

บทที่ 4

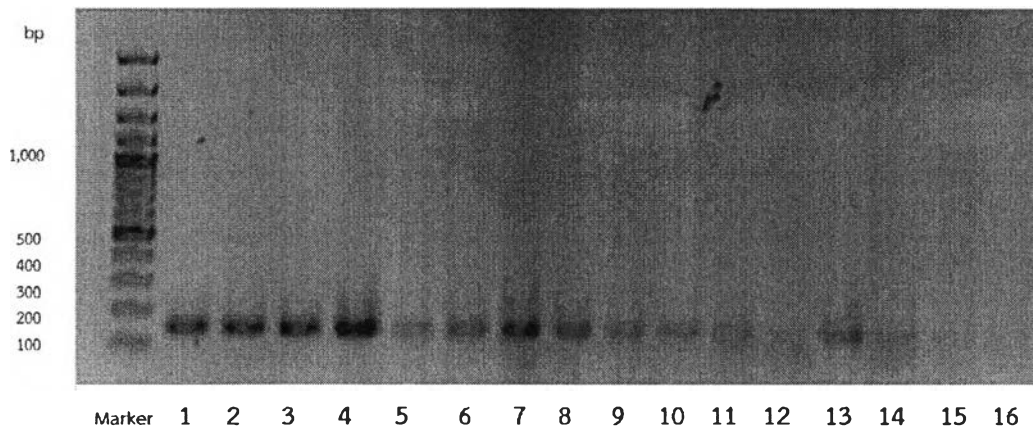
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp.

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

จากการศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ตามสภาวะที่กล่าวในวิธีการทดลอง โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ GC567F และ 680R และใช้โปรแกรมในการทำพีซีอาร์ จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR amplicon) โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.8 ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอบนเจล ขนาดประมาณ 120 bp ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า จึงระบุได้ว่าไพรเมอร์ GC567F และ 680R สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่มวิบริโอได้ แต่เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE ที่มีความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5 และความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45-70 (ที่อ้างอิงทั้ง 2 งานวิจัย) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจล (ไม่แสดงผลการทดลอง) ทั้งนี้อาจเกิดจากที่ความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5 มีขนาดของรูพรุนที่ใหญ่เกินไปซึ่งมีรายงานว่าความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5 เหมาะสำหรับการใช้แยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ (300-1,000bp) (Bio-Rad) ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ GC567F และ 680R เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน มีขนาดเพียง 120 bp แสดงดังภาพที่ 4.1 จึงอาจเคลื่อนที่ผ่านเจลและไม่เกิดเป็นแถบที่สังเกตเห็นได้





ภาพที่ 4.1 แสดงผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 1.8

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

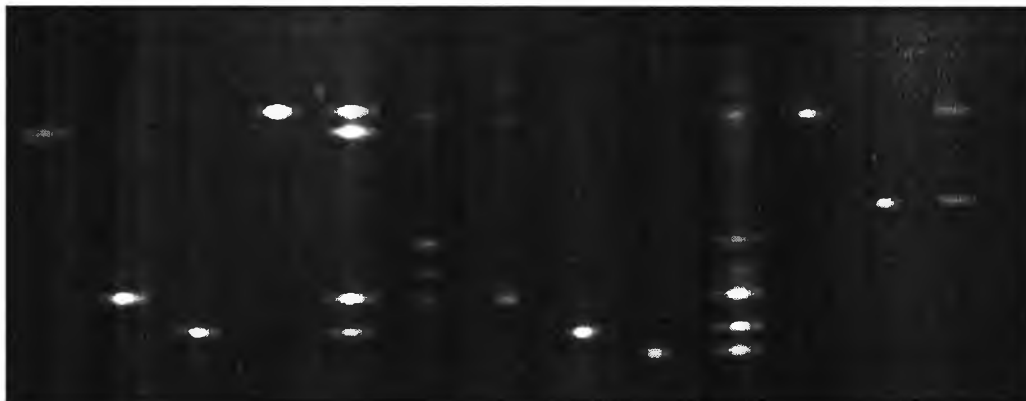
ทั้งนี้ในการเลือกความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลต้องพิจารณาจากขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยกความแตกต่างเป็นหลัก ดังนั้นจึงแปรค่าความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นร้อยละ 8 และ 10 ตามลำดับ โดยเลือกช่วงจากข้อแนะนำในคู่มือการใช้ของ DGGE with Dcode™ Universal Mutation Detection System ทั้งนี้ยังคงค่าความเข้มข้นของสาร denaturant เป็นร้อยละ 45-70 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลการแยกผลิตภัณฑ์ซีอาร์ระหว่างพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 8 และ 10 แสดงดังภาพที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ พบว่าตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดบนเจลทั้งสองความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจล ร้อยละ 10 แถบดีเอ็นเอมีความชัดเจนอย่างเห็นได้ชัด จากคู่มือการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE กล่าวว่าที่ความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6.5, 8 และ 10 เหมาะสำหรับการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300-1,000 bp, 200-400 bp และ 100-300 bp ตามลำดับ ความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดรูพรุนของเจลมีขนาดเล็กลงและเหมาะสำหรับใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงด้วย จึงทำให้ความละเอียดในการแยกแถบดีเอ็นเอและความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอมีมากขึ้น ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ประกอบด้วยเกรเดียนต์ของสาร denaturant ความเข้มข้นร้อยละ 45-70 สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

ภาพที่ 4.2 แลบดีเอ็นเอบนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 8

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



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

ภาพที่ 4.3 แลบดีเอ็นเอบนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10

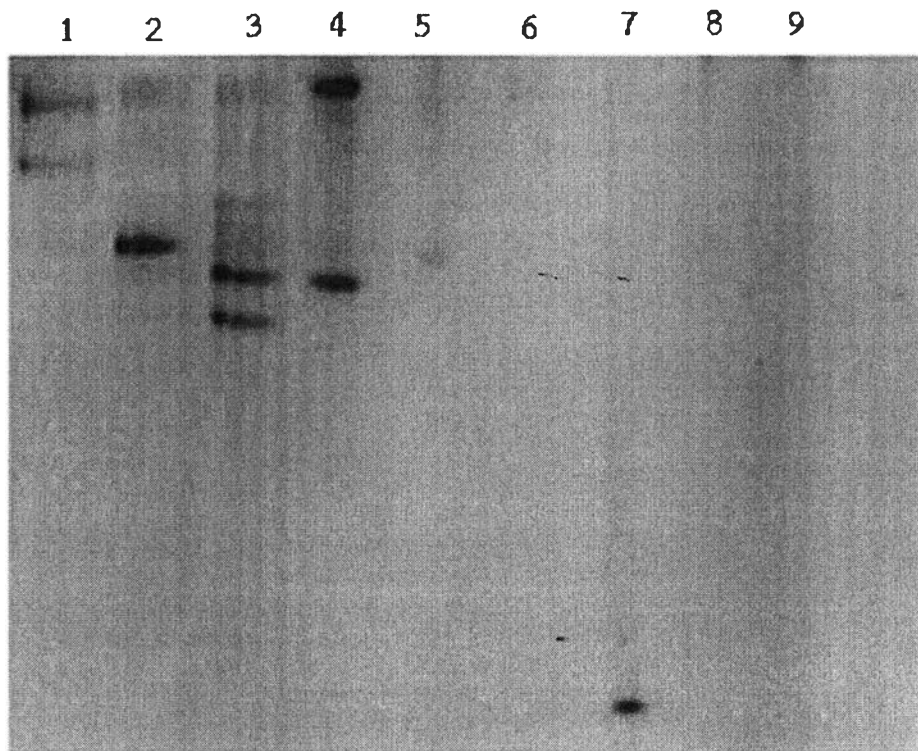
(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae*, 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus*, 3 คือ *Vibrio fluvialis*, 4 คือ *Vibrio mimicus*, 5 คือ *Vibrio cholerae*+ *Vibrio parahaemolyticus*+ *Vibrio fluvialis*+ *Vibrio mimicus*, 6 คือ *Vibrio alginolyticus*, 7 คือ *Vibrio harveyi*, 8 คือ *Vibrio furnissii*, 9 คือ *Vibrio vulnificus*,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

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

เมื่อพิจารณาผลการแยกดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่มไวรัสทั้ง 10 ชนิด ด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้พอลิอะคริลามิเดิลเจลความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ประกอบด้วยเกรเดียนต์ของสาร denaturant ความเข้มข้นร้อยละ 45-70 พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน ยกเว้นแถบดีเอ็นเอของไวรัส 2 คู่คือ *Vibrio fluvialis* กับ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ที่มีระยะการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกัน (แสดงดังภาพที่ 4.5) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Eiler and Bertilsson (2006) ที่ศึกษาเชื้อในกลุ่มไวรัสจำนวน 7 สปีชีส์คือ *Vibrio mimicus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio anguillarum* พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากไวรัสทั้งสองชนิดมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันและลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง 16S rDNA มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก (Eiler and Bertilsson, 2006) ซึ่งประเด็นนี้จะอภิปรายรายละเอียดในหัวข้อสุดท้ายหน้าที 61 ดังนั้นหากต้องการแยกเชื้อทั้งสองชนิดนี้อาจต้องใช้ดีเอ็นเอตำแหน่งอื่นเช่น *atpA* gene ที่มีรายงานว่าสามารถแยกความแตกต่างของไวรัสได้มากกว่า แต่เนื่องจากดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวมีความยาวมากเกินไป (1322bp) (Thompson et al., 2007a) จึงไม่เหมาะกับการแยกด้วยเทคนิค DGGE และต้องใช้เวลาในการประเมินหาตำแหน่งที่เหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตาม จากใช้ 16S rDNA จะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัสที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นจะมีไวรัสสปีชีส์หนึ่งเป็นเชื้อหลักที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ส่วนอีกสปีชีส์หนึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ค่อยมีรายงานว่าปนเปื้อนในอาหารและไม่มีความสำคัญในเรื่องของการก่อโรคนัก ดังนั้นในการใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการตรวจเชื้อไวรัสสามารถใช้ในการบ่งชี้ถึงโอกาสที่จะพบเชื้อก่อโรคทางอาหารที่สำคัญในตัวอย่าง ได้แก่ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus*



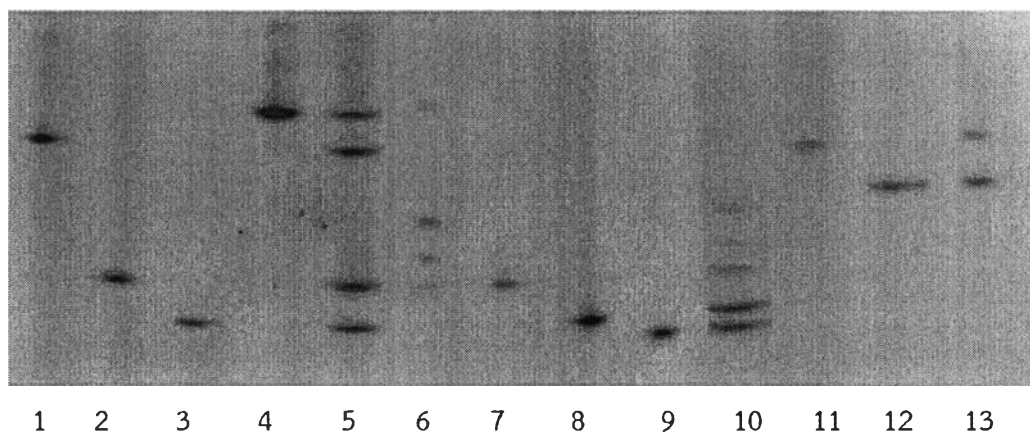
เป็นต้น ยกตัวอย่างเช่นถ้าพบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* ก็สามารถบ่งชี้เบื้องต้นได้ว่าการปนเปื้อนหรือพบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเพื่อเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบควบคุมคุณภาพด้านความปลอดภัย แต่ในการยืนยันผลยังคงต้องตรวจโดยวิธีมาตรฐานควบคุมไปด้วยเพื่อนำโคโลนีของเชื้อดังกล่าวมายืนยันผลด้วยการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผลหรืออีกแนวทางหนึ่งคือ นำแถบดีเอ็นเอที่พบบนพอลิอะคริลาไมด์เจลมาทำการโคลน เพิ่มจำนวนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing analysis) เพื่อระบุชนิดของเชื้อต่อไปได้ หรือโดยการหาสถานะในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ในขั้นตอน Selective enrichment ตัวอย่าง เพื่อมุ่งเน้นเชื้อก่อโรคตามมาตรฐานต่อไปนี้



ภาพที่ 4.4 ผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่ม vibrio และเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10

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

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



ภาพที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอบนพอลิอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (PCR-DGGE)

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

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

ในอาหารทั่วไปมักมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดและมีการปนเปื้อนในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งในการตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE หรือ RT-PCR-DGGE นั้น ต้องใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจากตัวอย่างอาหารโดยตรงแล้วจึงเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มของจุลินทรีย์เป้าหมาย ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้น ไพรเมอร์จะเข้าไปจับอย่างจำเพาะกับ DNA template ของไวรัสโดยดีเอ็นเอของไวรัสที่มีจำนวนมากในระบบย่อมมีโอกาสที่จะถูกจับด้วยไพรเมอร์มากกว่าดีเอ็นเอของไวรัสที่มีจำนวนเซลล์น้อย ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้จึงประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของเทคนิค PCR-DGGE หรือ RT-PCR-DGGE ที่สามารถตรวจพบไวรัสที่มีจำนวนชนิดและจำนวนเซลล์ในระบบที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทดสอบโดยการสร้างชุมชนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มไวรัสที่มีชนิดและจำนวนเซลล์ในระบบแตกต่างกัน 2 รูปแบบ ได้แก่ ชุมชนแบบที่ 1 คือชุมชนที่มีชนิดของไวรัสที่แตกต่างกันแต่มีจำนวนเซลล์เท่ากัน โดยแปรจำนวนเซลล์ในแต่ละชุมชนตั้งแต่ 10^1 - 10^5 CFU/ml ชุมชนแบบที่ 2 คือชุมชนที่มีชนิดและจำนวนเซลล์ของไวรัสแตกต่างกัน โดยอ้างอิงวิธีการในการแปรความเข้มข้นจากการศึกษาของ Prakitchaiwattana et al. (2004) แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4.1

จากนั้นสร้างชุมชนแบบที่ 1 คือชุมชนที่มีชนิดของไวรัสที่แตกต่างกันแต่มีจำนวนเซลล์เท่ากัน โดยการผสมเซลล์ที่ความเข้มข้นเดียวกันตามตารางที่ 4.1 ผสมเซลล์ที่ความเข้มข้นเดียวกันตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^5 CFU/ml (ตามคอลัมน์ A-E) แล้วสกัดดีเอ็นเอ (สำหรับในระบบ PCR-DGGE) และสกัดอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจเซลล์ที่มีชีวิตและใช้ในระบบ RT-PCR-DGGE) จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 (A-E) และตารางที่ 4.3 (A-E) ตามลำดับ พบว่าเมื่อตรวจสอบชุมชนของไวรัสแบบที่ 1 ด้วยเทคนิค PCR-DGGE ที่ไวรัสทุกชนิดมีความเข้มข้นเซลล์ 10^2 - 10^5 CFU/ml แสดงดังตารางที่ 4.2 (คอลัมน์ B-E) ปรากฏแถบดีเอ็นเอของไวรัสที่ชัดเจนบนเจล DGGE จำนวน 3 สปีชีส์คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* และ *Vibrio alginolyticus* แสดงดังตารางที่ 4.2 (คอลัมน์ B-E) ส่วนที่ความเข้มข้น 10^1 CFU/ml แสดงดังตารางที่ 4.2 (คอลัมน์ A) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของไวรัสทั้ง 10 สปีชีส์ ในขณะที่เมื่อใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE พบว่าแถบดีเอ็นเอของชุมชนของไวรัสแบบที่ 1 ที่มีจำนวนเซลล์ตั้งแต่ 10^2 - 10^5 CFU/ml เช่นเดียวกัน แต่สามารถตรวจพบแถบของ cDNA ของไวรัสในชุมชนได้มากถึง 5 ชนิด โดย 3 ชนิดแรกที่พบเหมือนกับที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-DGGE และชนิดที่ 4 และ 5 ที่พบเพิ่มคือ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* แสดงดังตารางที่ 4.3 (คอลัมน์ B-E) ทั้งนี้การที่ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับไวรัส 3 สปีชีส์ (PCR-DGGE) และ/หรือ 5 สปีชีส์ (RT-PCR-DGGE) นี้ก่อนทั้งที่มีจำนวนประชากรของเซลล์เท่ากัน อาจเป็นผลมาจากการที่สปีชีส์ที่มีจำนวน rRNA operon มากกว่าสปีชีส์อื่นๆซึ่งจำนวน rRNA operon ที่มีเป็นลักษณะของเชื้อในแต่ละเซลล์ (มีฐานข้อมูลเรื่องจำนวน rRNA



operon ของจุลินทรีย์ที่สามารถสืบค้นได้จาก rRNA operon database) ทั้งนี้จากผลการศึกษาจะเห็นว่า การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถตรวจพบจำนวนชนิดของไวรัสได้มากกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในขั้นตอนการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase ทำให้ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) มีความบริสุทธิ์สูงกว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์โดยตรง ซึ่งอาจยังมีสิ่งปนเปื้อนอยู่ในโครงสร้างของดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อเพิ่มจำนวนของ cDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จึงส่งผลให้ cDNA สามารถจับกับไพรเมอร์ได้อย่างจำเพาะมากกว่า จึงมีผลทำให้พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสที่ใช้อาร์เอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE มากกว่าแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสที่ใช้ดีเอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE ซึ่งถือเป็นรายงานวิจัยแรกที่พบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE มีความไวในการตรวจสูงกว่า PCR-DGGE

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

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

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



ดังนั้นจากการประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจไวรัสทุกชนิดที่มีจำนวนเซลล์ในชุมชนมากกว่า 10^1 CFU/ml ขึ้นไป ที่สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Eiler และ Bertilsson (2006) ซึ่งรายงานว่าการตรวจพบเชื้อไวรัสได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/g อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR-DGGE เปรียบเทียบกับ RT-PCR-DGGE เป็นครั้งแรกจึงยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องของความไวของเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเชื้อทุกชนิด แต่อาจอภิปรายได้ว่าการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสด้วยการวิเคราะห์คุณสมบัติของอาร์เอ็นเอนั้น จะต้องเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น complementary DNA (cDNA) ซึ่งมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วย DNase) ทำให้ cDNA template มีความบริสุทธิ์สูงกว่า ไพรเมอร์จึงสามารถเข้าจับกับ cDNA ได้อย่างจำเพาะมากขึ้น เมื่อเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แต่ในส่วนของดีเอ็นเอขั้นตอนการสกัดมีการทำให้บริสุทธิ์แต่เป็นการสกัดโดยตรงจากเซลล์จึงอาจทำให้มีสารประเภทฮิสโตนที่จับกับโครงร่างของดีเอ็นเอหลงเหลืออยู่ไปขัดขวางการเข้าจับของไพรเมอร์ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีจำนวนที่น้อยกว่าที่ควรจะเป็น (Shi et al., 2010; สุดสาย ตรีวานิช and สายพิน ทานัชมาลัย, 2546) และเมื่อทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอได้จำนวนน้อยกว่าแถบของอาร์เอ็นเอ จึงทำให้เทคนิค RT-PCR-DGGE จึงสามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าและมีความไว (sensitivity) มากกว่าเทคนิค PCR-DGGE ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการนำไปใช้ประเมินประสิทธิภาพในการศึกษาขั้นตอนต่อไป เนื่องจากมีความไวสูงกว่าเทคนิค PCR-DGGE และสามารถใช้ในการระบุสถานะการมีชีวิตของเซลล์ได้ และที่น่าสนใจคือเมื่อทำการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่าผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสม่ำเสมอของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR consistency) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเข้าจับของไพรเมอร์เป็นไปในลักษณะ template content oriented โดยจะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่มีความเข้มข้นหรือมีปริมาณมากกว่าเสมอ ซึ่งการเข้าจับแบบนี้จะช่วยให้การประเมินผลการตรวจพบมีความชัดเจนมากขึ้น ทั้งนี้มีรายงานยืนยันว่าชนิดของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายไม่ได้ส่งผลต่อการเข้าจับกับ template ของไพรเมอร์ แต่ปัจจัยที่มีอิทธิพลหลักคือจำนวนก็อปปีของดีเอ็นเอหรือปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) นั้นเอง (Eiler and Bertilsson, 2006)



3853900410



ตารางที่ 4.2 การตรวจพบแถบดีเอ็นเอของชุมชนไวรัสโอแบคทีเรีย 1 และแบคทีเรีย 2 ที่ตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

Vibrio species	Population mixtures (cfu/ml)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<i>Vibrio cholerae</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵					
	-	-	-	-	-					
<i>Vibrio fluvialis</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵					
	-	-	-	-	-					
<i>Vibrio mimicus</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ³
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Vibrio harveyi</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵					
	-	-	-	-	-					
<i>Vibrio furnissii</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵					
	-	-	-	-	-					
<i>Vibrio vulnificus</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵					
	-	-	-	-	-					
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵					
	-	-	-	-	-					
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵					
	-	-	-	-	-					

+ คือตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

- คือตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE



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

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

+ คือตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

- คือตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโอในการตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE

4.3 การประเมินผลของสภาวะของเซลล์ของไวรัสต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE

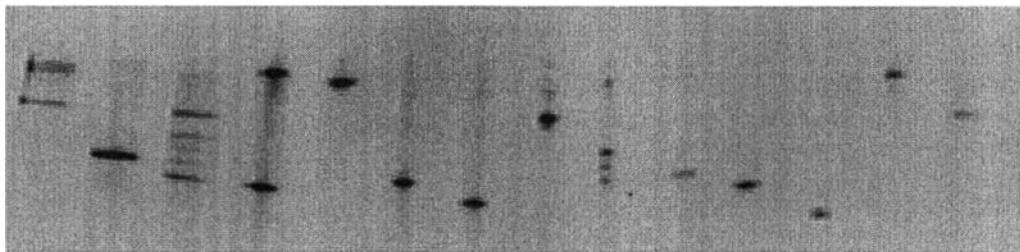
เนื่องจากในกระบวนการแปรรูปอาหารมีการใช้ความร้อน ความเย็นและการแช่เยือกแข็งซึ่งปัจจัยเหล่านี้ต่างก็มีผลต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร อาจทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บและส่งผลต่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้เป็นผลลบลงได้ (false negative) โดยที่ในตัวอย่างอาหารยังคงมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่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

ในการทดลองใช้เชื้อมาตรฐานกลุ่มไวรัสจำนวน 10 สปีชีส์โดยแปรสภาวะของเชื้อเป็น 3 สภาวะคือ เซลล์สมบูรณ์ (Viable cell; VC) เซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (Injured cell; IVC) และเซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (Injured cell + pre-enrichment; PIVC) เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR-DGGE พบว่าปรากฏแถบ cDNA ของไวรัสมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์จากทั้ง 3 สภาวะ ไม่แตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 4.6 - 4.8 ยกเว้นเชื้อ *Plesiomonas shigelloides* ที่ซึ่งเมื่อเซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) และเซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (PIVC) จะปรากฏแถบของ cDNA มากกว่า 1 แถบ (multiple band) แสดงดังภาพที่ 4.7 และ 4.8 (Lane 13) ทั้งนี้ อาจอธิบายได้ว่าการแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) มีผลต่อโครงสร้างอาร์เอ็นเอของเซลล์ของเชื้อ *Plesiomonas shigelloides* โดยอาจทำให้โครงสร้างเกิดการแตกหัก (denaturated) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ (deformed) จึงมีผลทำให้ไพรเมอร์เข้าจับได้อย่างไม่จำเพาะ แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลของการแช่แข็งต่อโครงสร้างอาร์เอ็นเอของเชื่อดังกล่าว แต่ก็มีกรรายงานของ Szaboa and Mackey (1999) เกี่ยวกับผลของความร้อนต่อโครงสร้างของอาร์เอ็นเอของเชื้ออื่นๆ คือ *Salmonella Eenteritidis* เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR-DGGE พบว่าโครงสร้างของอาร์เอ็นเอถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อนซึ่งส่งผลต่อการจับกันของไพรเมอร์กับ cDNA จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื่อดังกล่าวด้วยวิธี RT-PCR-DGGE นอกจากนี้ผลการทดสอบบ่งชี้ด้วยว่า *Plesiomonas shigelloides* ที่บาดเจ็บและผ่านการ pre-enrichment อาจไม่สร้างอาร์เอ็นเอใหม่ เนื่องจากเซลล์อยู่ในช่วงปรับสภาพให้ฟื้นตัว จึงยังไม่มีกรแบ่งเซลล์ ดังจะเห็นได้จากการยังพบ multiple band ของเซลล์ที่ผ่านการ pre-enrichment

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



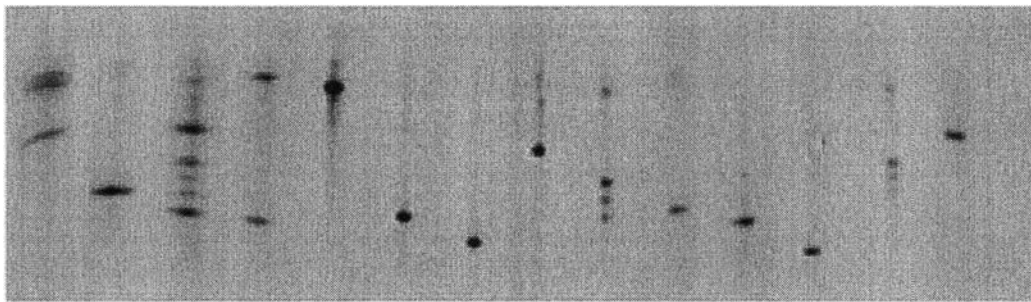
เกิดจากความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ในการสกัด โดยเซลล์สมบูรณ์ (VC) และเซลล์ที่อยู่ในสภาวะขาดเจ็บ (IVC) สกัดจากเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10^8 CFU/ml ที่ทำการบ่ม 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์ที่อยู่ในสภาวะเซลล์ขาดเจ็บแต่ผ่านขั้นตอนการทำ pre-enrichment (PIVC) ใช้เซลล์ที่มีความเข้มข้นเดียวกันคือ 10^8 CFU/ml จำนวน 1 มิลลิลิตร และนำไปแช่เยือกแข็ง จากนั้น pre-enrichment ใน Tryptic soy broth ที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 90 ml และบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เซลล์ที่อยู่ในสภาวะ PIVC จะมีความเข้มข้นของเชื้อที่น้อยกว่าเซลล์เริ่มต้นของเซลล์สมบูรณ์ (VC) และเซลล์ที่อยู่ในสภาวะขาดเจ็บ (IVC) จึงมีผลให้ความเข้มข้นของแถบ cDNA ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ PIVC มีความเข้มข้น (intensity) ที่น้อยกว่า ซึ่งในประเด็นนี้ยังเป็นการบ่งชี้ได้ชัดเจนขึ้นว่าเซลล์ที่ขาดเจ็บอาจไม่เพิ่มจำนวนในการ pre-enrichment อย่างไรก็ตามสำหรับเชื้อกลุ่มไวรัสที่เป็นเชื้อที่พบการรายงานว่าทำให้เกิดโรคบ่อยๆ ได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis* และ *Vibrio alginolyticus* ที่มีสภาวะเซลล์ในทุกรูปแบบยังสามารถปรากฏแถบ cDNA ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงคาดว่าน่าจะสามารถนำวิธี RT-PCR-DGGE ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสกลุ่มนี้ในตัวอย่างอาหารที่ผ่านการแช่แข็งได้



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

ภาพที่ 4.6 ผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มไวรัสที่สภาวะเซลล์สมบูรณ์ (VC) บนพอลิอะคริลลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE)

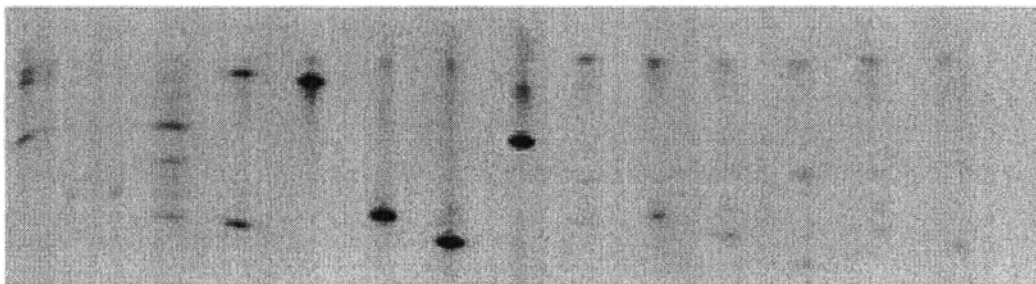
(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae* + *Plesiomonas shigelloides* + *Aeromonas hydrophila*, 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus* + *Vibrio harveyi*, 3 คือ *Vibrio fluvialis* + *Vibrio alginolyticus* + *Vibrio furnissii*, 4 คือ *Vibrio mimicus* + *Vibrio vulnificus*, 5 คือ *Vibrio cholerae*, 6 คือ *Vibrio parahaemolyticus*,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



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

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

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



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

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

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

4.4 การประเมินวิธี RT-PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบไวรัสในตัวอย่างอาหาร

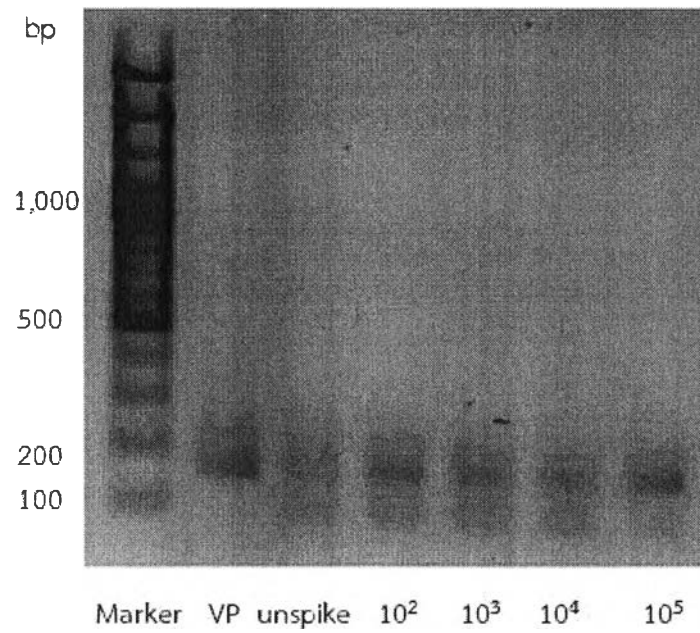
จากการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR-DGGE โดยใช้เชื้อมาตรฐานกลุ่มไวรัส พบว่าวิธี RT-PCR-DGGE มีศักยภาพที่จะสามารถนำไปใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อในกลุ่มไวรัสได้ ดังนั้นจึงได้นำไปประเมินความเป็นไปได้ของวิธี RT-PCR-DGGE ในการตรวจไวรัสในอาหารเทียบกับวิธีมาตรฐาน (US Food and Drug Administration, 2004) โดยเตรียมตัวอย่างอาหารที่มีการเติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ตั้งแต่ 10^1 - 10^5 CFU/ml ในการทดลองนี้เลือกใช้ตัวอย่างปลาหมึกแช่แข็งเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากเป็นตัวอย่างอาหารทะเลที่มักพบการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มไวรัส และเป็นตัวอย่างอาหารที่เตรียมให้ปราศจากเชื้อได้ง่ายเนื่องจากมีลักษณะผิวที่เรียบ

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

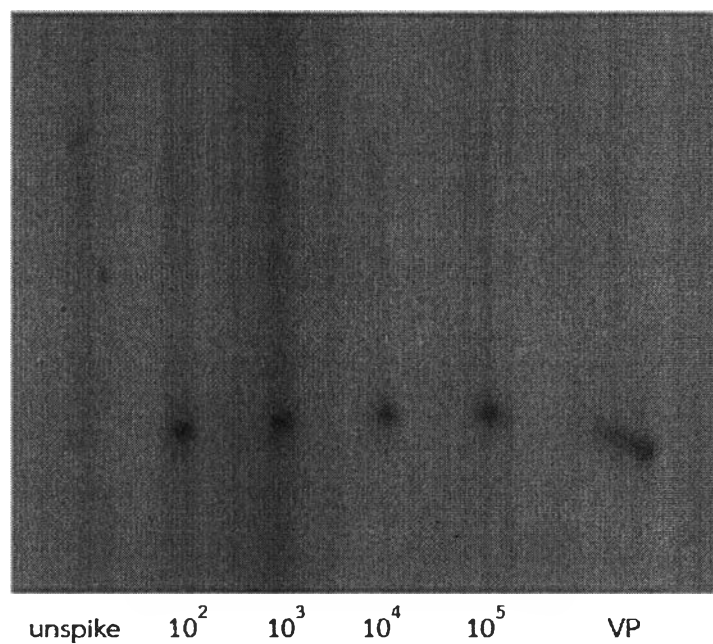
จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่สามารถตรวจพบ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 CFU/กรัม ได้ อย่างไรก็ตามอาจสามารถเพิ่มความไวของวิธีโดยการเพิ่มขึ้นตอน pre-enrichment ตัวอย่างเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค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



3853500410



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



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

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

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

4.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในตัวอย่างอาหาร

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในตัวอย่างอาหารโดยตรงและผ่านการ pre-enrichment ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และวิธีมาตรฐาน (ทำการยืนยันผลโดยการทดสอบโคโลนีที่คัดแยกได้ทางชีวเคมีด้วย VITEK[®] 2 system โดยการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลจำนวน 14 ตัวอย่าง คือ ปลาหมึก (สด) เนื้อปลากระพงแล้ (แช่แข็ง) เนื้อปลาเก๋าแล้ (แช่แข็ง) ปลาหมึก (แช่แข็ง) หนวดปลาหมึก (สด) ปลาหมึกกล้วย (สด) กุ้งขาว (สด) ปลาหู (สด) กุ้งแม่น้ำ (สด) เนื้อปลาดอลลีแล้ (แช่แข็ง) หอยแครง (สด) หอยนางรม (สด) ปลาแซลมอนแล้ (สด) และปลาอินทรีแล้ (สด) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส พบว่าการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐาน (US Food and Drug Administration, 2004) ที่ทำการยืนยันผลโดยการทดสอบโคโลนีที่คัดแยกได้ทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK[®] 2 system นั้นตรวจพบลักษณะโคโลนีของเชื้อในกลุ่มไวรัสจำนวน 18 ไอโซเลต และผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK[®] 2 system แสดงดังภาคผนวก จ.

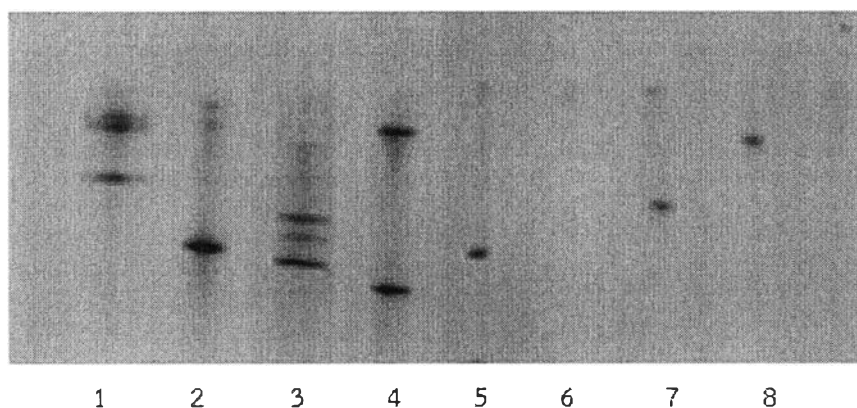
จากการตรวจเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE โดยตรงจากตัวอย่างอาหารโดยไม่ผ่านขั้นตอนการ pre-enrichment ผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏแถบ cDNA บนอะกาโรสเจล ทั้งนี้อาจเกิดจากในตัวอย่างอาหารอาจมีเชื้อเริ่มต้นที่ต่ำกว่าระดับที่เทคนิค RT-PCR-DGGE จะสามารถตรวจได้ ดังนั้นในการประยุกต์ใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE จึงเลือกใช้การเพิ่มขั้นตอนการ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

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

ตัวอย่างที่ตรวจสอบและให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 50 จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัวอย่างคือปลาหมึก (สด), หนวดปลาหมึก (สด), ปลาหมึกกล้วย (สด), กุ้งขาว (สด), กุ้งแม่น้ำ (สด) และปลาแซลมอนแล้ (สด) โดยพบว่าผลการตรวจพบการปนเปื้อนของไวรัสโอที่ตรงกันมักจะเป็นเชื้อไวรัสโอชนิดที่ก่อโรค กล่าวคือเมื่อตรวจด้วยวิธีมาตรฐานพบการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* และเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ก็พบการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* เช่นกัน (ในตัวอย่างปลาหมึก (สด), หนวดปลาหมึก (สด) และกุ้งขาว (สด)) ส่วนเชื้ออื่นๆที่พบไม่ตรงกันคือเชื้อที่ไม่ค่อยพบรายงานการปนเปื้อนในอาหาร และ/หรือ เป็นเชื้อที่ไม่ได้นำมาใช้ในการประเมินเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการทดลองนี้ ยกเว้นในตัวอย่างปลาหมึกกล้วย (สด) ที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานพบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio mimicus* แต่เทคนิค RT-PCR-DGGE ตรวจพบการปนเปื้อนของ *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio mimicus* นอกจากนี้มีตัวอย่างที่ทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกันคิดเป็นร้อยละ 50 คือพบ *Vibrio cholerae* ในตัวอย่างกุ้งแม่น้ำ (สด) และพบ *Vibrio fluvialis* ในตัวอย่างปลาแซลมอนแล้ (สด) ส่วนการตรวจพบชนิดเชื้อที่ไม่ตรงกันมี 2 รูปแบบได้แก่ รูปแบบที่ 1 คือตัวอย่างที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโอเพิ่มขึ้นอีก 1 ชนิดแต่ตรวจไม่พบด้วยวิธีมาตรฐาน ซึ่งผลลักษณะนี้ตรวจพบในตัวอย่างอาหาร 4 ตัวอย่าง เชื้อไวรัสโอที่ตรวจพบการปนเปื้อนเพิ่มเติมโดย RT-PCR-DGGE คือ *Vibrio alginolyticus* และ *Aeromonas hydrophila* รูปแบบที่ 2 คือตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนของไวรัสโอที่ตรงกัน 1 ชนิดและทั้งสองวิธีต่างตรวจพบการปนเปื้อนของไวรัสโอเพิ่มขึ้นอีกวิธีละ 1 ชนิดที่ต่างกัน ซึ่งรูปแบบที่ 2 นี้พบในตัวอย่างอาหาร 2 ชนิดคือปลาหมึก (สด) ที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานพบเชื้อ *Aeromonas salmonicida* เพิ่ม และปลาหมึกกล้วยสดที่ตรวจพบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เพิ่ม แต่ในขณะที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE พบเชื้อ *Vibrio alginolyticus* เพิ่ม ทั้งนี้ไวรัสโอที่ตรวจพบการปนเปื้อนด้วยวิธีมาตรฐานส่วนใหญ่เป็นเชื้อไวรัสโอที่ไม่ได้นำมาใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการประเมินวิธี RT-PCR-DGGE เช่น *Aeromonas salmonicida*

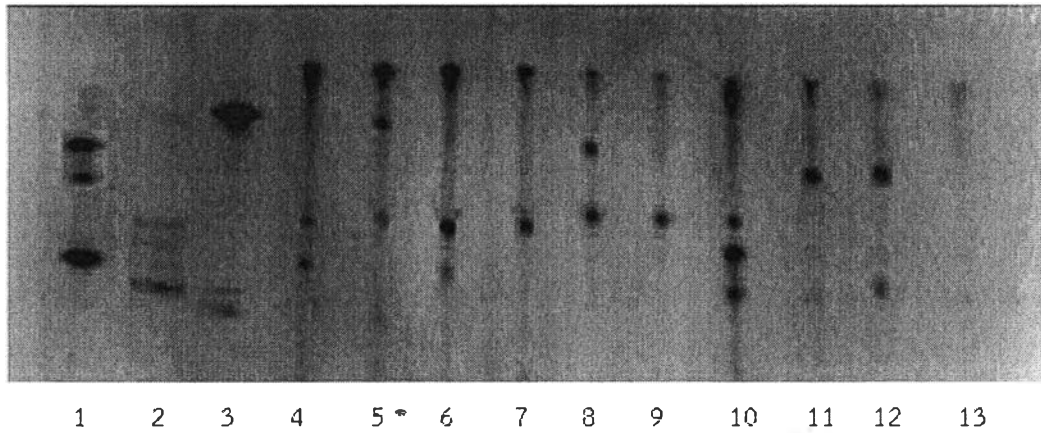


ตัวอย่างที่ผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลไม่ที่สอดคล้องกัน (ร้อยละที่พบตรงกันเท่ากับ 0) จำนวนทั้งสิ้น 4 ตัวอย่างคือเนื้อปลากระพงแล้ (แซ่แข็ง), ปลาหู (สด), เนื้อปลาดอกรี่แล้ (แซ่แข็ง) และ หอยนางรม (สด) โดยเชื้อไวรัสที่พบในแต่ละวิธีคือเชื้อไวรัสที่มีมักจะไม่ค่อยพบการรายงานการปนเปื้อนในอาหารได้แก่ *Vibrio alginolyticus* และ *Aeromonas hydrophila* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และ *Morganella morganii* ssp. *morganii* และ *Vibrio metschnikovii* เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน และเชื้อไวรัสที่ตรวจพบการปนเปื้อนด้วยวิธีมาตรฐานเป็นเชื้อไวรัสที่ไม่ได้ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการประเมินเทคนิค RT-PCR-DGGE ในการศึกษา



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสในตัวอย่างอาหารชุดที่ 1 บนพอลีอะครีลาไมด์เจล ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae* + *Plesiomonas shigelloides* + *Aeromonas hydrophila*, Lane 2 คือ *Vibrio parahaemolyticus* + *Vibrio harveyi*, Lane 3 คือ *Vibrio fluvialis* + *Vibrio alginolyticus* + *Vibrio furnissii*, Lane 4 คือ *Vibrio mimicus* + *Vibrio vulnificus*, Lane 5 คือปลาหมึก (สด), Lane 6 คือเนื้อปลากระพงแล้ (แซ่แข็ง), Lane 7 คือเนื้อปลาเก๋าแล้ (แซ่แข็ง) และ Lane 8 คือปลาหมึก (แซ่แข็ง)



ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสโอในตัวอย่างอาหารชุดที่ 2 บนพอลิอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

(Lane 1 คือ *Vibrio cholerae* + *Plesiomonas shigelloides* + *Aeromonas hydrophila* + *Vibrio parahaemolyticus* + *Vibrio harveyi*, Lane 2 คือ *Vibrio fluvialis* + *Vibrio alginolyticus* + *Vibrio furnissii*, Lane 3 คือ *Vibrio mimicus* + *Vibrio vulnificus*, Lane 4 คือหนองปลาหมึก (สด), Lane 5 คือปลาหมึกกล้วย (สด), Lane 6 คือกุ้งขาว (สด), Lane 7 คือปลาหู (สด), Lane 8 คือกุ้งแม่น้ำ (สด), Lane 9 คือเนื้อปลาต่อลรีแล่ (แซ่แข็ง), Lane 10 คือหอยแครง (สด), Lane 11 คือหอยนางรม (สด), Lane 12 คือ เนื้อปลาแซลมอนแล่ (สด) และ Lane 13 คือ ปลาอินทรีแล่ (สด)





ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการตรวจไวรัสในตัวอย่างอาหารโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน

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



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

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

จากการเปรียบเทียบการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน พบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE มีแนวโน้มที่ตรวจพบจำนวนชนิดของเชื้อไวรัสโอในตัวอย่างอาหารได้มากกว่า โดยในส่วนของชนิดของเชื้อไวรัสโอที่พบในตัวอย่างอาหารที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่ตรงกับที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานนั้นส่วนใหญ่คือเชื้อไวรัสโอที่ไม่ค่อยมีการรายงานการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารและเป็นเชื้อไวรัสโอที่ไม่ได้ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในขั้นตอนการพัฒนาวิธีดังกล่าว อย่างไรก็ตามเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE สำหรับตรวจสอบไวรัสโอในอาหารให้ครอบคลุมมากขึ้นควรต้องนำเชื้อไวรัสโอสปีชีส์อื่นๆมาใช้เป็นจุลินทรีย์มาตรฐานสำหรับเป็น DNA marker ในการศึกษาจึงประเมินความเป็นไปได้ของวิธีในการแยกไวรัสโอสปีชีส์อื่นๆเพิ่มเติม โดยการนำนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA ของไวรัสโอมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์ที่ใช้ในการทดลองนี้ และที่ตรวจพบเพิ่มเติมในตัวอย่างอาหาร (*Vibrio metschnikovii*, *Morganella morganii* ssp. *morganii* และ *Aeromonas salmonicida*) จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology (NCBI) ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST) มาตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม โดยการสร้างแผนภูมิไฟโลจีนติกทรี (phylogenetic tree) ตามวิธี Two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ Maximum Likelihood method (<http://www.geneious.com/features/phylogenetic-tree-building>) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985) โดยใช้โปรแกรม Mega 6 (Tamura et al., 2013) และการวิเคราะห์ %homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ 16S rRNA เดียวกันของเชื้อทุกชนิดสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธี

จากการวิเคราะห์ไฟโลจีนติกทรี (phylogenetic tree) และ % homology แสดงดังภาพที่ 4.13 และตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบผลกับรูปแบบแถบดีเอ็นเอบนพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความสอดคล้องกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของไวรัสโอแต่ละชนิด กล่าวคือแถบดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่บนพอลิอะคริลาไมด์เจลอยู่ในตำแหน่งเดียวกันหรือใกล้เคียงกันจะเป็นไวรัสโอที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันบนไฟโลจีนติกทรี ได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกันมาก เมื่อประเมิน % homology พบว่าทั้ง 3 สปีชีส์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันถึง 99 % homology ในทำนองเดียวกันกับ *Vibrio fluvialis* และ *Vibrio furnissii* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันบนไฟโลจีนติกทรีมีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกัน 99 % homology เช่นเดียวกันกับกลุ่มแรก ซึ่งกลุ่มของ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio mimicus* ก็มีผล



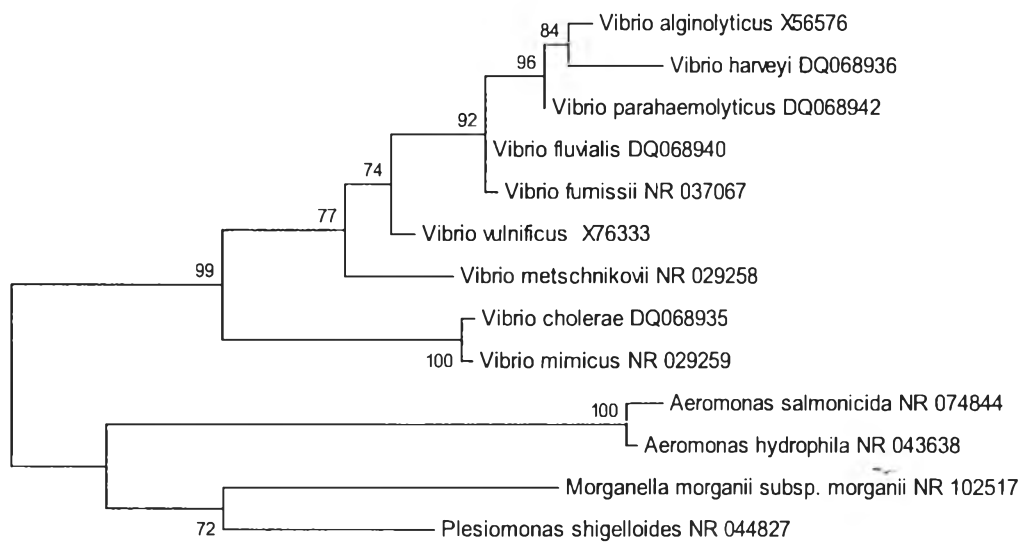
3853500410

เป็นไปในทำนองเดียวกัน ที่ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกัน 99 % homology

ในขณะที่ไวรัสสปีชีส์อื่นๆที่มีแถบดีเอ็นเอแตกต่างออกไปอย่างเห็นได้ชัด ได้แก่ *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* และ *Plesiomonas shigelloides* จะเป็นเชื้อที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมต่างกลุ่มกัน และพบว่าไวรัสเหล่านี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA เหมือนกับสปีชีส์อื่น ๆ น้อยกว่า 99 (90-98) ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในอาหารเพื่อเป็นแนวทางในการนำมาพัฒนาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) ได้แก่ *Vibrio metschnikovii*, *Aeromonas salmonicida* และ *Morganella morganii ssp morganii* พบว่าทั้ง 3 สปีชีส์มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมแตกต่างจากไวรัส 10 สปีชีส์แรก และในทั้ง 3 สปีชีส์เองก็มีความแตกต่างทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมกัน และเมื่อพิจารณา % homology ของนิวคลีโอไทด์ (บนพื้นที่ 16s RNA ตำแหน่งที่เข้าจับด้วย GC567F และ 680R) พบว่าทั้ง 3 สปีชีส์ มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกับไวรัส 10 สปีชีส์แรกเพียง 91-98 % homology และภายใน 3 สปีชีส์ ก็มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกันเพียง 91 % homology

จากผลการประเมินดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์น่าจะสามารถแยกด้วยวิธี RT-PCR-DGGE ได้ โดยเมื่อประเมินจาก % homology แล้วคาดว่าแถบดีเอ็นเอของทั้ง 3 สปีชีส์ น่าจะเคลื่อนบนพอลิอะคริลลาไมด์เจล ได้แตกต่างกันและแถบดีเอ็นเอของทั้ง 3 สปีชีส์ก็น่าจะไม่ตรงกับแถบดีเอ็นเอของไวรัสมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาใช้เชื้อทั้ง 3 สปีชีส์เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ต่อไป นอกจากนี้จากผลการประเมินดังกล่าวยังสามารถมาใช้ในการอภิปรายผลของการตรวจไวรัสในตัวอย่างอาหารด้วย RT-PCR-DGGE นั้นสามารถบอกได้ว่าการที่ตรวจพบเชื้อ *Vibrio metschnikovii*, *Aeromonas salmonicida* และ *Morganella morganii ssp morganii* ด้วยวิธีมาตรฐานแต่ตรวจไม่พบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่ได้เกิดจากการที่แถบดีเอ็นเอของทั้ง 3 สปีชีส์ซ้อนทับหรือแยกไม่ได้จากเชื้อไวรัสมาตรฐานทั้ง 10 สปีชีส์ แต่น่าจะเกิดจากจำนวนประชากรของเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหารมีจำนวนประชากรน้อยกว่าเชื้อไวรัสสปีชีส์อื่นๆที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนพอลิอะคริลลาไมด์เจล และ/หรือมีจำนวนประชากรหลังผ่านการ pre-enrichment มีจำนวนน้อยกว่าค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของเทคนิค RT-PCR-DGGE ดังนั้นแนวทางในการพัฒนาการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ให้ครอบคลุมเชื้อไวรัส นอกเหนือจากการพัฒนา DNA marker ของสปีชีส์อื่นๆ เพิ่มเติมแล้ว หากต้องการศึกษาเชื้อจำเพาะ อาจต้องออกแบบไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดจำเพาะที่ต้องการ หรือการเพิ่มขั้นตอน selective enrichment สำหรับเชื้อที่ต้องการก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถพัฒนาได้





ภาพที่ 4.13 ไฟโลจีเนติกทรี (phylogenetic tree) ของเชื้อกลุ่ม vibrio

ที่มา: Tamura et al. (2013)





ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ % homology ของไวรัสโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และไวรัสโอที่ตรวจพบด้วยวิธีมาตรฐาน

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>Morganella morganii</i> ssp <i>morganii</i>
<i>V. alginolyticus</i>	100	99	95	95	98	98	99	98	96	93	90	90	92
<i>V. parahaemolyticus</i>	99	100	95	95	99	99	99	99	97	94	91	91	92
<i>V. mimicus</i>	95	95	100	99	95	95	96	96	95	92	91	91	92
<i>V. cholerae</i>	95	95	99	100	95	95	96	96	95	92	91	91	92
<i>V. harveyi</i>	98	99	95	95	100	98	98	97	96	93	91	91	92
<i>V. fluvialis</i>	98	99	95	95	98	100	99	99	97	94	91	91	93
<i>V. furnissii</i>	99	99	96	96	98	99	100	99	97	94	91	91	93
<i>V. vulnificus</i>	98	99	96	96	97	99	99	100	98	93	91	91	92
<i>V. metschnikovii</i>	96	97	95	95	96	97	97	98	100	93	91	91	91
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	93	94	92	92	93	94	94	93	93	100	92	92	94
<i>A. hydrophila</i>	90	91	91	91	91	91	91	91	91	92	100	99	91
<i>A. salmonicida</i>	90	91	91	91	91	91	91	91	91	92	99	100	91
<i>Morganella morganii</i> ssp <i>morganii</i>	92	92	92	92	92	93	93	92	91	94	91	91	100

รับคืนจาก...
 สำนักระบาดวิทยา...
 วันที่...
 ๒๑๖๑
 ๒๖๖๖

จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถนำไปพัฒนาประสิทธิภาพต่อไปได้และมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกในการระบุการปนเปื้อนของไวรัสในอาหารได้ โดยใน ส่วนที่พบแถบของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นสามารถระบุชนิดต่อไปได้ทำได้การโคลน (Cloning) และตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดได้ หรืออาจใช้ร่วมกับวิธีมาตรฐานเพื่อตรวจสอบเบื้องต้น แล้วยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานต่อไปในกรณีที่พบเชื้อก่อโรคที่สำคัญและต้องการรับรองผล (Certificate) เมื่อพิจารณาข้อได้เปรียบในการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ประเด็นแรกคือด้านเวลา พบว่าการตรวจเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 1-2 วัน ก็สามารถระบุชนิดของไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารได้ ในขณะที่วิธีดั้งเดิมใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน ดังนั้น RT-PCR-DGGE จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับเป็นวิธีที่รวดเร็วและสามารถใช้ในการตรวจสอบเพื่อควบคุมจุดวิกฤต (critical control point) ในระบบการควบคุมความปลอดภัยทางอาหาร และ/หรือเพิ่มประสิทธิภาพของระบบประกันคุณภาพในสายการผลิตอาหาร

ประเด็นที่สองด้านราคา เมื่อประเมินราคาต่อหน่วยการวิเคราะห์พบว่าการตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธีมาตรฐานและการยืนยันผลด้วยการทดสอบทางด้านชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK®2 system เพื่อ ยืนยันผลต่อ 1 โคลนียุทธศาสตร์รวมทั้งสิ้นประมาณ 2,000 บาท ดังนั้นถ้ามีโคลนที่สงสัยมากกว่า 1 โคลน ก็ จะทำให้ราคาเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว ดังนั้นหากโคลนที่สงสัยมีจำนวนมากและไม่ใช่อุบัติการณ์ที่มีความสำคัญจะทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากร หากมีวิธีคัดเลือกเบื้องต้นก็จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ ส่วน การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR-DGGE ต่อครั้งที่ทำการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้ครั้งละ 14 ตัวอย่าง ราคาประมาณ 2,500 บาท และสามารถระบุชนิดของไวรัสที่ปนเปื้อนได้อย่างน้อย 5 สปีชีส์ ในเวลาเดียวกัน

ประเด็นที่สามด้านความปลอดภัย เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นวิธี Cultural independent ที่ซึ่ง ไม่ต้องการเพาะเลี้ยงเซลล์จึงช่วยลดความเสี่ยงของการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการ และลดโอกาสการปนเปื้อนในสายการผลิตได้ ประเด็นสุดท้ายด้านการใช้จ่ายแรงงาน เนื่องจากการตรวจ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถดำเนินการได้อย่างรวดเร็วจึงใช้แรงงานในการดำเนินการ น้อยกว่าวิธีมาตรฐาน



3853500410