บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะของ PCR-DGGEโดยอ้างอิงจากค่าเริ่มต้นจากรายงานของ Thompson และคณะ (2004) และจากรายงานของ Eiler และ Bertilsson (2006) พบว่าสภาวะที่สามารถใช้เพื่อเป็นวิธีในการตรวจสอบเชื้อวิบริโอคือใช้ไพรเมอร์ GC567Fและ680R ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและใช้ความเข้มข้นของพอลีอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 10 ที่ผสมสารดีเนเจอร์แรน (denaturant) (ยูเรียและฟอร์มาไมด์) เข้มข้นร้อยละ 45-70 พบว่าเทคนิค DGGE สามารถแยก DNA และ cDNA ของเชื้อกลุ่มวิบริโอออกจากกันได้ โดยมีลักษณะของแถบ DNA และ cDNA (migration pattern) ที่ไม่แตกต่างกันจำนวน 2 คู่ คือ *Vibrio fluvialis* กับ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio parahoemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบด้วยวิธี PCR-DGGE กับ RT-PCR-DGGE พบว่าสามารถแยก DNA amplicons และ cDNA amplicons ของวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ได้ไม่แตกต่างกัน และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium ออกจากเชื้อในกลุ่มวิบริโอได้

เมื่อประเมินความไวของวิธีในการตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากันพบว่าระบบ PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอเพียง 3 สปีชีส์คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, และ *Vibrio alginolyticus* ขณะที่ระบบ RT-PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอ 5 สปีชีส์ คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* และเมื่อตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอที่มีชนิดและความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกัน (แปรค่าตั้งแต่ 10^2-10^5 CFU/ml) พบว่า PCR-DGGE ตรวจพบ DNA ของสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดสองลำดับแรกในกลุ่ม ในขณะที่ RT-PCR-DGGE ตรวจพบ cDNA ของ สปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์แตกต่างกันได้ถึงห้าลำดับแรกในกลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง PCR-DGGE กับ RT-PCR-DGGE พบว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยการใช้อาร์เอ็นเอ (RT-PCR-DGGE) มีความไว (sensitivity) และสามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยการใช้ ดีเอ็นเอ (PCR-DGGE) ดังนั้นจึงเลือกวิธี RT-PCR-DGGE สำหรับประเมินการตรวจสอบเชื้อวิบริโอต่อไป

3853500410

เมื่อประเมินการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเซลล์วิบริโอที่สภาวะต่างๆ คือ เซลล์สมบูรณ์(VC) เซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ(IVC) และเซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (PIVC) พบว่า สามารถตรวจหา cDNA ของเซลล์ทั้งสามสภาวะได้ไม่แตกต่างกัน และเมื่อตรวจสอบวิบริโอที่เติมลงในตัวอย่างอาหาร พบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานและสามารถตรวจหาเชื้อวิบริโอในอาหารได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/g ขึ้นไปและเมื่อนำวิธีดังกล่าวมาตรวจสอบชุมชนวิบริโอในตัวอย่างอาหารพบว่าเทคนิค RT-PCR-DGGE มีแนวโน้มที่ตรวจพบจำนวนชนิดของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารได้มากกว่า โดยในส่วนที่พบว่าชนิดของเชื้อวิบริโอที่พบในตัวอย่างอาหารที่ตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ไม่ตรงกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานนั้นส่วนใหญ่คือเชื้อวิบริโอที่ไม่ค่อยมีการรายงานการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารและเป็นเชื้อวิบริโอที่ไม่ได้ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในขั้นตอนการพัฒนาวิธีดังกล่าว

5.2 ข้อเสนอแนะ

3855500410

เทคนิค RT-PCR-DGGE เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่มีศักยภาพที่สามารถนำ ไปพัฒนาต่อเพื่อให้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ โดยอาจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจลเทียบกับความเข้มข้นของเซลล์ที่ระดับต่างๆ และจากข้อด้อยของเทคนิค RT-PCR-DGGE ที่ไม่สามารถตรวจได้ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 CFU/กรัม ได้ อาจจะสามารถแก้ไขได้โดยการทำขั้นตอน pre-enrichment ตัวอย่างก่อนเหมือนการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ให้ถึงระดับที่เทคนิค RT-PCR-DGGE สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ($\geq 10^2$ CFU/กรัม) ในส่วนของเชื้อกลุ่มวิบริโอที่พบแถบของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นถ้าต้องการทราบว่าคือเชื้อวิบริโอสปีชีส์ใดก็อาจทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากแผ่นเจลแล้วนำมาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะทำให้ทราบว่าคือเชื้อวิบริโอสปีชีส์ใด หรืออีกวิธีคือทำการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานควบคู่ไปด้วยและทำการยืนยันผลอีกครั้งด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีก็ได้เช่นกัน

แนวทางในการพัฒนาต่ออาจนำแถบดีเอ็นเอไประบุชนิดของเชื้อโดยการโคลน (Cloning) และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือทำการเปลี่ยนตำแหน่งที่มี discriminatory มากกว่าและพัฒนาให้มีขนาดที่เหมาะสมกับการแยกด้วยเทคนิค DGGE นอกจากนี้อาจเพิ่มขั้นตอน selective enrichment เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไม่ต้องการ และมีเฉพาะเชื้อเป้าหมายหรือถูกกำหนดในมาตรฐาน

การใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว แม่นยำ ประหยัดเวลาและสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบเพื่อควบคุมจุดวิกฤต (critical control point) หรือประกันคุณภาพในสายการผลิตอาหาร เนื่องจากไม่ต้องทำการ enrichment การทำ selective plating การยืนยันผลโดยการทดสอบทางชีวเคมี และการทดสอบ serological test อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวต้องทำการศึกษา

เพิ่มเติมทางด้าน ความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไวของวิธีในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ โดยเพิ่มชนิดของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้นเพื่อพัฒนาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานและใช้ในการเปรียบเทียบและศึกษาความหลากหลายของเชื้อกลุ่มวิบริโอในระบบนิเวศต่างๆต่อไปในรูปแบบของการทำ full validation และวิธีการดังกล่าวยังสามารถที่จะนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อเป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆต่อไปได้

3853500410