บทที่ 1

บทนำ

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

3853500410

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

3853500410

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

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

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

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

3855500410