บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 *Vibrio* spp.

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

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

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

2.2 ลักษณะทั่วไปและการก่อโรคของ *Vibrio* spp.

2.2.1 *Vibrio parahaemolytucus*

3853500410

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

2.2.2 *Vibrio cholerae*

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

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

2.2.3 *Vibrio vulnificus*

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

2.2.4 *Vibrio* spp. สายพันธุ์อื่นๆ

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

3853500410

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

2.3 วิธีการจำแนกเชื้อ *Vibrio* spp.

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

2.3.1 วิธีมาตรฐาน

2.3.1.1 Selective plating

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

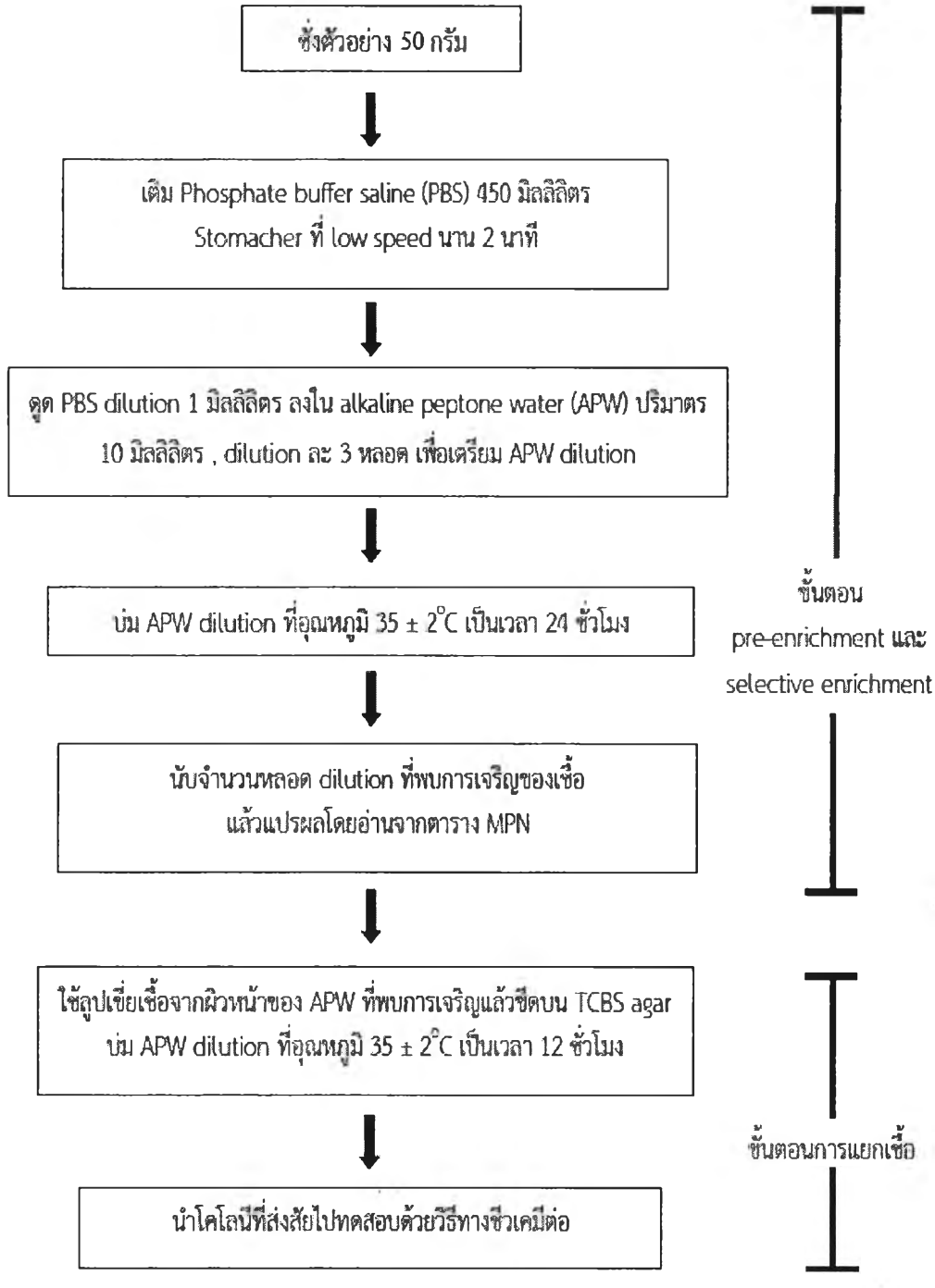
3853500410

ตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะใช้เวลานานกว่า 5 วันจึงจะทราบผลการตรวจสอบ ซึ่งเป็นข้อด้อยของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบอื่นๆดังจะกล่าวต่อไป

2.3.1.2 Most probable number (MPN)

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

3853500410



ภาพที่ 2.1 วิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีมาตรฐาน MPN

ที่มา : ดัดแปลงจาก US Food and Drug Administration (2004)

3853500410

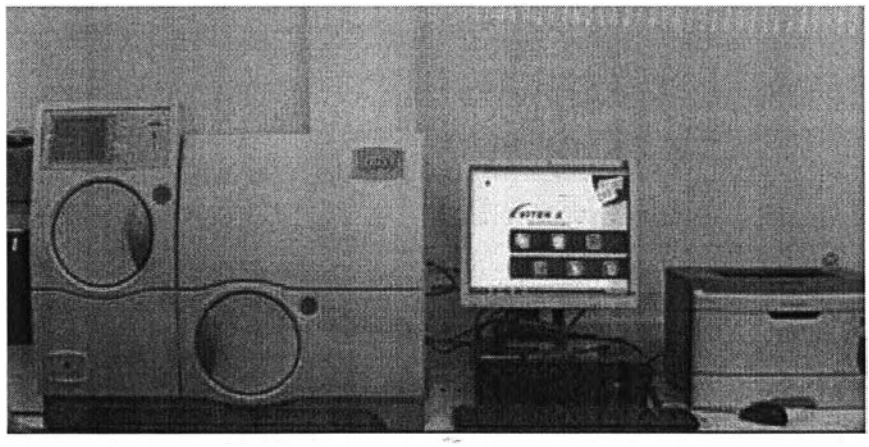
2.3.2 วิธีทางเลือก

คือ วิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อทำให้การทดสอบทำได้อย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่เป็นวิธีทางการค้า และบางวิธีก็ได้รับการรับรองพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการต่างๆดังต่อไปนี้

2.3.2.1 Biochemical identification test kit

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

3853500410



ภาพที่ 2.2 เครื่อง VITEK ®2 system

2.3.2.2 Dry rehydratable film method

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

3855500410

3853500410

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม Vibrionaceae ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล

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

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

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

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

Ka = Slant alkaline / Butt slightly acidic

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

3853500410

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม Vibrionaceae ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล (ต่อ)

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

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

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

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

Ka = Slant alkaline / Butt slightly acidic

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

2.3.2.3 Chromogenic medium

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

3855500410

2.3.2.4 Immunoassay

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

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

2.3.2.5 Nucleic acid hybridization

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

3853500410

ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ

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

3853500410

ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ (ต่อ)

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

3853500410

ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ (ต่อ)

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

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

385350410

2.4 Polymerase chain reaction (PCR)

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

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

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

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

เทคนิคพีซีอาร์ได้มีการพัฒนาและดัดแปลงให้มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ) ได้สูงขึ้นทั้งในเรื่องของปริมาณและความจำเพาะ ไม่จำกัดชนิดของสารพันธุกรรมที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ ลดปัญหาและอุปสรรคที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ปรับปรุงและลดขั้นตอนการปฏิบัติงานให้ง่ายและรวดเร็วขึ้น ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์ที่ได้มีการพัฒนาดัดแปลงได้แก่

3853500410

2.4.1 Nested PCR

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

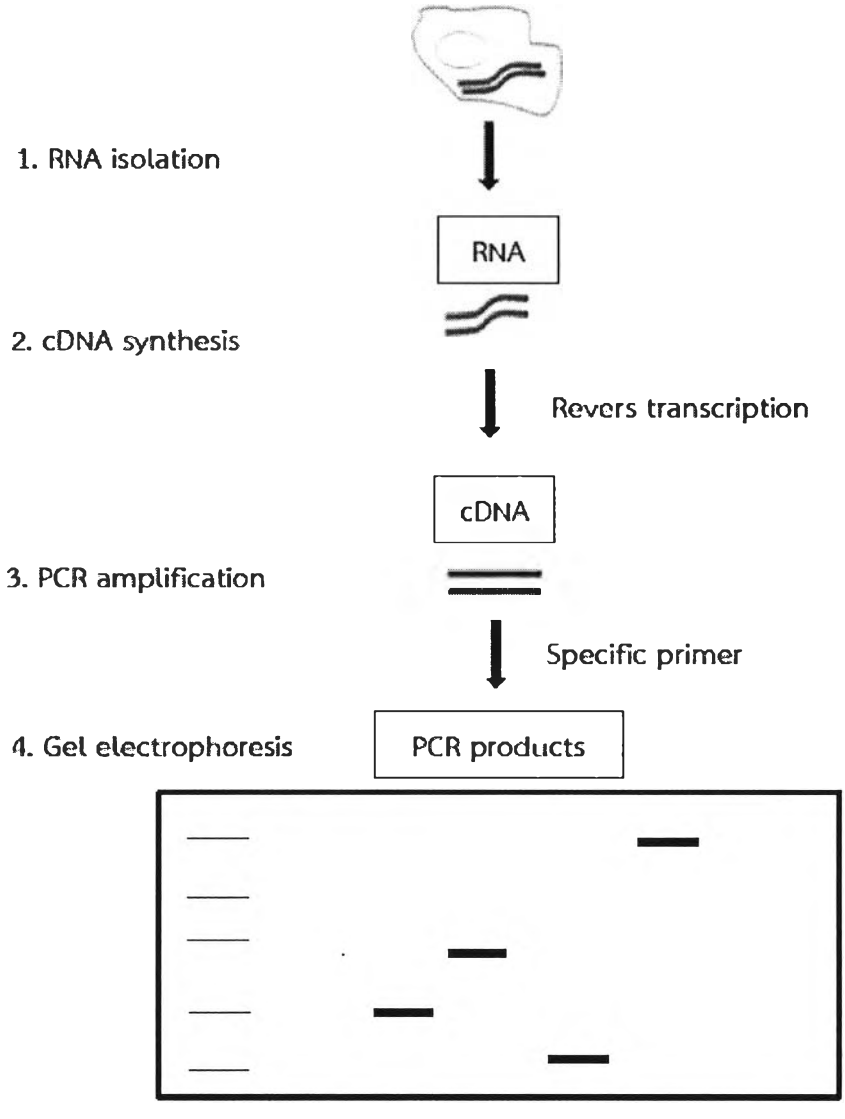
2.4.2 Multiplex PCR

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

2.4.3 Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

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

3853500410



ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนในการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค RT-PCR

ที่มา: ดัดแปลงจาก Adrover et al. (2010a)

2.5 การตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR

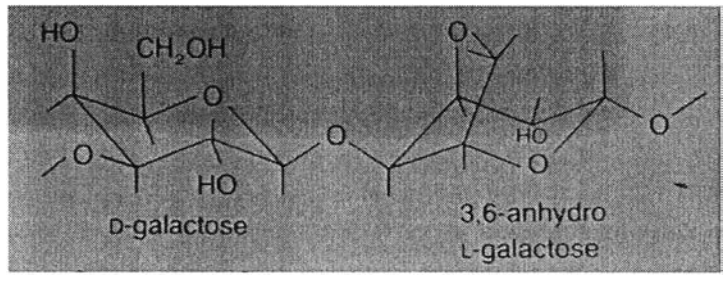
การตรวจผลิตผลพีซีอาร์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของผลิตผลพีซีอาร์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้วิเคราะห์ได้เพียงปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแต่ไม่สามารถระบุขนาดของดีเอ็นเอได้ (Saulnier et al., 2009) วิธี High performance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

2.5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Agarose Gel Electrophoresis)

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

3853500410

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลได้แก่ ขนาดโมเลกุลและโครงสร้างของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของอะกาโรส แสดงดังตารางที่ 2.3 ความต่างศักย์และองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ เป็นต้น



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของอะกาโรสเจล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Westermeier et al. (2001)

3853500410

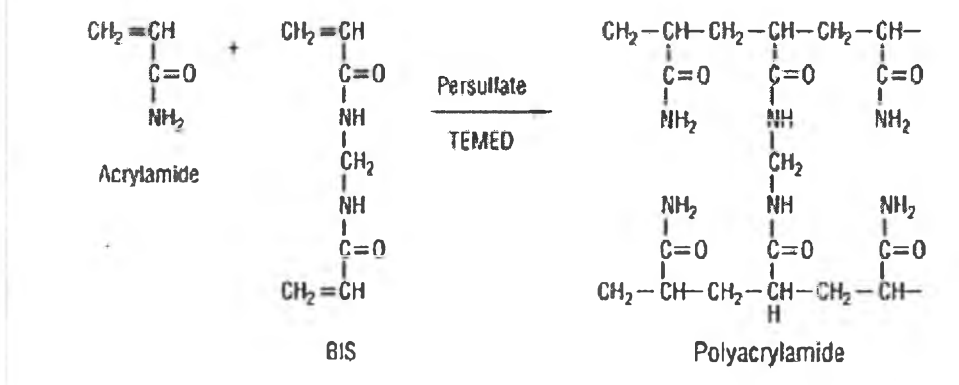
ตารางที่ 2.3 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้อะกาโรสเจลที่มีปริมาณอะกาโรสต่างๆกัน

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

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sambrook et al. (1989)

2.5.2 พอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

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



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของพอลิอะคลิลาไมด์เจล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Westermeier et al. (2001)

3853500410

ตารางที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของพอลิอะคลิลาไมด์เจลในการแยกดีเอ็นเอ

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

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bio-Rad. (2010)

2.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตผลพีซีอาร์

2.6.1 Sequencing analysis

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

2.6.2 DNA banding pattern

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

3853500410

มีการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยไม่ต้องทำการเลี้ยงเซลล์ก่อน แต่ทำการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากตัวอย่างโดยตรง และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้แก่ วิธีการ PCR-DGGE ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

2.7 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

2.7.1 หลักการของ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

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

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

3853500410

2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบนิเวศอาหาร

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

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

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

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

3853500410