บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย

แบคทีเรียในกลุ่มสกุล *Vibrio*สปีชีส์จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีสมาชิกมากกว่า 30 ชนิด มีทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคชนิดที่ก่อโรคจะเกี่ยวกับทางเดินอาหารโดยเฉพาะการรับประทานอาหารดิบในธรรมชาติอาศัยทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคที่ทำให้สิ่งมีชีวิตหรือโฮสต์ได้รับการติดเชื้อในขณะที่ภูมิคุ้มกันอ่อนแอลงได้จากรายงานการศึกษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สปีชีส์หลักที่พบเป็นจำนวนมากจากการคัดแยกเชื้อต่าง ๆ ในอาหารทะเลหรือในสัตว์น้ำติดเชื้อได้แก่ *V. alginolyticus*, *V.cholerae*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulinificus*มักจะเป็นสาเหตุของการเกิดโรควิบริโอซิส (Vibriosis) โดยเกิดจากปัจจัยความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอส่งผลต่อสัตว์น้ำและอาจติดเชื้อมาสู่คนที่รับประทานอาหารทะเลดิบได้ด้วย โดยแบคทีเรียที่เป็นชนิดหลักในการเกิดโรครุนแรงต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรีย *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*และ *V.parahaemolyticus*จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceaeย้อมติดสีแกรมลบต้องการเกลือในการเจริญ พบว่ามีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น น้ำทะเล ดินตะกอนและตัวสัตว์ทะเล ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งที่สะสมเชื้อสำคัญที่นำไปสู่การติดเชื้อและการก่อโรค โดยมีลักษณะทำให้ก่อโรคชนิดต่างๆ ดังนี้ *V. harveyi*เป็นแบคทีเรียที่สามารถเรืองแสงได้โดยอาศัยเอนไซม์ลูซิเฟอเรสและอาศัยทั่วไปในแหล่งน้ำเค็มแบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคเรืองแสง (Luminescent bacterial disease) สำหรับแบคทีเรีย *V. vulnificus*และ *V.parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการก่อโรคในมนุษย์ โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) อาจเข้าสู่ร่างกายจากการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Septicimia) หรือการติดเชื้อที่บาดแผล (Wound infection) ซึ่งอาจพบการติดเชื้อรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงในผู้ป่วยที่มีปัญหาระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคตับอักเสบเรื้อรัง (Izumiya et al. 2011) การตรวจสอบเพื่อจำแนกเชื้อดังกล่าวอาจดูจากลักษณะจากสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ เช่น *Vibrio harveyi* agar, TCBS (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar), CHROMagar™ *Vibrio*เป็นต้น แล้วอาจต้องนำมาจำแนกต่อไปเพื่อยืนยันผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาการตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี ซึ่งสารเคมีที่ใช้ต้องเตรียมหลายชนิดทำให้สิ้นเปลืองแรงงาน อีกทั้งแบคทีเรียทั้งสามชนิดมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใกล้เคียงกันมากทำให้ผลที่ได้อาจไม่แม่นยำ จึงต้องใช้ระยะเวลานานในการวิเคราะห์ผลเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรีย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจสอบที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดจากการทำ PCR มาพัฒนาเป็นเทคนิค Multiplex PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบ *V. harveyi*, *V.parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*ที่ครอบคลุมสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เป็นชนิดหลักที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในสัตว์น้ำโดยใช้ยีนที่ได้มีผลการศึกษาว่าเป็นสปีชีส์มาร์กเกอร์ ได้แก่ยีน *vhhP2*, *tl*และ *rpoS*ตามลำดับ โดยมีพื้นฐานของการศึกษาก่อนหน้านี้ (คณิตดา, 2558) ที่

ได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ทั้งสามคู่โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการทราบพิสูจน์ชนิดของการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดในเวลาเดียวกันในระยะเวลาเพียง 30 นาที ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำข้อมูลดังกล่าวข้างต้นมา ทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องโดยศึกษาเปรียบเทียบความถูกต้อง (accuracy) ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับวิธีดั้งเดิม (Conventional method) คือการเพาะแยกเชื้อจากหอยแต่ละชนิดและบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อประเมินความถูกต้องของเทคนิค Multiplex PCR สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสามในหอยทะเล ได้แก่ หอยแครง หอยลาย หอยแมลงภู่ โดยคาดว่าวิธีการ Multiplex PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นทำให้การตรวจสอบของแบคทีเรียทั้งสามชนิดเป็นไปอย่างสะดวกและรวดมากขึ้น เนื่องจากสามารถตรวจสอบเชื้อทั้งสามชนิดได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว และสามารถนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจติดตามเฝ้าระวังการติดเชื้อของแบคทีเรียทั้งสามในหอยที่พบแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมและในฟาร์มเพาะเลี้ยงหอยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1.ตรวจคัดแยก *V.harveyi, V.parahaemolyticus*และ *V.vulnificus*ในหอยแครง หอยลายและหอยแมลงภู่

2. การประเมินประสิทธิภาพของวิธี PCR ในการตรวจคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *V.harveyi, V.parahaemolyticus*และ *V.vulnificus*เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.ศึกษาค่าความไวของเชื้อแบคทีเรีย *V.harveyi, V.parahaemolyticus*และ *V.vulnificus*ในเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Multiplex PCR

2.ศึกษาการคัดแยก *Vibrio*สามสายพันธุ์จากหอยทะเลที่ได้รับจากตลาดสด 5 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานคร

3.สามารถนำ primer ทั้ง3 คู่มาประยุกต์ใช้ในการคัดแยกสายพันธุ์*Vibrio*ในหอยทะเล

1.4 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เดือนตุลาคม พ.ศ. 2557ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558

1.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ตึก 26 ชั้น 3และชั้น 4คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ที่อยู่ เลขที่ 1 ถนนอู่ทองนอก แขวงวชิระ เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300 โทรศัพท์ 0-2160-1143-45 โทรสาร 0-2160-1146