ความไวและความถูกต้องของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ในน้ำทะเล

Sensitivity and Validity of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Sea Water

สุรีย์พร เอี่ยมศรี[1] และสุดารัตน์ สวนจิตร[2]

Sureeporn Aeamsri[1] and Sudarat Suanjit[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวและความถูกต้องของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับการตรวจ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ในน้ำทะเล ยีนเป้าหมายสำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* คือ *tl* (thermolabile hemolysin gene) และ *tdh* (thermostable direct hemolysin gene) ส่วนการตรวจสอบ *V. vulnificus* ใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hemolysin/cytolysin หรือ *vvh* เป็นเป้าหมาย พบว่าความไวของเทคนิคในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงจากน้ำทะเล คือ 100 cfu/ml การเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนการทำพีซีอาร์ 4-6 ชั่วโมง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจสอบได้ดีขึ้น การศึกษาความถูกต้องของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปใช้ได้จริง เมื่อนำเทคนิคดังกล่าวมาตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียเป้าหมายทั้งสองชนิดในน้ำทะเลธรรมชาติควบคู่กับการตรวจโดยวิธีดั้งเดิม พบว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มีประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อเป้าหมายได้มากกว่าวิธีดั้งเดิม ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ในน้ำทะเล โดยรายงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกของการพัฒนาและใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* พร้อมกันในน้ำทะเล ซึ่งทำให้การตรวจสอบเป็นได้อย่างสะดวกและรวดเร็วมากขึ้น

คำสำคัญ : มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ น้ำทะเล, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*

ABSTRACT

The sensitivity and validity of multiplex PCR for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in sea water were pursued. Multiplex reaction was carried out using three sets of primers targeting genes encoded thermolabile hemolysin (*tl*) and thermostable direct hemolysin (*tdh*) of *V. parahaemolyticus* as well as the one encoded hemolysin/cytolysin (*vvh*) of *V. vulnificus.* The sensitivity of direct detection of both bacteria in spiked sea water was shown as 100 cfu/ml. The detection efficiency

[1] โครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

was improved by the addition of 4-6 hour-enrichment step prior to multiplex PCR. Results analyzed from validation assay confirmed the approval of the technique. Multiplex PCR, which run parallel to the conventional method, was subsequently adopted for the detection of both target organisms in natural sea water. Detection results indicated the superior of the developed technique, which is highly efficient and applicable. This is the first time of report demonstrates the use of multiplex PCR for simultaneous detection of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in sea water. This technique could be defined as robustness and less time consuming.

Key Words : multiplex PCR, sea water, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*

E-mail : shigella_01@hotmail.com

คำนำ

Vibrio parahaemolyticus และ *Vibrio vulnificus* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae ย้อมติดสีแกรมลบ ต้องการเกลือในการเจริญ พบว่ามีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น น้ำทะเล ดินตะกอนและสัตว์ทะเล ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งสะสมเชื้อที่สำคัญที่นำไปสู่การติดเชื้อและการก่อโรค (Thompson *et al.,* 2006) แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญต่อการก่อโรคในมนุษย์ กล่าวคือ *V. parahaemolyticus* ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) สำหรับ *V. vulnificus* เมื่อเข้าสู่ร่างกายก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Primary septicemia) หรือพบการติดเชื้อที่บาดแผล (Wound infection) ซึ่งอาจพบอาการรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงในผู้ป่วยที่มีปัญหาระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคตับอักเสบเรื้อรัง (Izumiya *et al*., 2011) โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ในตัวอย่างอาหารทะเลสามารถทำได้โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก (Selective media) เช่น Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar, CHROMagar™ *Vibrio* และ Modified cellobiose-polymyxin B-colistin (mCPC) เป็นต้น และยืนยันผลด้วยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีหลายชนิด ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลา 3-5 วันในการรายงานผล อย่างไรก็ตามเนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะที่คล้ายกัน ทำให้การตรวจสอบด้วยวิธีนี้มีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดได้ ในปัจจุบันจึงมีความสนใจนำเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจสอบ โดยเฉพาะการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและมีความจำเพาะสูง โดยยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ *toxR* (นำรหัสการสร้าง Transmembrane regulatory protein) และ *tl* (Thermolabile hemolysin gene) สำหรับการบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้ยีน *tdh* (Thermostable direct hemolysin gene) และ *trh* (TDH-related hemolysin gene) (Kim *et al*., 1999; Bej *et al.,* 1999) ในขณะที่การตรวจสอบ *V. vulnificus* มักใช้ยีนเป้าหมายเป็น *vvh* (Hemolysin/ cytolysin gene) (Panicker *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ยีน 16S rDNA และ *gyrB* เป็นเป้าหมายในการตรวจสอบเชื้อชนิดนี้ด้วยเช่นกัน (Kim and Jeon, 2001; Kumar *et al*., 2006)

ในงานวิจัยนี้สนใจพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) เพื่อตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* พร้อมกันในน้ำทะเล โดยมีพื้นฐานของการศึกษาก่อนหน้านี้ (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2551) ที่ได้ทดสอบความจำเพาะของคู่ไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tl* ซึ่งใช้บ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด และยีน *tdh* ซึ่งใช้บ่งชี้สายพันธุ์ก่อโรคของเชื้อ และทดสอบความจำเพาะของคู่ไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *vvh* ซึ่งใช้บ่งชี้ *V. vulnificus* ทั้งหมด รวมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำเนินปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์และอุณหภูมิในขั้นตอนการลงเกาะของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ) ในการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสามยีนพร้อมกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำทะเลเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีพอสำหรับนำไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำข้อมูลดังกล่าวข้างต้นมาทำการศึกษาต่อเนื่อง โดยศึกษาความไวของเทคนิคและเปรียบเทียบความถูกต้อง (Validity) ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับวิธีดั้งเดิม (Conventional method) คือการเพาะแยกเชื้อและบ่งชี้โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน

จุดมุ่งหมายที่สำคัญของงานวิจัยนี้คือศึกษาความไวและความถูกต้องของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล รวมทั้งนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในน้ำทะเลธรรมชาติ ที่เก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเล ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความสำคัญทั้งในด้านการท่องเที่ยวและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแหล่งหนึ่งของภาคตะวันออก โดยคาดว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ทำให้การตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นไปด้วยความสะดวกรวดเร็วมากขึ้น เนื่องจากสามารถตรวจสอบเชื้อทั้งสองชนิดได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว และสามารถนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจติดตามแบคทีเรียทั้งสองในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเพื่อทำให้การเฝ้าระวังแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงและการเพาะเลี้ยง

ในการศึกษานี้ใช้ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 (tl^+, tdh^+) และ *V. vulnificus* DMST 19346 (vvh^+) ซึ่งได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA, Difco) ที่มีเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ตัวอย่างน้ำทะเล

น้ำทะเลที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 30 ตัวอย่าง เก็บมาจากบริเวณชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนเมษายนและพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2552 โดยที่บริเวณของการเก็บตัวอย่างเป็นเขตน้ำขึ้นน้ำลง การเก็บตัวอย่างทำในช่วงน้ำขึ้น โดยเก็บน้ำจากบริเวณผิวหน้าน้ำที่ระดับความลึก 0-5 เซนติเมตร ใส่ในขวดปราศจากเชื้อ เก็บรักษาในกล่องน้ำแข็งและนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการทันที

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

คู่ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายคือ *tl* และ *tdh* และคู่ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบ *V. vulnificus* มีความจำเพาะต่อยีน *vvh* ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	Tm (°C)	Target genes	Amplicon size (bp)	Reference
L-*tl1*	AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG	70	*tl*	450	Bej *et al*.,
R-*tl2*	GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	68			1999
L-*tdh*	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC	66	*tdh*	269	Bej *et al*.,
R-*tdh*	TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	68			1999
F-*vvh*	TTC CAA CTT CAA ACC GAA CTA TGA	66	*vvh*	205	Panicker
R-*vvh*	ATT CCA GTC GAT GCG AAT ACG TTG-	70			*et al*., 2004

การศึกษาความไวของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล

เติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 ลงในตัวอย่างน้ำทะเล (25 ml) โดยให้มีปริมาณเซลล์แต่ละชนิดที่ระดับ 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 และ 1 cfu/ml เติม Alkaline peptone water (APW, Difco) ลงในตัวอย่างน้ำทะเล ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างทุกชุดการทดลองปริมาตร 1 ml มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS-Proteinase K lysis solution (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอ และชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) ใช้สารละลายดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 เป็นแม่แบบ (ประมาณ 100 ng)

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enrichment) ก่อนการตรวจสอบโดยมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

เติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 ลงในตัวอย่างน้ำทะเล (25 ml) โดยให้มีปริมาณเซลล์แต่ละชนิดที่ระดับ 1 cfu/ml เติม APW ลงในตัวอย่างน้ำทะเล ผสมให้เข้ากัน นำไปเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 °C ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอและทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ชุดควบคุมเชิงลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอ และชุดควบคุมเชิงบวกใช้สารละลายดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 (ประมาณ 100 ng)

การสกัดดีเอ็นเอ (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552)

นำตัวอย่าง 1 ml มาปั่นเหวี่ยง เก็บตะกอนเซลล์และนำมาเติม SDS-Proteinase K lysis solution (0.5% SDS, 0.15 mg/ml ProtenaseK, 1xTE buffer) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล และละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1x TE buffer นำดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552)

องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (50 µl) ประกอบด้วย 1x V*i*BufferA (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 0.01% Triton™X-100) 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM oligonucleotide primer (แต่ละเส้น) 2.5 U *Taq* DNA Polymerase (V*i*vant*i*s) และดีเอ็นเอแม่แบบ ปริมาตร 5 µl โดยมีสภาวะสำหรับการดำเนินปฏิกิริยาดังนี้ Initial denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่ 63 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นการดำเนินปฏิกิริยา ตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส (อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ใช้ Tris-acetate EDTA เป็นบัฟเฟอร์) ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *tl, tdh* และ *trh* มีขนาด 450 bp 269 bp และ 205 bp ตามลำดับ

การศึกษาความถูกต้อง (Validity) ของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

กำหนดให้ใช้ตัวอย่างน้ำทะเล 60 ตัวอย่าง สำหรับศึกษาความถูกต้องของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานดั้งเดิมสำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล โดยจัดแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 ชุด ซึ่งแต่ละชุดมีการเติมเชื้อในปริมาณต่างกัน ชุดละ 20 ตัวอย่าง คือ (1) ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ (2) ตัวอย่างที่มีเชื้ออยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำ 1-10 cfu และ (3) ระดับความเข้มข้นสูง 100-1000 cfu นำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจวิเคราะห์เชื้อ ทั้งสองชนิดโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Alternative method) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Standard method) ซึ่งอาศัยการเพาะแยกเชื้อบริสุทธิ์และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (ISO/TS21872: 2007) วิเคราะห์ค่าความแม่นยำ ความจำเพาะและความไว (The European Standard EN ISO 16140, 2003) ซึ่งเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถยอมรับให้นำมาใช้ได้จริงเมื่อมีค่าดังกล่าวมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล

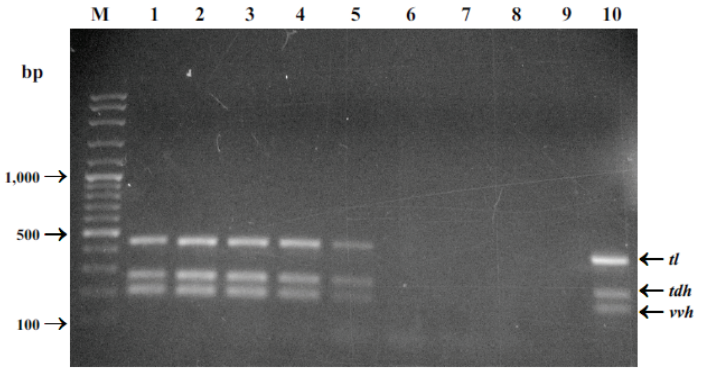
นำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่ผ่านการตรวจสอบและยอมรับให้นำมาใช้ได้ มาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล โดยนำน้ำทะเลปริมาตร 25 ml เติม APW ปริมาตร 225 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำทะเลที่บ่มแล้วปริมาตร 1 ml นำไปสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบการมีอยู่ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ในอีกทางหนึ่งนำน้ำทะเลตัวอย่างเดียวกันที่ผ่านการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาขีดแยกเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Difco)

บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 °C คัดเลือกโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ซึ่งมีสีเขียว กลม ขนาด 2-3 มิลลิเมตร มาขีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะเซลล์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (ISO/TS21872: 2007)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความไวของปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างน้ำทะเลโดยตรง

จากการจำลองการปนเปื้อนของน้ำทะเลโดยเติมเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 ในปริมาณต่าง ๆ จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ พบว่าสามารถตรวจสอบได้เมื่อมีเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดอยู่อย่างน้อย 100 cfu/ml (ภาพที่ 1)



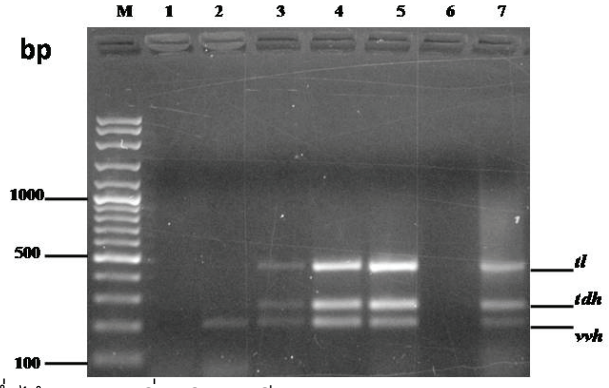
ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* จากตัวอย่างน้ำทะเลที่เติมเชื้อทั้งสองชนิดในปริมาณต่าง ๆ M: 100 bp sharp DNA marker (0.5 µg) 1-8: น้ำทะเลที่เติมเชื้อแต่ละชนิดปริมาณตั้งแต่ 10^6 ถึงน้อยกว่า 1 cfu/ml ตามลำดับ 9: ชุดควบคุมเชิงลบ และ 10: ชุดควบคุมเชิงบวก

ความไวของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้โดย Panicker *et al.* (2004) ซึ่งพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์แบบ real time สำหรับตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลโดยอาศัยยีน *vvhA* เป็นเป้าหมาย พบว่าเทคนิคนี้มีความไวเป็น 100 cfu/ml และรายงานวิจัยของ Gordon *et al.* (2008) ซึ่งพบว่ามีความไวของตรวจสอบ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล โดยอาศัยยีน 16S rDNA เป็นเป้าหมาย มีค่าเท่ากับ 100 cfu/ml เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม Rizvi and Bej (2010) ซึ่งพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์แบบ real time สำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเล โดยอาศัยยีน *tl* *tdh* และ *trh* เป็นเป้าหมาย พบว่ามีความไวของการตรวจสอบอยู่ที่ระดับ 10^6 cfu/ml รายงานการศึกษานี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกของการใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล

ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลก่อนตรวจสอบโดยมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

น้ำทะเลที่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ลงไปในปริมาณ 1 cfu/ml เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณเป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจพบเชื้อทั้งสองชนิดได้หลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) สำหรับเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนนำมาตรวจโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์นี้คือประมาณ 6 ชั่วโมง

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อถูกนำมาใช้ในหลายงานวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมาย เช่น งานวิจัยของ Rizvi and Bej (2010) พบว่าสามารถตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้โดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์แบบ real time เมื่อนำตัวอย่างน้ำทะเลไปผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นก่อนการเพิ่มปริมาณเชื้อเท่ากับ 1 cfu/ml) และรายงานของ Panicker *et al.* 2004 ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบ *V. vulnificus* ในตัวอย่างน้ำทะเลที่มีเชื้อเริ่มต้นเพียง 1 cfu/ml ได้ ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นขั้นตอนที่ช่วยในการฟื้นตัวและเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายซึ่งสามารถลดการเกิดผลลบปลอม (Zhou *et al.*, 2007) เนื่องจากในตัวอย่างอาจมีเชื้ออยู่น้อยกว่าระดับความไวของเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบ อีกทั้งการตรวจสอบเชื้อจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยตรง เช่น น้ำทะเล มีความเป็นไปได้ที่เชื้อเป้าหมายจะอยู่ในภาวะเครียดและได้รับบาดเจ็บเนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เชื้ออาศัยอยู่ ทำให้มีโอกาสของการตรวจไม่พบเชื้อ



ภาพที่ 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *tl* และ *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvh* ของ *V. vulnificus* จากน้ำทะเลโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ภายหลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลาต่าง ๆ โดย M: 100 bp sharp DNA marker (0.5 µg), 1-5: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากน้ำทะเลที่เติมเซลล์แบคทีเรียทั้งสองชนิด ในปริมาณชนิดละ 1 cfu/ml และนำไปผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ, 6: ชุดควบคุมเชิงลบ และ 7: ชุดควบคุมเชิงบวก

ความถูกต้อง (Validity) ของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

จากการศึกษาความถูกต้องของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล โดยศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานคือการ

เพาะแยกเชื้อ พบว่าการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดโดยใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่าความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไวเท่ากับ 100 % (ตารางที่ 2) จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถยอมรับให้นำไปใช้จริงได้

ตารางที่ 2 ความถูกต้องของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจมาตรฐาน (การเพาะแยกเชื้อ)

การประเมิน	**ความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมาย**	
	V. parahaemolyticus	*V. vulnificus*
Relative accuracy (AC)*	100	100
Relative specificity (SP)*	100	100
Relative sensitivity (SE)*	100	100

* วิเคราะห์ตามวิธีที่แสดงไว้ใน The European Standard EN ISO 16140 (2003)

การตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล

เมื่อทดลองนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลธรรมชาติ จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยศึกษาเปรียบเทียบกับการใช้วิธีตรวจสอบแบบดั้งเดิม (การเพาะแยกเชื้อ) ควบคู่ไปด้วย ผลการศึกษาพบ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ (100 %) โดยการตรวจสอบทั้งสองวิธีให้ผลที่ตรงกัน ในขณะที่การตรวจสอบ *V. vulnificus* พบว่าวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ตรวจพบเชื้อในน้ำทะเลจำนวน 13 ตัวอย่าง (43.3 %) ส่วนวิธีดั้งเดิมตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้เพียง 9 ตัวอย่าง (30 %) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และวิธีการตรวจสอบดั้งเดิม (การเพาะแยกเชื้อ)

เทคนิค	**จำนวนตัวอย่าง**	**จำนวนตัวอย่าง (%) ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อเป้าหมาย**	
		V. parahaemolyticus	*V. vulnificus*
เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์	30	30 (100)	13 (43.3)
วิธีการตรวจสอบดั้งเดิม	30	30 (100)	9 (30)

จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ในกรณีของ *V. vulnificus* วิธีการตรวจสอบเชื้อแบบดั้งเดิมซึ่งอาศัยการเพาะแยกเชื้อ มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบต่ำกว่าการตรวจด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ อย่างไรก็ตาม พบว่าโดยปกติแล้วการแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทะเล และอาหารทะเล มีโอกาส

ประสบความสำเร็จน้อย เนื่องจากมีรายงานว่าเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะที่ยังคงมีชีวิต แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Viable but non-culturable; VBNC) ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อนี้จากตัวอย่างที่ศึกษาได้ นอกจากนี้การใช้วิธีตรวจสอบแบบดั้งเดิมนั้นอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิดคัดเลือก (Selective medium) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ประกอบด้วยสารเคมีบางชนิดที่สามารถกดการเจริญของเชื้อที่มีภาวะบาดเจ็บ ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ ส่งผลให้ไม่สามารถคัดแยกเชื้อได้ (Toze, 1999) จึงปรากฏผลลบในการตรวจสอบ แต่การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นการตรวจที่โมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งไม่จำเป็นต้องอาศัยการเจริญของเชื้อเป้าหมาย หากมีเชื้อนั้นอยู่ในระดับที่ความไวของเทคนิคสามารถตรวจสอบได้

ดังนั้นเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้จึงมีประสิทธิภาพสูงในการบ่งชี้การมีอยู่ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลได้พร้อมกัน ซึ่งนอกจากมีความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวสูงแล้ว ยังสะดวกและรวดเร็ว กระบวนการตรวจสอบใช้ระยะเวลารวมทั้งหมดประมาณ 8 ชั่วโมง โดยลดขั้นตอนการเพาะแยกเชื้อและการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี เทคนิคนี้จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจติดตามและเฝ้าระวังแบคทีเรียทั้งสองชนิดในน้ำทะเลได้

สรุปผลและเสนอแนะ

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงในน้ำทะเล มีความไวของการตรวจสอบเชื้ออยู่ที่ระดับ 100 cfu/ml การเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ก่อนดำเนินปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจสอบได้มากขึ้น โดยสามารถตรวจสอบเชื้อได้แม้ว่ามีเชื้อเริ่มต้นเพียง 1 cfu/ml เมื่อประเมินค่าความถูกต้องของเทคนิคดังกล่าวพบว่าสามารถยอมรับให้นำมาใช้ได้ โดยมีค่าความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวของเทคนิคเท่ากับ 100 % เมื่อนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลจำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง โดยทำควบคู่กับการตรวจสอบโดยวิธีดั้งเดิม พบว่าวิธีทั้งสองให้ผลการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ตรงกัน โดยพบการปนเปื้อนในน้ำทะเลทุกตัวอย่าง (100 %) อย่างไรก็ตามเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ตรวจพบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลจำนวน 13 ตัวอย่าง (43.3 %) แต่เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีดั้งเดิม พบเชื้อ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลเพียง 9 ตัวอย่าง (30 %) ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบและบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลซึ่งเป็นแหล่งของการแพร่กระจายของเชื้อทั้งสองที่สำคัญแหล่งหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

สุดารัตน์ สวนจิตร, อภิรดี ปิลันธนภาคย์ และสุรีย์พร เอี่ยมศรี. (2552). การตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ในหอยนางรมและสภาพแวดล้อมชายฝั่งทะเลเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์: รายงานวิจัย. ชลบุรี: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

Bej, A. K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. L. Vickery, D. D. Jones, and C. A. Kaysner. 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.

ISO/TS 21872. 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.

ISO 16140. 2003. Protocol for the validation of alternative method.

Izumiya, H., K. Matsumoto, S. Yahiro, J. Lee, M. Morita, S. Yamonaoto, E. Arakawa, and M. Ohnishi. 2011. Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholera, Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Molecular and Cellular Probes** 25: 174-176.

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

Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto and N. Takahashi. 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 H. D. Jeong. 2001. Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environment. **Aquaculture** 193: 199-211.

Kumar, H. S., A. Parvathi, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 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.

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

Rizvi, A.V. and K. Bej. 2010. Multiplexed real-time PCR amplification of *tlh, tdh,* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and its rapid detection in shellfish and Gulf of Mexico water. **Antonie van Leeuwenhoek** 98: 279-290.

Thompson, F., B. Austin and J. Swing. 2006. **The biology of Vibrios**. Washington, DC: ASM Press.Toze, S. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water Research** 17: 3545-3556.

Zhou, S., Z. Hou, N. Li, and Q. Qin. 2007. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. **Journal of Applied Microbiology** 103: 1897-1906.