และน้ำตาลแลกโตส (Thompson, Austin, and Swings, 2006)

ตารางที่ 2-3 คุณสมบัติบางประการของ *V. vulnificus* 3 ไบโอไทป์

ลักษณะ	ไบโอไทป์ 1	ไบโอไทป์ 2	ไบโอไทป์ 3
1. ลักษณะฟีโนไทป์			
- Lactose fermentation	+	+	-
- salicin fermentation	+	+	-
- cellobiose fermentation	+	+	-
- mannitol fermentation	+	-	+
- indole	+	-	+
- citrate	+	+	-
- ornithine decarboxylase	+	-	+
- *o*-nitrophenly-β-D-galactopyranoside	+	+	-
-การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	+	-	+
2. โฮสต์ที่เชื้อเข้าก่อโรค	คน	ปลาไหล	คน
3. การก่อโรค	Gastroenteritis Primary septicemia Wound infection	Primary septicemia Wound infection	Wound infection
5. Lipopolysaccharide (LPS)	heterogeneous	homogeneous	ไม่พบรายงาน

ที่มา: Thompson, Austin, and Swings, 2006; Harwood, Gandhi and Wright, 2004

V. vulnificus สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในคนคือไบโอไทป์ 1 (Thompson, Austin, and Swings, 2006) โดยแยกได้ในปี 1976 ซึ่งพบเชื้อชนิดนี้ในบริเวณอ่าวแอตแลนติกและชายฝั่งทะเลแปซิฟิกของอเมริกาเหนือ เมื่อได้รับเชื้อ *V. vulnificus* เข้าสู่ร่างกาย ผู้ติดเชื้อมีอาการโลหิตเป็นพิษ ทำให้อัตราการป่วยตายสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณเชื้อเพียง 10^3 เซลล์ในอาหาร 1 กรัม สามารถก่อให้เกิดโรคได้ (ศรีวรรณา หัทยานานนท์ และคณะ, 2549) อย่างไรก็ตามพบว่าการก่อโรคของ *V. vulnificus* ในคนสามารถเกิดขึ้นได้ 3 ลักษณะคือ

(1) การติดเชื้อที่บาดแผล (wound infection) เชื้อสามารถลุกลามอย่างรวดเร็วจนทำให้เกิดเนื้อเยื่ออักเสบ ผิวหนังมีอาการบวม ร้อนแดง เจ็บปวด อาจกลายเป็นตุ่ม จนเกิดอาการเนื้อเน่าตายของเนื้อเยื่ออ่อนใต้ผิวหนัง การติดเชื้อที่บาดแผล พบประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์และมีอัตราการตายถึง 50 เปอร์เซ็นต์

(2) เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่กระแสโลหิตโดยผ่านทางเยื่อบุทางเดินอาหารจากการรับประทานอาหารทะเลดิบหรือผ่านทางบาดแผลจากการติดเชื้อที่บาดแผล มีอาการไข้ หนาวสั่น อ่อนเพลีย ความดันต่ำ อาจมีอาการอุจจาระร่วง อาเจียน อาการโลหิตเป็นพิษนี้พบประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์

(3) กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ จากการรับประทานอาหารทะเลดิบทำให้อุจจาระร่วง อาเจียนพบประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ อัตราการตายน้อยมาก (ศรีวรรณา หัทยานานนท์ และคณะ, 2549)

<u>ปัจจัยในการก่อโรค (virulence factors)</u>

มีปัจจัยหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *V. vulnificus* อันได้แก่ การมีคุณสมบัติในการสร้าง polysaccharide capsule การสร้าง lipopolysaccharide (LPS), extracellular hemolysin, elastolytic protease และความสามารถในการจับธาตุเหล็กในซีรัม เป็นต้น

Capsular polysaccharide (CPS)

จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. vulnificus* ซึ่งการสร้าง CPS ของเชื้อสามารถสังเกตได้จากลักษณะโคโลนี กล่าวคือเชื้อที่สามารถสร้าง CPS ได้นั้นโคโลนีมีลักษณะทึบแสง (opaque) ส่วนเชื้อที่ไม่สร้าง CPS โคโลนีจะโปร่งแสง (translucent) (Thompson, Austin, and Swings, 2006) ได้มีผู้สนใจศึกษากลไกการทำงานของ CPS ซึ่งสำคัญต่อการติดเชื้อระยะแรกของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ก่อโรค และช่วยในการต้านการเกิดฟาโกซัยโตซิส (antiphagocytosis) ของเซลล์ที่เชื้อนี้เข้าบุกรุก (Linkous and Oliver, 1999)

Acquisition of iron

ธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียจึงมีกลไกเพื่อย้ายธาตุเหล็กจากสิ่งแวดล้อมหรือจากตัวขนส่งในเซลล์เจ้าบ้าน (transferring, lactoferrin) มาใช้ในการเจริญ พบว่า *V. vulnificus* สามารถสร้าง siderophore ชนิด hydroxymate และ phenolate siderophore มีผลให้ *V. vulnificus* สามารถเจริญได้ในที่ที่มีธาตุเหล็กอย่างจำกัด โดยพบว่าขบวนการ Acquisition of iron มีความสำคัญต่อการเกิดโรคกล่าวคือ *V. vulnificus* เมื่อบุกรุกแล้วเซลล์เจ้าบ้านเพิ่มการสะสมของธาตุเหล็กสูงขึ้นก่อให้เกิดการขาดสมดุลของธาตุเหล็กในเซลล์และทำให้เซลล์อื่น ๆ ไวต่อการขาดสมดุลของธาตุเหล็ก ซึ่งทำให้การก่อโรคของ *V. vulnificus* สมบูรณ์ขึ้น โดยมีบางรายงานกล่าวว่าการเกิดภาวะขาดสมดุลของธาตุเหล็กในเซลล์เจ้าบ้าน มีผลให้ร่างกายไวต่อการติดเชื้อยิ่งขึ้นหรือมีความรุนแรงในการก่อโรคมากขึ้นจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง (Gulig, Bourdage and Starks, 2005)

Lipopolysaccharide (LPS)

เป็นปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญยิ่งของ *V. vulnificus* ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการของโรคที่แสดงการติดเชื้อในกระแสโลหิตและการมีแผลติดเชื้อรุนแรง (Linkous and Oliver, 1999) ซึ่งส่งผลต่อการช็อคและการตายในผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้ (Thompson, Austin, and Swings, 2006) โดย LPS ไปเหนี่ยวนำการผลิต tumor necrosis factor (TNF) ให้มากผิดปกติ กระตุ้นการผลิต nitric oxide synthase ที่สูงขึ้น เพื่อตอบสนองต่อ LPS โดยจากการทดลองพบว่า LPS บริสุทธิ์ที่แยกจาก *V. vulnificus* เมื่อฉีดเข้าหนูทดลองพบว่าสามารถทำให้หนูตายภายใน 1 ชั่วโมงด้วยภาวะความดันโลหิตลดต่ำอย่างเฉียบพลัน (Gulig, Bourdage and Starks, 2005)

Hemolysin/ cytolysin

จัดเป็น hemolysin/ cytolysin ที่ไม่เสถียรต่อความร้อนมีขนาด 56 กิโลดาลตัน ไม่เพียงเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ ยังสามารถทำลายเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เช่น Chinese hamster ovary (CHO) (Strom and Paranjpye, 2000) เมื่อนำ cytolysin บริสุทธิ์มาทดสอบกับหนูทดลองพบว่าหนูตายเมื่อฉีด hemolysin/ cytolysin เข้าหลอดเลือดดำที่ระดับความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นการทดลองการเกิดโรคในหนูทดลอง จากการทดลองสามารถตั้งสมมุติฐานว่า hemolysin/ cytolysin อาจมีส่วนร่วมในการก่อโรคของ *V. vulnificus* อย่างไรก็ตามพบว่ายีน hemolysin (*vvh*) สามารถพบได้ทั้งสายพันธุ์จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการสร้าง hemolysin (cytolysin) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคในคนของ *V. vulnificus* (Linkous and Oliver, 1999)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

2.2. การตรวจสอบ *V. vulnificus*

การตรวจสอบ *V. vulnificus* สามารถทำได้ 2 วิธีคือ วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารจำเพาะกับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

2.2.1 การเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยวิธีนี้สามารถทำได้ดังขั้นตอนต่อไปนี้ (FDA, 2004)

2.2.1.1 การเตรียมสารละลายเจือจางตามวิธี MPN

ชั่งตัวอย่าง 50 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เติม Phosphate buffer saline (PBS) 450 มิลลิลิตร ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่างความเร็วสูง เป็นเวลา 2 นาที สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 10^{-1} แล้วเตรียมสารละลายตัวอย่างเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} หรือมากกว่าด้วยสารละลาย PBS ปิเปตตัวอย่างความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี Alkaline peptone water (APW) 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด นำไปบ่ม 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

2.2.1.2 การเขี่ยเชื้อลงอาหาร TCBS หรือ mCPC เพื่อดูลักษณะโคโลนี

นำลูบเขี่ยเชื้อ จากส่วนบนลดจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ APW ที่มีการเจริญของเชื้อ ขีดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส หรือลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCPC agar บ่ม 18-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีของ *V. vulnificus* บนอาหาร TCBS มีโคโลนีสีเขียว กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร ส่วนลักษณะโคโลนีของ *V. vulnificus* บนอาหาร mCPC agar มีโคโลนีสีเหลือง กลม แบน ขนาด 2 มิลลิเมตร นำเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าว เขี่ยแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_1 agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์

2.2.1.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

(1) การทดสอบการใช้อาร์จินีน

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวบน T_1N_1 agar มาเขี่ยบน slant และแทงลง butt ของ Arginine glucose slant (AGS) ที่มีเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง *V. vulnificus* จะให้ผล K/A ไม่สร้างแก๊สและ H_2S

(2) การทดสอบการเคลื่อนที่

ใช้เข็มเขี่ยถ่ายเชื้อจาก AGS ที่มีเกลือ NaCl 3เปอร์เซ็นต์ แล้วแทงลง butt ของ Motility test medium ลึกประมาณ 5 เซนติเมตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส *V. vulnificus* สามารถเคลื่อนที่ได้จึงแสดงให้เห็นการเจริญนอกแนวปลูก

ว๗๑.๓
น๖๗๐
ล.๒
254690

(3) การทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ

ใช้เข็มเขี่ยถ่ายเชื้อจาก AGS ที่มีเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว T_1N_0, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 และ T_1N_{10} ซึ่งมีเกลือ NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ ปิดฝาหลวม ๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผล อาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 ขุ่นเนื่องจากมีการเจริญของ *V. vulnificus* แต่ T_1N_0, T_1N_8 และ T_1N_{10} ไม่ขุ่น

(4) การทดสอบคุณสมบัติ การสร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase

เขี่ยเชื้อที่ให้ผลบวกตามลักษณะข้างต้น ไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase โดยเขี่ยเชื้อจาก T_1N_1 agar ป้ายลงบนกระดาษกรองที่ชุบสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ *N,N,N,N* Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochoride โดย *V. vulnificus* ให้ผลบวก สีของกระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายใน 10 วินาที

(5) การตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะเซลล์

เขี่ยเชื้อจาก T_1N_1 agar ลงบนสไลด์นำไปย้อมสีแกรม จากนั้นตรวจสอบลักษณะเซลล์และการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ *V. vulnificus* มีลักษณะรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์และติดสีแกรมลบ

(6) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ด้วย API 20E

เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมี ตามลักษณะข้างต้นจาก T_1N_1 agar ที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ด้วย API 20E diagnostic strips and reagents (BioMerieux Vitek , Inc.) โดยดำเนินการตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดการแปลผล *V. vulnificus* ให้ผลทดสอบชีวเคมีตามลักษณะดังกล่าวและเมื่อทดสอบด้วย API 20E diagnostic strips and reagents ให้ผลเป็น *V. vulnificus* ไม่น้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ถ้าน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ทำการทดสอบเพื่อยืนผลอีกโดยใช้เชื้อจาก T_1N_1 agar และผู้ทำการทดสอบเดิม

2.2.1.4 การรายงานผล

นับจำนวนหลอดของแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* แล้วนำจำนวนหลอดไปเปิดเทียบกับตาราง MPN 3:3:3 รายงานผลเป็น MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง (FDA, 2004)

2.2.2 เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

วิธีตรวจการปนเปื้อน *V. vulnificus* ในตัวอย่างอาหาร ขององค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา เสนอแนะการตรวจ *V. vulnificus* ในหนังสือ Bacteriological Analytical Manual ซึ่งใช้วิธีการตรวจเชื้อนี้ เช่นเดียวกับการตรวจสอบการปนเปื้อนใน *V. parahaemolyticus* ซึ่งวิธีการทดสอบที่กล่าวมาข้างต้นต้องใช้ระยะเวลา 5-7 วัน เพื่อยืนยันผลการตรวจสอบทำให้เสียเวลาค่อนข้างมาก ดังนั้นองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้เสนอแนะการตรวจ *V. vulnificus* โดยเทคนิคทางโมเลกุลไว้ในหนังสือ Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2004) และมีรายงานวิจัยหลายงานที่ผ่านมาให้ความสำคัญที่นำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการตรวจ *V. vulnificus* จากน้ำทะเลและจากตัวอย่างอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยนางรมที่พบการปนเปื้อนด้วยเชื้อนี้ค่อนข้างมาก เพื่อศึกษาถึงการแพร่กระจายของเชื้อ การป้องกันและเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ ดังนั้นการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้จึงสามารถตรวจสอบเชื้อนี้ได้รวดเร็วและมีความแม่นยำ (Takahashi *et al.*, 2005) เทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. vulnificus* โดยทั่วไปได้แก่ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการทำไฮบริไดเซชันของกรดนิวคลีอิก

2.2.2.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* อย่างแพร่หลาย ดังเห็นได้จากรายงานวิจัยหลาย ๆ ผลงานดังเช่นรายงานวิจัยของ Brauns, Hudson, and Oliver (1999) ได้นำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจสอบ *V. vulnificus* ทั้งเซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และเพาะเลี้ยงไม่ได้ งานวิจัยของ Hill *et al.* (1991) นำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจสอบ *V. vulnificus* ในหอยนางรมที่จำลองการปนเปื้อนของเชื้อ จากงานวิจัยของ Brauns *et al.* (1991) และ Hill *et al.* (1991) ตามที่กล่าวมานั้นงานวิจัยทั้งสองงานอาศัยยีนเป้าหมายในการตรวจสอบคือ ยีน cytotoxin/ hemolysin (*cyt* หรือ *vvhA*) ซึ่งยีนเป้าหมายนี้จัดเป็น virulence gene ดังนั้นจึงพบว่าในปัจจุบันมีนักวิจัยให้ความสนใจที่จะนำยีนนี้มาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจสอบ *V. vulnificus* ดังเช่นงานวิจัยของ Aono *et al.* (1997) นำเทคนิค PCR มาตรวจสอบ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำทะเล ดินตะกอน หอยนางรมและปลาโกบี ที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวโตเกียว ซึ่งพบว่าการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR สามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนได้ 61 ไอโซเลท และได้ทดลองยืนยันผลการตรวจสอบ *V. vulnificus* ทั้ง 61 ไอโซเลท โดยเทคนิค DNA-DNA hybridization และชุด API 20E พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเทคนิค PCR มีความรวดเร็ว และแม่นยำในการบ่งชี้ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล โดยอาศัยยีนเป้าหมาย *vvhA* (519 bp) และองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้เสนอแนะการตรวจ *V. vulnificus* โดยเทคนิค PCR ในหนังสือ Bacteriological Analytical Manual ให้ใช้ยีน *vvhA* ในการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้ (FDA, 2004)

นอกจากการนำยีน *vvhA* มาใช้เป็นยีนเป้าหมายแล้วยังพบว่ายีน 16S rRNA ก็สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อนี้ได้ ดังรายงานของ Kim and Jeon (2001) ซึ่งได้พัฒนาเทคนิค PCR สำหรับตรวจสอบ *V. vulnificus* จากตัวอย่างน้ำทะเล ดินตะกอนทะเลและหอยนางรมจากฟาร์มเพาะเลี้ยง โดยมียีนเป้าหมายเป็นยีน 16S rRNA ซึ่งนอกเหนือจากการตรวจสอบเชื้อชนิดนี้ได้แล้ว เทคนิคนี้ยังสามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างไอโซเลทต่าง ๆ ของ *V. vulnificus* ที่คัดแยกได้ โดยสามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *V. vulnificus* type A และ type B ทั้งนี้เป็นผลมาจากความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้งานวิจัยของ Takahashi *et al.* (2005) ได้พัฒนาเทคนิค real time PCR สำหรับตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยอาศัยยีนเป้าหมาย *toxR* ซึ่งควบคุมการสร้าง trans-membrane DNA binding regulatory protein มีตำแหน่งอยู่บน ancestral chromosome และเป็นยีนที่พบในเชื้อสกุล *Vibrio* นอกจากนั้นบริเวณนี้ยังนิยมนำมาใช้ในการบ่งชี้เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. hollisae* ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบผลของการใช้ยีน *toxR* กับ *vvhA* (ชุดไพร์เมอร์ของ Hill *et al.*, 1991) พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน

ยีนที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* อีกยีนหนึ่งคือ *gryB* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ topoisomerase II ซับยูนิต B ซึ่งมีความสำคัญในขบวนการจำลองดีเอ็นเอของเซลล์ ดังเช่นงานวิจัยของ Kumar, Parvathi, Karunasagar, and Karunusagar (2006) ที่นำยีน *gryB* มาใช้เป็นเป้าหมายสำหรับตรวจสอบ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมที่ผ่านการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

การตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยเทคนิค PCR ยังพัฒนาการตรวจโดยอาศัยเทคนิค Nested PCR ดังเช่นการทดลองของ Arias, Garay, and Aznar (1995) สามารถตรวจสอบได้ไวมากคือ 10 เฟมโตกรัม ในดีเอ็นเอบริสุทธิ์ หรือ 120 เซลล์ ของเชื้อบริสุทธิ์

2.2.2.2 เทคนิคไฮบริไดเซชันของกรดนิวคลิอิก (Nucleic acid hybridization)

เทคนิคไฮบริไดเซชันถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบและบ่งชี้เชื้อจุลินทรีย์โดยมีความแม่นยำและสามารถตรวจสอบได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เช่น เทคนิคโคโลนีไฮบริไดเซชันที่อาศัยการออกแบบโพรบให้มีความจำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบ *V. vulnificus* ก็เป็นอีกหนึ่งเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้โดยอาศัยเทคนิคนี้ โดยในหนังสือ Bacteriological Analytical Manual ขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา เสนอให้ใช้โพรบที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน *vvhA* ในการตรวจสอบเชื้อนี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Vibrio vulnificus* agar (VVA) (FDA, 2004) โพรบ *vvhA* ที่ออกแบบมาพบว่าสามารถเกิดไฮบริไดเซชันได้กับเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและสายพันธุ์ทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Parvathi, Kumar, Karunasagar, and Karunasagar (2004) ใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันในการตรวจสอบ

V. vulnificus ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้โพรบที่มีความจำเพาะต่อยีน *vvhA* ตรวจสอบ *V. vulnificus* ในเชิงปริมาณด้วยการทำโคโลนีไฮบริไดเซชัน

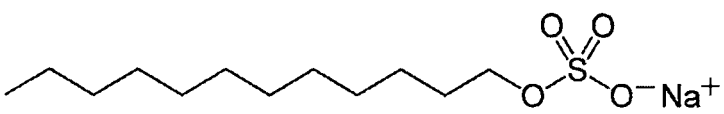
3. รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

โมเลกุลดีเอ็นเอประกอบด้วยสายโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวและมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบร่วมอยู่ด้วย (ในยูคาริโอต) ขนาดของดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์แล้วมีความยาวมากกว่าเป็นพันเท่า โดยจะพันทบกันแน่นจนสามารถบรรจุอยู่ในเซลล์ได้ ดีเอ็นเอของโปรคาริโอตไม่มีเยื่อหุ้มในขณะที่ดีเอ็นเอของยูคาริโอตอยู่ในนิวเคลียส เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีองค์ประกอบเหมือนเยื่อหุ้มเซลล์คือเป็นชั้นไขมันที่มีโปรตีนแทรกอยู่หรือจับอยู่หลวม ๆ ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์มีขั้นตอนพื้นฐาน 3 ขั้นตอนคือ

(1) การทำให้เซลล์แตก

โดยการทำให้ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา ในกรณีของโปรคาริโอตซึ่งไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตก เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการทำให้เซลล์แตกได้โดยใช้สารพวก detergent ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมัน เช่น sodium dodesyl sulfate (SDS) Triton X-100 และ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

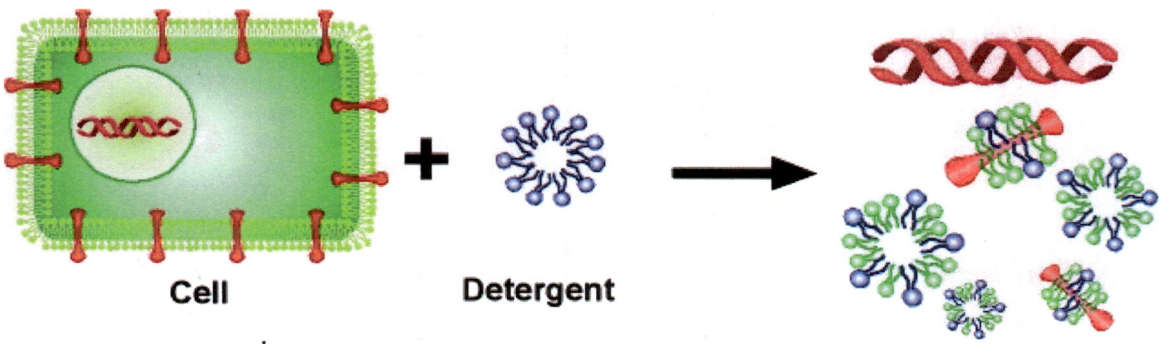
(ก) Sodium dodecyl sulfate (SDS) จัดเป็นสาร detergent สังเคราะห์ (synthetic detergent) ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติละลายไขมันและเป็นสารทำให้เกิดฟอง ในงานวิจัยนิยมใช้สาร SDS ในการทำให้เซลล์แตก เป็นสารลดแรงตึงผิวซึ่งอยู่ในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวประจุลบ (anionic surfactant) (Wikipedia, 2008) สูตรทางเคมีคือ $NaC_{12}H_{25}SO_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 288.38 กรัม ต่อโมล



ภาพที่ 2-7 สูตรโครงสร้างของ Sodium dodecyl sulfate (SDS)
(ที่มา: Wikipedia, 2008)

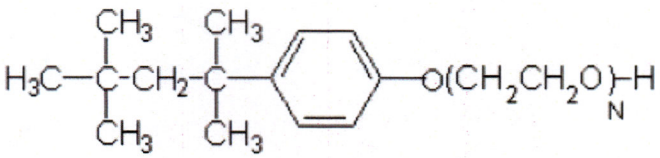
กลไกการทำงานของสาร SDS ในการทำให้เซลล์แตกเหมือนกับการที่สบู่สามารถล้างหรือละลายไขมันได้ SDS จะเข้าไปละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อนิวเคลียส รวมทั้งจับกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ที่เยื่อนี้ด้วย (hydrophobic protein) ทำให้เซลล์แตกออก ปล่อยองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือต่าง ๆ

น้ำตาล อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอออกมาในสารละลาย ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกต้องระมัดระวังไม่ให้ดีเอ็นเอแตกหัก (shearing) ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถดึงดีเอ็นเอให้ออกมาเป็นสายยาวได้ การผสมในขั้นนี้จึงต้องระวังไม่เขย่าหรือคนสารละลายแรงเกินไป การสังเกตว่าเซลล์แตกดูได้จากลักษณะของสารละลายเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใสและมีลักษณะข้นเนื่องจากองค์ประกอบภายในเซลล์สารต่าง ๆ มากมาย ภาพที่ 2-8 เป็นแผนภาพแสดงกลไกการทำงานของ detergent ในการทำให้เซลล์แตก



ภาพที่ 2-8 กลไกการทำงานของ detergent ในการทำให้เซลล์แตก
(ที่มา: Genetic Science Learning Central, nd)

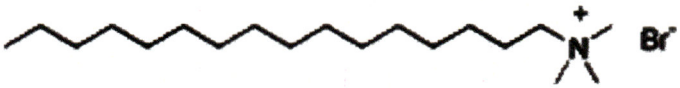
(ข) Triton X-100 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 625 กรัม ต่อโมล จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวไม่มีขั้ว (non-ionic surfactont) (Lavintman and Cardini, 1972) ละลายได้ในน้ำ เบนซิน (benzene) โทลูอีน (toluene) ไซลีน (xylene) เอทธานอล (ethanol) และไอโซโพรพานอล (isopropanol) เป็นต้น เกิดจากการรวมตัวกันของสาร octylphenol พอลิเมอร์ไรซ์กับ ethylene oxide (ภาพที่ 2-9) โดย Triton X-100 ทำหน้าที่เป็นตัวละลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Sigma, nd.)



ภาพที่ 2-9 สูตรโครงสร้างของ Triton X-100
(ที่มา: Sigma, nd)

(ค) cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) เป็นสารลดแรงตึงผิวอีกประเภทหนึ่งที่นำมาใช้ในการศึกษา ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวประจุบวก (cationic surfactant) (Lavintman and Cardini, 1972) สูตรทางเคมี คือ $CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3Br$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ

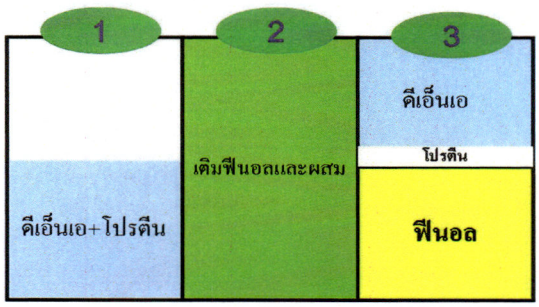
364.46 กรัม ต่อโมล (Wikipedia, 2008) CTAB ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย แล้วนำมาประยุกต์ใช้กับการแยกดีเอ็นเอของพืช CTAB มีความสามารถกำจัดพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) สารประกอบกลุ่มฟีนอล (phenolic compounds) สารประกอบต่าง ๆ ที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่พบในพืช (David and Dowhan, 2002) โดย CTAB สามารถสร้างพันธะกับกรดนิวคลีอิกในสภาวะที่มีเกลือสูง



ภาพที่ 2-10 สูตรโครงสร้างของ CTAB
(ที่มา: Wikipedia, 2008)

(2) การกำจัดอาร์เอ็นเอและโปรตีน

เมื่อเซลล์แตกดีเอ็นเอหลุดออกนอกเซลล์ โดยละลายอยู่ใน lysis buffer หากต้องการให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้นสามารถทำได้โดยการกำจัดอาร์เอ็นเอและโปรตีน การกำจัดอาร์เอ็นเอโดยใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase, ribonuclease) ในส่วนของโปรตีนสามารถย่อยออกได้ โดยเอนไซม์โปรติเอสและแยกโปรตีนที่ถูกดีเนเจอร์โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ฟีนอลและคลอโรฟอร์ม (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1987) โดยฟีนอลมีความสามารถดีเนเจอร์โปรตีนและสามารถละลายโปรตีนที่ถูกดีเนเจอร์ คลอโรฟอร์มมีความสามารถดีเนเจอร์โปรตีนเช่นเดียวกับฟีนอล แต่สามารถช่วยในการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ กับชั้นของน้ำได้คงที่ขึ้น ส่วนการเติม isoamyl alcohol ช่วยป้องกันการเกิดฟองในการเขย่าได้ เมื่อโปรตีนถูกดีเนเจอร์แล้วจะรวมตัวเป็นชั้นตกตะกอนอยู่ระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์และชั้นของน้ำ ซึ่งดีเอ็นเอจะลอยอยู่ในชั้นของน้ำ (ภาพที่ 2-11) รูปแบบในการขจัดโปรตีนวิธีนี้ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่แพง (David and Dowhan, 2002)



ภาพที่ 2-11 ขั้นตอนการแยกโปรตีนออกโดย phenol

(3) การตกตะกอนดีเอ็นเอ

เป็นขั้นตอนที่ทำเพื่อเพิ่มความเข้มข้นดีเอ็นเอและขจัดเกลือไอออน โดยการเติมแอลกอฮอล์ในสารละลายดีเอ็นเอ ได้แก่ เอทธานอล หรือไอโซโพรพานอล ในสภาวะที่มี monovalent cation (Na^+, K^+ หรือ NH_4^+) เช่น การใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมอะซิเตท หรือแอมโมเนียมอะซิเตท เป็นต้น ในความเข้มข้นที่เหมาะสม (0.1-0.5 โมลาร์)โดย monovalent cation ทำให้เกิดความเป็นกลางของ sugar phosphate backbone ทำให้ดีเอ็นเอละลายน้ำได้น้อย แล้วแอลกอฮอล์ที่เติมลงไปเหนี่ยวนำดีเอ็นเอให้ตกตะกอน (David and Dowhan, 2002) สภาวะการตกตะกอนดีเอ็นเอที่เหมาะสมควรบ่มที่อุณหภูมิต่ำ และแยกดีเอ็นเอที่ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1987) โดยปกติแล้วหลังจากตกตะกอนแล้วตามด้วยการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลอีกครั้ง เพื่อกำจัดเกลือออก โดยเกลือโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมอะซิเตท และแอมโมเนียมอะซิเตทถูกละลายออกในขั้นนี้ (David and Dowhan, 2002)

การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา PCR ดีเอ็นเอควรมีความบริสุทธิ์ โดยเฉพาะการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่อยู่ในหอยนางรมเพื่อนำไปใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR เพราะส่วนประกอบต่าง ๆ ในหอยนางรมมีผลรบกวนต่อปฏิกิริยา PCR เช่น เอนไซม์ดีเอ็นเอส เอนไซม์โปรติเนส โปรตีนต่าง ๆ และกรดฮิวมิก (Luan and Levin, 2008) อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากหอยนางรมที่มีรายงานไว้มีหลายวิธี เช่น การต้ม (Deepanjali *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006) การสกัดด้วย lysis buffer ชนิดต่าง ๆ (Coleman, Melanson, Biosca, and Oliver, 1996; Bej *et al.*, 1999; Panicker *et al.*, 2004) ซึ่งดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากแต่ละวิธีมีความบริสุทธิ์แตกต่างกันไป

4. ปัจจัยที่ควรพิจารณาสำหรับการใช้เทคนิค PCR ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจจุลินทรีย์ในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ เช่น ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม สิ่งส่งตรวจทางการแพทย์และตัวอย่างอาหาร เป็นต้น อย่างไรก็ตามในการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์จากตัวอย่างประเภทต่าง ๆ มีข้อกำจัดในการตรวจสอบคือองค์ประกอบจากตัวอย่างเหล่านั้นอาจมีผลไปยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยา PCR หรือการทำลายส่วนประกอบในปฏิกิริยาโดยเรียกสิ่งเหล่านี้ว่าตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) เช่น chelator ของ cation และสารที่สามารถจับหรือทำลายเอนไซม์พอลิเมอเรสหรือดีเอ็นเอแม่แบบได้ เป็นต้น

การแยกดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารออกมาเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR นั้นพบว่ามีความซับซ้อนมากกว่าการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์ต้องอาศัยขั้นตอนการทำงานที่มากขึ้น เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งมีความบริสุทธิ์มากพอที่ไม่มีผลยับยั้งการดำเนิน

ปฏิกิริยา PCR ซึ่งพบว่าในตัวอย่างอาหารต่าง ๆ เช่น เนื้อสัตว์ นม ชีส และเครื่องเทศมักมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ตัวอย่างเช่น ในตัวอย่างน้ำนมประกอบด้วยอิออนบวก (Ca^{2+}) เอนไซม์โปรติเอส นิวคลีเอส และกรดไขมัน ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการรบกวนหรือยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ (Maurer, 2006) ในตัวอย่างประเภทอื่น ๆ เช่น อาหารทะเล ตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่พบได้แก่ สารกลุ่มฟีนอล (phenolic compounds) ครีซอล (cresol) อัลดีไฮด์ (aldehydes) (Maurer, 2006; Luan and Levin, 2008) หรือในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์พบว่า เกลือน้ำดี (bile salt) และพอลิแซคคาไรด์ในอุจาระ ฮีมในเลือด และยูเรียในปัสสาวะก็มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยา PCR เช่นกัน การปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในตัวอย่างดีเอ็นเอ ถึงแม้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ ก็มีผลรบกวนอย่างมากต่อการการตรวจสอบจุลินทรีย์เป้าหมาย ดังนั้นในการทำงานเพื่อตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย นอกจากต้องคำนึงถึงการรักษาไว้ซึ่งดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบและความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ยังต้องมีการกำจัดตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่อยู่ในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของเอนไซม์โพลิเมอเรสก็มีส่วนช่วยในการทำงานอีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น *Tfl* และ *rTTH* สามารถทำงานได้ดีกว่า *Taq* เมื่อนำใช้กับดีเอ็นเอแม่แบบที่แยกจากตัวอย่างเนื้อและชีส อย่างไรก็ตามสามารถช่วยให้การทำงานของเอนไซม์มีประสิทธิภาพได้แม้มีตัวยับยั้งอยู่ในปฏิกิริยาโดยการใช้ bovine serum albumin (BSA), dimethyl sulfoxide (DMSO) Tween 20 และ betaine ซึ่งการเติมสารเหล่านี้ต้องคำนึงถึงชนิดของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบด้วย (Maurer, 2006)

นอกจากสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่ต้องคำนึงถึงในการทำงานแล้วสิ่งที่ต้องคำนึงถึงต่อการนำ PCR มาใช้ในการตรวจสอบคือ ความไวของปฏิกิริยา PCR ที่ตรวจตัวอย่างเมื่อมีการปนเปื้อนเชื้อ เพราะในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมจะพบการปนเปื้อนด้วยเชื้อก่อโรคที่ต้องการตรวจในระดับที่ต่ำ ดังนั้นก่อนการตรวจเชื้อจึงต้องมีขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณเชื้อให้ได้ในระดับวิธีที่พัฒนาขึ้นมาสามารถตรวจสอบได้

5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Bej *et al.* (1999) ใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างหอยทะเล โดยใช้ยีน *tl* เป็นยีนเป้าหมาย ผู้วิจัยได้ทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR กับ *V. parahaemolyticus* จำนวนทั้งหมด 111 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย 27 ไอโซเลท แยกจากอาหารทะเล 43 ไอโซเลท แยกจากสิ่งแวดล้อม 15 ไอโซเลท แยกจากหอยนางรม 19 ไอโซเลท และ *V. parahaemolyticus* ที่มีเก็บอยู่ในห้องปฏิบัติการอีก 7 ไอโซเลท พบว่า *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดให้ผลบวกต่อยีน *tl* ส่วนเชื้อที่ให้ผล PCR เป็นบวกต่อยีน *tdh* และ *trh* มีจำนวน 60 และ 43 ไอโซเลท ตามลำดับ การสกัดดีเอ็นเอ *V. parahaemolyticus* ที่เติมในหอยนางรม ผู้วิจัยใช้ lysis buffer ที่ประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ EDTA, 100 มิลลิโมลาร์ Tris.Cl, 5 มิลลิกรัม proteinase K และ 50 มิลลิกรัม sarkosyl โดยเติม lysis buffer ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นสกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:24:1) ตามด้วยขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล พบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่เติมลงในตัวอย่างหอยนางรมเท่ากับ 10^2 CFU ต่อ 10 กรัมของตัวอย่าง โดยที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

Alam, Tomochika, Miyoshi, and Shinoda (2002) สำรวจ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค ในบริเวณชายฝั่งทะเล Seto-Inland Sea ประเทศญี่ปุ่น ในช่วงเดือนที่มีอุณหภูมิของน้ำต่ำ (เดือนมกราคมถึงพฤษภาคม ค.ศ. 2001) โดยเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและอินทรียวัตถุเพื่อนำมาตรวจสอบโดยวิธี most probable number (MPN) แบบดั้งเดิม ควบคู่กับการใช้เทคนิค MPN-PCR เพิ่มปริมาณยีน *toxR, tdh* และ *trh* โดยปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ จากการตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมดพบว่าวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดย MPN แบบดั้งเดิมพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างจำนวน 40 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่วิธี MPN-PCR แบบมัลติเพล็กซ์ตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด (เมื่อพิจารณาจากการปรากฏผลบวกของยีน *toxR*) และเมื่อพิจารณาจากการปรากฏผลบวกของยีน *tdh* และ *trh* ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค 55 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด ตามลำดับ

Campbell and Wright (2003) นำเทคนิค real time PCR แบบ *Taq* Man มาตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม โดยอาศัยยีนเป้าหมาย *vvhA* ความไวของเทคนิคเมื่อตรวจสอบกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์เท่ากับ 22 เฟมโตกรัม ต่อปฏิกิริยา หรือเท่ากับเชื้อบริสุทธิ์ 10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp DNA minikit (Qiagen, Valencia, Calif.) ความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อในหอยนางรมโดยตรงอยู่ที่ 10^3 CFU ต่อกรัม (เชื้อที่ปนเปื้อนเดิมมีอยู่ 10^2 CFU ต่อกรัม) การตรวจสอบปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยวิธี real time PCR แบบ *Taq* Man เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจนับด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วทำ colony hybridization พบว่าให้ผลที่สัมพันธ์กัน

Blackstone *et al.* (2003) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (*tdh* +) ในหอยนางรมของศูนย์เก็บรวบรวมหอยนางรม Alabama ประเทศสหรัฐอเมริกา ในช่วงเดือนมีนาคม 1999 ถึงกันยายน 2000 โดยใช้เทคนิค real time PCR พบว่าตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมด 131 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยา PCR จำนวน 70 ตัวอย่าง ผู้วิจัยได้นำเทคนิค real time PCR มาใช้ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคในหอยนางรมที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยคู่ไพร์เมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ออกแบบจากยีน *tdh* ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะสูง เมื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบความไวของเทคนิค real time PCR ของการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในกรณีที่เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบจากเชื้อบริสุทธิ์และดีเอ็นเอที่เตรียมจากตัวอย่างหอยนางรมที่เติมแบคทีเรียชนิดนี้ลงไป พบว่าเทคนิคมีความไวในการตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์สูงกว่าการตรวจสอบเชื้อที่เติมในตัวอย่างหอยนางรม อย่างไรก็ตามเทคนิค real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงและมีความไวสูง (1 CFU ต่อปฏิกิริยา)

Deleep *et al.* (2003) ศึกษาเปรียบเทียบการนำเทคนิค PCR โดยใช้ยีนเป้าหมาย *toxR*, *tdh* และ *trh* และการตรวจสอบเชื้อโดยวิธีจุลชีววิทยาทางอาหารดัดแปลงจากวิธีของ Bacteriological analytical manual of USFDA และวิธี Farmer and Hickman-Brenner (1992) เพื่อตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารทะเล น้ำทะเล และตะกอนดิน ที่ได้จากบริเวณ Mangalore ประเทศอินเดีย โดยเก็บตัวอย่างในเดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม ค.ศ. 2001 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีทั้งหมด 86 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อใช้วิธีวิเคราะห์เชื้อทางจุลชีววิทยาทางอาหารพบการปนเปื้อน 28 ตัวอย่าง โดยมี 4 ตัวอย่างที่สามารถตรวจโดย direct plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มี 15 ตัวอย่างที่ตรวจโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนในอาหาร APW เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วขีดแยกเชื้อบนอาหาร TCBS และมี 9 ตัวอย่างที่สามารถตรวจสอบได้ทั้งสองวิธี สำหรับการตรวจโดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย โดยนำ enrichment broth ที่บ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมงมาใช้สกัดดีเอ็นเอโดยต้ม ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 53 ตัวอย่าง แสดงผลบวกต่อปฏิกิริยา PCR เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ในตัวอย่างเพื่อบ่งบอกการเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค พบว่ามี 1 ตัวอย่างที่มียีน *tdh* ซึ่งเก็บตัวอย่างปลาจากตลาดสดขายปลา Kankanady ส่วนยีน *trh* พบใน 3 ตัวอย่างที่แยกจากหอย การที่ผลการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีจุลชีววิทยาทางอาหารนั้นให้ผลการทดสอบน้อยกว่าเนื่องจากเชื้อที่แยกได้นั้นมีลักษณะของปฏิกิริยาชีวเคมีที่แตกต่างกัน กล่าวคือ การใช้น้ำตาลอาราบิโนส (arabinose) เซลโอไบโอส (cellobiose) และ ซาลิซิน (salicin) ที่แปรผันไปจากเชื้อปกติ ดังนั้นการบ่งชี้อาจผิดพลาดได้และการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยง TCBS โคโลนีสีเขียวที่คาดว่าเป็นเชื้อเป้าหมายมักจะถูกปกคลุมด้วยเชื้อสีเหลืองที่พบเป็นจำนวนมาก

Parvathi *et al.* (2004) ใช้เทคนิค nested PCR ตรวจสอบ *V. vulnificus* ในหอยนางรมที่เก็บจากบริเวณปากแม่น้ำชายฝั่งทะเลด้านตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอินเดีย โดยศึกษาเปรียบเทียบผลที่ได้กับการตรวจด้วยวิธีการเพาะและแยกเชื้อและการใช้ดีเอ็นเอโพรบ โดยยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจสอบคือ *vvhA* ผลการศึกษาพบว่าการตรวจโดยใช้ nested PCR หลังจากผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง สามารถตรวจพบเชื้อได้ 83-87 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจแบบดั้งเดิมและการใช้เทคนิคดีเอ็นเอโพรบซึ่งตรวจพบเชื้อเพียง 53-60 เปอร์เซ็นต์

Panicker *et al.* (2004) ตรวจสอบ *Vibrio* spp. ในตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ โดยเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ ซึ่งมียีน *viuB* (pathogenic strains) และ *vvh* เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจ *V. vulnificus* ส่วนยีน *trh, tlh, tdh* และ orf8 เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจ *V. parahaemolyticus* และยีน *ompU, toxR, tcpI* และ *hlyA* เป็นยีนเป็นหมายในการตรวจ *V. cholerae* วิธีการสกัดดีเอ็นเอนั้นผู้วิจัยได้ใช้ Alkaline lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ proteinase K (100 ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ cetyltrimethylammonium bromide เพื่อใช้กำจัดพอลิแซคคาไรด์ จากนั้นเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 volume นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่จากนั้นเติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:24:1) ปริมาตร 1 volume ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล จากการศึกษาผู้วิจัยพบว่าดีเอ็นเอของ *Vibrio* spp. ที่สกัดได้จากหอยนางรมมีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อบริสุทธิ์ถึง 10 เท่า กล่าวคือในการตรวจสอบ *Vibrio* spp. ในหอยนางรมต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 10 พิโคกรัม แต่สำหรับในเชื้อบริสุทธิ์ใช้ดีเอ็นเอปริมาณเพียง 1 พิโคกรัม ก็สามารถตรวจพบ นอกจากนี้ยังพบว่าขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจสอบ *Vibrio* spp. ที่อยู่ในหอยนางรมโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบ *Vibrio* spp. ที่อยู่ในตัวอย่างหอยนางรมเมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 CFU ต่อกรัม

Panicker, Vickery, and Bej (2004) พัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์สำหรับตรวจสอบ *V.vulnificus* สายพันธุ์ก่อโรคโดยอาศัยยีนเป้าหมาย *vvh* (205 bp) เพื่อใช้บ่งบอกว่าเป็น *V. vulnificus* และยีนเป้าหมายเป็น *viuB* (504 bp) เพื่อบ่งบอกการเป็นสายพันธุ์ก่อโรค กล่าวคือได้มีการทดสอบการมีอยู่ของยีน *viuB* ใน *V.vulnificus* 22 ไอโซเลท ที่แยกจากตัวอย่างทางการแพทย์พบว่าทุกไอโซเลทมียีนนี้อยู่ แต่ในทางกลับกัน *V.vulnificus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม มีเพียง 8 ไอโซเลท จาก 33 ไอโซเลท ที่ตรวจพบยีนนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์มาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนในตัวอย่างหอยนางรม และสามารถบ่งบอกได้ว่าเชื้อที่ปนเปื้อนเป็น

สายพันธุ์ก่อโรคหรือสายพันธุ์สิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยศึกษาความไวของเทคนิค พบว่าเมื่อนำมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์มีความไวเท่ากับ 10 พิโคกรัม ในขณะที่ความไวของเทคนิคในการตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์อยู่ที่ 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาตรวจในตัวอย่างหอยนางรมพบว่าความไวของเทคนิคสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้น 1 CFU ต่อกรัม หลังจากการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 1 คืน ผู้วิจัยได้นำเทคนิคที่พัฒนามาตรวจสอบกับตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บในฤดูร้อนพบว่าตัวอย่างหอยนางรม ให้ผลบวกกับยีน *vvh* 51 เปอร์เซ็นต์ และมีตัวอย่างให้ผลบวกทั้งสองยีนเพียง 15 เปอร์เซ็นต์

Panicker, Myers, and Bej (2004) พัฒนาเทคนิค real time PCR ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* ในหอยทะเลและน้ำทะเลบริเวณอ่าวเม็กซิโก โดยได้คัดเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม และมีความไวมากที่สุดสำหรับเทคนิค real time PCR โดยศึกษาจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน GWP-16 (น้ำทะเลบริเวณอ่าวเม็กซิโก ที่ระดับความเค็ม 16 พีพีที และเติม peptone ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์) วิธีการสกัด ดีเอ็นที่ศึกษาเปรียบเทียบมีทั้งหมด 5 วิธี คือการใช้ Qiaprep (Qiagen, Valencia, Calif.) พบว่ามีความไว 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร วิธีการต้มในน้ำเดือดมีความไว 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนวิธีการใช้ Magnetic beads (Bugs n' Beads, Genpoint, Oslo, Norway) และวิธี Nucletrap DNA purification (Clontech, Palo Alto, Calif.) ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อได้โดยปฏิกิริยา PCR ส่วนวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่มีความไวมากที่สุดคือวิธี Instagene matrix (Bio-Rad) โดยมีความไวเท่ากับ 10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำวิธีการสกัดดีเอ็นเอนี้มาใช้กับตัวอย่างหอยนางรมและน้ำทะเลพบว่าตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* เริ่มต้น 1 CFU ต่อกรัม เทคนิค real time PCR สามารถตรวจสอบได้ หลังผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

Deepanjali *et al.* (2005) สกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* จากหอยนางรมที่ผ่านการเพิ่มปริมาณเซลล์ (enrichment) เป็นเวลา 0, 6 และ 18 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน *toxR, tdh* และ *trh* โดยปฏิกิริยา PCR โดยนำเซลล์แขวนลอยปั่นที่ความเร็วรอบต่ำ ๆ ก่อนคือ 800 x g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเนื้อหอยนางรม จากนั้นเก็บส่วนใสแล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาแขวนลอยในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เก็บดีเอ็นเอในส่วนใสเพื่อใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ต่อไป พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์สามารถเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบโดยวิธีนี้ได้ดีขึ้น

Ottaviani *et al.* (2005) ตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่ที่เก็บจากบริเวณทะเล Adriatic ประเทศอิตาลี โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณยีน *tl, tdh* และ *trh* พบว่าหอยแมลงภู่ที่นำมาตรวจมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* 24.3 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด

โดยตรวจพบว่ามี *V. parahaemolyticus* 1 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และมี 3 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อยีน *trh* เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้เทคนิค PCR และการทดสอบทางชีวเคมี (Kanagawa phenomenon ซึ่งบ่งชี้ความสามารถในการสร้าง TDH และกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งบ่งชี้ความสามารถในการสร้าง TRH) พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่มีบทบาทต่อการก่อโรคของเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* ได้ ดังนั้นหากไม่พบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ใน *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ แต่เอนไซม์โปรติเอสของเชื้ออาจมีความสำคัญต่อการก่อโรคได้ จากการศึกษาวิจัยพบว่า *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธ์ที่แยกได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ CHO และ Vero กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวนี้เป็นอิสระต่อการมีอยู่หรือไม่ก็ตามของยีน *tdh* และ *trh*

Bilung *et al.* (2005) ศึกษาการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างหอยแครงที่เก็บจากบริเวณ Tanjung Karang ในรัฐ Selanggor ประเทศมาเลเซีย จำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* จำนวน 62 ตัวอย่าง ซึ่งในการตรวจสอบการปนเปื้อน ทำโดยใช้อาหารคัดเลือก CHROM™ *Vibrio* agar ร่วมกับเทคนิค PCR โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณยีน *toxR* เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด ส่วนการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคโดยเทคนิค PCR นั้น พบว่าตัวอย่างหอยแครงให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และยีน *trh* จำนวน 2 และ 11 ตัวอย่าง ตามลำดับ

Subedi, Baynette, and Rakshit (2005) พัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ เพื่อตรวจสอบ *V. vulnificus*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งและปู โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* ยีน 16S rRNA ของ *V. harveyi* และยีน *gyrB* ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งการตรวจสอบเชื้อทั้ง 3 ชนิดพร้อมกันใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส เตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Easy DNA kit (Invitrogen) ความไวของเทคนิคเมื่อศึกษากับเชื้อบริสุทธิ์พบว่า ปริมาณเซลล์น้อยสุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 10 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร สำหรับ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* และ $1x10^3$ เซลล์ ต่อมิลลิลิตร สำหรับ *V. vulnificus*

Takahashi *et al.* (2005) พัฒนาเทคนิค real-time PCR ในการตรวจ *V. vulnificus* โดยมียีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย ด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในเชิงปริมาณได้ จากเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นนี้พบว่ามีความไวของการตรวจสอบเชื้อในน้ำทะเลและหอยนางรมสูงมาก กล่าวคือ 10 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณของ *V. vulnificus* ที่ตรวจสอบได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเซลล์ที่ตรวจนับได้จากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ real time PCR ยังสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อได้ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงมีประสิทธิภาพสูง สะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบหรือติดตามเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเล เช่น หอยนางรม เป็นต้น

Wang and Levin (2006) สกัดดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* ที่เติมลงในหอยแครง ซึ่งเพิ่มปริมาณยีน *vvh* โดย real-time PCR ในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกนั้นผู้ทำการทดลองได้ใช้ lysis

solution ชนิดพิเศษ (TZ) ที่มีผลต่อเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ โดยใช้ 2X ของ TZ lysis solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (1X TZ ประกอบด้วย 2.0 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100 และ 2.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร sodium azide) จากนั้นจึงนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำมาวางในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ เพิ่มความบริสุทธิ์ให้ดีเอ็นเอโดยนำไปผ่าน Micropure-ER columns ผลการศึกษาพบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดังกล่าวซึ่งไม่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์สามารถตรวจพบได้ที่ปริมาณเซลล์น้อยที่สุดเท่ากับ 100 CFU ต่อกรัม แต่เมื่อเพิ่มขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ *V. vulnificus* โดยปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 CFU ต่อกรัม ซึ่งผู้วิจัยรายงานว่าดีเอ็นเอที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Micropure-ER columns มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งมีผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ นอกจากนี้ยังกล่าวต่อว่าในการสกัดดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* ที่เติมลงในหอยแครงนั้นความสามารถในการตรวจพบเชื้อได้โดยเทคนิค real time PCR นั้นค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจในเชื้อบริสุทธิ์ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ที่อยู่ในหอยแครง หรือองค์ประกอบต่าง ๆ ของเนื้อหอยแครงมีผลต่อการดำเนินปฏิกิริยา PCR

Maugeri *et al.* (2006) ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* จากตัวอย่างน้ำทะเลและแพลงตอนสัตว์ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียนในช่วงปี 2002-2003 โดยยีนเป้าหมายที่ใช้คือยีน 16S rRNA และยีน hemolysin/ cytolysin เปรียบเทียบกับการตรวจโดยวิธีดั้งเดิมคือการเพาะแยกเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าการตรวจโดยใช้เทคนิค PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อได้ดีกว่าการตรวจโดยวิธีดั้งเดิม เมื่อพิจารณาถึงการโดยเทคนิค PCR ซึ่งมียีนเป้าหมายที่ต่างกันนั้น พบว่าการตรวจโดยใช้ยีน 16S rRNA เป็นเป้าหมายนั้น สามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าการตรวจโดยใช้ยีน cytolysin เป็นยีนเป้าหมาย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนชุดของยีน 16S rRNA ที่มีอยู่ในเซลล์มีมากกว่ายีน cytolysin นั่นเอง นอกจากนี้การตรวจสอบโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 3 เส้นที่มียีนเป้าหมายเป็นยีน 16S rRNA ยังสามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างแต่ละไอโซเลทของ *V. vulnificus* ได้อีกด้วยโดยใช้รูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าว

Kumar *et al.* (2006) ตรวจสอบการปนเปื้อน *V. vulnificus* ในหอยนางรม โดยการเพิ่มปริมาณยีน *gyrB* มีขนาด 285 bp โดยผู้วิจัยได้ทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์กับ *V. vulnificus* 45 ไอโซเลท พบว่าให้ผลบวกกับทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบ และการทดสอบได้เพิ่มปริมาณยีน *vvh* กับเชื้อที่ทดสอบกับยีน *gyrB* พบว่าให้ผลที่ตรงกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ยีน *gyrB* ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* ได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาความไวของเทคนิค PCR เมื่อเติมเซลล์ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีต้มเซลล์ โดยไม่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์ก่อน พบว่ามีความไวของการตรวจสอบเท่ากับ 300 CFU ต่อกรัม แต่เมื่อเพิ่มขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าความไวของการตรวจพบเท่ากับ 30 CFU ต่อกรัม (เป็นปริมาณเซลล์ก่อนการเพิ่มจำนวน) ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบตัวอย่างหอยนางรมที่

เก็บจากบริเวณปากแม่น้ำ Manggalove ประเทศอินเดีย จำนวนทั้งหมด 79 ตัวอย่าง พบว่าปนเปื้อนเชื้อนี้ 59 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาทางอาหารซึ่งพบการปนเปื้อนเพียง 36 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเทคนิค PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อนี้ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างหอยนางรม และการที่ผู้วิจัยเลือกใช้ยีน *gyrB* เป็นยีนเป้าหมายนั้นเนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างท็อกซินสามารถเกิดการผ่าเหล่าได้ง่าย ซึ่งอาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการตรวจสอบได้

Ward and Bej (2006) นำเทคนิค real time PCR แบบ *Taq* Man มาตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณยีน *tl, tdh, trh*, และ *orf8* พบว่าความไวของเทคนิคเมื่อใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เป็นแม่แบบคือ 200 พิโคกรัม (สกัดดีเอ็นเอด้วย alkaline lysis ตามด้วย CTAB-NaCl ตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol-chloroform และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล) ส่วนความไวเมื่อตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์อยู่ที่ 10^4 CFU ต่อมิลลิลิตร (สกัดดีเอ็นด้วย Instagene matrix) และความไวเมื่อตรวจเชื้อในตัวอย่างหอยทะเล พบว่าตรวจได้ในตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้น 1 CFU ต่อกรัม หลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลาข้ามคืน เมื่อนำเทคนิค real time PCR มาตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมด 33 ตัวอย่าง พบการปรากฏของยีน *tl* 17 ตัวอย่าง ยีน *tdh* 4 ตัวอย่าง ในขณะที่ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบยีน *trh* และ *orf8*

Pinto *et al.* (2007) ศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคและไม่ก่อโรคที่ปนเปื้อนในตัวอย่างหอยทะเลที่เก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคใต้ของประเทศอิตาลี โดยวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อโดยวิธีทางจุลชีววิทยาทางอาหารและการใช้เทคนิค PCR การวิเคราะห์เชื้อเริ่มจากนำตัวอย่างหอยทะเล 25 กรัม มาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ APW 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น เพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 7 และ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาขีดแยกเชื้อบนอาหาร TCBS คัดเลือกโคโลนีสีเขียวมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อยืนยันเชื้อ ส่วนการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR นั้นได้นำ enrichment broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยดีเอ็นเอด้วยชุด QIAamp DNA mini Kit แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl, tdh, trh* และ *toxR* จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างหอยทะเลทั้งหมด 144 ตัวอย่าง พบ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาทางอาหาร 12 ตัวอย่าง ส่วนการทดสอบด้วยเทคนิค PCR พบ *V. parahaemolyticus* 23 ตัวอย่าง และพบการมีอยู่ของยีน *tdh* 7 ตัวอย่าง แต่ไม่พบการมีอยู่ของยีน *trh*

Nordstrom *et al.* (2007) พัฒนาเทคนิค real time PCR แบบมัลติเพล็กซ์สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยนางรม โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณยีน *tl, tdh* และ *trh* โดยในปฏิกิริยา PCR ได้เติม internal amplification control (IAC) เข้าร่วมในปฏิกิริยาเพื่อเป็นการประกันผลการทดลองว่ามีความสมบูรณ์ และขจัดการรายงานผลลบปลอม (ซึ่งจากรายงานมีผลลบปลอม 7 หลอด MPN จาก 306 หลอด MPN) ผลการสำรวจการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus*

ในหอยนางรมที่เก็บจาก Prince William Sound และพื้นที่ชายฝั่งของ Alaska ในเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ค.ศ. 2004 จำนวน 27 ตัวอย่าง โดยได้ตรวจสอบเชื้อตามวิธีของ FDA Bacteriological Analytical Manual (ตรวจโดยทำ MPN ระบบ 3 หลอด โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ APW และตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tl, tdh* และ *trh* ด้วยวิธี alkaline phosphatase gene probe hybridization) เปรียบเทียบกับวิธี real time PCR แบบมัลติเพล็กซ์ โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดจากหลอด MPN (นำ 1 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ APW ที่มีการเจริญของเชื้อมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที เพื่อสกัดดีเอ็นเอ) ก่อนการทำปฏิกิริยา PCR พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 27 ตัวอย่าง การตรวจสอบเชื้อตามวิธีของ FDA Bacteriological Analytical Manual พบยีน *tl* 9 ตัวอย่าง *tdh* 5 ตัวอย่าง และ *trh* 7 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี real time PCR แบบมัลติเพล็กซ์พบยีน *tl* จำนวน 12 ตัวอย่าง พบยีน *tdh* จำนวน 12 ตัวอย่าง และพบยีน *trh* จำนวน 14 ตัวอย่าง

Lee *et al.* (2008) ตรวจสอบเชื้อ *Vibrio* spp. และ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมดิบที่เก็บจากตลาดสดขายปลีกในกรุงโซล ประเทศเกาหลี ในช่วงเดือนเมษายนถึงธันวาคม ค.ศ. 2005 โดยมีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง 1-4 log MPN ต่อกรัม ในขณะที่การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* อยู่ในช่วง 1-3 log MPN และพบว่าปริมาณของเชื้อมีสูงมากในฤดูร้อนตอนปลายถึงต้นฤดูใบไม้ร่วง และลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในเดือนธันวาคม

Wu *et al.* (2008) พัฒนาเทคนิค real time PCR แบบ *Taq* Man ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยอาศัยยีน *vvhA* เป็นเป้าหมายโดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นมีขนาด 100 bp ผู้วิจัยสร้าง recombinant plasmid pMD19-*vvhA*100 เพื่อเติมลงในปฏิกิริยา PCR สำหรับใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก คู่ไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาสำหรับการศึกษานี้นำมาทดสอบความจำเพาะกับเชื้อ *V. vulnificus* *Vibrio* spp. และเชื้อนอกกลุ่มวิบริโอ (non-*Vibrio* spp.) พบว่าปฏิกิริยา PCR ให้ผลบวกกับเชื้อ *V. vulnificus* เท่านั้น ความไวของเทคนิคเมื่อตรวจสอบกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดด้วย DNA mini kit (Takara.Bio, Japan) มีความไวเท่ากับ 0.01 นาโนกรัม ผู้วิจัยนำเทคนิค real time PCR มาใช้ตรวจ *V. vulnificus* ในตัวอย่างทางการแพทย์ คือตัวอย่างเลือดหนูและชิ้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ *V. vulnificus* พบว่าทุกตัวอย่างที่ตรวจให้ผลบวกต่อปฏิกิริยา ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการนำเทคนิค real time PCR แบบ *Taq* Man ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างทางการแพทย์ที่เกิดการติดเชื้อนี้ทั้งในกระแสโลหิตและบาดแผลโดยไม่ต้องทำการแยกเชื้อก่อน

Gordon *et al.* (2008) นำเทคนิค real time PCR มาพัฒนาเพื่อตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยอาศัยยีนเป้าหมายจากบริเวณที่ต่างกันของยีน 16S rRNA โดยปฏิกิริยา PCR สามารถเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวได้ โดยมีรูปแบบของผลิตภัณฑ์ PCR 2 แบบ คือ 16S rDNA type A (ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 245 bp) และ 16S rDNA type B (ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 841 bp) ซึ่งรูปแบบดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับแหล่งของเชื้อ กล่าวคือคือเชื้อส่วนใหญ่จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและจากตัวอย่างทางการแพทย์มีรูปแบบของยีนนี้เป็น type A และ type B ตามลำดับ โดย *V. vulnificus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมพบว่า

94 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธุ์ที่ตรวจสอบเป็น 16S rDNA type A แต่ *V. vulnificus* ที่แยกตัวอย่างการแพทย์พบว่า 76 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ที่ตรวจสอบเป็น 16S rDNA type B จากข้อมูลเบื้องต้นนี้ผู้วิจัยได้นำเทคนิค real time PCR แบบ SYBR green เพื่อใช้ในการตรวจและบ่งชี้ความแตกต่างของ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรม โดยมีการจำลองการปนเปื้อนเชื้อในตัวอย่างหอยนางรมแล้วเพิ่มปริมาณเชื้อใน APW เป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ enrichment broth มาเจือจางลง 10 เท่าด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ต่อจากนั้นต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปั่นเหวี่ยง 16000 x g นำส่วนใสที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR พบว่าถ้าเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบเชื้อโดยปฏิกิริยา PCR ได้ อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบเชื้อในตัวอย่างได้เมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา แสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
V. parahaemolyticus vp1	ผศ.ดร. สุวรรณา ภาณุตระกูล ภาควิชาวาริชศาสตร์
V. parahaemolyticus vp2	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
V. parahaemolyticus 13 ไอโซเลท	แยกจากอาหารทะเลและน้ำทะเล (ในการศึกษานี้)
V. parahaemolyticus DMST15285	
V. alginolyticus DMST 14800	ผศ.ดร. ปภาศิริ บาร์เนท
V. cholerae Ogawa AFRIM	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
V. harveyi KTCT 2717	มหาวิทยาลัยบูรพา
V. vulnificus DMST 5852	
V. vulnificus DMST 19346	
V. vulnificus DMST 21245	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
V. vulnificus DMST 22441	
V. vulnificus DMST 22033	
Bacillus subtilis	
Escherichia coli	
Listeria monocytogenes	
Pseudomonas aerugenosa	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
Salmonella Weltevreden	มหาวิทยาลัยบูรพา
Shigella boydii	
Serratia marcescense	
Staphylococcus aureus	

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

    2.1 Alkaline peptone water (APW)

    2.2 Tryptic soy agar (TSA)

    2.3 Thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS)

3. สารเคมีและบัฟเฟอร์ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)

    3.1 Agarose

    3.2 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB)

    3.3 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ที่เตรียมด้วย TE buffer (1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE)

    3.4 Chloroform : Isoamylalcohol (24 :1)

    3.5 Ethidium bromide stock solution (5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร)

    3.6 Gel-loading buffer

    3.7 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol

    3.8 Isopropanol

    3.9 Phenol (equilibrated)

    3.10 Phosphate buffer saline (PBS)

    3.11 SDS-Proteinase K lysis solution

    3.12 Tris/ EDTA (TE) buffer

    3.13 Tris-acetate-electrophoresis (TAE) buffer

    3.14 TritonX-100 (0.5-2 เปอร์เซ็นต์)

4. Standard molecular weight marker (100 bp sharp DNA Marker Vivantis)

5. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase recombinant (Vivantis)

6. ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAzol® reagent

7. ไพร์เมอร์

    7.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tl* และ *tdh* แสดงดังตารางที่ 3-2

    7.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ศึกษาเชื้อ *V. vulnificus* ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *vvhA*, *vvh*, และ *toxR* แสดงดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* (ยีน *tl* และ *tdh*) และ *V. vulnificus* (ยีน *vvh*, *vvhA*, และ *toxR*)

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	Tm * (°C)	Target genes	Amplicon size (bp)	Reference
L-tl1	5'-AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG-3'	70	*tl*	450	Bej, *et al.*,
R-tl2	5'-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC-3'	68			1999
L-tdh	5'-GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC-3'	66	*tdh*	269	Bej, *et al.*,
R-tdh	5'-TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC-3'	68			1999
vvh-F	5'-TTC CAA CTT CAA ACC GAA CTA TGA -3'	66	*vvh*	205	Panicker,
vvh-R	5'ATT CCA GTC GAT GCG AAT ACG TTG- -3'	70			*et al.*, 2004
vvhA-F	5'-CCG CGG TAC AGG TTG GCG CA-3'	68	*vvhA*	519	Lee et al.,
vvhA-R	5'-CGC CAC CCA CTT TCG GGC-3'	62			1999
toxR-F	5'-TGT TCG GTT GAG CGC ATT AA -3'	58	*toxR*	70	Takahashi
toxR-R	5'-GCT TCA GAA GCT GCG TCA TTC -3'	64			*et al.*, 2005

*Tm คำนวนมาจากสูตร Tm=2(A+T)+4(C+G)

7. อุปกรณ์และเครื่องมือ

7.1 Gel chamber (BIO-RAD, WIDE MINI SUB™ CELL)

7.2 Power supply (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENT, PS500XT)

7.3 Waterbath (SHELLAB, Model 1265)

7.4 UV transilluminator (SPECTROLINE®, Model TVC-312A)

7.5 Spectrophotometer (THERMO, Hexios δ)

7.6 Refrigerated high speed centrifuge (Sorvall®, RC 26plus)

7.7 DNA thermal cycler (Biometra®, TGradient)

วิธีการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์

1.1 นำ *Vibrio* spp. จาก stock culture มาขีดแยกเชื้อบน TSA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ส่วนเชื้อแบคทีเรียสกุลอื่น ๆ จาก stock culture มาขีดแยกเชื้อบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจาก *Vibrio* spp. (Bej *et al.*, 1999)

1.2.1 นำเชื้อ *Vibrio* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ใช้ลูบขูดเซลล์ที่ผิวอาหารนำมาแขวนลอยใน 1X TE buffer 500 ไมโครลิตร

1.2.2 นำเซลล์แขวนลอยมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแช่ในน้ำแข็งทันที

1.2.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่แยกได้ ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา

1.3 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียอื่น ๆ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAzol® reagent

1.3.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ใช้ลูบขูดเซลล์ที่ผิวอาหารนำมาแขวนลอยในน้ำกลั่นจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1-2 ครั้ง

1.3.2 เติม DNAzol ® reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ต่อปริมาณเซลล์ 1-3 x 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร) แล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลง

1.3.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่

1.3.4 ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม Absolute เอธานอล (ใช้ 0.5 มิลลิลิตรต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของ DNAzol ® reagent ที่ใช้ในข้อ 1.3.2) ผสมกันโดยการกลับหลอดไปมา (ในระหว่างนี้จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่นเกิดขึ้น) ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 1-3 นาที

1.3.5 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.3.6 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล (0.8 -1.0 มิลลิลิตร ต่อปฏิกิริยา) ผสมโดยการกลับหลอดไปมา

1.3.7 ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก 70 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล หลังจากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้

1.3.8 ละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา

2. การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์

2.1 ทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่มียีนเป้าหมายเป็นยีน *tl*, *tdh*, *vvhA* และ *toxR* โดยใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ (จากข้อ 1) เป็นแม่แบบ โดยแยกการทดสอบครั้งละ 1 ยีน

2.2 ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอ

2.3 ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ (ตารางที่ 3-3) ลงในหลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3-3 องค์ประกอบปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	32.0	-
10X PCR buffer	5.0	1 เท่า
50 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 มิลลิโมลาร์
10 mM dNTP mix	1.0	0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด)
Forward primer (10 µM)	2.5	0.5 ไมโครโมลาร์
Resverse primer (10 µM)	2.5	
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0	ประมาณ 10-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	50.0	-

2.4 นำ reaction mixture ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3 ไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ซึ่งปฏิกิริยา PCR ทำเป็นจำนวนทั้งหมด 35 รอบ โดยแต่ละรอบมีสภาวะดังตารางที่ 3-4

2.5 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำสารละลายจากหลอดปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส (วิธีแสดงในภาคผนวก ค) เพื่อดูแถบที่ปรากฏบนเจลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

ตารางที่ 3-4 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	35
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Final extension	72	10 นาที	1

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และ ยีน *vvhA* และ *toxR* ของ *V. vulnificus* โดยการใช้ปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ได้ศึกษา 2 ปัจจัย คือความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน annealing

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการดำเนินปฏิกิริยา PCR

3.1.1 ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ขององค์ประกอบ PCR โดยมีรายละเอียดขององค์ประกอบปฏิกิริยา PCR แสดงดังตารางที่ 3-5 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ในหลอดปฏิกิริยา PCR ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และใช้ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* DMST15285 หรือ *V. vulnificus* DMST 19346 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3.1.2 กำหนดให้ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอ

3.1.3 นำ reaction mixture ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 ไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ซึ่งปฏิกิริยา PCR จะทำเป็นจำนวนทั้งหมด 35 รอบ โดยแต่ละรอบมีสภาวะดังตารางที่ 3-6

3.1.4 นำหลอดปฏิกิริยาเข้าเครื่อง DNA thermal cycler เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำสารละลาย จากหลอดปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบความเข้มของแถบที่ปรากฏบนเจลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

ตารางที่ 3-5 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	27	-
10X PCR buffer	5.0	1 เท่า
50 mM $MgCl_2$	1.0-4.0	1.5 มิลลิโมลาร์
10 mM dNTP mix	1.0	0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด)
ไพร์เมอร์ (*V. parahaemolyticus*)		
10 µM *L-tl*	2.5	
10 µM *R-tl*	2.5	
10 µM *L-tdh*	2.5	
10 µM *R-tdh*	2.5	
หรือ		0.5 ไมโครโมลาร์ (แต่ละชนิด)
ไพร์เมอร์ (*V. vulnificus*)		
10 µM *vvhA-F*	2.5	
10 µM *vvhA-R*	2.5	
10 µM *toxR-F*	2.5	
10 µM *toxR-R*	2.5	
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0	-
Taq polymerase	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	50.0	-

ตารางที่ 3-6 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการศึกษาความเข้มข้นของ $MgCl_2$

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	35
Annealing	63	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Final extension	72	10 นาที	1

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน annealing

3.2.1 เตรียมหลอดปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* DMST15285 หรือ *V. vulnificus* DMST 19346 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3.2.2 กำหนดชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอ

3.2.3 เติมส่วนผสมต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3-5 (โดยใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เท่ากับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.1) แล้วนำหลอดใส่ในเครื่อง DNA thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องให้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เป็นเกรเดียนซ์ตั้งแต่ 50 - 70 องศาเซลเซียส

3.2.4 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำสารละลายจากหลอดปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบความเข้มของแถบที่ปรากฏบนเจลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

4. การศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. vulnificus* จากเชื้อบริสุทธิ์

4.1 นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 จาก stock culture มาขีดแยกเชื้อบน TSA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16- 18 ชั่วโมง นำลูบขูดเซลล์ที่ผิวอาหารนำมาแขวนลอยในหลอดทดลองที่มี 10 มิลลิลิตร 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์

4.2 นำเซลล์แขวนลอยมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ 0.2 ซึ่งเทียบได้กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

4.3 เจือจางเซลล์ 10 เท่าตามลำดับ ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่มี 1X TE buffer 0.9 มิลลิลิตร จนกระทั่งมีปริมาณเซลล์น้อยกว่า 1 เซลล์ ซึ่งการหาปริมาณเซลล์ในแต่ละระดับการเจือจางใช้วิธี drop plate (โดยทำเป็น 2 ชุดการเจือจาง) ดังนี้

4.3.1 เจือจางเซลล์ในแต่ละระดับการเจือจางใน 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม

4.3.2 นำเซลล์แขวนลอยจากแต่ละการเจือจางปริมาตร 25 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จำนวน 5 หยด โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.3.3 นับโคโลนีที่ปรากฏในจานเพาะเชื้อในหยดที่มีโคโลนีในช่วง 5-50 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณเป็นปริมาณเซลล์ในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร

4.4 นำเซลล์จากแต่ละระดับการเจือจางมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง และแขวนลอยตะกอนเซลล์ใน 1X TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4.5 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 1.2 และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ยีน *vvhA* และ *toxR* ของ *V. vulnificus* โดยดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาได้จากข้อ 3

5. การศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 จากเชื้อบริสุทธิ์

5.1 นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 จาก stock culture มาขีดแยกเชื้อบน TSA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำลูบขูดเซลล์ที่ผิวอาหารนำมาแขวนลอยในหลอดทดลองที่มี 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.2 นำเซลล์แขวนลอยมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ 0.2 ซึ่งเทียบได้กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

5.3 ผสมเซลล์ *V. vulnificus* DMST 19346 และ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.2 เชื้อละ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง แล้วแขวนลอยเซลล์ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5.4 เจือจางเซลล์ 10 เท่าตามลำดับ ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ที่มี 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จนกระทั่งมีปริมาณเซลล์น้อยกว่า 1 เซลล์ ซึ่งการหาปริมาณเซลล์ในแต่ละระดับการเจือจางใช้วิธี drop plate (โดยทำเป็น 2 ชุดการเจือจาง) ดังนี้

5.4.1 เจือจางเซลล์ในแต่ละระดับการเจือจางใน 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม

5.4.2 นำเซลล์แขวนลอยจากแต่ละการเจือจางปริมาตร 25 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCPC agar จำนวน 5 หยด โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

5.4.3 นับโคโลนีที่ปรากฏในจานเพาะเชื้อในหยดที่มีโคโลนีในช่วง 5-50 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณเป็นปริมาณเซลล์ในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร

5.5 นำเซลล์จากแต่ละระดับการเจือจางมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที

ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง และแขวนลอยตะกอนเซลล์ใน 1X TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

5.6 สกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และ ยีน *vvhA* และ *toxR* ของ *V. vulnificus* โดยดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาได้จากข้อ 3

6. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียและตัวอย่างหอยนางรมเพื่อใช้จำลองการปนเปื้อนเชื้อในหอยนางรม

6.1 การเตรียมเซลล์ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

6.1.1 ขีดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ลงบนอาหาร TSA ที่เติมเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

6.1.2 ใช้ลูบขูดเชื้อที่เจริญบนอาหาร TSA นำมาแขวนลอยในสารละลาย PBS ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเซลล์ที่แขวนลอย เท่ากับค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

6.2 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรม

การเตรียมตัวอย่างหอยนางรม นำหอยนางรมมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดประมาณ 2-3 ครั้ง แช่หอยนางรมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 30 นาที และแช่หอยนางรมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง เสร็จแล้วนำหอยนางรมที่ล้างทำความสะอาดแล้วปริมาณ 25 กรัม มาตัดเป็นชิ้น ๆ เพื่อใช้ในการทดลอง

7. ศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากหอยนางรมเพื่อใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR

7.1 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรมก่อนการสกัดดีเอ็นเอ

7.1.1 นำตัวอย่างหอยนางรมที่ได้จากข้อ 6.2 มาเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยให้มีปริมาณเซลล์ในตัวอย่างเท่ากับ 10^6 CFU ต่อกรัม เติม APW ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง (ความเข้มข้นตัวอย่างเจือจางลง 10 เท่า)

7.1.2 เก็บตัวอย่างหอยนางรมที่เตรียมเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยง 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แขวนลอยเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นดูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จำนวน 50 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งได้เซลล์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

7.2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแบ่งออกได้เป็น 3 ลักษณะคือ

7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอแบบหยาบ (crude extraction) โดยการต้ม (boiling) เซลล์ใน lysis solution ชนิดต่าง ๆ

(1) นำเซลล์มาจากข้อ 7.1.2 แขวนลอยในน้ำกลั่น, Triton X-100 (0.5-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB (1-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB-TE (1-2 เปอร์เซ็นต์) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ชนิดละ 2 หลอด

(2) นำเซลล์แขวนลอยทั้งหมดมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่เย็นเป็นเวลา 20 นาที

(3) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ (crude DNA) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7.2.2 วิธีการสกัดด้วยแบบหยาบและเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการตกตะกอน

7.2.2.1 การต้มใน lysis solution ชนิดต่าง ๆ ตามด้วยการตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล

(1) นำเซลล์มาจากข้อ 7.1.2 แขวนลอยในน้ำกลั่น, Triton X-100 (0.5-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB (1-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB-TE (1-2 เปอร์เซ็นต์) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ชนิดละ 2 หลอด

(2) นำเซลล์แขวนลอยทั้งหมดมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่เย็นเป็นเวลา 20 นาที

(3) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ (ปริมาตรประมาณ 300 ไมโครลิตร)

(4) เติมไอโซโพรพานอลในปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่เก็บมา (600 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา (inversion)

(5) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

(6) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอทธานอลทิ้ง

(7) ทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(8) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ไมโครลิตร

(9) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7.2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ตามด้วยการตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล

(1) แขวนลอยเซลล์ที่เตรียมได้ (ข้อ 7.1.2) ด้วย SDS-Proteinase K lysis solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร

(2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(3) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

(4) ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ไอโซโพรพานอล ตามวิธีที่กล่าวแล้วข้อ 7.2.2.1

(5) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ไมโครลิตร

(6) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7.2.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์

7.2.3.1 การต้มเซลล์ใน lysis solution ชนิดต่าง ๆ ทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ตามด้วยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล

(1) นำเซลล์มาจากข้อ 7.1.2 แขวนลอยในน้ำกลั่น, Triton X-100 (0.5-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB (1-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB-TE (1-2 เปอร์เซ็นต์) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ชนิดละ 2 หลอด

(2) นำเซลล์แขวนลอยทั้งหมดมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่เย็นเป็นเวลา 20 นาที

(3) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ (ปริมาตรประมาณ 350 ไมโครลิตร)

(4) เติม Phenol ในปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่เก็บมา (ประมาณ 350 ไมโครลิตร) และ Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตร 1

เท่าของส่วนใสที่เก็บมา (ประมาณ 350 ไมโครลิตร) แล้วเขย่าอย่างแรง เป็นเวลา 10 วินาที

(5) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ (ปริมาตรประมาณ 300 ไมโครลิตร)

(6) เติมไอโซโพรพานอล ในปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่เก็บมา (600 ไมโครลิตร) เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมกันโดยการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-3 นาที

(7) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

(8) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอทธานอล ทิ้ง

(9) ทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(10) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ไมโครลิตร

(11) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7.2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ตามด้วยขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล

(1) แขวนลอยเซลล์ที่เตรียมได้ (ข้อ 7.1.2) ด้วย SDS-Proteinase K lysis solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร

(2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(3) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

(4) สกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 7.2.3.1

(5) ตกตะกอนดีเอ็นเอตามวิธีที่กล่าวในข้อ 7.2.3.1

(6) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ไมโครลิตร

(7) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8. การทดสอบหาความไวของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม

8.1 นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จาก stock culture มาขีดแยกเชื้อบน TSA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

8.2 นำลูบขูดเซลล์ที่ผิวอาหาร นำมาแขวนลอยในหลอดทดลองบรรจุ PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรวัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยจะมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (ตรวจวัดโดยวิธี drop plate และ MPN)

8.3 เจือจางเซลล์ครั้งละ 10 เท่าตามลำดับ ในฟลาก์สที่มี PBS 90 มิลลิลิตรโดยเจือจางเซลล์ลงให้มีจำนวนตั้งแต่ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ถึง น้อยกว่า 1 CFU ต่อมิลลิลิตร (ตรวจวัดโดยวิธี drop plate และ MPN)

8.4 ดูดเซลล์ที่แขวนลอยจากข้อ 8.3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ฟลาก์สที่มี Alkaline peptone water (APW) 200 มิลลิลิตร

8.5 เติมเซลล์แขวนลอยในอาหาร APW (ปริมาตร 225 มิลลิลิตร) ลงในหอยนางรม (ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ) 25 กรัม ผสมให้เข้ากัน ปริมาณเชื้อเจือจางลง 10 เท่า (ตรวจวัดปริมาณเซลล์อีกครั้งโดยวิธี MPN)

8.6 เก็บตัวอย่างหอยนางรมที่เตรียมเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด

8.7 ปั่นเหวี่ยง 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์เทส่วนใสทิ้ง

8.8 แขวนลอยเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อล้างเซลล์

8.9 ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จะได้เซลล์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

8.10 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 7

8. 11 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ ลงในหลอดสำหรับทำ PCR ดังข้อ 11

9. การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อจากตัวอย่างก่อนการทำปฏิกิริยา PCR

9.1 นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จาก stock culture มาขีดแยกเชื้อบน TSA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

9.2 นำลูบขูดเซลล์ที่ผิวอาหาร นำมาแขวนลอยในหลอดทดลองบรรจุ PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรวัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยจะมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (ตรวจวัดโดยวิธี drop plate และ MPN)

9.3 เจือจางเซลล์ครั้งละ 10 เท่าตามลำดับ ในฟลาก์สที่มี PBS 90 มิลลิลิตร โดยเจือจางเซลล์ลงให้มีจำนวน 1 CFU ต่อมิลลิลิตร

9.4 ดูดเซลล์ที่แขวนลอยจากข้อ 9.3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ฟลาก์สที่มี Alkaline peptone water (APW) 200 มิลลิลิตร เติมเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้ (ปริมาตร 225 มิลลิลิตร) ลงในหอยนางรม (ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ) 25 กรัม ผสมให้เข้ากัน ปริมาณเชื้อเจือจางลง 10 เท่า (ตรวจวัดปริมาณเซลล์อีกครั้ง โดยวิธี MPN)

9.5 นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 9.4 มาบ่มเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ

9.6 เมื่อครบเวลา เก็บตัวอย่างหอยนางรมที่เตรียมเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด

9.7 ปั่นเหวี่ยง 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์เทส่วนใสทิ้ง

9.8 แขวนลอยเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อล้างเซลล์ ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จะได้เซลล์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

9.9 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่เหมาะสมจากข้อ 7 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ ลงในหลอดสำหรับทำ PCR ดังข้อ 11

10. การตรวจสอบความใช้ได้ (Validation) ของวิธี PCR แบบมัลติเพล็กซ์สำหรับการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงจากหอยนางรม

10.1 นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จาก stock culture มาขีดแยกเชื้อบน TSA ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

10.2 นำลูบขูดเซลล์ที่ผิวอาหาร นำมาแขวนลอยในหลอดทดลองบรรจุ PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรวัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (ตรวจวัดโดยวิธี drop plate และ MPN)

10.3 เจือจางเซลล์ครั้งละ 10 เท่าตามลำดับ ในหลอดที่มี PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตรเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ใส่ลงในตัวอย่างอาหาร คือ เจือจางเซลล์ลงให้มีจำนวนในช่วง 1-10 CFU ต่อมิลลิลิตร (low level) และ 100-1000 CFU ต่อมิลลิลิตร (high level) (ตรวจวัดโดย วิธี drop plate)

10.4 การเตรียมตัวอย่าง กำหนดให้ใช้ตัวอย่างหอยนางรม 60 ตัวอย่างทำ Validation เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม โดยวิธีการทำปฏิกิริยา PCR กับการตรวจสอบโดยวิธีมาตรฐาน ใส่เชื้อลงในตัวอย่างหอยนางรมเป็น 3 ระดับความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นละ 20 ตัวอย่าง คือ (1) ไม่ใส่เชื้อ (control

unspiked) (2) ระดับความเข้มข้นต่ำ (low level) 1-10 CFU ต่อกรัม และ (3) ระดับความเข้มข้นสูง (high level) 100-1000 CFU ต่อกรัม โดยใส่เชื้อระดับละ 25 มิลลิลิตร ลงในหอยนางรม (ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ) ปริมาณ 25 กรัม

10.5 นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ ตามวิธีการวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยวิธีการทำปฏิกิริยา PCR (Alternative method) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (standard method)

10.6 การคำนวณ โดยใช้ Paired results of the reference and alternative method เมื่อได้ผลการวิเคราะห์แล้วให้นับจำนวนผลที่เป็น Negative deviation, Positive deviation, Positive agreement, Negative agreement

Responses	**Reference method positive**	**Reference method negative**
Alternative method positive	+/+ positive agreement (PA)	-/+ positive deviation (PD)
Alternative method negative	+/- negative deviation (ND)	-/- negative agreement (NA)

โดยการรายงานผลการทำ Validation ใช้เปอร์เซ็นต์ของค่า Relative Accuracy, Relative Specificity, Relative Sensitivity โดยค่าที่ได้ควรจะมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ วิธีทดสอบโดยวิธีการทำปฏิกิริยา PCR จึงจะสามารถนำมาใช้งานได้

Relative accuracy หมายถึง ระดับความตรงกันระหว่างผลที่ได้จากวิธีมาตรฐานและวิธีการทำปฏิกิริยา PCR ในตัวอย่างที่เหมือนกัน

Relative specificity (ความจำเพาะของการทดสอบ) หมายถึง ความสามารถของวิธีการทดสอบในการตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง

Relative sensitivity (ความไวของการทดสอบ) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบในการตรวจตัวอย่างที่มีเชื้อเป้าหมายปนเปื้อนได้อย่างถูกต้อง

สูตรการคำนวณ

$$\text{Relative accuracy (AC)} = \frac{(PA+NA)\ x100\%}{PA+NA+PD+ND}$$

$$\text{Relative specificity (SP)} = \frac{NA\ x\ 100\%}{NA+PD}$$

$$\text{Relative sensitivity (SE)} = \frac{PA\ x\ 100\%}{PA+ND}$$

11. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

11.1 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ ลงในหลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3-7, 3-8, และ 3-9

ตารางที่ 3-7 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *tl* และ *tdh*

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	26.0	-
10X PCR buffer	5.0	1 เท่า
50 mM $MgCl_2$	2.5	1.5 มิลลิโมลาร์
10 mM dNTP mix	1.0	0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด)
ไพร์เมอร์		
10 µM *L-tl*	2.5	
10 µM *R-tl*	2.5	0.5 ไมโครโมลาร์
10 µM *L-tdh*	2.5	
10 µM *R-tdh*	2.5	
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0	-
Taq DNA polymerase*	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	50.0	-

*เติมเอนไซม์หลังขั้นตอน initial denaturation

ตารางที่ 3-8 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *vvh*

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	31.0	-
10X PCR buffer	5.0	1 เท่า
50 mM $MgCl_2$	2.5	1.5 มิลลิโมลาร์
10 mM dNTP mix	1.0	0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด)
ไพร์เมอร์		
10 µM *F-vvh*	2.5	0.5 ไมโครโมลาร์
10 µM *R-vvh*	2.5	
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0	-
Taq DNA polymerase*	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	50.0	-

*เติมเอนไซม์หลังขั้นตอน initial denaturation

ตารางที่ 3-9 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *tl, tdh,* และ *vvh*

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	21.0	-
10X PCR buffer	5.0	1 เท่า
50 mM $MgCl_2$	2.5	1.5 มิลลิโมลาร์
10 mM dNTP mix	1.0	0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด)
ไพร์เมอร์		
10 µM *L-tl*	2.5	
10 µM *R-tl*	2.5	
10 µM *L-tdh*	2.5	0.5 ไมโครโมลาร์
10 µM *R-tdh*	2.5	
10 µM *F-vvh*	2.5	
10 µM *R-vvh*	2.5	
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0	-
Taq DNA polymerase*	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	50.0	-

11.2 นำหลอดปฏิกิริยาที่เตรียมได้ไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ซึ่งปฏิกิริยา PCR ทำเป็นจำนวนทั้งหมด 35 รอบ โดยแต่ละรอบมีสภาวะ ดังตารางที่ 3-10

ตารางที่ 3-10 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการศึกษา

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	15 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	35
Annealing	63	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extention	72	7 นาที	1

11.3 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำสารละลายจากหลอดปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีส (วิธีแสดงในภาคผนวก ค) เพื่อดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ความจำเพาะของไพร์เมอร์ต่อยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และ ยีน *vvh*, *vvhA*, *toxR* ของ *V. vulnificus*

แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษาความจำเพาะของไพร์เมอร์ประกอบด้วยแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ ทั้งในกลุ่มของแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีทั้งสกุล *Vibrio* และสกุลอื่น ๆ จากการศึกษาความจำเพาะของไพร์เมอร์ต่อการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* พบว่าไพร์เมอร์ทั้งสองคู่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* เท่านั้น โดยไพร์เมอร์สำหรับยีน *tl* แสดงผลของปฏิกิริยา PCR เป็นบวกกับ *V. parahaemolyticus* ทุกไอโซเลทที่นำมาศึกษา ส่วนไพร์เมอร์สำหรับยีน *tdh* มีความจำเพาะกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคเท่านั้น (*V. parahaemolyticus* DMST 15285) การทดสอบไพร์เมอร์กับแบคทีเรียอื่น ๆ พบว่าให้ผลปฏิกิริยา PCR เป็นลบ สำหรับไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *vvh*, *vvhA* และ *toxR* พบว่ามีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* เท่านั้น (ในกรณีของเชื้อนี้ ในเบื้องต้นได้เลือกคู่ไพร์เมอร์สำหรับยีน *vvhA* และ *toxR* มาศึกษาต่อไป) ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tl*, *tdh*, *vvhA*, *vvh*, และ *toxR*

แบคทีเรีย	ผลของปฏิกิริยาPCR				
	tl	*tdh*	*vvh*	*vvhA*	*toxR*
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-
Escherichia coli	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	-	-	-	-	-
Pseudomonas aerugenosa	-	-	-	-	-
Salmonella Weltevreden	-	-	-	-	-
Shigella boydii	-	-	-	-	-
Serratia marcescense	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-
Vibrio aginolyticus DMST 14800	-	-	-	-	-
V. cholerae Ogawa AFRIM	-	-	-	-	-
V. harveyi KTCT 2717	-	-	-	-	-
V. vulnificus DMST 5852	-	-	+	-	+

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ผลของปฏิกิริยาPCR				
	tl	*tdh*	*vvh*	*vvhA*	*toxR*
V. vulnificus DMST 19346	-	-	+	-	+
V. vulnificus DMST 21245	-	-	+	-	+
V. vulnificus DMST 22441	-	-	+	-	+
V. vulnificus DMST 22033	-	-	+	-	+
V. parahaemolyticus DMST 15285	+	+	-	+	-
V. parahaemolyticus ATCC 17802	+	-	-	-	-
V. parahaemolyticus vp1	+	-	-	-	-
V. parahaemolyticus vp2	+	-	-	-	-
V. parahaemolyticus จำนวน 13 ไอโซเลท*	+	-	-	-	-

* เป็นไอโซเลทที่แยกจากตัวอย่างหอยนางรมและน้ำทะเลโดยคณะผู้วิจัย

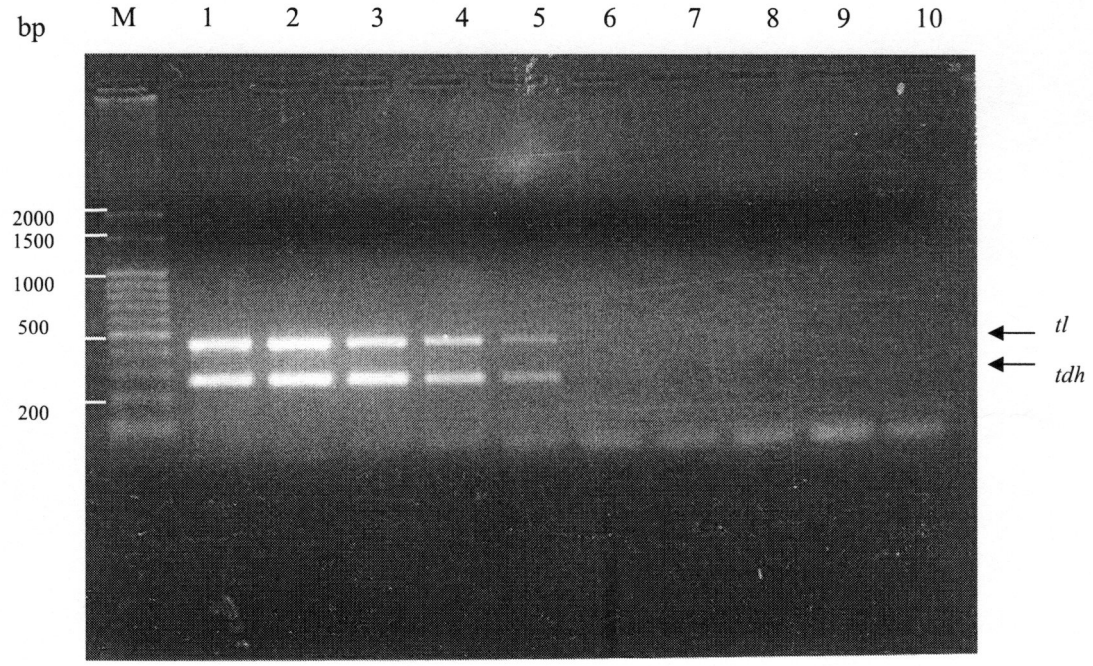
2. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvhA* และ *toxR* ของ *V. vulnificus* โดยปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* หรือ ยีน *vvhA* และ *toxR* ของ *V. vulnificus* ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิสำหรับขั้นตอนการลงเกาะของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยเกณฑ์การพิจารณาค่าที่เหมาะสมสำหรับปัจจัยทั้งสองที่ศึกษานี้ได้พิจารณาจากความเข้มหรือความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการทำอะกาโรสเจล อิเลคโตโฟรีซิส ซึ่งผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน annealing ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยีนทั้ง 4 ยีนคือ 3.0 มิลลิโมลาร์ และ 63 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3. การศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์

3.1 การทดสอบความไวเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus*

ในการศึกษานี้ได้เตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 ที่มีปริมาณเซลล์แตกต่างกันไป การศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์โดยเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* พร้อมกัน เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้ดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่เลือกจากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นคือในองค์ประกอบของปฏิกิริยาใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ใช้ที่ 63 องศาเซลเซียส พบว่าเทคนิคดังกล่าวมีความไวของการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในปริมาณที่มากกว่าหรือเท่ากับ 100 CFU ต่อปฏิกิริยา (ประมาณ 10^4 CFU ต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 4-1 ซึ่งปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาตรวจสอบโดยวิธีการ drop plate บนอาหาร TSA ควบคู่ไปด้วย

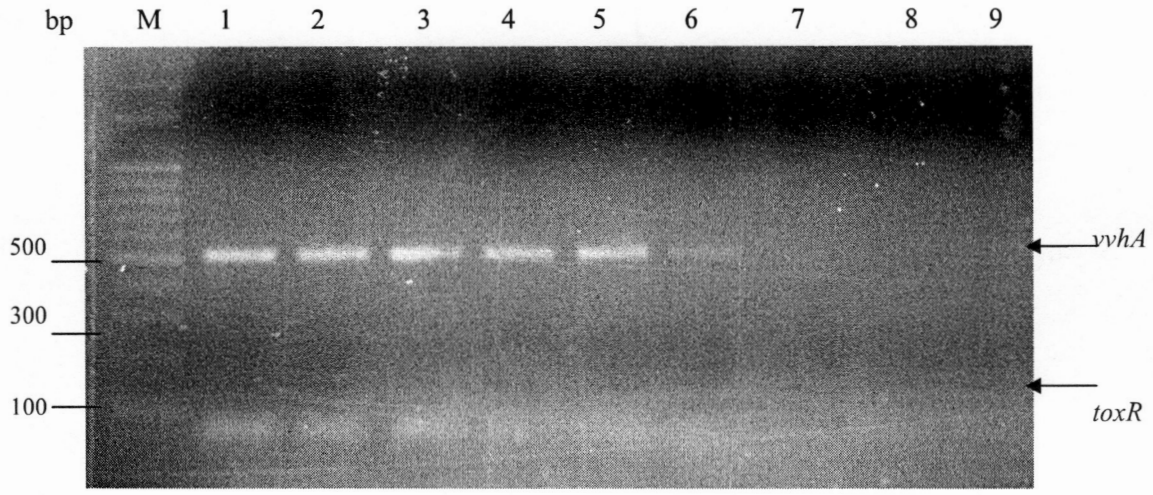


ภาพที่ 4-1 ความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 Lane M: 100 bp sharp DNA Marker, lane 1-9: ปริมาณเซลล์ 10^6 CFU ต่อปฏิกิริยา และลดลง 10 เท่าตามลำดับจนถึงปริมาณเซลล์น้อยกว่า 1 CFU ต่อปฏิกิริยา และ lane 10: negative control (Detection limit = 100 CFU ต่อปฏิกิริยา (lane 5)

3.2 การทดสอบความไวในการเพิ่มปริมาณยีน *vvhA* และ *toxR* ของ *V. vulnificus*

การศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์โดยเพิ่มปริมาณยีน *vvhA* และ *toxR* พร้อมกัน เพื่อตรวจสอบ *V. vulnificus* ได้ดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่เลือกจาก

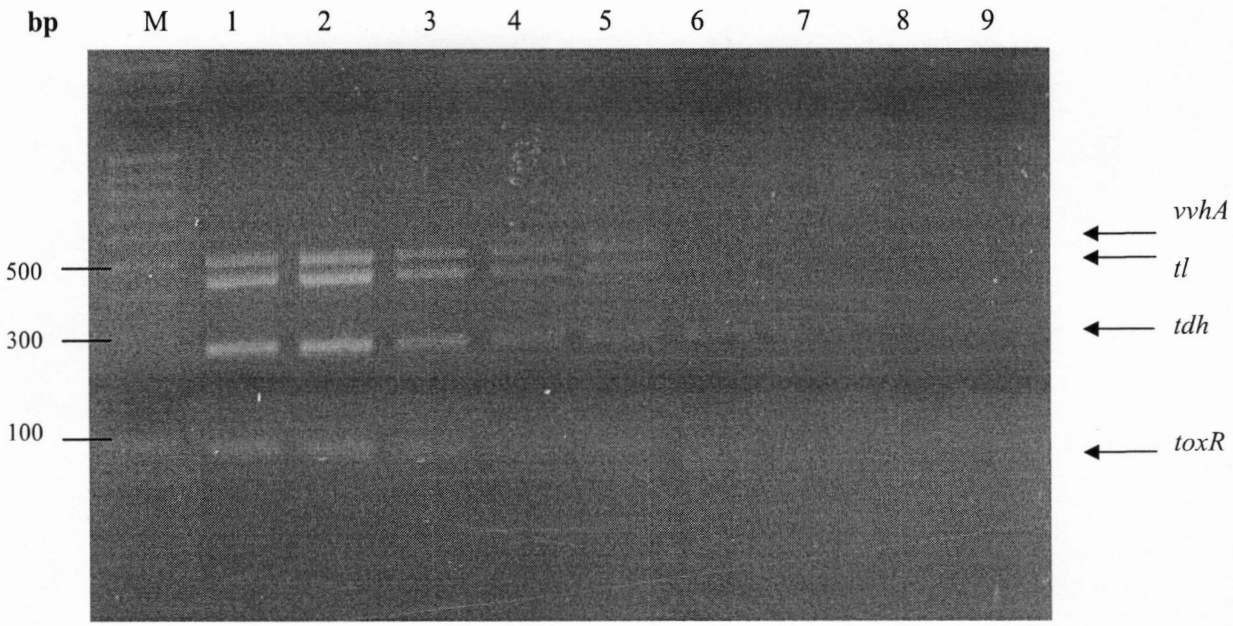
การศึกษาดังกล่าวข้างต้น กล่าวคือใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ในองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ใช้ที่ 63.0 องศาเซลเซียส พบว่าเทคนิคดังกล่าวมีความไวของการตรวจสอบ *V. vulnificus* ในปริมาณที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1 CFU ต่อปฏิกิริยา (ประมาณ 10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 4-2 ซึ่งปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาตรวจสอบโดยวิธีการ drop plate บนอาหาร TSA ควบคู่ไปด้วย



ภาพที่ 4-2 ความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* DMST 19346 Lane M: 100 bp sharp DNA Marker, lane 1-9: ปริมาณเซลล์ 10^6 CFU ต่อปฏิกิริยาและลดลง 10 เท่าตามลำดับจนถึงปริมาณเซลล์น้อยกว่า 1 CFU ต่อปฏิกิริยา

3.3 การศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 ในปฏิกิริยาเดียวกัน

ผลการการศึกษาความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 ในปฏิกิริยาเดียวกัน (ในกรณีนี้พิจารณาจากการปรากฏของยีนทั้ง 4 ยีน) พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองได้มากกว่าหรือเท่ากับ 1 CFU ต่อปฏิกิริยา (10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 4-3 ซึ่งปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาตรวจสอบโดยวิธีการ drop plate บนอาหาร mCPC ควบคู่ไปด้วย ในกรณีของการใช้อาหารชนิดนี้ในการตรวจสอบปริมาณของแบคทีเรียผสมดังกล่าวนี้ โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* มีสีม่วง ในขณะที่โคโลนีของ *V. vulnificus* มีสีเหลือง



ภาพที่ 4-3 ความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* DMST 19346 และ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 Lane M: 100 bp sharp DNA Marker, lane 1-9: ปริมาณเซลล์ 10^6 CFU ต่อปฏิกิริยาและลดลง 10 เท่าตามลำดับจนถึงปริมาณเซลล์น้อยกว่า 1 CFU ต่อปฏิกิริยา

4. การสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* โดยปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์

4.1 การตรวจสอบปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมที่นำมาใช้ในการศึกษาโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

จากการตรวจสอบปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่เติมลงในตัวอย่างหอยนางรมที่ใช้ในการศึกษาโดยวิธี Most Probable Number (MPN) ระบบ 5 หลอด ใน Alkaline peptone water (APW) จากนั้นนำหลอดที่พบการเจริญของเชื้อมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar เลือกโคโลนีสีเขียวมาตรวจสอบยืนยันความเป็น *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยการทำ PCR ซึ่งมียีนเป้าหมายเป็น *tl* และ *vvh* นับจำนวนหลอดของแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (ผล PRC เป็นบวก) แล้วไปเทียบกับตาราง MPN 5:5:5 ซึ่งพบว่าหอยนางรมที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีปริมาณ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 1.7×10^6 MPN ต่อกรัม และ *V. vulnificus* เท่ากับ 1.1×10^6 MPN ต่อกรัม

4.2 การสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมด้วยวิธีการสกัดแบบหยาบ (crude extraction)

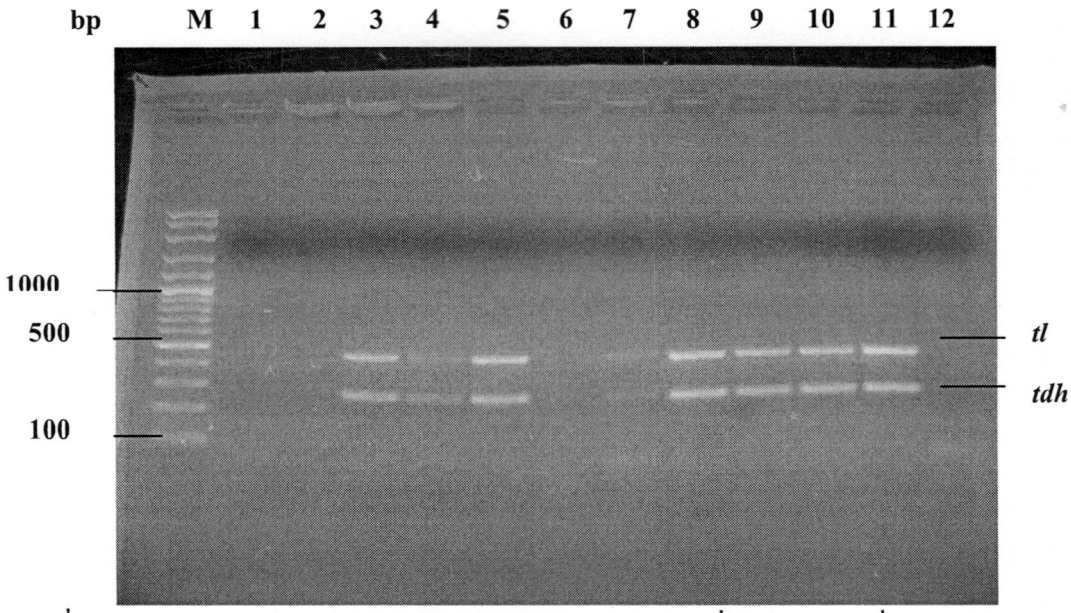
จากการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการสกัดแบบหยาบ (crude extraction) โดยนำเซลล์มาแขวนลอยใน lysis solution ชนิดต่าง ๆ (ในปริมาตร 350 ไมโครลิตร) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, Triton X-100 (0.5-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB (1-2 เปอร์เซ็นต์) CTAB-TE (1-2 เปอร์เซ็นต์) และ SDS-Proteinase K lysis solution จากนั้นต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เฉพาะกรณีของการใช้ SDS-Proteinase K lysis solution) นำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* เมื่อตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจล อิเลคโตโฟริซีส พบว่าทุกชุดการทดลองให้ผล PCR เป็นลบ (ไม่ได้แสดงผล)

4.3 การสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมด้วยวิธีแบบหยาบและเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol และการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากหอยนางรม

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* จากหอยนางรม

จากการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นที่เหมาะสมของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* โดยแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ lysis solution ชนิดต่าง ๆ คือ 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบ จากนั้นนำไปเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol และด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ซึ่งเพิ่มขั้นตอนของการกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนด้วย isopropanol เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* โดยปฏิกริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีส พบว่าให้ผลเป็นลบ (ไม่ได้แสดงผล)

เมื่อใช้ 1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB, 1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE และ SDS-Proteinase K lysis solution ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอและวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีโดยใช้ lysis solution ชนิดต่าง ๆ มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีส พบว่าการใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ให้คุณภาพของดีเอ็นเอแม่แบบดีกว่าการใช้ lysis solution ชนิดอื่น ๆ โดยพิจารณาจากปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR (ภาพที่ 4-4) โดยวิธีการสกัดทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก



ภาพที่ 4-4 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอ และด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-5 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบด้วย lysis solution ต่าง ๆ พร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอ lane 1: 1% CTAB, lane 2: 2% CTAB, lane 3: 1% CTAB-TE, lane 4: 2% CTAB-TE, lane 5: SDS-Proteinase K lysis solution lane 6-10 สกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย lysis solution ต่าง ๆ lane 6: 1% CTAB, lane 7: 2% CTAB, lane 8: 1% CTAB-TE, lane 9: 2% CTAB-TE, lane 10: SDS-Proteinase K lysis solution, lane 11: positive control และ lane 12: negative control

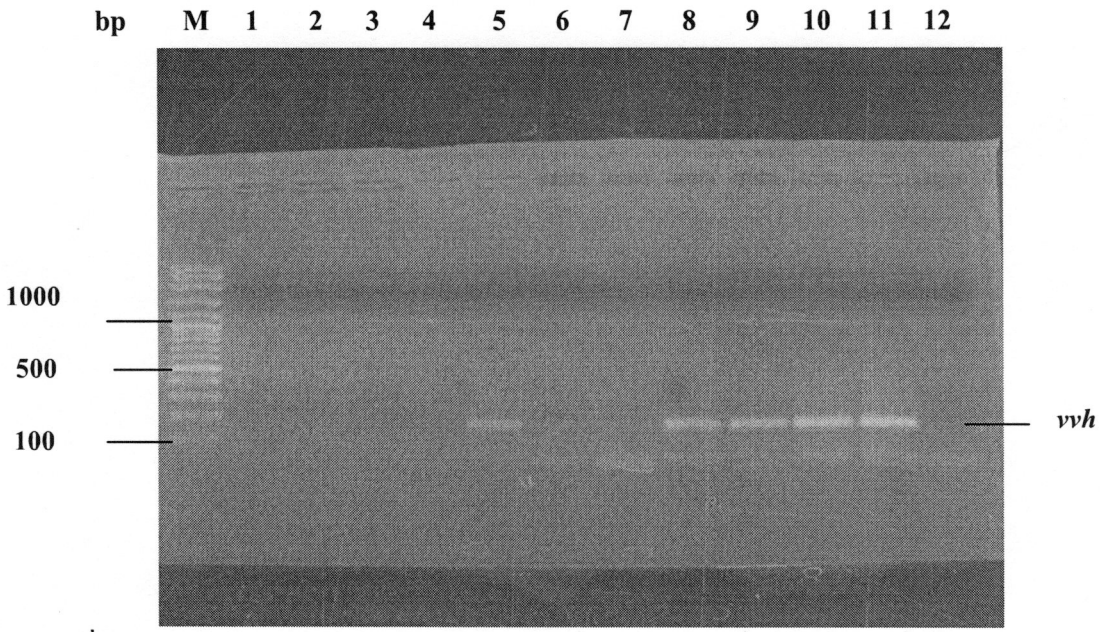
4.3.2 การสกัดดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* จากหอยนางรม

ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยพบว่ามีความจำเป็นต้องเปลี่ยนการใช้ยีนเป้าหมายสำหรับตรวจสอบ *V. vulnificus* เนื่องจากการใช้ยีน *vvhA* และ *toxR* เป็นยีนเป้าหมายของ *V. vulnificus* ค่อนข้างมีปัญหาในการตรวจสอบมากเมื่อเซลล์แบคทีเรียอยู่ในหอยนางรม โดยให้ผลที่ค่อนข้างแปรปรวนและมีผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นจำนวนมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนคู่ไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน hemolysin/ cytolysin ซึ่งยังคงเป็นยีนเดิม แต่ไม่ก่อให้เกิดปัญหาดังกล่าวข้างต้นเมื่อตรวจสอบกับตัวอย่างหอยนางรม โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์คู่นี้ใช้ชื่อว่า *vvh* ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 205 คู่เบส ซึ่งสามารถถูกเพิ่มจำนวนได้เป็นอย่างดีภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินปฏิกิริยา PCR ตามที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้

จากการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของ *V. vulnificus* ในหอยนางรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *vvh* โดยแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ lysis solution 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมกับเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดย

การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol และด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ซึ่งเพิ่มขั้นตอนของการกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนด้วย isopropanol เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* โดยปฏิกริยา PCR และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีส พบว่าให้ผลเป็นลบ (ไม่ได้แสดงผล)

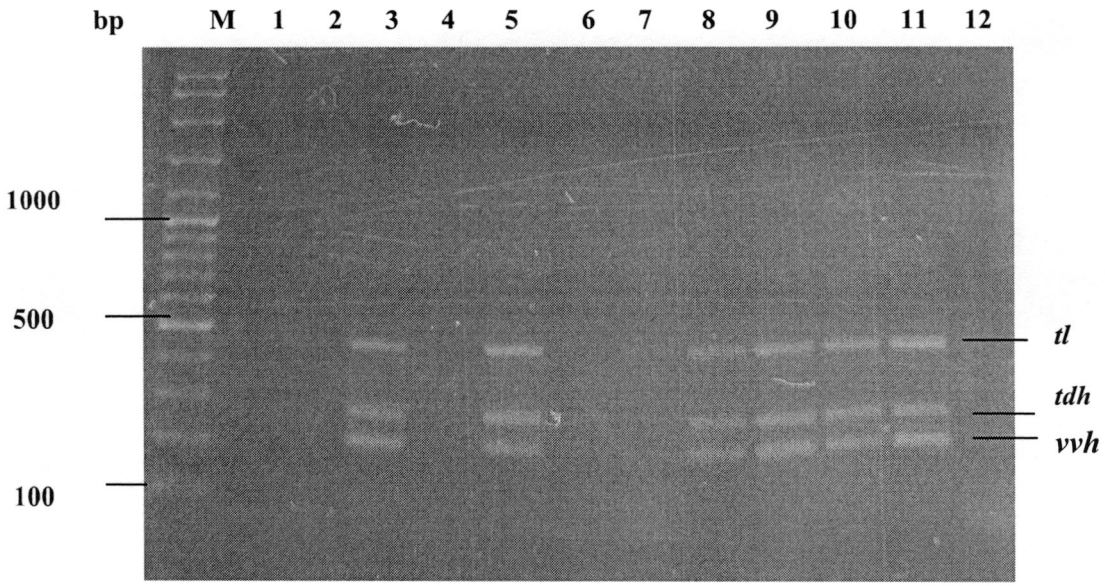
เมื่อใช้ lysis solution ของ 1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB, 1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE และ SDS-Proteinase K lysis solution ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอ และด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีโดยใช้ lysis solution ชนิดต่าง ๆ มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR พบว่าให้ผลที่คล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* กล่าวคือการใช้ SDS-Proteinase K lysis solution สำหรับสกัดดีเอ็นเอให้คุณภาพของดีเอ็นเอแม่แบบดีที่สุด โดยพิจารณาจากปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificuss* ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอและด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-5 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบด้วย lysis solution ต่าง ๆ พร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอ lane 1: 1% CTAB, lane 2: 2% CTAB, lane 3: 1% CTAB-TE, lane 4: 2% CTAB-TE, lane 5: SDS-Proteinase K lysis solution lane 6-10 สกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย lysis solution ต่าง ๆ lane 6: 1% CTAB, lane 7: 2% CTAB, lane 8: 1% CTAB-TE, lane 9: 2% CTAB-TE, lane 10: SDS-Proteinase K lysis solution, lane 11: positive control และ lane 12: negative control

4.3.3 การสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากหอยนางรม

ในการศึกษาเลือก 1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB, 1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE และ SDS-Proteinase K lysis solution มาทดสอบโดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบหยาบตามด้วยการตกตะกอนดีเอ็นเอและด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีโดยใช้ lysis solution แต่ละชนิด มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีส พบว่าการสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันมากนักในกรณีของการใช้ 1-2 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE และ SDS-Proteinase K เป็น lysis solution (ภาพที่ 4-6) แต่เนื่องจากผู้วิจัยพบว่า การใช้ CTAB นั้นมักแสดงความแปรผันของผลการทดลองหลายครั้ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกการใช้ SDS-Proteinase K เป็น lysis solution และเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบหยาบร่วมกับการตกตะกอนดีเอ็นเอมาใช้ในการทดลองตลอดการศึกษาที่ดำเนินต่อไป

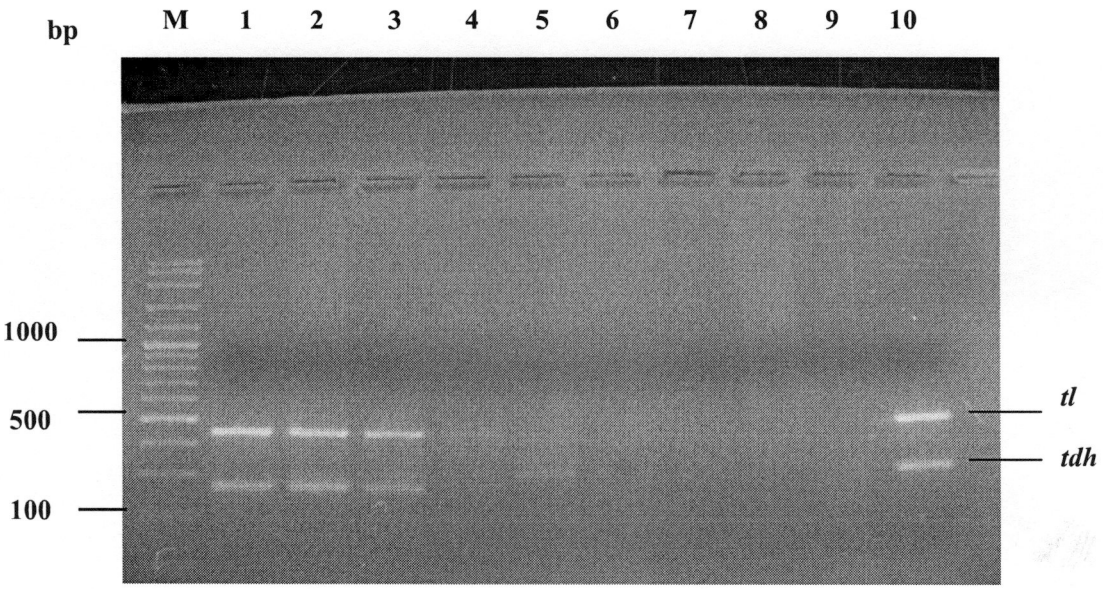


ภาพที่ 4-6 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V.vulnificus* ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบพร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอ และด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-5 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบหยาบด้วย lysis solution ต่าง ๆ พร้อมการตกตะกอนดีเอ็นเอ lane 1: 1% CTAB, lane 2: 2% CTAB, lane 3: 1% CTAB-TE, lane 4: 2% CTAB-TE, lane 5: SDS-Proteinase K lysis solution lane 6-10 สกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย lysis solution ต่าง ๆ lane 6: 1% CTAB, lane 7: 2% CTAB, lane 8: 1% CTAB-TE, lane 9: 2% CTAB-TE, lane 10: SDS-Proteinase K lysis solution lane 11: positive control และ lane 12: negative control

5. การศึกษาความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม

5.1 ความไวในการตรวจ *V. parahaemolyticus*ในหอยนางรม โดยใช้ยีนเป้าหมาย *tl* และ *tdh*

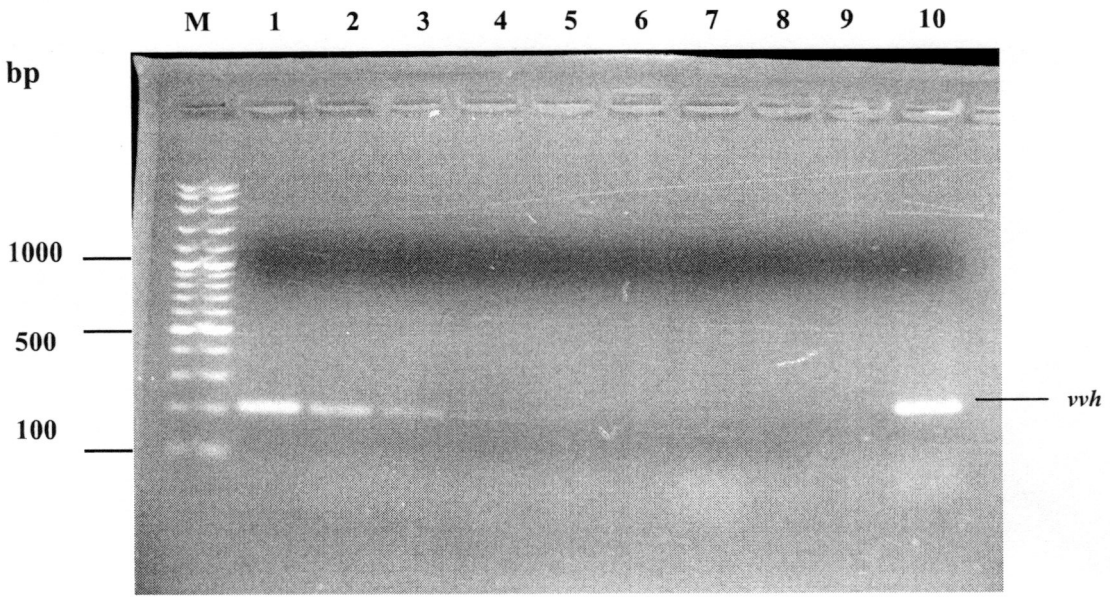
จากการแปรผันปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 ที่เติมลงในตัวอย่างหอยนางรม และใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ตรวจสอบ พบว่าสามารถตรวจสอบได้เมื่อมีเซลล์อยู่อย่างน้อย 100 CFU ต่อกรัม (ภาพที่ 4-7)



ภาพที่ 4-7 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* โดยการใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ ในการทดลองมีการเติมเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างหอยนางรมปริมาณต่าง ๆ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-8: ปริมาณเชื้อที่เติมในหอยนางรมตั้งแต่ 10^6 – น้อยกว่า 1 CFU ต่อกรัม, lane 9: negative control, lane 10: positive control

5.2 ความไวเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* ในหอยนางรม

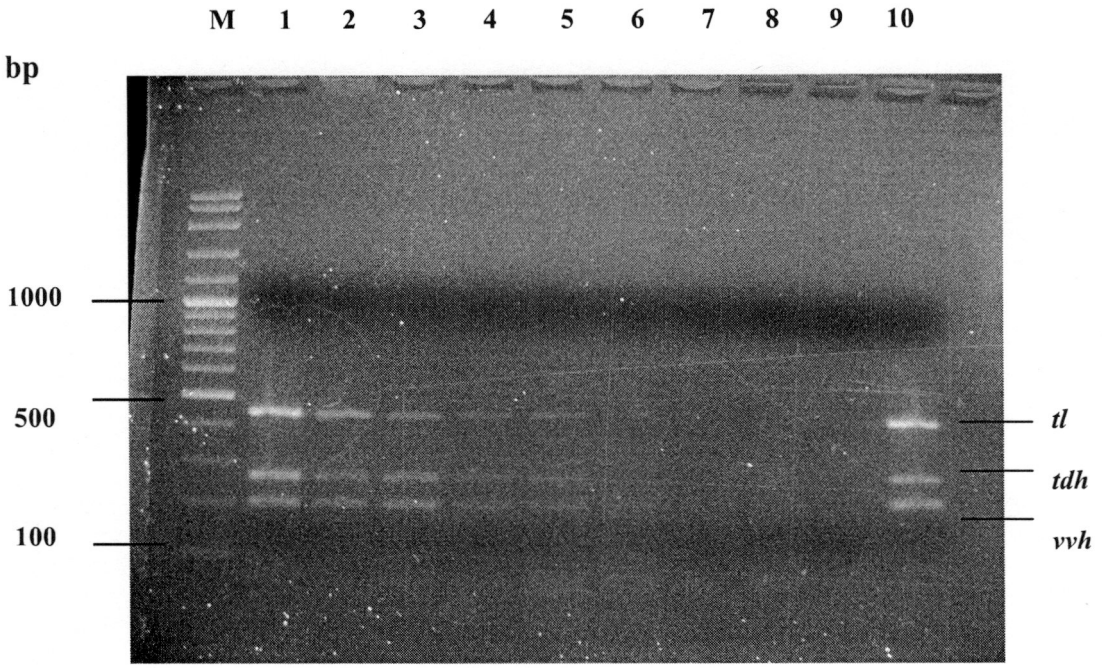
เมื่อเติมเซลล์ของ *V. vulnificus* DMST 19346 ในปริมาณต่าง ๆ ลงในตัวอย่างหอยนางรม และใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ พบว่าสามารถตรวจสอบได้เมื่อมีเซลล์อยู่อย่างน้อย 100 CFU ต่อกรัม (ภาพที่ 4-8) เช่นเดียวกับการตรวจ *V. parahaemolyticus*



ภาพที่ 4-8 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* โดยการใช้เทคนิค PCR ในการทดลองมีการเติมเซลล์ของ *V. vulnificus* ลงในตัวอย่างหอยนางรมปริมาณต่าง ๆ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution เมื่อศึกษาความไวของเทคนิค PCR Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-8: ปริมาณเชื้อที่เติมในหอยนางรมตั้งแต่ 10^6 – น้อยกว่า 1 CFU ต่อกรัม, lane 9: negative control, lane 10: positive control

5.3 ความไวเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* และ *vvh* ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม

จากการจำลองการปนเปื้อนของหอยนางรมโดยเติมเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 ในปริมาณต่าง ๆ จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้โดยใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ พบว่าสามารถตรวจสอบได้เมื่อมีเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดอยู่อย่างน้อย 100 CFU ต่อกรัม (ภาพที่ 4-9) เช่นเดียวกับผลการตรวจสอบที่ได้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดดังได้กล่าวข้างต้น

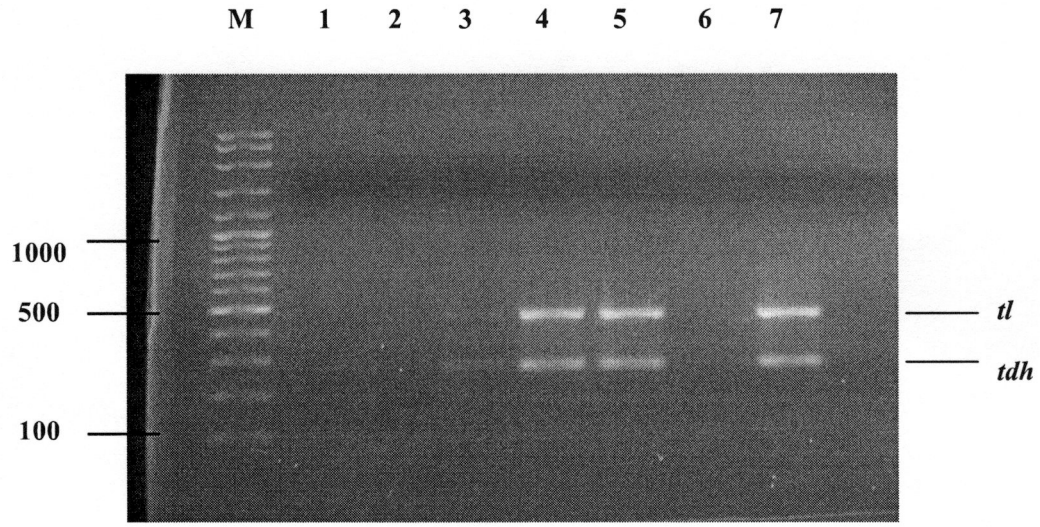


ภาพที่ 4-9 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V.vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมที่เติมเชื้อทั้งสองชนิดในปริมาณต่าง ๆ Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-8: ปริมาณเชื้อแต่ละชนิดที่เติมในหอยนางรมตั้งแต่ 10^6 CFU ต่อกรัม และลดลงสิบเท่าตามลำดับจนถึงปริมาณเซลล์น้อยกว่า 1CFU ต่อกรัม, lane 9: negative control, lane 10: positive control

6. การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรม ภายหลังการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนการทำปฏิกิริยา PCR

6.1 การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus*

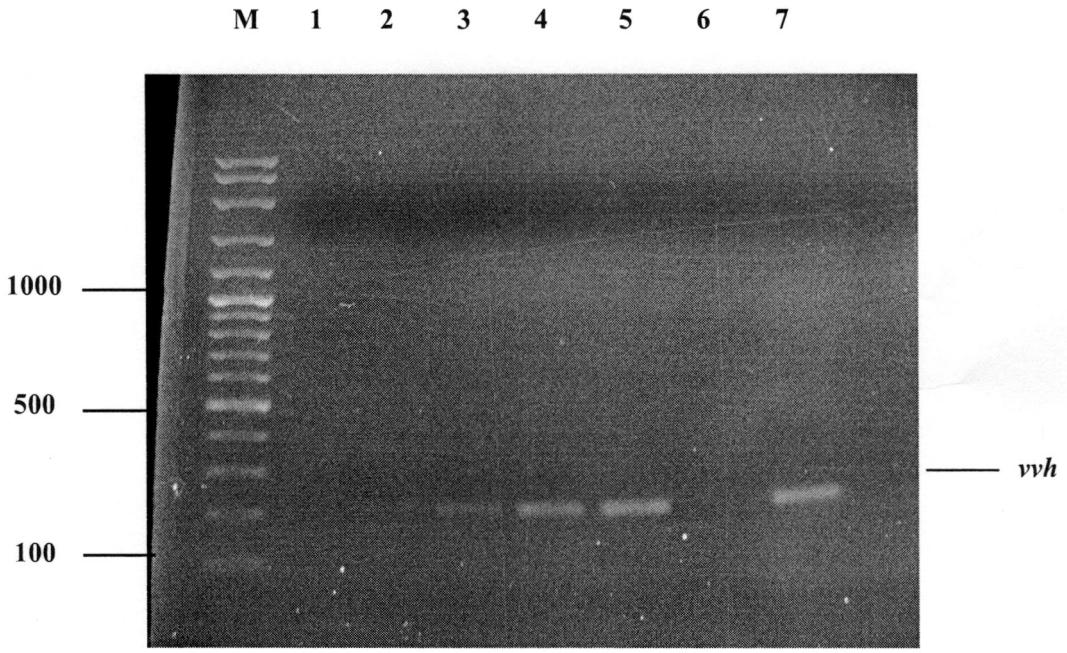
เมื่อนำตัวอย่างหอยนางรมมาเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 ลงไปในปริมาณ 1 CFU ต่อกรัม จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใน APW เป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิค PCR ซึ่งเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายคือ *tl* และ *tdh* พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจพบเชื้อได้หลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-10 สำหรับเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนนำมาตรวจโดยเทคนิค PCR นี้คือ 6-8 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-10 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมเมื่อนำตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ก่อนการทำปฏิกิริยา PCR โดย Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-5: ผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างหอยนางรมที่เติมเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 ในปริมาณ 1CFU ต่อกรัม และนำไปผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ, lane 6: negative control, lane 7: positive control

6.2 การตรวจสอบ *V. vulnificus*

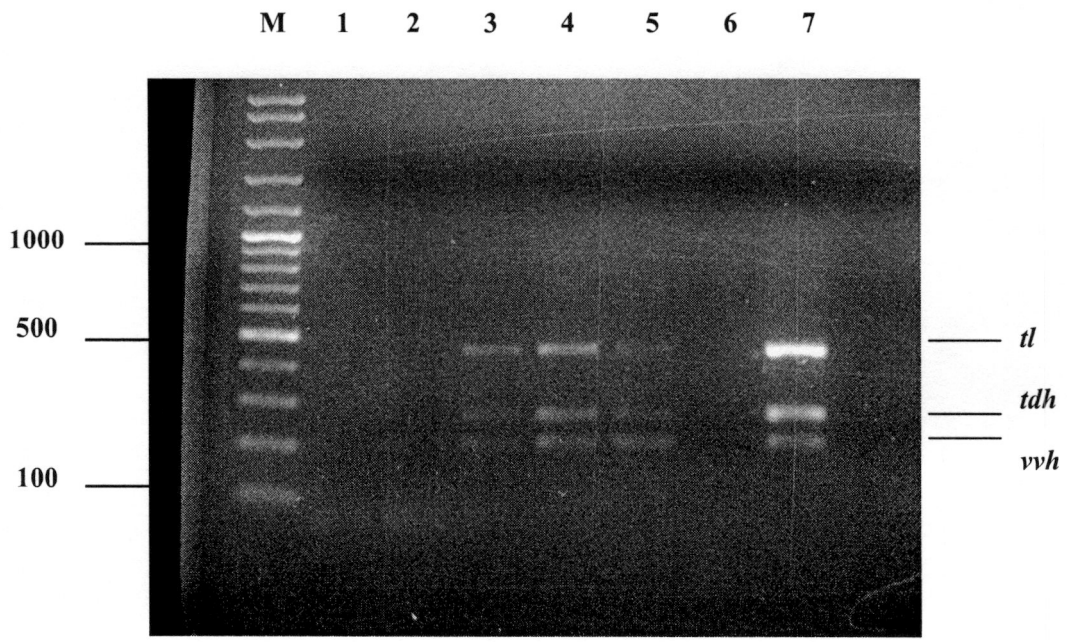
เมื่อนำตัวอย่างหอยนางรมมาเติมเชื้อ *V. vulnificus* DMST 19346 ลงไปในปริมาณ 1 CFU ต่อกรัม จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณเชื้อใน APW เป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิค PCR ซึ่งเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายคือ *vvh* พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจพบเชื้อได้หลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11) สำหรับเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนนำมาตรวจโดยเทคนิค PCR นี้คือ 6-8 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-11 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* ในหอยนางรมเมื่อนำตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ก่อนการทำปฏิกิริยา PCR โดย Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-5: ผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างหอยนางรมที่เติมเซลล์ของ *V. vulnificus* DMST 19346 ในปริมาณ 1CFU ต่อกรัม และนำไปผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลาตามลำดับ, lane 6: negative control, lane 7: positive control

6.3 การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

เมื่อนำตัวอย่างหอยนางรมมาเติม *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 แต่ละชนิดลงไปในปริมาณ 1 CFU ต่อกรัม จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณเชื้อใน APW เป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิค PCR ซึ่งเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายคือ *tl*, *tdh* และ *vvh* พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจพบเชื้อทั้งสองชนิดได้หลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-12) สำหรับเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนนำมาตรวจโดยเทคนิค PCR นี้คือประมาณ 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-12 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซีสของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมโดยใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ ภายหลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลาต่าง ๆ โดย Lane M: 100 bp sharp DNA marker ปริมาณ 0.5 µg, lane 1-5: ผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างหอยนางรมที่เติมเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 แต่ละชนิดในปริมาณ 1CFU ต่อกรัม และนำไปผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลาตามลำดับ, lane 6: negative control, lane 7: positive control

7. การตรวจสอบความใช้ได้ (Validation) ของวิธี PCR แบบมัลติเพล็กซ์สำหรับการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงจากหอยนางรม

จากการตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม โดยศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานดั้งเดิมคือการเพาะแยกเชื้อ รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าความแม่นยำ (Relative accuracy; AC) ความจำเพาะ (Relative specificity; SP) และความไว (Relative sensitivity; SE) โดยค่าที่ได้ควรมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ เทคนิคหรือวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้จึงสามารถนำไปใช้งานได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ให้ค่าความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวเท่ากับ 98, 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) ส่วนการตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่าให้ค่าความแม่นยำเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความจำเพาะและความไวของการตรวจสอบเท่ากับ 96 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 การตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมโดยตรง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจมาตรฐาน (วิธี MPN)

ค่าที่ตรวจสอบ	ความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมาย	
	V. parahaemolyticus	*V. vulnificus*
Relative accuracy (AC)	98	98
Relative specificity (SP)	100	96
Relative sensitivity (SE)	98	100

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ในการพัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์เพื่อตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* โดยใช้ยีนเป้าหมาย 3 ยีน คือ *tl*, *tdh*, *vvh* พบว่าไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* โดยปฏิกิริยา PCR มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* โดยไพร์เมอร์ที่มียีนเป้าหมายเป็น *tl* สามารถใช้ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้ทุกไอโซเลท ในขณะที่ไพร์เมอร์ที่มียีนเป้าหมายเป็น *tdh* แสดงผลบวกต่อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคเท่านั้น ส่วนไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* มีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* เท่านั้น สภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสองโดยใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ คือใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับไพร์เมอร์ในการจับกับดีเอ็นเอแม่แบบของไพร์เมอร์ (annealing) คือ 63 องศาเซลเซียส ความไวของการตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์คือ 1 CFU ต่อปฏิกิริยา

สำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงจากตัวอย่างหอยนางรม พบว่าการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบด้วยวิธีสกัดดีเอ็นเอแบบหยาบโดยใช้ SDS-Proteinase K เป็น lysis solution ตามด้วยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล เป็นวิธีที่สะดวก ใช้เวลาน้อย และไม่ต้องใช้ฟีนอลซึ่งเป็นสารเคมีอันตราย อีกทั้งเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สูง สะดวกในการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส เมื่อศึกษาถึงความไวของปฏิกิริยา PCR สำหรับตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม พบว่าเทคนิคที่ใช้มีความไวในการตรวจแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็น 100 CFU ต่อกรัม ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม จึงศึกษาถึงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ก่อนการตรวจสอบ ซึ่งพบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนการทำ PCR ช่วยเพิ่มความไวของการตรวจสอบได้ดีมากขึ้น โดยสามารถตรวจสอบเชื้อได้แม้ว่ามีเชื้อเริ่มต้นเพียง 1 CFU ต่อกรัม เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นได้ในงานวิจัยนี้ได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ซึ่งเทียบเคียงกับวิธีมาตรฐาน โดยมีความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวอยู่ในระดับสูงเกินกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (96-100 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงสามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมได้

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์เพื่อตรวจสอบ *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญต่อการก่อโรคในมนุษย์ โดยเฉพาะ *V. vulnificus* ถือว่าเป็นเชื้อก่อโรคอุบัติใหม่ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการตายในผู้ติดเชื้อได้ การปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้พบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมทางทะเล รวมทั้งอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยนางรม โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ถูกกำหนดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสากล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารของแต่ละประเทศ อย่างไรก็ตามประเทศไทยโดยเฉพาะภาคตะวันออกมีพื้นที่ชายฝั่งทะเลซึ่งเป็นเขตเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งในเชิงการท่องเที่ยวและการเป็นแหล่งผลิตอาหารทะเล จึงเป็นที่น่าสนใจในการตรวจสอบเพื่อการเฝ้าระวังการระบาดของโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ ผู้วิจัยได้สนใจและพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยอาศัยพื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล กล่าวคือการใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณยีนที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด ทั้งนี้เพื่อความสะดวกและรวดเร็ว ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ ซึ่งสามารถตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้จากปฏิกิริยาเดียวกัน โดยตัวอย่างที่สนใจตรวจสอบคือหอยนางรม ซึ่งถือได้ว่าเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญของเชื้อดังกล่าว การดำเนินการศึกษาได้เริ่มจากการเลือกคู่ไพร์เมอร์และปรับสภาวะของการดำเนินปฏิกิริยา PCR ให้มีความเหมาะสม โดยศึกษากับเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาต่อโดยศึกษาในตัวอย่างจริงคือหอยนางรม

การพัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 2 ยีน ที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* คือ ยีน thermolabile hemolysin (*tl*) ซึ่งพบได้ทั่วไปใน *V. parahaemolyticus* และยีน thermostable direct hemolysin (*tdh*) ซึ่งเป็นยีนที่พบเฉพาะใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคเท่านั้น (Deepanjali *et al.*, 2005) ไพร์เมอร์ที่นำมาใช้ถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* โดยมีขนาดผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 450 และ 269 คู่เบส ตามลำดับ (Bej *et al.*, 1999) จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยนำไพร์เมอร์ทั้งสองคู่ดังกล่าวนี้มาทดสอบความจำเพาะ โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ทั้งในสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. aginolyticus, V. cholerae, V. harveyi, V. vulnificus* และแบคทีเรียในสกุลอื่น ๆ ได้แก่ *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aerugenosa, Salmonella* Weltevreden และ *Shigella boydii* พบว่าไพร์เมอร์ทั้งสองคู่นี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยไพร์เมอร์สำหรับยีน *tl* ให้ผลบวกของปฏิกิริยา PCR ต่อ *V. parahaemolyticus* เท่านั้น ในขณะที่ไพร์เมอร์สำหรับยีน *tdh* มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bej *et al.* (1999) ที่ได้ทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ทั้งสองคู่นี้กับ *V. parahaemolyticus* จำนวนทั้งหมด 111 ไอโซเลท *V. hollisae* 5 ไอโซเลท *V. cholerae* 6

ไอโซเลท *V. mimicus, V. vulnificus, V. alginolytius, V. damsela, V. fluvialis, V. furnissii, V. metschikovii, V. proteolytius* และ *Plesiomonas* sp. ชนิดละ 1 ไอโซเลท พบว่าคู่ไพร์เมอร์สำหรับยีน *tl* สามารถเพิ่มปริมาณยีนนี้ได้เฉพาะ *V. parahaemolyticus* เท่านั้น ในขณะเดียวกัน *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ พบว่ามี 60 ไอโซเลท ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์สำหรับยีน *tdh* (Bej *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไพร์เมอร์ทั้งคู่มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อการนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* โดยเทคนิค PCR เพื่อใช้ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus*

ในกรณีของไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน cytolysin/ hemolysin (*cyt* และ *vvhA*) และ *toxR* ของ *V. vulnificus* พบว่ามีความจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดนี้เช่นกัน ยีน cytolysin/ hemolysin และ *toxR* เป็นยีนที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* (Brauns, *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1991; Aono *et al.*, 1997; Harwood *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005; Wang and Levin, 2006) ในกรณีของการใช้ยีน *toxR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง transmembrane DNA binding regulatory protein ของแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ นอกจากใช้ในการติดตามและตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายได้แล้ว ยังสามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอได้อีกด้วย เนื่องจากยีนนี้พบบนโครโมโซม (ancestral chromosome) ของวิบริโอทุกชนิด โดยแต่ละชนิดมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบางส่วนของยีน ซึ่งบ่งชี้ความเป็นวิบริโอชนิดนั้น ๆ ได้ (Provenzano *et al.*, 2000) ซึ่งได้มีรายงานการใช้ยีนนี้ในการจัดจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Kim *et al.*, 1999) และ *V. hollisae* (Vuddhakul *et al.*, 2000)

สำหรับยีน *vvh* หรือ *vvhA* (หรือ *cyt*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hemolysin/ cytotoxin ของ *V. vulnificus* ซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งในการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ มีรายงานการใช้ยีนดังกล่าวเป็นเป้าหมายในการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้กันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Brauns *et al.* (1991) ใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ *V. vulnificus* ทั้งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้และเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรายงานของ Wang and Levin ในปี 2006 ซึ่งใช้เทคนิค real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในหอยแครง (*Protochaca staminea*) โดยมียีน *vvhA* เป็นเป้าหมายเช่นกัน ซึ่งในกรณีนี้สามารถตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ได้

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ เพื่อตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในเบื้องต้นมุ่งเน้นไปที่ 2 ปัจจัยสำคัญ คือความเข้มข้นของแมกนีเซียมและอุณหภูมิในขั้นตอนการลงเกาะของไพร์เมอร์บนสายดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing temperature) ซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อการดำเนินปฏิกิริยาและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้น แมกนีเซียมที่มีอยู่ในปฏิกิริยาเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ dNTP ซึ่งมีความสำคัญต่อการจดจำโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส สำหรับขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา PCR เป็นขั้นตอนที่มี

การปรับอุณหภูมิให้เอื้อต่อการเข้าจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งอยู่ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว การจับกันของดีเอ็นเอนี้เกิดขึ้นในบริเวณเฉพาะของดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับไพร์เมอร์ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับค่า melting temperature (Tm) ของไพร์เมอร์ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยปกติจะต่ำกว่าค่า Tm ของไพร์เมอร์ประมาณ 5-15 องศาเซลเซียส หากใช้อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้ไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้ไม่ดีหรือไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่เป็นเป้าหมายได้น้อยหรือไม่เกิดเลย ในทางตรงกันข้ามหากปรับอุณหภูมิในขั้นตอนนี้ต่ำเกินไปทำให้ไพร์เมอร์มีการลงเกาะแบบสุ่ม ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ PCR แบบไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR เป้าหมายเกิดขึ้นน้อย รวมทั้งมีผลิตภัณฑ์ PCR อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้ จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสองปัจจัยนี้ พบว่าการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ และอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน annealing 63 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนเป้าหมายอยู่ในระดับที่ดี

อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการดำเนินปฏิกิริยา PCR คือคุณภาพของดีเอ็นเอที่นำมาใช้เป็นแม่แบบ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจจุลินทรีย์ในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ เช่น ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม สิ่งส่งตรวจทางการแพทย์และตัวอย่างอาหาร เป็นต้น แต่ก็มีข้อจำกัดอย่างมาก เนื่องจากองค์ประกอบจากตัวอย่างเหล่านั้นอาจมีผลไปยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยา PCR เช่น ไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase (Abolmaaty, Gu, Witkowaky, and Levin, 2007) เช่น เกลือน้ำดีและพอลิแซคคาไรด์ในอุจาระ ฮีมในเลือด กรดฮิวมิกในดิน เอนไซม์โปรติเนสในนม ยูเรียในปัสสาวะ ส่วนในตัวอย่างหอยนางรมมีรายงานว่าเอนไซม์ดีเอ็นเอสและโปรติเนส รวมทั้งโปรตีนชนิดต่าง ๆ มีส่วนสำคัญในการรบกวนหรือยับยั้งปฏิกิริยา PCR (Luan and Levin, 2008) ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอให้ปราศจากสิ่งรบกวนเหล่านี้จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ซึ่งนำไปสู่ผลสำเร็จของการดำเนินปฏิกิริยา PCR

โดยทั่วไปวิธีการที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. vulnificus* ในรูปแบบของเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อที่อยู่ในตัวอย่างหอยนางรมมีความแตกต่างกัน กล่าวคือในการสกัด ดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์มักนิยมใช้วิธีการต้มที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที (Bej *et al.*, 1999; Bilung *et al.*, 2005; Buenaventura, Wong, and Levin, 2006; Nhung *et al.*, 2007) แต่สำหรับการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อที่อยู่ในหอยนางรมนั้นจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ เนื่องจากในหอยนางรมนั้นมีปัจจัยหลายประการที่สามารถรบกวนปฏิกิริยา PCR ดังได้กล่าวแล้ว จากการศึกษาสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมโดยวิธีสกัดแบบหยาบ กล่าวคือการใช้วิธีการต้มเป็นเวลา 10 นาที ใน lysis solution ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, Triton X-100 (0.5-2 เปอร์เซ็นต์), CTAB (1-2 เปอร์เซ็นต์) และ CTAB-TE (1-2 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปใช้เป็น

แม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR พบว่าให้ผลเป็นลบทั้งหมด ทั้งนี้ผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าที่ผลการศึกษาเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก 2 สาเหตุ คือ

(1) ดีเอ็นเอที่เตรียมได้นั้นไม่มีความบริสุทธิ์ และมีปัจจัยบางประการเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยาPCR ซึ่งการต้มเซลล์ใน lysis solution เหล่านั้นเป็นเพียงการทำให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอหลุดออกมาอยู่ในสารละลายเท่านั้น ปัจจัยรบกวนหรือสารยับยั้ง (inhibitor) ที่มาจากหอยนางรมยังไม่ถูกกำจัดออกไป สอดคล้องกับรายงานของ Blackstone *et al.* (2003) ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคในตัวอย่างหอยนางรมที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยใช้ยีน *tdh* เป็นยีนเป้าหมายสำหรับการตรวจด้วยเทคนิค real time PCR ในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบโดยใช้วิธีการต้มซึ่งพบว่าวิธีการตรวจด้วยการ streak plate/ probe method ให้ผลเป็นบวก แต่เมื่อตรวจสอบด้วย real time PCR ให้ผลเป็นลบ ซึ่งผู้วิจัยกล่าวว่าเนื่องจากดีเอ็นเอแม่แบบไม่บริสุทธิ์จึงยับยั้งปฏิกิริยา real time PCR และ/ หรือ

(2) ดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีความเข้มข้นต่ำ (อยู่ใน lysis solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร) ถึงแม้ว่าวิธีการต้มเซลล์เป็นวิธีที่ทำได้สะดวกและรวดเร็ว แต่อาจใช้ได้ดีกับเซลล์ที่อยู่ในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่อยู่ในหอยนางรมด้วยวิธีนี้อาจทำได้ยากกว่าเนื่องจากเซลล์แขวนลอยอาจเกิดการยึดเกาะกับอนุภาคของโปรตีนพอลิแซคคาไรด์หรือสารอื่น ๆ ที่อยู่ในตัวอย่าง ทำให้มีดีเอ็นเอหลุดออกมาอยู่ในส่วนของสารละลายน้อย หรือดีเอ็นเอที่หลุดออกจากเซลล์อาจยึดเกาะหรือจับตัวอยู่กับอนุภาคต่าง ๆ ดังกล่าวนี้ เมื่อนำดีเอ็นเอดังกล่าวปริมาตรเพียง 5 ไมโครลิตร (จากทั้งหมด 350 ไมโครลิตร) มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR จึงให้ผลเป็นลบ

จากสมมติฐานดังกล่าวข้างต้น เมื่อพิจารณาผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยวิธีการต้มและเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนด้วย isopropanol ในลำดับต่อมา พบว่าการใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากการต้มเซลล์ใน 1 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE, 2 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE และการสกัดดีเอ็นเอด้วย SDS-Proteinase K lysis solution ตามด้วยขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ ซึ่งให้ผลปฏิกิริยา PCR เป็นบวกสำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* ดีเอ็นเอแม่แบบจากการสกัดดีเอ็นเอด้วย SDS-Proteinase K lysis solution ตามด้วยขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอให้ผลบวกเท่านั้น และการทดลองปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และ *vvh* ของ *V. vulnificus* โดยปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์นั้นให้ผลบวกกับการสกัดดีเอ็นเอด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE และการสกัดดีเอ็นเอด้วย SDS-Proteinase K lysis

solution ตามด้วยขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากการทดลองเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มากขึ้นแล้ว (เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้มีขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ) ยังมีผลกระทบน้อยมากจากปัจจัยที่เข้ามายับยั้งปฏิกิริยา PCR ทำให้สามารถดำเนินปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณยีน *tl, tdh* และ *vvh* ได้ ผลการศึกษาที่แสดงเช่นนี้อาจเนื่องจากใน lysis solution ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์แตกได้ดี กล่าวคือใน SDS-Proteinase K lysis solution มี SDS ซึ่งเป็น anionic surfactant ช่วยในการทำให้เซลล์แตกโดยเข้าไปรบกวนบริเวณผนังเซลล์ (Xu and Keiderling, 2004) อีกทั้งใน SDS-Proteinase K lysis solution ยังมีเอนไซม์ proteinase K ซึ่งช่วยย่อยสลายโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Goldenberger, Perschil, Ritzler, and Altwegg, 1995) ทำให้ดีเอ็นเอหลุดออกมาจากเซลล์ได้มาก สำหรับ CTAB นั้นเป็น cationic surfactant (Lavintman and Cardini, 1972) เป็นส่วนสำคัญในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ CTAB ยังมีบทบาทในการจับกับเศษเซลล์ โปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ในตัวอย่าง (Panicker *et al.*, 2004) หลังจากการทำให้เซลล์แตกแล้ว ทำให้เกิดการตกตะกอนของโมเลกุลเหล่านี้ได้ง่าย เมื่อปั่นกำจัดเศษสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ออกไปแล้ว นำส่วน supernatant ซึ่งมีดีเอ็นเอละลายอยู่มาเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยการตกตะกอนก่อนนำไปมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR จึงสามารถทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขึ้นมาในระดับที่สามารถตรวจสอบด้วยสายตาได้

สำหรับการใช้ Triton X-100 เป็นองค์ประกอบของ lysis solution ในการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าไม่ได้ให้ผลที่ดีนักเมื่อพิจารณาจากปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้น Triton X-100 เป็นสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม nonionic (Lavintman and Cardini, 1972) ซึ่งมักถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของ lysis buffer สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์สิ่งมีชีวิต จากการศึกษาครั้งนี้ให้ผลลบต่อทุกปฏิกิริยา PCR จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอาจเป็นไปได้ที่การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้นอกจากการมีอยู่ของปัจจัยรบกวนปฏิกิริยา PCR ในดีเอ็นเอที่เตรียมแล้วปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้เป็นแม่แบบได้ยังมีอยู่ในปริมาณต่ำอย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100 ใน 1 มิลลิโมลาร์ EDTA ให้ผลที่ดีต่อมาสกัดดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* ที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้โดยเทคนิค PCR (Lee *et al.*, 1998)

นอกจากนี้ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงการมีอยู่ของปัจจัยรบกวนปฏิกิริยา PCR ในตัวอย่างหอยนางรม กล่าวคือในชุดการทดลองที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกแล้วนำไปสกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol เพื่อกำจัดโปรตีนออก จากนั้นนำไปเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ตรวจพบผลบวกที่ดีที่สุดในทุกชุดการทดลองเมื่อใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ให้ผลดีที่สุด รองลงมาได้แก่การใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE และ 2 เปอร์เซ็นต์ CTAB-TE ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถอธิบายได้ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นถึงประสิทธิภาพของการใช้ lysis

solution ทั้งสามชนิดนี้ และเมื่อเพิ่มขั้นตอนการสกัดด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ร่วมด้วยก็จะทำให้สามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ออกจากสารละลายดีเอ็นเอได้ดีขึ้น (Goldenberger *et al.*, 1995) ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะมีคุณภาพดีกว่าชุดที่ไม่ได้สกัด phenol-chloroform-isoamyl alcohol เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR จึงทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายดีกว่า ดังจะเห็นได้จากปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้งสองชนิดคือ *tl, tdh* และ *vvh* มีมากกว่า อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้เลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบหยาบโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ร่วมกับการตกตะกอนดีเอ็นเอมาใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการทดลองขั้นต่อไป โดยพิจารณาจากปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งอยู่ในระดับที่ผู้วิจัยยอมรับได้ วิธีการไม่ยุ่งยาก ใช้ระยะเวลาน้อย รวมทั้งการลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย เช่น ฟีนอล

เมื่อนำวิธีการสกัดแบบหยาบโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ร่วมกับการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอลไปใช้ได้เพื่อตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR สำหรับตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม พบว่าความไวของเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เป็น 100 CFU ต่อกรัม อย่างไรก็ตามเมื่อนำตัวอย่างหอยนางรมมาผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนการทำ PCR พบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้งสองนี้ได้แม้มีเซลล์เริ่มต้นในตัวอย่างหอยนางรมอยู่น้อยมากเพียง 1-10 CFU ต่อกรัม ซึ่งพบว่าขั้นตอนเพิ่มปริมาณเชื้อถูกนำไปใช้ในหลายงานวิจัยเช่น รายงานการวิจัยของ Panicker *et al.* (2004) ตรวจสอบ *Vibrio* spp. ในตัวอย่างหอยนางรม ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ โดย multiplex PCR พบว่าสามารถตรวจพบ *Vibrio* spp. ที่อยู่ในตัวอย่าง หอยนางรมเมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (โดยมีเซลล์เริ่มต้นก่อนการเพิ่มปริมาณเชื้อเท่ากับ 1 CFU ต่อกรัม) รายงานวิจัยของ Kumar *et al.* (2006) พัฒนาเทคนิค PCR ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยมียีนเป้าหมายเป็น *gryB* พบว่าความไวของการตรวจสอบโดยไม่ผ่านขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณเชื้อมีค่าเป็น 300 CFU ต่อกรัม ในขณะที่หากมีการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนใน APW เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ความไวการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้สูงขึ้นเป็น 30 CFU ต่อกรัม นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Wang and Levin (2006) ซึ่งใช้เทคนิค real time PCR ในการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้ในหอยแครง (*Protochaca staminea*) โดยพบว่าหากไม่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ ความไวของการตรวจสอบมีค่าประมาณ 100 CFU ต่อกรัม และหากมีการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ความไวของการตรวจสอบมีค่าเป็น 1 CFU ต่อกรัม ในขณะที่รายงานของ Takahashi *et al.* (2005) ซึ่งใช้เทคนิค real time PCR ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลและหอยนางรม แสดงค่าความไวของการตรวจสอบเป็น 10 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและรายงานของ Bej *et al.* (1999) ซึ่งใช้เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ใน

การตรวจ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างหอยทะเล ที่ผ่านผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่เติมลงในตัวอย่างหอยนางรมเท่ากับ 1 CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง

อย่างไรก็ตามถึงแม้ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อสามารถช่วยให้ประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อทั้งสองมีความไวที่สูงขึ้น แต่อาหารเลี้ยงเชื้อ APW ที่ใช้เพิ่มปริมาณเชื้อนั้นไม่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างได้ ดังนั้นเชื้อเป้าหมายและเชื้ออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนจึงเจริญได้เช่นกันซึ่งเชื้อเหล่านั้นอาจจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมายที่ต้องการตรวจได้ ดังนั้นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้ออาจต้องใช้อาหารที่เป็น selective enrichment ของเชื้อที่ต้องการตรวจเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นและให้การตรวจสอบเชื้อเป้าหมายมีประสิทธิภาพมากขึ้น

การพัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์มาใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยเฉพาะ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ก่อโรคและไม่ก่อโรค ซึ่งเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้อย่างแม่นยำและรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งต้องใช้เวลาและแรงงานในการตรวจสอบมาก กล่าวคือต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ คือ การนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว การทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีประมาณ 10-15 ชุดทดสอบ และขั้นยืนยันผลทางเซอโรโลยี ซึ่งการทดสอบเสร็จสิ้นต้องใช้เวลา 4-5 วันในการตรวจสอบ ในกรณีของ *V. parahaemolyticus* หากต้องการบ่งชี้ถึงความสามารถในการก่อโรค ได้แก่การสร้าง thermostable direct hemolysin (TDH) การตรวจแบบดั้งเดิมต้องตรวจสอบบนอาหาร Wagatsuma agar โดยสังเกตจากการเกิด β-hemolysis การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ต้องใช้เลือดคนหรือเลือดกระต่ายที่ใหม่ (อายุน้อยกว่า 24 ชั่วโมง) ซึ่งเป็นปัญหาลำบากต่อการเตรียม และผลที่ได้จากการทดสอบมักเกิดปัญหาผลบวกปลอม (Karunasagar, Karunasagar, and Kumar, 2002) สำหรับ *V. vulnificus* นั้น การที่จะระบุว่าเป็นสายพันธุ์ก่อโรคหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย กล่าวคือความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้มีหลายปัจจัย (multifactorial)เข้ามาเกี่ยวข้อง มิได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเท่านั้น (Strom and Paranjpye, 2000) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคสามารถเปลี่ยนเป็นสายพันธุ์ก่อโรคได้ และในขณะเดียวกันสายพันธุ์ก่อโรคก็มีการสูญเสียความสามารถดังกล่าวได้ (Dalsgaard, nd.; Strom and Paranjpye, 2000) การตรวจสอบที่สามารถบ่งชี้ความเป็น *V. vulnificus* จึงมีความสำคัญ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการพัฒนาเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาใช้ตรวจสอบ เช่น PCR แบบมัลติเพล็กซ์ ซึ่งสามารถตรวจเชื้อทั้งสองชนิดนี้ได้พร้อม ๆ กัน จึงช่วยให้การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เป็นไปได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

ในงานวิจัยนี้ เทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิด คือ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้ผ่านการทดสอบยืนยันความเชื่อถือสำหรับการนำไปใช้ได้จริง ซึ่งมีความสะดวก รวดเร็ว มีความแม่นยำและความไวในการตรวจสอบสูง ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้เป็นเครื่องมือเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลสำหรับนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อ การส่งเสริมให้เกิดสุขาภิบาลที่ดี และลดปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่เกิดจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

วัชรี อัตถทิพพหลคุณและมนตรี อัตถทิพพหลคุณ. (2536). *ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำ. (2549). *วิธีวิเคราะห์ Vibrio parahaemolyticus*. กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง. วันที่ค้นข้อมูล 6 กุมภาพันธ์ 2550. เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/rgmsamutsa /AnalysisMethod/MicrobiologicalMethod/ Vpara.pdf

สุดารัตน์ สวนจิตร. (2546). *เอกสารประกอบการสอนวิชา 305412 พันธุวิศวกรรม*. ชลบุรี: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศรีวรรณา หัทยานานนท์. (ม.ป.ป.). ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค: *Vibrio parahaemolyticus*. วันที่ค้นข้อมูล 6 กุมภาพันธ์ 2550. เข้าถึงได้จาก http://webdb.dmsc. moph.go.th/ ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1134

ศรีวรรณา หัทยานานนท์, กฤษณา ภูริกิตติชัย, กรองแก้ว ศุภวัฒน์ และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ. (2549). มหันตภัยจากเชื้อ *Vibrio vulnificus*. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

อิโนะอุเอะ ฟุจิโอะ และ สุวิมล กีรติพิบูล. (2546). *จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น).

Alam, M. J., Tomochika, K. I., Miyoshi, S. I., and Shinoda, S. (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 208, 83-87.

Abolmaaty, A., Gu, W., Witkowsky, R., and Levin, R. E. (2007). The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 349-352.

Angela, D. P., Giuseppina, C., Rita, D. C., Lucia, N., Valentina, T. (in press). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in Southern Italy shellfish. *Food Control*.

Antonio, L. L., Torres, J., Carlos, R. O., and Jaime, M. U. (2003). Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letter*, 226, 281-284.

Aono, E., Sugita, H., Kawasaki, J., Sakakibara, H., Takahashi, T. Endo, K., and Deguchi, Y. (1997). Evalution of the polymerase chain reaction method for identification of *Vibrio*

vulnificus isolated from marine environments. *Journal of Food Protection,* 60, 81-83.

Arias, C. R., Garay, E., and Aznar, R. (1995). Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3476-3478.

Banerjee, S., Pandian, S., Todd, E. C., and Farber, J. M. (2002). A rapid and improved method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* strains grown on hydrophobic grid membrane filters. *Journal of Food Protection*, 65, 1049-1053.

Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C. L., Jones, D. D., and Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl, tdh* and *trh. Journal of Microbiological Methods*, 36, 215-225.

Bilung, L. M., Radu, S., Bahaman, A. R., Rahim, R. A., Napis, S., Ling, M. W. C. V., Tanil, G. B., and Nishibuchi, M. (2005). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 252, 85-88.

Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Bowen, M. D., Meyer, R. F., and DePaola, A. (2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 149-155.

Brauns, L.A., Hudson, M.C., and Oliver, J. (1991). Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Applied and environmental Microbiology*, 57, 2651-2655.

Buenaventura, E., Wong, C., and Liu, J. (2006). Specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) based on the *R72H* taxonomic marker and the hemolysin genes *tdh* and *trh. Health Products and Food Branch*, 23, 1-8.

Campbell, M. S., and Wright, A. (2003). Real- time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7137-7144.

Coleman, S. S., Melanson, D. M., Biosca, E. G., and Oliver, J. D. (1996) Detection of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 in eels and oysters by PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1378-1382.

Dalsgaard,A. (nd). *Vibrio vulnificus. Culture*. 23, 5-8.

David, D. M. and Dowhan, D. (2002). *Current protocol in molecular biology*. John Wiley & Sons.

Deepanjali, A., Kumar, H. S., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the Southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3575-3580.

DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C. A., Tenge, B.J., Nordstrom, J. L., Wella, J., Puhr, N., and Gendel, S. M. (2003). Molecular, serological and virulent characteristics of *V. parahaemolyticus* isolated from environment, food and clinical sources in North America and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3999-4005.

Department of Food Technology and Nutrition, Mahasarakham University. (2007). Retrieved February 16, 2007, from http://www.techno.msu.ac.th/ fn/ecenter/pathogens /vibrio_parahaemolyticus.htm.

Dileep, V., Kumar, H. S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. (2003). Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafood and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology,* 36, 423-427.

Dobel, S., Palludan, E., and Jensen, F. (nd). Danish Environmental Protection Agency, Danish Miniatry of the Environment: *Vibrio vulnificus in Denmark.* Retrieved June 24, 2007, from http://www2.mst.dk/udgiv/Publications/1999/87-7909-344-2/html/samfat_eng.htm

EHA Consulting Group. (nd). *Vibrio parahaemolyticus* February 12, 2008, from http://www.ehagrop.com/epidemiology/illnesses/vibrio-parahaemolyticus.asp

Gordon, K.V., Vickery, M.C., DePaola, A., Staley, C., and Harwood, V. J. (2008). Real-time PCR assay for quantification and differentiation of Vibrio vulnificus strains in oyster and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1704-1709.

Goldenberger, D., Perschli, I., Ritzler, M., and Altwegg, M. (2007). A simple "Universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods and Applications*, 4, 368-370.

Guvenner, Z. T., and McCarter, L. L. (2003). Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 185, 5431-5441.

Gulig, P. A, and Bourdage, K. L., and Stark, A. M. (2005). Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *The Journal of Microbiology*, 43, 118-131.

Genome Information Research Center. (2006). *Vibrio parahaemolyticus*. Retrieved February 16, 2007, from http://genome.naist.jp/bacteria/vpara/images/vpem.jpg

Genome Informatin Research Center. (2003) *V. parahaemolyticus* genomic project Retrieved

February 12, 2008, from http://www.genome.naist.jp/bacteria/vpara/

Genetic Science Learning Center. (nd). How does it work February 12, 2008, from http://learn.genetic.utah.edu/units/activities/wheatgerm/bachground.cfm

Harwood, V.J., Gandhi, J.P., and Wright, A.C., (2004). Method for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *Journal of Microbiological Method*s, 59, 301-316.

Hill, W.E., Keasler, S.P., Truckseess, M.W., Feng, P., Kaysner, C.A., and Lampel, K.A. (1991). Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 707-711.

Honda, T., and Iida, T. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysin. *Reviews of Medical Microbiology*, 4, 106-113.

Hui, Y. H. (1994). *Foodborne disease handbook : Diseases caused by bacteria*. New York: Marcel Dekker.

Humada, D., Higurashi, T., Mayanagi, K., Miyata, T., Fukui, T., Lida, T., Honda, T., and Yanagihara, I. (2007). Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle X-ray scattering and electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 365, 187-195.

Karunasagar, I., Karunasagar, I., and Kumar, H. S. (2002). Molecular methods for rapid and specific detection of pathogens in seafood. *Aquaculture*, 7, 34-36.

Kasai, H., Ezaki, T., and Harayama, S. (2000). Differentiation of phylogenetically related slowly growing *Mycobacteria* by their *gyrB* sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 301-308.

Kaysner, C.A. and DePaola, A. Jr. (2001). *Compendium of method for the microbiological examination of food.* Washington, DC: American Public Health Association.

Kelly, M. T. and Stroh, E. M. (1989). Urease-positive Kanakawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2820-2822.

Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., and Takahashi, N. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology,* 37, 1173-1177.

Kim, M. S. and Jeong, H.D. (2001). Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the

detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environment. *Aquaculture*, 193, 199-211.

Krieg, N. R. and Holt, J. G. (1989). *Bergey's of manual of determinative bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkin Company.

Kumar, H.S., Parvathi, A., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. (2006). A *gryB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 216-220.

Lavintman, N., and Cardini, C. E. (1972). Effect of cetyltrimethylammonium bromide on the activity of particulate stsrch synthetase from potato tuber. *Plant Physiology*, 50, 205-207.

Lee, C., Chen, L. H., Liu, M. L., and Su, Y. C. (1992). Use of an oligonucleotide probe to detect *Vibrio parahaemolyticus* in artificially contaminated. *Applied and Environmental Microbiology,* 85, 3419-3422.

Lee, S. E., Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, H. S., Shin, J. H., Choi, S. H, Chung, S. S, and Rhee, J. H. (1998). Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2887–2892.

Lee, J., Jung, D., Eom, S. Oh, S., Kim, Y., Kwak, H., and Kim, Y. (2008). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. *Food Control*, 19, 990-994.

Lesmana, M., Subekti, D., Simanjuntak, C. H., Tjaniadi, P., Campbell, J. R., and Oyofo, B. A. (2001). *Vibrio parahaemolyticus* associated with Cholera-like diarrhea among patients in North Jakarta, Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*, 39, 71-75.

Linkous, D. A., and Oliver, J. D. (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus. FEMS Microbiology.* 174, 207-214.

Luan, C., and Levin, R. E. (2008). Use of activated carbon coated with bentonite for increasing the sensitivity of PCR detectionof *Escherichia coli* O157:H7 in Canadian oyster (*Crassostrea gigas*) tissue. *Journal of Microbiological Methods*, 72, 67-72.

Maugeri, T. L., Carbone. M., Fera, M. T., and Gugliandolo, C. Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and planktonof a coastal zone of the Mediterranean sea. *Research in Microbiology*, 157, 194-200.

Maurer, J. (2006). *PCR Methods in Food.* New York: Springer.

Mahon, C. R., and Manuselis, G. (1995). *Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders.

McLaughlin, J. B., DePaola, A., Bopp, C. A., Martinek, K. A., Napolilli, N. P., Allison, C. G., Murray, S. L., Thompson, E. C., Bird, M. M., and Middaugh, J. P. (2005). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *The New England Journal of Medicine*, 353, 1463-1470.

McCarthy, S. A., DePaola, A., Cook, D. W., Kaysner, C. A., and Hill, W. E. (1999). Evaluation of alkaline phosphatase- and digoxigenin-labelled probes for detection of the thermolabile (*tlh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 66-70.

Nhung, P. H., Ohkusu, K., Miyasaka, J., Sun, X. S,. and Ezaki, T. (2007). Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 59, 271-275.

New Zealand Food Safety Authority. (May 2001). Retrieved June 24, 2007, from http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/vibrio-vulnificus.pdf

Nishibuchi, M., Hill, W. E., Zon, G., Payne, W. L., and Kaper, J. B. (1986). Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect Kanakawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 23, 1091-1095.

Nishibuchi, M., Ishibashi, M., Takeda, Y., and Kaper, J. B. (1985). Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infection Immunology,* 49, 481-486.

Nordstrom, J. L., Vickery, C. L., Blackstone, G. M., Murray, S. L., and DePaola, A. (2007). Development of a Multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5840-5847.

Ottaviani, D., Santarelli, S., Bacchiocchi, S., Masini, L., Ghittino, C., and Bacchiocchi, I. (2005). Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strain in mussels from the Adriatic Sea, Italy. *Food Microbiology*, 22, 585-590.

Panicker, G., Vickery, M. C. L., and Bej, A. K. (2004). Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 911-922.

Paricker, G., Myers, M. L., and Bej, A. K. (2004). Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 498-507.

Panicker, G., Call, D. R., Krug, M. J., and Bej, K. (2004). Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7436-7444.

Park, K. W., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M. H., Lida, T., and Honda, T. (2004). Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus. Microbiology and Immunology*, 48, 313-318.

Parvathi, A., Kumar, S., Karunasagar, I. And Karunasagar. (2004). Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oyster from two estuaries along the Southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6909-6913.

Pillot, A. R., Guenole, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J. M., and Quilici, M. L. (2004). Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from water and raw shellfish collected in two French coastal and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 319-325.

Pinto, A. D., Ciccarese, G., Corato, R. D. Novello, L. and Terio, V. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. *Food Control*, 19, 1037-1041.

Provenzano, D., Schuhmacher, D. A., Barker, J. L., and Klose, K. E. (2000). The virulence regulatory protein *toxR* mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infection Immunology*, 68, 1491-1497.

Provenzano, D., Schuhmacher, D. A., Barker, J. L., and Klose, K. E. (2000). The virulence regulatory protein *toxR* mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infection Immunology*, 68, 1491-1497.

Public Health, Epidemiology and Food Safety Consultants. (n.d.). Retrieved February 16, 2007, from http://www.ehagroup.com/vibrio-parahaemolyticus.asp

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sigma product information sheet. Retrieved February 12, 2008, from http://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf

Shinoda, S., Nakahara, N., Ninomiya, Y., Itoh, K., and Kane, H. (1983). Serological method for identification of *Vibrio parahaemolyticus* from marine samples. *Applied and Environmental Microbiology,* 45, 148-152.

Stavric, S., and Buchanan, B. (1995, April). The isolation and identification of *Vibrio cholerae* 01 and NON-01 and from food. In *Health Protection Branch Ottawa: Government of Canada*. Retrieved February 16, 2007, from http://www.hc-sc.gc.ca/fn an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mflp72_e.pdf

Strom, M. S., and Paranjpye, R. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 2, 177-188.

Su, Y. C., and Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology,* 24, 549-558.

Subedi, P. H., Barnette, P., and Rakshit, S. K. (2005). Rapid detection of three pathogenic *Vibrio* species in Shrimp and Crab using multiplex PCR. In *The International Conference on Shrimp Biotechnology: New Challenges through Thai Shrimp Industry* (pp. 131-137).

Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H., Fukushima, S., Takano, J., Nishibuchi, M., and Takeda, Y. (1992). Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Molecular Cell Probes*, 6, 477-487.

Takahashi, H., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Kumagai, S., and Konuma, H., (2005). Development of a quantitative real time polymerase chain reaction targeted to the *ToxR* for detection of *Vibrio vulnificus. Journal of Microbiological Methods,* 61, 77-85.

Thompson, F., Austin, B., and Swing, J. (2006). *The biology of Vibrios*. Washington, DC: ASM Press

U.S. Food and Drug Administration. (2000). Interpretive Summary: Draft risk assessment on the Public Health Impact of Vibrio parahaemolyticus in raw molluscan shellfish. Retrieved February 16, 2007, from http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat/vprisksu.pdf

U.S. Food and Drug Administration. (2004). *Vibrio* : In *Bacteriological Analytical Manual (BAM) online.* Retrieved February 16, 2007, from http:// www. cfsan. fda.gov /~ebam/ bam-9.html.

Venkateswaran, K., Dohmoto, N., and Harayama, S. (1998). Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 681-687.

Vickery, M. C. L., Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., and DePaola A. (2003). Detection and quantification of total and potentially virulent *Vibrio parahaemolyticus* using a 4-channel multiplex real time PCR targeting the *tl*, *tdh*, and *trh* genes and a novel PCR internal control. *Cepheid*. Retrieved February 16, 2007, from http://www.cepheid.com/sites/cepheid/litpdfs/vibrio_quantification.pdf.

Vuddhakul, V., Bhoopong, P., Hayeebilan, F., and Subhadhirasakul, S. (2007). Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*, 24, 413-418.

Ward, L. N., and Bej, K. (2006). Detection *of Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with *Taq*Man fluorescent probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2031-2042.

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

Wikipedia. (2008) Cetyltrimethylammonium bromide. Retrieved February 12, 2008, from http://de.wikipedia.org/wiki/Cetyltrimethylammoniumbromid

Wikipedia. (2008) Sodium dodecyl sulfate. Retrieved February 12, 2008, from http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_lauryl_sulfate

Wong, H. C. (2003). Detecting and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 100-107.

Wu, Z., Lou, Y., Lu, Y. and Yan, J. Develpoment of quantitative real-time polymerares Chain Reaction for the detection of *Vibrio vulnificus* based on hemolysin (*vvhA*) coding system. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21, 296-301.

Xu, Q., Keiderling, T. A. (2004). Effect of sodium dodecyl sulfate on folding and thermal stability of acid-denatured cytochrome c: A spectroscopic approach. *Protein Science*, 13, 2949-2959.

Yamamoto, K., Honda, T., Miwatani, T., Tamatsukuri, S., and Shibata, S. (1992). Enzyme-labeled oligonucleotide probes for detection of the genes for thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) of *Vibrio parahaemolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 410-416.

Yamamoto, S., and Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Application Environment Microbiology*, 61, 1104-1109.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Alkaline peptone water (APW) (Difco™)

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตรปรับ pH เป็น 8.5 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS agar) (Difco™)

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium thiosulphate pentahydrate	10.0	กรัม
Trisodium citrate dehydrate	10.0	กรัม
Bile salts	8.0	กรัม
Sucrose	20.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
Ferric chloride	1.0	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร หลอมให้ละลาย ปรับ pH เป็น 8.6±0.2 ต้มจนเดือดประมาณ 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

3. Tryptic Soy Agar (Difco™)

Tryptone	15.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตรปรับ pH เป็น 7.3±0.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

1. 0.5 โมลาร์ Ethylene diamine tetraacetic (EDTA)

EDTA (disodium salt, MW = 372.24)	18.6	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

กวนสารละลายด้วย magnetic stirrer คอยเติมเกล็ด NaOH ลงจนกระทั่งได้ pH เท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA ละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. 10X Tris/EDTA (TE) buffer

2 โมลาร์ Tris-Cl, pH 8.0	25.0	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ EDTA	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	465.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 50X Tris-acetate-electrophoresis (TAE) buffer

Tris-base	242.0	กรัม
Glycial acetic acid	57.1	กรัม
0.5 โมลาร์ EDTA (pH 8.0)	100.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. 6X Gel loading-buffer

Bromophenol blue (MW=533.60)	0.25	กรัม
Xylene cyanol (MW=342.30)	0.25	กรัม
Sucrose	40.00	กรัม

นำ Sucrose ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Ethidium bromide stock solution (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่ง Ethidium bromide 250 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลิลิตร คนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งละลาย เก็บสารละลายไว้ในขวดที่ห้อด้วยอะลิเนียมฟอยด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. 1% CTAB

CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)	1.0	กรัม
5M NaCl	120.0	ไมโครลิตร

ละลาย CTAB และ NaCl ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. 2% CTAB

CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)	2.0	กรัม
5M NaCl	120.0	ไมโครลิตร

ละลาย CTAB และNaCl ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. 1% CTAB-TE

CTAB	1.0	กรัม
5M NaCl	28.0	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl	10.0	มิลลิลิตร
0.5M EDTA	4.0	มิลลิลิตร

ละลาย CTAB และ NaCl ใน TE buffer จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (Cullings, 1992)

9. 2% CTAB-TE

CTAB	2.0	กรัม
5M NaCl	28.0	มิลลิลิตร
.1M Tris-HCl	10.0	มิลลิลิตร
0.5M EDTA	4.0	มิลลิลิตร

ละลาย CTAB และ NaCl ใน TE buffer จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (Cullings, 1992)

10. SDS-Proteinase K lysis solution

20% SDS	8.75	ไมโครลิตร
20mg/ml Proteinase K	2.625	ไมโครลิตร
10X TE buffer	35	ไมโครลิตร

ผสม 20% SDS และ Proteinase K และTE bufferในน้ำกลั่นตามลำดับปรับปริมาตรให้ได้ 350 ไมโครลิตร

11. Phosphate- Buffered Saline (PBS)

Na_2HPO_4 (anhydrous)	12.0	กรัม
$NaH_2PO_4 . H_2O$	2.2	กรัม
NaCl	85.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

การทำอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส

การเตรียมอะกาโรส

1. ละลายอะกาโรสเจลให้มีความเข้มข้น 1.5% ใน 1XTAE buffer นำไปหลอมในไมโครเวฟจนอะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียสใส่ ethidium bromide ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เทอะกาโรสเจลที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงชุดถาดเจลที่มีหวีเสียบเตรียมไว้แล้วให้ได้ความหนาที่เหมาะสม
3. รอจนอะกาโรสแข็งตัวจึงดึงหวีออก

การทำอิเลคโตรโฟริซีส

1. นำอะกาโรสเจลที่เตรียมได้ใส่ลงใน electrophoresis chamber
2. เทสารละลายบัฟเฟอร์ (1XTAE) ให้ท่วมผิวหน้าเจล
3. นำผลิตภัณฑ์ PCR ผสมกับ loading buffer (6X) จากนั้นนำมาหยอดใส่ลงในช่องเจลที่เตรียมไว้
4. ต่อวงจรกระแสไฟฟ้าเข้าที่ chamber โดยให้ขั้วที่อยู่ด้านดีเอ็นเอตัวอย่างเป็นขั้วลบและด้านตรงข้ามเป็นขั้วบวก
5. เปิดกระแสไฟฟ้า โดยให้มีความต่างศักย์คงที่ที่ 60 โวลต์ (สังเกตสีของ loading buffer ให้เคลื่อนที่ไปประมาณกึ่งกลางเจลจึงทำการหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า)
6. ตรวจสอบแถบของชิ้นดีเอ็นเอจากการเรืองแสงภายใต้ UV โดยเปรียบเทียบขนาดกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ