สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาเชื้อก่อโรคสกุลวิบริโอสามชนิด ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

Optimal Condition for Detection of Three Pathogenic *Vibrio* spp. by Multiplex PCR

อุมาพร ขิมมากทอง * ฐิตาภา แท่งทอง นันทิชา ยกทอง และ อุมาพร นิ่มแก้ว

Umaporn Khimmakthong *, Thitapha Thaengthong, Nunticha Yokthong and Umaporn Nimkaew

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอจำนวน 3 ชนิด ที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิสในกุ้งขาว ได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* โดยออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของแบคทีเรียทั้งสามชนิด ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์คือ 62 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบความจำเพาะของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์โดยนำไปเพิ่มจำนวนแบคทีเรียชนิดอื่น ผลปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นที่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหลอดที่มีเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น ยกเว้นหลอดที่มี *Vibrio fluvialis* นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับวิธีพีซีอาร์ธรรมดา (conventional PCR) เทคนิคนี้สามารถใช้ในการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในกุ้ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งต่อฟาร์มเลี้ยงกุ้งและโรงเพาะฟัก และนำไปสู่การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดและวางแผนการจัดการบ่อและน้ำเพื่อให้กุ้งมีสุขภาพดีอยู่เสมอ

คำสำคัญ: มัลติเพล็กซ์, พีซีอาร์, วิบริโอซิส, แบคทีเรีย, กุ้ง

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย เลขที่ 133 หมู่ 5 ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, 133 Moo 5, Thungyai, Thungyai, Nakhon Si Thammarat 80240, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): tal_biot@hotmail.com Tel: 08 0545 8353

ABSTRACT

The objective of this study aimed to find the optimal condition of multiplex PCR for the detection of three pathogenic *Vibrio* spp. (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*) causing Vibriosis in white shrimp. Three pairs of primer were designed to amplify the target DNA fragments of three bacteria. The results showed that the optimal annealing temperature for multiplex PCR is 62 degrees Celsius. The specificity of multiplex PCR was evaluated by amplify the others bacteria. The results showed no specific bands of *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* appeared in the reaction tubes of others bacteria except reaction tube of *Vibrio fluvialis*. In addition, it saves time and cost when compared to conventional PCR. This technique will be beneficial for bacterial detection in shrimp farms and hatcheries. It leads to the monitoring outbreak and management planning of pond and water to gain the healthy shrimps.

Key words: multiplex, PCR, vibriosis, bacteria, shrimp

บทนำ

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งขาวได้เป็นอันดับ 2 ของโลก และส่งออกเป็นอันดับ 1 ของโลก แต่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวของไทยก็กำลังประสบปัญหาโรคระบาดที่เกิดขึ้น โดยเริ่มระบาดอย่างหนักตั้งแต่ต้นปี 2554 กระทั่งทำให้ผลผลิต กุ้งขาวโดยรวมปี 2555 ลดลงประมาณร้อยละ 10-20 (สำนักกิจกรรมสื่อสารองค์กร เครือเจริญโภคภัณฑ์, 2555) การติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาวที่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยด้วย คือ โรควิบริโอซิส (Vibriosis) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียสกุล วิบริโอ (de la Peña *et al*., 1993; Janda *et al*., 2015) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนโค้ง ใช้แฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ เจริญได้ทั้งในบริเวณที่มีอากาศและไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 18-37 องศาเซลเซียส มีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียสกุลวิบริโอจากกุ้งที่เป็นโรค เช่น *Vibrio parahaemolyticus* (Kumar *et al*., 2014; Jun *et al*., 2016) *Vibrio alginolyticus* (Li *et al*., 2008; Chang *et al*., 2008) และ *Vibrio vulnificus* (Dalsgaard and Hoi, 1997)

กุ้งที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะมีอัตราการตายสูง กินอาหารน้อยลง สังเกตจากกุ้งไม่มีอุจจาระและลอกคราบได้ช้าลงเลือด(hemolymph) แข็งตัวช้า ตับและตับอ่อนผิดปกติ สีเนื้อจะขุ่น กุ้งจะขึ้นมาเกาะตามขอบบ่อ ตัวกุ้งจะสกปรก มีจุดและตะกอนเกาะตามผิวและเปลือก (Robert-Pillot *et al*., 2010) *V. vulnificus* ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบ พบมากในเขตน้ำกร่อยและเค็ม โดยจะออกฤทธิ์ที่ตับและตับอ่อน ซึ่งเป็นแหล่งสะสม

อาหารและสร้างน้ำย่อย สะสมเกลือแร่ และสารพิษต่างๆ ทำให้มีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย โดยเชื้อจะเข้าสู่ตัวกุ้งทางการกินอาหาร และบาดแผล ซึ่งเกิดจากการจัดการภายในบ่อที่ไม่ดี ทำให้เชื้อ *V. vulnificus* ที่มีอยู่ในน้ำเข้าทำอันตรายต่อกุ้ง โดยเฉพาะตับและตับอ่อน กุ้งมีอาการอ่อนแอ กินอาหารได้น้อยลง ตับจะมีขนาดโตหรือฝ่อ มีการเปลี่ยนเป็นสีขาวซีดหรือดำคล้ำ กล้ามเนื้อจะมีสีขาวขุ่น และมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น (Dalsgaard and Hoi, 1997) ส่วนกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* จะกินอาหารลดลง เปลือกนิ่ม อาจมีดวงขาวที่เปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว ตัวกุ้งอาจมีสีแดง กล้ามเนื้อตายมักมีสีขาวขุ่น กุ้งมีอัตราการตายสูง และมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่พบว่าเกิด nodules จำนวนมากล้อมรอบบริเวณของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย โดยมีเม็ดเลือด (hemocyte) เข้ามารวมกลุ่มเพื่อกำจัดเซลล์ที่ถูกทำลายไป และมีการสะสมของเม็ดสี (melanization) บริเวณที่เกิดบาดแผล จึงอาจทำให้กุ้งตายได้ (Esteve and Herrera, 2000)

การตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูง ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่าง ต่อมาจึงได้มีความพยายามในการใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย เช่น การทำพีซีอาร์ซึ่งจะช่วยให้การตรวจมีความไวสูงขึ้น และใช้เวลาน้อยลง (Wei *et al*., 2014) โดยในช่วงแรกจะเป็นการตรวจหายีนที่เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic markers) ที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียแค่ชนิดเดียว เช่น ตรวจหายีน *ctx* ของ *V. mimicus* (Dick *et al*., 2012) และยีน *trh* ของ *V. parahaemolyticus* (Nordstrom *et al*., 2007) เป็นต้น ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ที่สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดในหลอดเดียว ช่วยให้ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายมากขึ้น เรียกว่ามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) และมีหลายงานวิจัยที่นำเอาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ในการตรวจหาเชื้อวิบริโอ (Nhung *et al*., 2007; Tarr *et al*., 2006; Teh *et al*., 2010)

งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่ที่มีความจำเพาะกับเชื้อแต่ละตัวเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญสกุลวิบริโอสามชนิด ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในคราวเดียว และมีไพรเมอร์ของยีนควบคุมอีกหนึ่งคู่เพื่อป้องกันผลลบเท็จที่อาจเกิดขึ้น โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อแต่ละชนิด จากนั้นทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ต่อเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย และการนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้จริงในอนาคตเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง และในกุ้งที่วางขายตามท้องตลาดจะเป็นประโยชน์อย่างมากทั้งต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งและผู้บริโภคกุ้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences, Thailand) เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. cholera* และ *V. mimicus* และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas*

hydrophila และ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอทำการเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มี 1.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธีการต้ม (ดัดแปลงจาก Pathmanathan *et al*., 2003) โดยนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ในน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงนี้จะถูกและเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำพีซีอาร์ต่อไป

3. การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับเบสของแบคทีเรียทั้งสามชนิดที่ถูกเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www. ncbi. nlm.nih.gov/genbank/) มาทำ multiple alignment เพื่อหาช่วง different region ซึ่งคือช่วงที่พบได้เฉพาะแบคทีเรียชนิดนั้นๆ เท่านั้น ไม่พบในแบคทีเรียชนิดอื่น แล้วจึงนำช่วงของดีเอ็นเอนั้นมาออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 โดยไพรเมอร์ที่ได้จะต้องมีค่า T_m ที่ใกล้เคียงกัน และขนาดของ PCR product ที่ได้จากแต่ละคู่ของไพรเมอร์จะต้องต่างกันอย่างน้อย 20 คู่เบส (base pairs, bp) (Sint *et al*., 2012)

4. การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ไพรเมอร์แต่ละคู่ที่จะใช้ในการทดลองจะถูกตรวจสอบโดยการทำพีซีอาร์ธรรมดาก่อน โดยใช้ PCR Master Mix II (5X) (GeneMark, Taiwan) ใน 1 หลอดปฏิกิริยา (25 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย Forward primer 0.4 ไมโครโมลาร์, Reverse primer 0.4 ไมโครโมลาร์, Taq DNA polymerase 0.75 ยูนิต, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์, dNTPs 250 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายในเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิช่วง annealing ที่แตกต่างกัน คือ 60, 61 และ 62 องศาเซลเซียส สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60, 61, 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นนำไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ (ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย 3 คู่ + ไพรเมอร์ของยีนควบคุม 1 คู่) มารวมกันใน 1 หลอด โดยใน 1 หลอดปฏิกิริยา (25 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย Forward primer คือ VA-F 0.4 ไมโครโมลาร์, VP-F 0.4 ไมโครโมลาร์, VV-F 0.4 ไมโครโมลาร์ และ 16S-F 0.4 ไมโครโมลาร์), Reverse primer คือ VA-R 0.4 ไมโครโมลาร์, VP-R 0.4 ไมโครโมลาร์, VV-R 0.4 ไมโครโมลาร์ และ 16S-R 0.4 ไมโครโมลาร์), Taq DNA

polymerase 0.75 ยูนิต, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์, dNTPs 250 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ไมโครลิตร (ดีเอ็นเอของ *V. alginolyticus* 1 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* 1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* 1 ไมโครลิตร) สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ และมีหลอดควบคุมลบ (Negative control) ที่จะใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ และตรวจสอบผลโดยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis

5. การตรวจสอบความจำเพาะของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ตรวจสอบความจำเพาะของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์โดยการทำทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอตัวอื่นที่ไม่ใช่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้แก่ *V. fluvialis*, *V. cholera* และ *V. mimicus*, และกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในสัตว์น้ำชนิดอื่นที่ไม่ใช่วิบริโอ ได้แก่ *S. typhimurium, A. hydrophila และ P. Aeruginosa* โดยใน 1 หลอดปฏิกิริยา (25 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย Forward primer คือ VA-F 0.4 ไมโครโมลาร์, VP-F 0.4 ไมโครโมลาร์, VV-F 0.4 ไมโครโมลาร์ และ 16S-F 0.4 ไมโครโมลาร์), Reverse primer คือ VA-R 0.4 ไมโครโมลาร์, VP-R 0.4 ไมโครโมลาร์, VV-R 0.4 ไมโครโมลาร์ และ 16S-R 0.4 ไมโครโมลาร์), Taq DNA polymerase 0.75 ยูนิต, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์, dNTPs 250 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบของพีซีอาร์ธรรมดาและมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์รวมถึงการทดสอบความไวและความจำเพาะของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จะแสดงในรูปแบบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เทียบกับ 100 bp markers ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

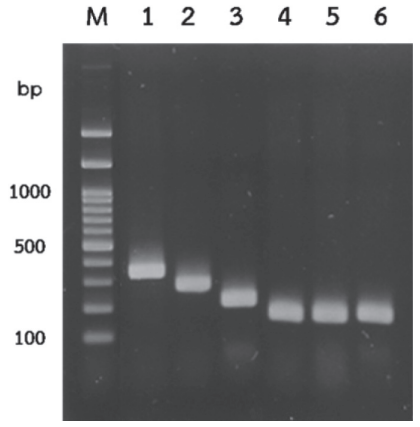
มัลติเพล็กพีซีอาร์เป็นเทคนิคพีซีอาร์ที่ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ หลายคู่พร้อมกันในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน ช่วยให้ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ที่นำมาใช้ต้องออกแบบให้ดี ไม่มีการจับคู่กันเอง และเมื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วจะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันไม่น้อยกว่า 20 bp (Sint *et al*., 2012) การทำมัลติเพล็กพีซีอาร์นั้น ต้องปรับสภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถ

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากทุกไพรเมอร์ที่ใส่ลงไปได้เท่าๆ กัน มีหลายงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับการใช้มัลติเพล็กพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อในกลุ่มวิบริโอ (Nhung *et al*., 2007; Tarr *et al*., 2006; Teh *et al*., 2010) แต่ละงานวิจัยก็ให้ผลออกมาแตกต่างกัน บางงานวิจัยชี้ให้เห็นว่าเทคนิคนี้ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันมากได้ เช่น ระหว่างเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* และนอกจากนี้ยังพบว่าอาจมี PCR inhibitors ในตัวอย่างที่ไปยับยั้งปฏิกิริยาทำให้ได้ผลการทดลองเป็นลบเท็จ (false-negative) (Al-Soud and Rådström, 2001) ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการทำ Internal amplification control (IAC) เพิ่มไปอีกหนึ่งตัว (Hoorfar *et al*., 2004) ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบและใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายของแบคทีเรียสกุลวิบริโอ 3 ชนิด คือ ยีน *gyrB* ของ *V. alginolyticus*, ยีน *collagenase* ของ *V. parahaemolyticus* และยีน *vvhA* ของ *V. vulnificus* และมีไพรเมอร์ของยีนควบคุมอีก 1 คู่ คือยีน *16S rRNA* ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด ทั้งนี้เพื่อป้องกันผลลบเท็จที่อาจเกิดขึ้น

ไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงในตารางที่ 1 โดยในการทดสอบได้ใช้อุณหภูมิช่วง annealing 3 อุณหภูมิ คือ 60, 61 และ 62 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าที่ 60 และ 61 องศาเซลเซียส พบ non-specific เกิดขึ้น (ไม่แสดงข้อมูล) ในขณะที่ 62 องศาเซลเซียส ให้ผลดีที่สุด คือแถบดีเอ็นเอที่ได้ชัดเจน และไม่มี non-specific เกิดขึ้น จึงได้ใช้อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 62 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง เมื่อทดสอบไพรเมอร์แต่ละคู่ต่อเชื้อ ที่ต้องการศึกษา ผลปรากฏว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตรงกับขนาดที่ได้ออกแบบไว้คือ ไพรเมอร์ VA กับเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 338 bp, ไพรเมอร์ VP กับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 281 bp, ไพรเมอร์ VV กับเชื้อ *V. vulnificus* ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 213 bp และไพรเมอร์ 16S ต่อเชื้อทุกตัวได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 168 bp ดังแสดงในรูปที่ 1

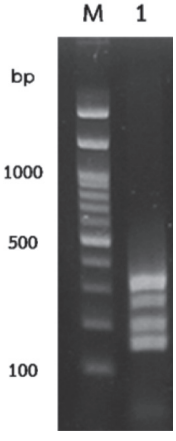
ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5'→3')	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (bp)	อ้างอิง
V. alginolyticus	**VA-F:** GAGAACCCGACAGAAGCGAAG	338	Zhou *et al*., 2007
	VA-R: CCTAGTGCGGTGATCAGTGTTG		
V. parahaemolyticus	**VP-F:** GCAAATATGCGGGGCCAATCTT	281	งานวิจัยนี้
	VP-R: CGCCGCTTGATTGTCTTTTTCG		
V. vulnificus	**VV-F:** TCCATCGATGTTCGCGTCAA	213	งานวิจัยนี้
	VV-R: ACTGCTGGCGAATGGACCAA		
16S rRNA	**16S-F:** CCTGGTAGTCCACGCCGTAA	168	Wei *et al*., 2014
	16S-R: CGAATTAAACCACATGCTCCA		



ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของพีซีอาร์ธรรมดา เมื่อทดสอบไพรเมอร์แต่ละคู่ ที่ 62 องศาเซลเซียส (Lane M: 100 bp marker, Lane 1: primer VA กับ *V. alginolyticus*, Lane 2: primer VP กับ *V. parahaemolyticus*, Lane 3: primer VV กับ *V. vulnificus*, Lane 4, 5 และ 6: primer 16S กับ *V. alginolytisus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ตามลำดับ)

เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ มาใส่รวมกันในหลอดเดียวเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ไปพร้อมๆ กันในหลอดเดียวกัน ผลปรากฏว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้ง 4 ขนาดเกิดขึ้นในหลอดเดียว คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 338 bp ของเชื้อ *V. alginolyticus*, ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 281 bp ของเชื้อ *V. parahaemolyticus*, ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 213 bp ของเชื้อ *V. vulnificus* และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 168 bp ของเชื้อทั้งสามตัว แต่ละแถบมีความชัดเจน มีความหนาที่ใกล้เคียงกันทุกแถบ และมีขนาดที่ถูกต้องตามที่ออกแบบไว้ ดังแสดงในรูปที่ 2

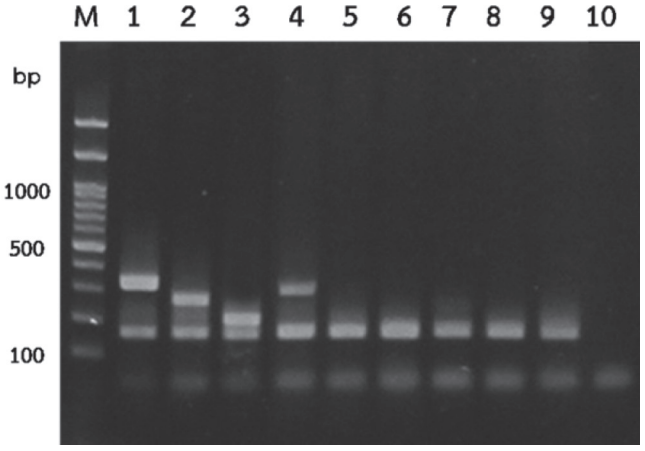


ภาพที่ 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Lane M: 100 bp marker, Lane 1: primer ทั้ง 4 คู่ กับ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*)

2. การตรวจสอบความจำเพาะของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

การทดสอบความจำเพาะของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ต่อเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นๆ ผลปรากฏว่า พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในหลอดที่มี *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ด้วยขนาดที่ถูกต้อง และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหลอดที่มีเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น ยกเว้นหลอดที่มี *V. fluvialis* ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับ 338 bp ของ *V. alginolyticus* ดังแสดงในรูปที่ 3

V. fluvialis เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นพบได้ในลำไส้ของกุ้งและในน้ำทะเล แม้ว่า *V. fluvialis* จะไม่ค่อยมีรายงานการก่อโรคในกุ้ง แต่กลับมีรายงานว่าการบริโภคกุ้งที่มี *V. fluvialis* ปนเปื้อนในปริมาณมากจะทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงและบางรายอาจเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ (Lai *et al*., 2006) แถบดีเอ็นเอไม่พึงประสงค์ของ *V. fluvialis* ที่เกิดขึ้นนี้มีขนาดอยู่ระหว่าง 281 bp ของ *V. parahaemolyticus* และ 338 bp ของ *V. alginolyticus* ซึ่งเป็นทั้งข้อดีและข้อเสีย ข้อเสียคือ หากผู้ทดลองไม่ทำ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เทียบลงไปด้วย อาจทำให้การวินิจฉัยผลการทดลองผิดพลาด โดยอาจวินิจฉัยผิดว่าเชื้อ *V. fluvialis* เป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. alginolyticus* ได้ แต่ในทางกลับกันก็เป็นข้อดีคือ หากผู้ทดลองทำเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เทียบลงไปด้วยในการทดลองทุกครั้ง ผู้ทดลองจะสามารถวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียได้เพิ่มอีกหนึ่งชนิดคือ *V. fluvialis* ซึ่งหากเป็น *V. fluvialis* ก็จะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดดังกล่าวเกิดขึ้น



รูปที่ 3 ผลการทดสอบความจำเพาะของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์กับเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น (Lane M: 100 bp 1: *V. alginolyticus*, Lane 2: *V. parahaemolyticus*, Lane 3: *V. vulnificus*, Lane 4: *V. fluvialis*, Lane 5: *V. cholerae*, Lane 6: *V. mimicus*, Lane 7: *S. typhimurium*, Lane 8: *A. hydrophila*, Lane 9: *P. aeruginosa*, Lane 10: negative control)

มีรายงานการทดลองที่ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอทั้งในส่วนของฟาร์มกุ้ง (He *et al.*, 2014; Wei *et al*., 2014; Cano-Gomez *et al*., 2015) และในเนื้อกุ้งที่วางขาย (Zhang *et al*., 2015) นอกจากนี้ยังพบรายงานการใช้มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในสัตว์น้ำชนิดอื่นด้วย เช่น ในปลา (Espiñeira *et al*., 2010) และหอย (Yáñez *et al*., 2015) เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดรายงานตรงกันว่ามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง ช่วยประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย และเมื่อทำการคำนวณค่าใช้จ่ายที่ใช้สำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดควบคู่กับยีนควบคุม ปรากฏว่าวิธีพีซีอาร์ธรรมดามีค่าใช้จ่ายอยู่ที่ 2,233.2 บาท ในขณะที่การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มีค่าใช้จ่ายเพียง 1 ใน 4 ของพีซีอาร์ธรรมดาคือ 556.05 บาท

สรุป

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในงานวิจัยนี้สามารถตรวจหาเชื้อสามชนิด คือ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันได้อย่างจำเพาะ และในการตรวจหาเชื้อทั้งสามชนิดนี้ในหลอดปฏิกิริยาเดียว เมื่อเทียบกับการทำพีซีอาร์ธรรมดาที่ต้องใช้หลอดปฏิกิริยาถึงสี่หลอด จึงช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายลงได้ ในอนาคตหากนำเทคนิคนี้ไปใช้จริงในการตรวจเชื้อเหล่านี้ในกุ้ง จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง เพราะสามารถใช้ตรวจหาเชื้อในกุ้งได้ก่อนที่กุ้งจะเป็นโรค และจะได้หาแนวทางป้องกันได้อย่างทันท่วงที อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคกุ้งเพราะสามารถใช้ตรวจหาเชื้อเหล่านี้ที่ปนเปื้อนอยู่ในกุ้งที่จะนำไปวางขายในท้องตลาด ทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้บริโภคอันมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย และสถานที่ในการทำวิจัยคือ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์ และห้องปฏิบัติการชีวเคมีทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ทุ่งใหญ่

เอกสารอ้างอิง

สำนักกิจกรรมสื่อสารองค์กร เครือเจริญโภคภัณฑ์. 2555. **สัญญาณเตือนภัย กุ้งปี 2555 "ราคาตก" (*CPe-news*).** แหล่งที่มา: http://www.cpthailand.com/Default.aspx?tabid=129&articleType=ArticleView&articleId=770, 27 เมษายน 2559.

Al-Soud, W.A. and Rådström, P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology** 39(2): 485-493.

Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L., Baillie, B.K. and Andreakis, N. 2015. A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of Vibrio harveyi-related species. **Aquaculture** 437: 195-200.

Chang, C., Yeh, M., Lin, H. and Cheng, W. 2008. The effect of Vibrio alginolyticus infection on caspase-3 expression and activity in white shrimp Litopenaeus vannamei. **Fish & Shellfish Immunology** 25(5): 672-678.

Dalsgaard, A. and Hoi, L. 1997. Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from shrimp products imported into Denmark. **Journal of Food Protection** 60: 1132-1135.

de la Peña, L.D., Tamaki, T., Momoyama, K., Nakai, T. and Muroga, K. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, Penaeus japonicas. **Aquaculture** 115(1-2): 1-12.

Dick, M.H., Guillerm, M., Moussy, F. and Chaignat, C.L. 2012. Review of two decades of cholera diagnostics-How far have we really come?. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 6: e1845.

Espiñeira, M., Atanassova, M., Vieites, J.M. and Santaclara, F.J. 2010. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of Vibrio by multiplex PCR in fish and seafood. **Food Microbiology** 27(1): 122-131.

Esteve, M. and Herrera, F.C. 2000. Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Dacapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. **Journal of Invertebrate Pathology** 76: 1-5.

He, P., Chen, Z., Luo, J., Wang, H., Yan, Y., Chen, L. and Gao, W. 2014. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus strains. **Molecular and Cellular Probes** 28(5-6): 246-250.

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M. and Fach, P. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology** 42(5): 1863-1868.

Janda, J.M., Newton, A.E. and Bopp, C.A. 2015. Vibriosis. **Clinics in Laboratory Medicine** 35(2): 273-288.

Jun, J.W., Han, J.E., Tang, K.F.J., Lightner, D.V., Kim, J., Seo, S.W. and Park, S.C. 2016. Potential application of bacteriophage pVp-1: Agent combating Vibrio parahaemolyticus strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. **Aquaculture** 457: 100-103.

Kumar, B.K., Deekshit, V.K., Raj, J.R.M., Rai, P., Shivanagowda, B.M., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2014. Diversity of Vibrio parahaemolyticus associated with disease outbreak among cultured Litopenaeus vannamei (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture** 433: 247-251.

Lai, C.H., Hwang, C.K., Chin, C., Lin, H.H., Wong, W.W. and Liu, C.Y. 2006. Severe watery diarrhoea and bacteraemia caused by Vibrio fluvialis. **Journal of Infection** 52(3): e95-e98.

Li, C., Yeh, S. and Chen, J. 2008. The immune response of white shrimp Litopenaeus vannamei following Vibrio alginolyticus injection. **Fish & Shellfish Immunology** 25: 853-860.

Nhung, P.H., Ohkusu, K., Miyasaka, J., Sun, X.S. and Ezaki, T. 2007. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to dnaJ gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 59(3): 271-275.

Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Blackstone, G.M., Murray, S.L. and DePaola, A. 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. **Applied and Environmental Microbiology** 73: 5840-5847.

Pathmanathan, S.G., Cardona-Castro, N., Sanchez-Jimenez, M.M., Correa-Ochoa, M.M., Puthucheary, S.D. and Thong, K.L. 2003. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. **Journal of Medical Microbiology** 52: 773-776.

Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P. and Quilici, M.L. 2010. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology** 143: 190-197.

Sint, D., Raso, L. and Traugott, M. 2012. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. **Methods in Ecology and Evolution** 3(5): 898-905.

Tarr, C.L., Patel, J.S., Puhr, N.D., Sowers, E.G., Bopp, C.A. and Strockbine, N.A. 2006. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. **Journal of Clinical Microbiology** 45(1): 134-140.

Teh, C.S.J., Chua, K.H. and Thong, K.L. 2010. Simultaneous differential detection of human pathogenic and nonpathogenic *Vibrio* species using a multiplex PCR based on gyrB and pntA genes. **Journal of Applied Microbiology** 108(6): 1940-1945.

Wei, S., Zhao, H., Xian, Y., Hussain, A.M. and Wu, X. 2014. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 79: 115-118.

Yáñez, R., Bastías, R., Higuera, G., Salgado, O., Katharios, P., Romero, J., Espejo, R. and García, K. 2015. Amplification of tlh gene in other Vibrionaceae specie by specie-specific multiplex PCR of Vibrio parahaemolyticus. **Electronic Journal of Biotechnology** 18(6): 459-463.

Zhang, Z., Xiao, L., Lou, Y., Jin, M., Liao, C., Malakar, P.K., Pan, Y. and Zhao, Y. 2015. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of Vibrio parahaemolyticus, Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw shrimp. **Food Control** 51: 31-36.

Zhou, S., Hou, Z., Li, N. and Qin, Q. 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.