



รายงานวิจัย

การตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของการก่อโรค
และการวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *Vibrio parahaemolyticus*
สายพันธุ์ที่แยกจากหอยนางรมสด

Molecular-based Characterization of Potential Virulent Markers
and Phylogenetic Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated
from Raw Oyster

สุดาร์ตน์ สนวนจิตร
ณัฐฐวิ ชั่งชัย
เบญจมาศ โปปัญญาทะกุล

ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2556
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2556

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้วิเคราะห์คุณลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยนางรมสด จากร้านค้าปลีกบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลา ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 จำนวน 1,785 ไอโซเลท เพื่อบ่งชี้ *Vibrio parahaemolyticus* โดยเฉพาะสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ระบาดทั่ว เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและยืนยันเชื้อด้วยการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีน *tl* ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถระบุเชื้อที่นำมาศึกษาว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 1,293 ไอโซเลท เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* ดังกล่าวมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนก่อโรค คือ *tdh* และ *trh* พบว่ามี 17 ไอโซเลท (1.31 เปอร์เซ็นต์) แสดงผลบวกกับยีน *tdh* และมี 2 ไอโซเลท (0.15 เปอร์เซ็นต์) แสดงผลบวกกับยีน *trh* โดยไม่พบสายพันธุ์ที่มียีนทั้งสองยีนดังกล่าว เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่พบระบาดทั่ว โดยการทำให้ GS-PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของ *toxRS/new sequence* รวมทั้งตรวจสอบการมีอยู่ของ ORF8 ของฟาจ f237 พบว่ามี 9 ไอโซเลท (0.31 เปอร์เซ็นต์) ที่มีจีโนไทป์เป็น *tdh*⁺ GS-PCR⁺ ORF8⁺ ซึ่งเป็นจีโนไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่ว O3:K6 และซีโรไทป์อื่น ๆ ที่แปรผันมาจาก O3:K6 เมื่อวิเคราะห์ซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus* ที่มีจีโนไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่ว ร่วมกับสายพันธุ์อื่น พบว่าเชื้อเหล่านี้มีซีโรไทป์หลากหลาย โดยระบุได้เป็น 7 ซีโรไทป์ ได้แก่ O1:KUT, O4:KUT, O11:K36, O4:K4, O8:K41, O1:K68 และ O4:K42 โดยที่ O4:KUT เป็นซีโรไทป์ที่พบมากที่สุด (33.3 เปอร์เซ็นต์) โดยในการศึกษานี้ไม่พบซีโรไทป์ O3:K6 ซึ่งเป็นซีโรไทป์หลักของสายพันธุ์ระบาดทั่ว อย่างไรก็ตามพบ *V. parahaemolyticus* 1 ไอโซเลท (*tdh*⁺ GS-PCR⁺, ORF8⁺) มีซีโรไทป์ O1:KUT ซึ่งเป็นซีโรไทป์หนึ่งซึ่งพบได้ในสายพันธุ์ระบาดทั่ว ส่วนอีก 6 ซีโรไทป์ที่ตรวจนั้น ถือเป็นรายการงานครั้งแรกของอุบัติการณ์ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่ตรวจพบซีโรไทป์เหล่านี้ใน *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีจีโนไทป์สัมพันธ์กับสายพันธุ์ระบาดทั่ว ในอีกทางหนึ่ง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *atpA* ของ *V. parahaemolyticus* เหล่านี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ได้ ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าพื้นที่ชายฝั่งทะเลแถบตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคทั่วไปและสายพันธุ์ก่อโรคที่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ระบาดทั่ว โดยที่หอยนางรมเป็นแหล่งสะสมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่สำคัญ ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นทั้งกับผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงควรมีมาตรการจัดการที่ดี รวมทั้งการพัฒนาโมเดลเครื่องหมายเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชิงระบาดวิทยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อประโยชน์ในการป้องกันและลดความเสี่ยงหรืออันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการแพร่ระบาดของแบคทีเรียชนิดนี้ในอนาคต

คำสำคัญ วิบริโอ วิบริโอ พาราฮีโมลัยติคัส หอยนางรม การก่อโรคของวิบริโอ
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของวิบริโอ พาราฮีโมลัยติคัส

ABSTRACT

This study was performed to identify and characterize *Vibrio parahaemolyticus* amongst isolates obtained from unshelled raw oyster retailed along Ang-Sila coast, Chonburi province, during December 2009-February 2011. Molecular characteristics regarding virulent gene marker and pandemic traits of this bacterium were assessed. Total of 1,785 bacterial isolates were tested and 1,293 isolates were approved to be *V. parahaemolyticus* based on species-specific gene (*tl*)-targeted PCR confirmation. Seventeen (1.31 %) and two (0.15 %) isolates carried one of the pathogenic genes, *tdh* and *trh*, respectively. However, isolate of *V. parahaemolyticus* possessing both *tdh* and *trh* was not observed. Subsequent characterization demonstrated that the nine strains of pathogenic *V. parahaemolyticus* harbored pandemic-associated characteristics, i.e. *tdh*⁺, GS-PCR⁺, ORF8⁺, as found in the pandemic O3:K6 strain and its serovariants. Serological analyses indicated that these strains belonged to seven serovars including O1:KUT, O4:KUT, O11:K36, O4:K4, O8:K41, O1:K68, and O4:K42, of which the O4:KUT was the most dominant serovar in this area (33.3 %). Indeed, there was one strain displayed O1:KUT serovar, which is one of recently recognized serovariants of the pandemic O3:K6 clone. Notably, the other six serovars were firstly reported here as *V. parahaemolyticus* serovars associated with pandemic-specific traits. Nucleotide sequences of 16S rRNA and *atpA* gene were adopted to infer the diversity among intraspecies of *V. parahaemolyticus* originated from oysters in Ang-Sila coast. The analyses showed that such molecular chronometer could not provide certain evolutionary relationships among *V. parahaemolyticus* strains due to high similarities of gene sequences. The occurrence of pathogenic as well as pandemic-associated strains of *V. parahaemolyticus* is a sign of health hazard invading the eastern region of Thailand. Raw oyster is not only a major reservoir of virulent *V. parahaemolyticus*, but it is also a vehicle of spreading of pandemic strains of this bacterium which could be a potent causative agent of human infection. Taking into consideration, risk assessment and management should be acted promptly for prevention of disease outbreak in this area. Genetic diversity among strains of both organisms should be further verified since this might relate to their epidemiology and could benefit the program of surveillance.

Keywords: Vibrios, *Vibrio parahaemolyticus*, Oyster, Pathogenicity of Vibrios, Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus*

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง.....	ง
สารบัญภาพ.....	จ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	5
รายละเอียดเกี่ยวกับ <i>V. parahaemolyticus</i>	5
รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	13
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	41
สรุปผลการทดลอง.....	41
อภิปรายผลการทดลอง.....	41
ข้อเสนอแนะ.....	46
เอกสารอ้างอิง.....	47
ภาคผนวก.....	55
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	56
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี บัฟเฟอร์ และรีเอเจนต์.....	59
ภาคผนวก ค การทดสอบทางชีวเคมี.....	61
ภาคผนวก ง ลำดับขั้นตอนการจำแนก <i>V. parahaemolyticus</i>	66
โดยวิธีทางชีวเคมีและการยืนยันผลด้วยพีซีอาร์	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	แบบแผนคุณลักษณะทางชีวเคมีสำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียสกุลวิบริโอ.....	11
3-1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	19
3-2	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน <i>tl</i>	21
3-3	สภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>tl</i>	22
3-4	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน <i>tdh</i>	23
3-5	สภาวะของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>tdh</i>	23
3-6	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน <i>trh</i>	24
3-7	สภาวะของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>trh</i>	24
3-8	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับ GS-PCR	25
3-9	สภาวะของการดำเนินปฏิกิริยา GS-PCR	25
3-10	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณ ORF8	26
3-11	สภาวะของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ORF8	26
4-1	ลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีของวิบริโอชนิดต่าง ๆ	28
	ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง	
4-2	จำนวนไอโซเลทของ <i>V. parahaemolyticus</i> จากการคัดกรองบน.....	29
	CHROMagar TM <i>Vibrio</i> และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	
4-3	การยืนยัน <i>V. parahaemolyticus</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์	31
	โดยใช้ยีนเครื่องหมาย <i>tl</i> ซึ่งจำเพาะต่อสปีชีส์	
	โดยเปรียบเทียบกับการจำแนกเบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวเคมี	
4-4	ไอโซเลทของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ที่แยกจากหอยนางรม.....	35
	ที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ระบาดทั่ว	
4-5	การวิเคราะห์ซีโรไทป์ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ	36
	ที่แยกได้จากหอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายในบริเวณชายทะเลอ่างศิลา	
	จังหวัดชลบุรี	

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะแฟลกเจลลาของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
2-2	ลักษณะโคโลนีของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนอาหาร TCBS agar....	6
2-3	ตำแหน่งเป้าหมายของไพรเมอร์ (GS-VP.1 และ GS-VP.2)	13
	ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน <i>toxRS</i> ด้วยเทคนิค GS-PCR	
	และองค์ประกอบของเบสที่แตกต่างกันจาก <i>toxRS</i>	
	ระหว่าง O3:K6 สายพันธุ์เดิม และ O3:K6 สายพันธุ์ใหม่	
4-1	การใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมาย <i>tl</i> เพื่อยืนยันการจัดจำแนก.....	30
	<i>V. parahaemolyticus</i>	
4-2	การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>tdh</i> ใน.....	32
	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ที่แยกได้จากหอยนางรมสดแกะเปลือก	
4-3	การตรวจสอบยีน <i>trh</i> ซึ่งเป็นเครื่องหมายการก่อโรคของ	33
	<i>V. parahaemolyticus</i>	
4-4	การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบ Group-specific (GS) sequence (651 คู่เบส)....	34
	ใน <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ก่อโรคที่แยกจากหอยนางรม	
4-5	การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบการมีอยู่ของ ORF8 ของฟาจ f237 ใน	34
	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ที่แยกจากหอยนางรม	
4-6	แผนภูมิต้นไม้แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่าง <i>V. parahaemolyticus</i>	39
	สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งสร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA	
4-7	แผนภูมิต้นไม้แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่าง <i>V. parahaemolyticus</i>	40
	สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งสร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>atpA</i>	
ค-1	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 โคโลนีมีสีม่วงชมพูอ่อน	61
ค-2	<i>V. parahaemolyticus</i> DMST 15285 โคโลนีมีสีม่วงชมพู ขอบใส.....	61
ค-3	<i>V. cholerae</i> DMST 2873 โคโลนีสีเขียวน้ำเงิน.....	62
ค-4	<i>V. cholerae</i> Ogawa AFRIM โคโลนีสีเขียว	62
ค-5	<i>A. hydrophila</i> DMST 21250 โคโลนีสีม่วงน้ำเงิน.....	62
ค-6	<i>V. alginolyticus</i> DMST 14800 โคโลนีสีขาวขุ่น.....	62
ค-7	ลักษณะโคโลนี <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar....	63
ค-8	ลักษณะของเชื้อที่เจริญเมื่อถูกทดสอบด้วย TSI agar.....	64
ค-9	ผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส	65
ค-10	ผลการทดสอบยูรีเอส.....	65

บทที่ 1 บทนำ

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ต้องการเกลือในการเจริญ (Halophile) แพร่กระจายทั่วไปในระบบนิเวศทางทะเล โดยแหล่งสะสมที่สำคัญของแบคทีเรียชนิดนี้ได้แก่ น้ำทะเล ดินตะกอน และสัตว์ทะเล โดยเฉพาะ หอยสองฝา เช่น หอยนางรม เป็นต้น (Gopal *et al.*, 2005) บางสายพันธุ์ก่อโรคต่อมนุษย์ที่มีความสัมพันธ์กับการบริโภคอาหารทะเล (Liston, 1990) โดยเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อหลังการบริโภคอาหารทะเลแบบดิบหรือกึ่งสุกกึ่งดิบ เมื่อผู้บริโภคได้รับเชื้อชนิดนี้เข้าสู่ร่างกาย ทำให้เป็นโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบหรืออาหารเป็นพิษ (Thompson *et al.*, 2006) โดยมีอาการท้องร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้และอาเจียน

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ก่อโรคมักมีความสามารถในการสร้างโปรตีนซึ่งเป็นสารพิษที่มีคุณสมบัติทนความร้อน ซึ่งพบได้ 2 ชนิด คือ Thermostable direct hemolysin (TDH) และ TDH-related hemolysin (TRH) (Yeung & Boor, 2004) โดย TDH ทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (β -hemolysis) บนอาหาร Wagatsuma agar ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Kanagawa phenomenon (KP⁺) ส่วน TRH เป็นสารพิษที่ไม่ทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (KP⁻) สารพิษทั้งสองชนิดเป็นปัจจัยสำคัญของการก่อโรคใน *V. parahaemolyticus* (Wong *et al.*, 2000) โดยปกติแล้ว *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคนั้นมักแยกได้จากผู้ป่วย และพบได้น้อยในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามจากรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสามารถแยก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคได้จากน้ำทะเลและอาหารทะเลชนิดต่าง ๆ ซึ่งพบได้ทั่วโลก (Miyamoto *et al.*, 1969; Matsumoto *et al.*, 2000; Sakazaki *et al.*, 1968)

ในปัจจุบันการบ่งชี้สายพันธุ์ก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* นิยมใช้การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ซึ่งนำรหัสการสร้างโปรตีน TDH และ TRH ตามลำดับ แบคทีเรียชนิดนี้ถูกจัดแบ่งเป็นซีโรไทป์ต่าง ๆ ตามชนิดของ O และ K antigen ปัจจุบันพบทั้งสิ้น 75 ซีโรไทป์ (Nasu *et al.*, 2000) โดยการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดได้จากหลายซีโรไทป์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 เป็นต้นมา มีรายงานการระบาดของซีโรไทป์ O3:K6 ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย จึงจัดให้ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดทั่ว (Pandemic strain) และเป็นสายพันธุ์ใหม่ซึ่งต่างจาก O3:K6 ที่เคยแยกได้ก่อนปี ค.ศ. 1996 โดย *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่พบในช่วงตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 เป็นต้นมานั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), Ribotyping, Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) และ Multilocus Sequence Typing (MLST) พบว่ามีลักษณะจีโนมไทป์แตกต่างไปจาก *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่เคยมีรายงานไว้ในช่วงก่อนปี ค.ศ. 1996 นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1998 พบ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O4:K68, O1:K25 และ O1:KUT (Untypeable) ระบาดร่วมกับ O3:K6 ในหลายประเทศ โดยสายพันธุ์เหล่านี้มีลักษณะจีโนมไทป์คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ O3:K6 ที่ระบาดทั่ว รวมทั้งยังพบว่ามีอีก 21 ซีโรไทป์ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่มีสายวิวัฒนาการเดียวกับ O3:K6 จึงเป็นไปได้ที่ซีโรไทป์เหล่านี้มีจุดกำเนิดมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน (Nair *et al.*, 2007)

V. parahaemolyticus O3:K6 สายพันธุ์ที่มีการระบาดทั่วโลกนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 เป็นต้นมานั้น มียีนก่อโรค *tdh* แต่ไม่มียีน *trh* ($tdh^+ trh^-$) การบ่งชี้ความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น ๆ สามารถทำได้โดยใช้ดีเอ็นเอที่เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic markers) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์นี้ คือ *toxRS/new sequence* (*toxRS/new*) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอบริเวณจำเพาะที่อยู่ภายใน *toxRS* operon โดยโอเปอรอนนี้เข้ารหัสการสร้าง Transmembrane proteins ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อนี้ (Matsumoto *et al.*, 2000; Meador *et al.*, 2007) โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *toxRS* จึงมีการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 สายพันธุ์ที่มีการระบาดทั่วเพื่อใช้ในการบ่งชี้สายพันธุ์ดังกล่าว เรียกเทคนิคนี้ว่า Group-specific (GS) PCR (Matsumoto *et al.*, 2000; Laohartthisan *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการพบฟาจ f237 มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 สายพันธุ์ระบาดทั่ว โดยฟาจชนิดนี้มีดีเอ็นเอบริเวณที่เรียกว่า Open Reading Frame 8 (ORF8) ซึ่งมีลักษณะจำเพาะ (ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีลักษณะ Homology กับดีเอ็นเอใด ๆ เท่าที่มีข้อมูลอยู่ในปัจจุบัน) จึงมีการใช้ดีเอ็นเอบริเวณนี้เป็นเครื่องหมายสำหรับบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ระบาดทั่วของแบคทีเรียชนิดนี้ได้เช่นกัน (Myers, Panicker, & Bej, 2003)

ในประเทศไทยมีการระบาดของ *V. parahaemolyticus* O3:K6 สายพันธุ์ระบาดทั่วในเขตพื้นที่ภาคใต้ จึงมีโปรแกรมการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อนี้อย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 ถึง 2005 มีอัตราการพบเชื้อสายพันธุ์นี้ 55.5-87.0 เปอร์เซ็นต์ (Vuddhakul *et al.*, 2000; Laohartthisan *et al.*, 2003; Wootipoom *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามในพื้นที่อื่น ๆ ของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงใต้ไม่มีรายงานถึงการพบ *V. parahaemolyticus* O3:K6 สายพันธุ์ระบาดทั่วในผู้ป่วย รวมทั้งจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหารทะเลซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อที่สำคัญ การศึกษาครั้งนี้จึงมีความสนใจตรวจสอบจีโนมไทป์ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยนางรมสดบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่สำคัญแห่งหนึ่งของการเพาะเลี้ยงและจำหน่ายหอยนางรมในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย ซึ่งนอกจากการตรวจสอบการปรากฏของยีนที่บ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรค คือ *tdh* และ *trh* แล้วยังต้องการตรวจสอบลักษณะที่บ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ระบาดทั่ว คือ การมีอยู่ของดีเอ็นเอบริเวณที่เรียกว่า Group-specific (GS) sequence โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ รวมทั้งตรวจสอบการมีอยู่ของ ORF8 ของฟาจ f237 (Ansaruzzaman *et al.*, 2008) ซึ่งข้อมูลที่ได้มีความสำคัญในการนำมาใช้อธิบายถึงการแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดทั่วโลกได้

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อที่คัดแยกได้ รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีข้อมูลปรากฏในฐานข้อมูลสาธารณะ โดยยีนที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (Phylogenetic marker) เป็นยีน 16S rRNA และ *atpA* โดยคาดว่าข้อมูลยีนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* มีประโยชน์ต่อการนำมาใช้ทางด้านระบาดวิทยาและการประเมินความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยเฉพาะในกรณีที่เกี่ยวข้องกับการบริโภค

หอยสองฝา เช่น หอยนางรม โดยในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ยังไม่เคยมีรายงาน ข้อมูลเหล่านี้มาก่อน

ความมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อจำแนกและยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลทที่แยกได้จากหอยนางรม โดยวิธีทางชีวเคมีร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์
2. เพื่อตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมบางประการซึ่งบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรค (Virulent strain) และสายพันธุ์ที่พบระบาดทั่วของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยนางรม
3. เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) ของ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากหอยนางรมสด

ความสำคัญของการศึกษา

1. สามารถจัดจำแนก *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากหอยนางรม ได้อย่างถูกต้อง
2. สามารถระบุความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยนางรม
3. สามารถระบุลักษณะทางพันธุกรรมบางประการที่สัมพันธ์กับสายพันธุ์ระบาดทั่วของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคได้
4. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้จากหอยนางรม

สมมติฐานของการศึกษา

1. ไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยนางรมมีโอกาสเป็น *V. parahaemolyticus*
2. *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนเครื่องหมายความสามารถในการก่อโรค สามารถพบได้ในไอโซเลทที่คัดแยกจากหอยนางรมสด
3. สามารถพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดทั่วได้ในไอโซเลทของเชื้อที่แยกจากหอยนางรม
4. *V. parahaemolyticus* ที่คัดแยกได้จากหอยนางรม มีความหลากหลายทางพันธุกรรม

ขอบเขตของการศึกษา

นำเชื้อที่แยกจากหอยนางรมซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จำนวน 1,785 ไอโซเลท มาฟื้นฟูสภาพเซลล์ จากนั้นนำมาจัดจำแนกโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และยืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งอาศัยยีน *tl* เป็นเป้าหมาย นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านการยืนยันเชื้อแล้วมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* เพื่อบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรค รวมทั้งตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ระบาดทั่วด้วยวิธี GS-PCR และตรวจสอบ

การมีอยู่ของ ORF8 ของฟาจ f237 และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในแบคทีเรียชนิดนี้โดยใช้
ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *atpA*

บทที่ 2

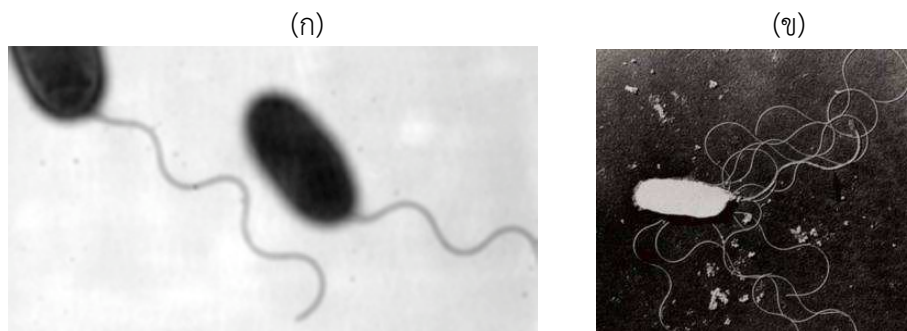
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกเป็น 2 ตอน โดยตอนแรกเป็นรายละเอียดเกี่ยวกับ *Vibrio parahaemolyticus* ทั้งในด้านสัณฐานวิทยา การแพร่กระจาย การก่อโรคและการจัดจำแนกเชื้อ ส่วนตอนที่ 2 เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. *Vibrio parahaemolyticus*

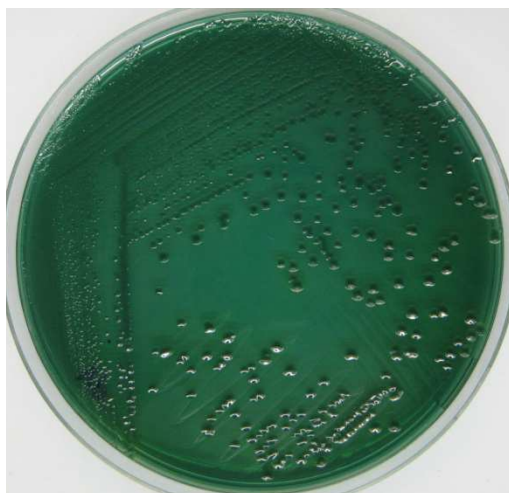
1.1 ลักษณะทั่วไป

V. parahaemolyticus อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือโค้งงอ ขนาดประมาณ $0.5-1.3 \times 1.0-3.2$ ไมโครเมตร เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ปลายเซลล์ (ภาพที่ 2-1ก) ไม่สร้างสปอร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีค่าพีเอชมากกว่าหรือเท่ากับ 8.5 จะสร้างแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยว แต่จะสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (ภาพที่ 2-1ข) *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 10-44 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญ โดยระดับความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 2-4 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชที่สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 7.6-9.0 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate Citrate Bile Salt agar (TCBS agar) ให้โคโลนีสีเขียว เนื่องจากไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครส (ภาพที่ 2-2) โคโลนีมีลักษณะกลม แบนราบ ขอบเรียบ



ภาพที่ 2-1 ลักษณะแฟลกเจลลาของ *Vibrio parahaemolyticus* (ก) monotrichous
(ข) lophotrichous

(ที่มา: McCarter, 2001)



ภาพที่ 2-2 ลักษณะโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เจริญบนอาหาร TCBS agar

1.2 การแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มฮาโลไฟล์ (Halophilic bacteria) ซึ่งต้องการเกลือในการเจริญ สามารถพบเชื้ออาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลหรือมหาสมุทรในเขตอบอุ่นหรือเขตร้อนได้ทั่วไป เชื้อสามารถสะสมตัวอยู่ในดินตะกอน แพลงก์ตอน และสัตว์ทะเลชนิดต่าง ๆ การแพร่กระจายของเชื้อมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล ในช่วงฤดูหนาวอุณหภูมิของน้ำจะต่ำลงเชื้อสามารถอาศัยในตะกอนใต้พื้นน้ำ เมื่อถึงฤดูร้อนอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นเชื้อจากตะกอนใต้พื้นน้ำแพร่กระจายเข้าสู่แพลงก์ตอนสัตว์ (Zooplankton) เชื้อนี้สามารถย่อยโคติน (เป็นส่วนประกอบในชั้นเปลือกของแพลงตอนสัตว์) เพื่อใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนในฤดูร้อน เชื้อนี้เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 9.5-45 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชเท่ากับ 5-11 และสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl 0.5-8 เปอร์เซ็นต์ (ศรีวรรณณา ทัทยานานนท์, ม.ป.ป.; Blachwell & Oliver, 2008; Oliver, 2006) ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อกลุ่มนี้ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล คือ อุณหภูมิ ผิวหน้าของน้ำทะเล ความเค็ม และความเข้มข้นของสารอินทรีย์ โดยพบว่าอุณหภูมิผิวหน้าของน้ำทะเลเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อกลุ่มนี้มากที่สุด (Vezzulli *et al.*, 2009)

1.3 การก่อโรค

Vibrio parahaemolyticus ถูกแยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1950 โดย Fujino ซึ่งแยกจากตัวอย่างอุจจาระ (stool) ของผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ ที่เมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น โดยที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อจากการบริโภคปลาซาร์ดีนแห้ง (Semi-dried young sardines; Shirasu) โดยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pasteurella parahaemolyticus* ต่อมาได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Vibrio parahaemolyticus* โดยคณะกรรมการอนุกรมวิธานของเชื้อสกุล *Vibrio* (Subcommittee on Taxonomy of *Vibrio* of International Committee on Systematic Bacteriology) (Martinez-Urtaza *et al.*, 2010) จากการระบาดครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นพบผู้ป่วยด้วยโรคอาหาร

เป็นพิษจำนวน 272 ราย และเสียชีวิต 20 ราย ต่อมาในปี ค.ศ. 1956 และ ค.ศ. 1960 ประเทศญี่ปุ่น ก็มีการระบาดด้วยเชื้อนี้ซ้ำอีก และ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่มีการระบาดหลายครั้งในญี่ปุ่น สำหรับการระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1971 ที่เมือง Maryland จากการปนเปื้อนเชื้อในปูหนึ่งและสลัดปู มีผู้ป่วยจำนวน 425 ราย และเชื้อที่แยกได้เป็น สายพันธุ์ที่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า (β -hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma agar มีซีโรไทป์ เป็น O4:K11 (Ray *et al.*, 1978) สำหรับประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1973 รายงานโดย SEATO Medical Research Laboratory Annual Report (SMRL) ในช่วงตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 1970 ถึงเดือนมิถุนายน ค.ศ. 1973 สามารถแยกเชื้อชนิดนี้จากผู้ป่วย ซึ่งรายงานไว้โดยโรงพยาบาลบาราณาราดูร และพบว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 1983 ถึง 1996 สามารถแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้จากผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วงเฉลี่ย 4.5-7.6 เปอร์เซ็นต์ (Jaisawang, 2005) และในช่วงกว่าสองทศวรรษที่ผ่านมาสามารถกล่าวได้ว่า *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่พบผู้ป่วยมากที่สุดของประเทศในแถบเอเชีย (Wong *et al.*, 1999)

การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการกินอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อและปรุงไม่สุก เช่น ปลาดิบ และหอยนางรมดิบ เป็นต้น จำนวนเชื้อต้องมีมากพอตั้งแต่ 10^4 - 10^8 เซลล์ของเชื้อนี้ จึงสามารถทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ บางครั้งอาจก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารอย่างเฉียบพลัน (Acute gastroenteritis) มีระยะฟักตัวประมาณ 5-24 ชั่วโมง เชื้อนี้จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุก ๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ ผู้ป่วยจะมีอาการใช้ตำ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และถ่ายเป็นน้ำจำนวนมาก อาการมักไม่รุนแรงและหายได้เองภายใน 2-3 วันโดยไม่ต้องรักษาด้วยยาต้านเชื้อแบคทีเรีย การรักษาด้วยยาต้านเชื้อแบคทีเรียไม่ช่วยลดระยะเวลาการดำเนินโรค บางรายอาจมีอาการรุนแรงจนทำให้ถ่ายปนเลือดได้ ผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผลที่ผิวหนังหรือเยื่อเมือกบริเวณที่สัมผัสกับแหล่งน้ำ ทำให้เกิดการติดเชื้อของบาดแผลหรือการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ โรคนี้มักพบในฤดูร้อน ไม่ค่อยพบในฤดูหนาว ไม่พบรายงานการแพร่เชื้อจากคนสู่คน การป้องกันควรหลีกเลี่ยงการกินอาหารทะเลดิบ (Nair *et al.*, 2007; Drake, DePaola, & Jaykus, 2007)

ปัจจัยก่อโรคของ *V. parahaemolyticus*

จากการศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและอาหารทะเล (Environmental and seafood strains) จากบริเวณต่าง ๆ พบว่าสามารถแยกเชื้อที่เป็นสายพันธุ์ก่อโรค มีคุณสมบัติในการสร้างโปรตีน 2 ชนิด คือ TDH และ/หรือ TRH และนอกเหนือจากโปรตีนทั้งสองชนิดดังกล่าวแล้ว มีความเป็นไปได้ที่อาจมีปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคได้ เช่น การสร้าง Vibrio ferrin, Pathogenicity island และ Type III Secretion System (TTSS) (Yeung & Boor, 2004) นอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้วยังมีอีกปัจจัยที่ก่อความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ Adherence factors, Urea hydrolysis, ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และแอนติเจน (ศรีวรรณ หัตถยานนท์, ม.ป.ป.; Yeung & Boor, 2004)

(1) Thermostable direct hemolysin (TDH)

TDH เป็นโปรตีนที่จัดว่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* โดยสามารถตรวจสอบการสร้างโปรตีนชนิดนี้ได้จากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -hemolysis บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma agar เรียกลักษณะที่เกิดว่า Kanagawa phenomenon โปรตีน TDH จัดเป็นโปรตีนที่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (Humada *et al.*, 2007) ยีน *tdh* นำรหัสการสร้างโปรตีน TDH ซึ่งอยู่บน Cellular membranes เป็น Pore-forming toxin โดยสามารถแสดงคุณสมบัติได้หลายชนิดคือ ก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษต่อหัวใจ (Cardiotoxic) ภาวะเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น ก่อให้เกิดการไหลออกของไอออนภายในเซลล์เจ้าบ้านที่ผิดปกติ และการเข้าไปทำลายเส้นใยไมโครทิวบูลภายในเซลล์เจ้าบ้าน เกิดภาวะเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร (Enterotoxicity) และสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity) (Honda, Ni, & Miwatani, 1992; Fabbri *et al.*, 1999; Raimondi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000)

(2) TDH-related hemolysin (TRH)

พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่มีความสามารถในการก่อโรบบางสายพันธุ์ผลิตโปรตีน TRH ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งในการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ โปรตีน TRH สร้างขึ้นจากการแสดงออกของยีน *trh* โปรตีนชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (สุภาทีนิ โสบุญ, 2546) การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *trh* สามารถทำได้จากการทดสอบทางชีวเคมีของปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส (Urease test) ที่ให้ผลบวก โดยการทดสอบดังกล่าวเป็นการทดสอบเชิงความสัมพันธ์ไม่ใช้การทดสอบการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตามสามารถตรวจสอบความสามารถในการผลิต TRH โดยตรงจากชุดทดสอบทางอิมมูโนวิทยา (Immunological kit) นอกจากนี้สามารถตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *trh* โดยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น การใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์และการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอ (USFDA, 2004)

(3) Thermolabile hemolysin (TL)

โปรตีน Thermolabile hemolysin เป็นโปรตีนที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคนและม้า แต่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma agar ได้ เป็นโปรตีนที่ไม่ทนต่อความร้อน สามารถถูกทำลายได้เมื่อได้รับความร้อนมากกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โปรตีน TL มีน้ำหนักประมาณ 45,000 ดาลตัน มียีน *tl* นำรหัสการสร้างโปรตีนนี้ ยีน *tl* มีค่า G+C content เท่ากับ 47.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า G+C content ทั้งจีโนมของเชื้อ (Zhang & Austin, 2005) และพบว่ายีน *tl* พบได้ในเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ ดังนั้นจึงสามารถนำยีนนี้มาใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างของระดับสปีชีส์ของ *V. parahaemolyticus* ได้ (Bej *et al.*, 1999)

(4) Vibrioferrin

ธาตุเหล็กเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโดยพบว่าภายใต้ภาวะที่มีธาตุเหล็กจำกัด *V. parahaemolyticus* สามารถสร้าง Siderophore ที่เรียกว่า Vibrioferrin จากการทดลองเพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีภาวะธาตุเหล็กจำกัด (FeCl_3 ความเข้มข้น 0-1 ไมโครโมลาร์) หรือมีการเติม Iron chelator ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียนี้มีการสร้าง Vibrioferrin ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการผลิต Vibrioferrin ในระดับที่สูงจะทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการแข่งขันเพื่ออยู่รอดในภาวะที่มีธาตุเหล็กจำกัด เช่น ในเซลล์เจ้าบ้าน (เซลล์มนุษย์) จากการศึกษาของ Yamamoto, Okujo, Miyoshi, Shinoda, and Narimatsu (1999) พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยมีความสามารถในการสร้าง Vibrioferrin ในระดับที่สูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากอาหารทะเลและสิ่งแวดล้อม และจากการศึกษาของ Wong and Lee (1994) และ Dai, Lee, and Wong (1992) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรียนี้ในสภาวะที่มีธาตุเหล็กจำกัดมีผลทำให้เชื้อนี้มีความสามารถในการเกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน (Adherence) และมีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่มากขึ้นหรือกล่าวคือเชื้อมีความสามารถในการก่อโรคได้มากขึ้น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าความสามารถในการสร้าง Vibrioferrin จึงอาจเป็นปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญของ *V. parahaemolyticus* (Yeung & Boor, 2004)

(5) Pathogenicity island (VP-PAI) และ Type III Secretion System (TTSS)

จากการศึกษา *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 พบว่าเชื้อมีโครโมโซม 2 ชุด โดยที่โครโมโซมชุดที่หนึ่งจะมีขนาดใหญ่ และอีกโครโมโซมจะมีขนาดเล็กกว่า กล่าวคือจะมีขนาด 3.3 และ 1.9 เมกะเบส ตามลำดับ โดยโครโมโซมชุดที่ 1 ประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและกลไกต่าง ๆ ของเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่าโครโมโซมชุดที่ 2 ก็มียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อ จึงกล่าวได้ว่าโครโมโซมชุดที่ 2 ก็มีความจำเป็นต่อการเจริญและอยู่รอดของเชื้อเช่นเดียวกับโครโมโซมชุดที่ 1 นอกจากนี้บนโครโมโซมชุดที่ 2 นั้นพบว่ามีกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้ออยู่บนโครโมโซมนี้ โดยเรียกกลุ่มของยีนนี้ว่า Pathogenicity island (VP-PAI) ซึ่งเป็นชุดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคมายู่รวมในบริเวณเดียวกัน ส่วนของ VP-PAI มีความยาว 80 กิโลเบส มีค่าเฉลี่ย G+C content เท่ากับ 39.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของค่า G+C content ของทั้งจีโนม ดังนั้น จึงคาดว่า *V. parahaemolyticus* น่าจะได้รับดีเอ็นเอบริเวณนี้มาจากเชื้ออื่นผ่านทางขบวนการถ่ายถอดยีนตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบยีน *tdh* และ TTSS ในบริเวณนี้ด้วย (Yeung & Boor, 2004)

TTSS เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตีน เชื้อก่อโรคใช้ TTSS เพื่อขนส่งโปรตีนซึ่งเป็นปัจจัยในการก่อโรคเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้านโดยตรง จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของเชื้อ *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 ที่แยกจากผู้ป่วยพบ TTSS 2 ชุด เรียกว่า TTSS1 และ TTSS2 โดยอยู่บนโครโมโซมชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า G+C content ของ TTSS1 พบว่าคล้ายคลึงกับค่าเฉลี่ยของค่า G+C content ของทั้งจีโนม แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีส่วนของ TTSS1 อยู่ในจีโนมตั้งแต่แรก สำหรับ TTSS2 พบอยู่ใน

Pathogenicity island (VP-PAI) และพบว่า TTSS2 พบในเชื้อสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เท่านั้น ดังนั้น การมีอยู่ของ TTSS2 อาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ (Yeung & Boor, 2004)

(6) *toxRS* operon

ใน *toxRS* operon ประกอบด้วยยีน *toxR* และ *toxS* เป็นยีนที่ควบคุมการก่อโรค และเป็นบริเวณอนุรักษ์ของแบคทีเรียจีโนม (Miller, Taylor, & Mekalanos, 1987; Matsumoto *et al.*, 2000) ทำหน้าที่นำรหัสการสร้างโปรตีนควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างทอกซิน พิลาไล และการแสดงออกของเยื่อหุ้มโปรตีนชั้นนอก (Outer-membrane protein) ซึ่งยีน *toxR* นอกจากจะพบใน *Vibrio cholerae* แล้วยังพบใน *V. parahaemolyticus*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio vulnificus*, และ *Vibrio hollisae* (Lin, Kumagai, Baba, Mekalanos, & Nishibuchi, 1993; Reich & Schoolnik, 1994; Matsumoto *et al.*, 2000) ส่วนยีน *toxS* จะพบใน *toxR* operon โดยเชื่อมต่อกับยีน *toxR* พบใน *V. cholerae* (Miller *et al.*, 1987)

1.4 การจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus*

1.4.1 การจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

ในการจัดจำแนกและบ่งชี้เชื้อว่าเป็น *V. parahaemolyticus* อาศัยลักษณะทางสัณฐาน และคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยคัดกรองเฉพาะเชื้อกลุ่มวิบริโอที่เจริญบนอาหาร TCBS agar เท่านั้น (Farmer, Hickman-Brenner, & Kelly, 1985, p. 285) ดังแสดงในตารางที่ 2-1 และผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีอื่น ๆ ดัดแปลงมาจาก Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams (1994) และ ISO/TS 21872-1:2007 อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกโดยวิธีนี้อาจเกิดข้อผิดพลาดได้สูง เนื่องจากบางส่วนของเชื้อนี้อาจมีลักษณะที่แตกต่างหรือแปรผันไปจากเชื้อส่วนใหญ่

1.4.2 การจำแนก *V. parahaemolyticus* โดยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์

ในปัจจุบันงานวิจัยจำนวนมากได้นำวิธีทางอนุพันธุศาสตร์เช่นพีซีอาร์ เข้ามาใช้ในการจัดจำแนกและยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Nair *et al.*, 2007) โดยโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้สำหรับวัตถุประสงค์นี้คือยีน *tl* ซึ่งนำรหัสการสร้าง Thermolabile hemolysin หรือยีน *toxR* ซึ่งนำรหัสการสร้าง Transmembrane regulatory protein ซึ่งยีนทั้งสองชนิดนี้พบใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ (Bej *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999) นอกจากการระบุชนิดโดยอาศัยยีน *tl* หรือ *toxR* แล้วยังมีการตรวจสอบและบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* โดยตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* (Thermostable direct hemolysin) และ/หรือ *trh* (TDH-related hemolysin)

ตารางที่ 2-1 แบบแผนคุณลักษณะทางชีวเคมีสำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

คุณสมบัติทางชีวเคมี	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Growth on TCBS agar	Y	Y	G	Y	Y/G	Y	G	G	G
Indole production test ^a	[+]	+	-	[-]	+	[-]	+	+	+
Citrate utilization test	-	+	-	+	-	d	+	-	d
Oxidase test	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ONPG	-	+	-	d	-	d	+	-	d
Motility test	+	+	d	d	-	d	+	+	+
Methyl red test	d	+	+	+	+	-	+	[+]	[+]
Acid from L-arabinose	-	-	-	+	-	-	-	[+]	-
Acid from sucrose	+	+	-	+	d	+	-	-	[-]
Gas from D-glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from D-glucose	+	+	+	+	d	+	+	+	+
Acid from lactose	-	-	-	-	-	d	[-]	-	[+]
Lysine decarboxylase test ^a	+	+	d	-	+	d	+	+	+
Ornithine decarboxylase ^a	d	+	-	-	-	-	+	+	d
Arginine dihydrolase ^a	-	-	+	+	-	d	-	-	-
Growth in the presence of NaCl									
0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	d	+	+	+	[+]	d	+	d
8% NaCl	+	-	-	d	-	d	-	[+]	-

หมายเหตุ

- 90-100 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ให้ผลลบ + 90-100 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ให้ผลบวก
- [-] 11-25 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ให้ผลบวก [+] 76-89 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ให้ผลบวก
- d 26-75 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ให้ผลบวก ^a มีการเติมเกลือ NaCl 1 เปอร์เซ็นต์
- Y โคโลนีสีเหลือง G โคโลนีสีเขียว

(ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Farmer *et al.*, 1985, p. 285; Holt *et al.*, 1994; ISO/TS 21872-1, 2007)

1.4.3 การจำแนกซีโรไทป์

การแบ่งซีโรไทป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปัจจุบัน O-antigen มี 13 ชนิด และ K-antigen มี 71 ชนิด (Yeung & Boor, 2004) ซีโรไทป์ของเชื้อต้องบอกทั้งชนิดของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ (O-antigen) และแอนติเจนที่แคปซูล (K-antigen) เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อซึ่งทำให้เกิดโรคของเชื้อนี้ ข้อมูลสำคัญประการหนึ่งเกี่ยวกับการระบาดของแบคทีเรียชนิดนี้

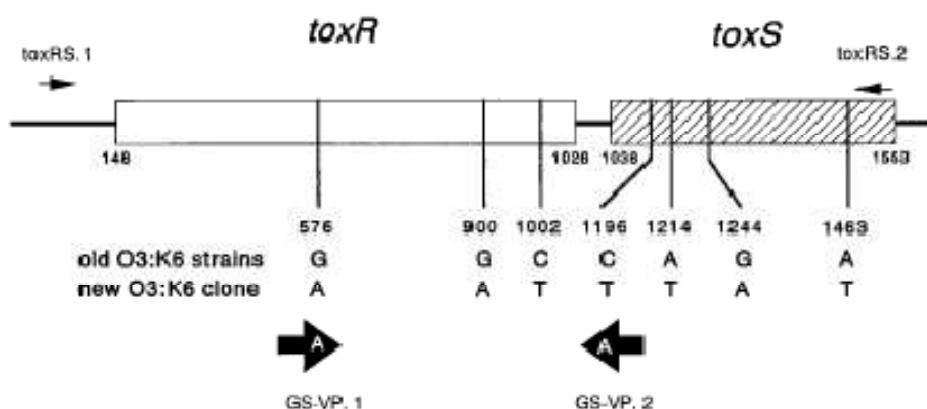
คือการปรากฏของเชื้อสายพันธุ์ระบาดทั่วซึ่งมีซีโรไทป์เป็น O3:K6 *V. parahaemolyticus* O3:K6 ถูกรายงานว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการระบาดใหญ่ของโรคอาหารเป็นพิษเป็นครั้งแรกที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดีย เมื่อเดือนกุมภาพันธ์ ค.ศ. 1996 ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่เคยมีรายงานถึงการแยกเชื้อซีโรไทป์นี้มาก่อนในเมืองกัลกัตตา นอกจากนี้ยังพบว่า *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่แยกได้จากเมืองกัลกัตตานี้มียีนก่อโรค *tdh* แต่ไม่มียีน *trh* และลักษณะทางพันธุกรรมหรือแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ AP-PCR เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ แตกต่างไปจาก O3:K6 ที่เคยพบก่อนปี ค.ศ. 1996 (*tdh⁻trh⁺*) จึงได้มีการจัดให้เชื้อสายพันธุ์นี้เป็น O3:K6 สายพันธุ์ใหม่ (new O3:K6) ซึ่งในเวลาต่อมาพบว่า เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในมนุษย์และก่อให้เกิดการระบาดไปทั่วโลก (Mitsuaki, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึง *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์อื่น ๆ เช่น O1:K25, O4:K68, O1:KUT, O6:K18 และ O3:K46 เป็นต้น ที่ทำให้เกิดการระบาดทั่วซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกับ (new) O3:K6 โดยคาดว่าซีโรไทป์เหล่านี้ น่าจะมีจุดกำเนิดมาจากโคลนเดียวกัน คือ (new) O3:K6 จากนั้นมีวิวัฒนาการแปรผันไป (Matsumoto *et al.*, 2000; Serichantalerg *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008)

1.4.4 การบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6

ในปี ค.ศ. 2000 Matsumoto *et al.* (2000) พัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า GS-PCR สำหรับตรวจสอบและบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 เทคนิคนี้อาศัยการออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอบริเวณจำเพาะที่อยู่ในภายใน *toxRS* operon ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างไปจากที่พบใน *V. parahaemolyticus* O3:K6 สายพันธุ์เดิม (old) O3:K6 รวมถึงซีโรไทป์อื่น ๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *toxRS* ระหว่าง (new) O3:K6 และ (old) O3:K6 พบว่ามีความแตกต่างอยู่ 11-14 ตำแหน่ง โดยในจำนวนนี้ที่มีนิวคลีโอไทด์อยู่ 7 ตำแหน่งมีลักษณะคงที่ (ภาพที่ 2-3) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ GS-PCR อาศัยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่ง (จาก 7 ตำแหน่งดังกล่าวข้างต้น) ระหว่าง (new) และ (old) O3:K6 คณะผู้วิจัยพบว่า (new) O3:K6 ทุกสายพันธุ์ รวมทั้งซีโรไทป์อื่น ๆ ที่มีจุดเริ่มต้นของการแปรผันไปจาก (new) O3:K6 เช่น O1:KUT และ O4:K68 ให้ผล GS-PCR เป็นบวก ในขณะที่ (old) O3:K6 ทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาให้ผลลบ ดังนั้นในเวลาต่อมามีงานวิจัยจำนวนมากจึงนำเทคนิคนี้มาใช้ในการบ่งชี้ลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่ว กล่าวคือให้ผล GS-PCR เป็นบวก (GS-PCR⁺)

นอกจากการทำ GS-PCR แล้ว ยังมีงานวิจัยที่รายงานถึงการใช้โมเลกุลเครื่องหมายอื่น ๆ สำหรับบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 เช่น Myers *et al.* (2003) พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่เป็น ORF8 ของฟาจ f237 สำหรับบ่งชี้ความเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 การที่คณะผู้วิจัยเลือก ORF8 เป็นโมเลกุลเครื่องหมาย เนื่องจากพบว่าฟาจ f237 มีความจำเพาะในการบุกรุก *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 จีโนมของฟาจชนิดนี้มี 10 ORFs โดยที่จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF8 ไม่มีลักษณะที่เหมือนหรือคล้ายคลึง (Homology) กับดีเอ็นเอชนิดอื่น ๆ ที่พบในสิ่งมีชีวิต

จากการศึกษาในเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยนี้พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาสำหรับการเพิ่มปริมาณ ORF8 มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 เท่านั้น อย่างไรก็ตามรายงานวิจัยของ Bhuiyan *et al.* (2002) แสดงให้เห็นว่า ORF8 สามารถถูกตรวจพบได้ในซีโรไทป์ O1:KUT, O1:K25 และ O4:K68 ด้วยเช่นกัน รวมทั้งให้ข้อมูลว่าการตรวจสอบการมีอยู่ของ ORF8 นั้นให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับลักษณะจีโนไทป์ของสายพันธุ์ระดับทั่ว (GS-PCR และ AP-PCR) ทั้งนี้เนื่องจากจีโนมของฟาจที่แทรกอยู่กับจีโนมของแบคทีเรียนี้ อาจเกิดการขาดหายไปบางส่วน (ซึ่งรวมส่วนของ ORF8 อยู่ด้วย) หรือทั้งจีโนมก็เป็นไปได้ทำให้การตรวจสอบโดยใช้ ORF8 เป็นเป้าหมายนั้นอาจแสดงผลเป็นลบขึ้นมาได้ คณะผู้วิจัยจึงไม่แนะนำให้ใช้ ORF8 เป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพียงชนิดเดียวเพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ระดับทั่ว



ภาพที่ 2-3 ตำแหน่งเป้าหมายของไพรเมอร์ (GS-VP.1 และ GS-VP.2) ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน *toxRS* ด้วยเทคนิค GS-PCR และองค์ประกอบของเบสที่แตกต่างกันจาก *toxRS* ระหว่าง O3:K6 สายพันธุ์เดิม และ O3:K6 สายพันธุ์ใหม่ (ที่มา: Matsumoto *et al.*, 2000)

2. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

สุภาทินี โสภณ (2546) ตรวจสอบลักษณะของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากอาหารทะเล และผู้ป่วยในภาคใต้ของประเทศไทยเป็นจำนวน 666 ไอโซเลท และ 188 ไอโซเลท ตามลำดับ พบยีน *tdh* และ *trh* ในเชื้อที่แยกได้จากอาหารทะเล 14 ไอโซเลท และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย พบว่า 168 ไอโซเลทมียีน *tdh* 10 ไอโซเลทมียีน *trh* และพบเชื้อ 5 ไอโซเลท มีทั้งยีน *tdh* และ *trh* เมื่อตรวจสอบซีโรไทป์ พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมมีซีโรไทป์เป็น O3:K6 มากที่สุด (50.0 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือซีโรไทป์ O1:K25 (31.3 เปอร์เซ็นต์) และซีโรไทป์อื่น ๆ (18.8 เปอร์เซ็นต์) ส่วน *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยพบว่ามีซีโรไทป์ O3:K6 มากที่สุด (50.0 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือซีโรไทป์ O1:K25 (10.1 เปอร์เซ็นต์) O4:K68 (5.3 เปอร์เซ็นต์) และซีโรไทป์อื่น ๆ (34.6 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำเชื้อ

ทั้งหมดมาทดสอบ GS-PCR พบ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O1:K25 เป็นซีโรไทป์ใหม่ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่มีแหล่งกำเนิดเดียวกันกับสายพันธุ์ที่กำลังระบาด เมื่อนำมาตรวจยืนยันโดยวิธี AP-PCR และ PFGE พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3:K6, O1:K25 และ O3:KUT ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันแสดงว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์เหล่านี้ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน

สุภาทิณี ไสบุญ และทรศนีย์ มาศจำรัส (2548) ศึกษา *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่แยกจากหอยนางรมสดจากฟาร์มเลี้ยงบริเวณอ่าวบ้านดอน อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2547 โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือน เดือนละ 12 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 144 ตัวอย่าง จากการจำแนกและบ่งชี้เชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี Immunomagnetic technique การทดสอบทางชีวเคมีและวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย พบ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม 120 ตัวอย่าง (83.3 เปอร์เซ็นต์) สามารถแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 422 ไอโซเลท เมื่อนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ TDH และ TRH ตามลำดับ พบ *V. parahaemolyticus* จำนวน 1 ไอโซเลท (0.2 เปอร์เซ็นต์) ที่มียีนสร้างสารพิษทั้ง 2 ชนิด (*tdh*⁺ *trh*⁺) ผู้วิจัยกล่าวว่า แม้ว่าปริมาณ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนสร้างสารพิษที่พบในหอยนางรมจะมีปริมาณน้อย แต่การบริโภคหอยนางรมดิบ ๆ ก็มีโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบได้

ขวัญฤทัย แสงโนราช (2553) ทำการสำรวจการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมสดแกะเปลือก จำนวนทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากร้านค้าบริเวณชายฝั่งทะเล ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจสอบคือ ยีน *tl* สำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด ยีน *tdh* สำหรับบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (*tdh*⁺) และยีน *vvh* สำหรับบ่งชี้ *V. vulnificus* ทั้งหมด พบว่าหอยนางรมสดแกะเปลือกที่นำมาตรวจสอบมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* มากที่สุดในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 (100 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 (95 เปอร์เซ็นต์) และเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 (92.5 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ สำหรับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (*tdh*⁺) พบว่ามีการปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างของเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 เท่านั้น (9 ตัวอย่าง, 22.5 เปอร์เซ็นต์) และตรวจไม่พบ *V. vulnificus*

Bej et al. (1999) ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยทะเล โดยใช้ยีนเป้าหมาย คือ *tl*, *tdh* และ *trh* ในเบื้องต้นมีการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการจำนวนทั้งหมด 111 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 27 ไอโซเลท เชื้อที่แยกได้จากอาหารทะเล จำนวน 43 ไอโซเลท เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม จำนวน 15 ไอโซเลท เชื้อที่แยกได้จากหอยนางรม จำนวน 19 ไอโซเลท และเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ จำนวน 7 ไอโซเลท ผลการศึกษาพบว่า *V. parahaemolyticus* ทุกไอโซเลทให้ผลบวกกับยีน *tl* รวมทั้งพบการมีอยู่ของ

ยีน *tdh* และ *trh* ในเชื้อจำนวน 42 ไอโซเลท ส่วนเชื้อที่ตรวจพบเฉพาะยีน *tdh* หรือ *trh* มีจำนวน 18 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ และมี 50 ไอโซเลทของเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมดตรวจไม่พบทั้ง *tdh* และ *trh* เมื่อมีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ลงไปในหอยนางรม พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไปในตัวอย่างทีน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ คือ 10^2 CFU ต่อ 10 กรัมของตัวอย่างภายหลังที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

Kim et al. (1999) นำเทคนิคโคลนไฮบริดเซชัน (Colony hybridization) มาใช้ในการจำแนก *V. parahaemolyticus* โดยใช้โพรบที่มีความจำเพาะต่อยีน *toxR* ของแบคทีเรียชนิดนี้ จากการทดสอบกับทั้งหมด 663 สายพันธุ์ ประกอบด้วยตัวอย่างที่เป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 373 สายพันธุ์ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ อีก 290 สายพันธุ์ พบว่า *V. parahaemolyticus* ทั้ง 373 สายพันธุ์ แสดงผลการทดสอบเป็นบวกทั้งหมด ในขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ทุกสายพันธุ์ แสดงผลลบทั้งหมด ยกเว้น *Vibrio alginolyticus* ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกอย่างอ่อน (Weak positive)

Wong et al. (2000) ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมและคุณสมบัติทางชีววิทยาบางประการของ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3:K6 ที่แยกจำนวน 205 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในประเทศอินเดีย ญี่ปุ่น เกาหลี และไต้หวัน โดยใช้เทคนิค PFGE การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่มีความสามารถในการสร้างโปรตีน TDH รวมทั้งความไวต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อพิจารณารูปแบบของ PFGE พบว่ามีทั้งหมด 13 รูปแบบ ซึ่งสามารถจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน โดย *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่แยกได้ก่อนปี ค.ศ. 1996 ทุกไอโซเลทถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยแยกจากอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งเป็น *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่แยกได้ในช่วงตั้งแต่ ค.ศ. 1996 จนถึงปัจจุบัน ซึ่งทุกไอโซเลทแสดงผลบวกต่อยีน *tdh* อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้ รวมทั้งเชื้อที่ไม่ใช่ซีโรไทป์ O3:K6 ในด้านความไวต่อยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการสร้าง TDH และความไวต่อสภาวะเครียด ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *V. parahaemolyticus* O3:K6 สายพันธุ์ที่แยกได้หลังจาก ค.ศ. 1996 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน ในขณะที่ลักษณะทางชีววิทยาอื่น ๆ นั้นแปรผันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อโดยไม่ปรากฏว่ามีลักษณะใดที่เป็นลักษณะเฉพาะสำหรับ *V. parahaemolyticus* O3:K6 สายพันธุ์ที่แยกได้หลังจาก ค.ศ. 1996 จนถึงปัจจุบัน

Laohaprerthisan et al. (2003) ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคท้องร่วงในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์และโรงพยาบาลหาดใหญ่ ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม ค.ศ. 1999 จำนวน 317 ไอโซเลท เพื่อตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เกิดการระบาดอย่างแพร่หลาย พบว่า 76 เปอร์เซ็นต์ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้มีคุณสมบัติตรงกับสายพันธุ์ที่ระบาดทั่วและมีลักษณะทางพันธุกรรมสัมพันธ์กันกับ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3:K6 รวมทั้งยังพบซีโรไทป์อื่น ๆ อีก คือ O1:K25, O1:K41 และ O4:K12 นอกจากนี้ยังตรวจพบสายพันธุ์ O1:K25 และ O1:K41 ร่วมกับสายพันธุ์ที่เกิดการระบาดซึ่งแยกได้จากนักท่องเที่ยวที่เดินทางเข้ามาในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียระหว่าง ค.ศ. 1998 และปี ค.ศ. 1999 แสดงให้เห็นว่าพื้นที่ในเขตตอนใต้ของประเทศไทยนั้นมีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยส่วนหนึ่งที่พบเป็นสาเหตุของการระบาดนั้นเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่มีการระบาดทั่วโลก

Bilung *et al.* (2005) ศึกษาการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงที่เก็บจากบริเวณ Tanjung Karang ในรัฐ Selangor ประเทศมาเลเซีย โดยเก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2003 จำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างจำนวน 62 ตัวอย่าง ซึ่งในการตรวจสอบการปนเปื้อนนั้นทำโดยใช้อาหารคัดเลือก CHROMagar™ *Vibrio* ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณยีน *toxR* เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด ส่วนการบ่งชี้การปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคโดยเทคนิคพีซีอาร์นั้น พบว่าตัวอย่างหอยแครงให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และยีน *trh* จำนวน 2 และ 11 ตัวอย่าง ตามลำดับ

Wootipoom *et al.* (2007) รายงานอุบัติการณ์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดทั่วในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยวิเคราะห์ซีโรไทป์และจีโนไทป์ของ *V. parahaemolyticus* จำนวนทั้งหมด 865 ไอโซเลทที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง 2005 การวิเคราะห์ประกอบด้วยการตรวจสอบซีโรไทป์ ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* และการทำ GS-PCR พบว่าอัตราการพบสายพันธุ์ระบาดทั่ว (GS-PCR⁺ *tdh*⁺ *trh*⁺) ระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง 2003 ค่อนข้างใกล้เคียงกัน กล่าวคือ 64.1, 67.5, 67.9 และ 67.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซีโรไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่วที่ตรวจพบส่วนใหญ่ได้แก่ O3:K6, O1:K25, O4:K68 และ O1:KUT

Ansaruzzaman *et al.* (2008) วิเคราะห์ซีโรไทป์และจีโนไทป์ของ *V. parahaemolyticus* จำนวน 58 ไอโซเลท ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคท้องร่วงในโรงพยาบาลเมือง Beira ประเทศโมซัมบิก โดยตรวจสอบชนิดของแอนติเจน O และ K ตรวจสอบยีน *toxR* เพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อ ตรวจสอบยีน *tdh* และ *trh* เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ก่อโรครวมทั้งตรวจสอบลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่วโดยการทำให้ GS-PCR, ORF8-PCR, PFGE, AP-PCR, และ MSTL ผลการวิเคราะห์พบว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3:K6 (38 ไอโซเลท) และ O4:K68 (4 ไอโซเลท) ทุกสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่เป็นสายพันธุ์ระบาดทั่วโดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงที่มีซีโรไทป์เป็น O3:K6 และ O4:K68 ซึ่งแยกได้ในเอเชียในปี ค.ศ. 1996 และก่อให้เกิดการระบาดไปทั่วโลกในเวลาต่อมา และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์อื่น ๆ (O4:K13, O3:KUT และ O8:K41) แสดงลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ระบาดทั่ว

Lee *et al.* (2008) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) ที่เก็บจากตลาดสดชายปลึกในกรุงโซล สาธารณรัฐเกาหลี (เกาหลีใต้) ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนธันวาคม ค.ศ. 2005 จำนวน 72 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* อยู่ในช่วง 1-3 log MPN และพบว่าปริมาณของเชื้อมีสูงมากในฤดูร้อนตอนปลายถึงต้นฤดูใบไม้ร่วง และลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว และการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคโดยอาศัยยีน *tdh* และ *trh* พบเชื้อเพียง 1 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกกับยีน *trh* แต่ไม่พบเชื้อที่มียีน *tdh*

Serichantalergs *et al.* (2008) วิเคราะห์ซีโรไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อ

V. parahaemolyticus ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลบำรุงราษฎร์ กรุงเทพมหานคร โดยแยกจากผู้ป่วยชาวต่างประเทศที่เดินทางมาพำนักในประเทศไทย จำนวน 50 ไอโซเลท และจากผู้ป่วยชาวไทย จำนวน 43 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์ซีโรไทป์ พบซีโรไทป์ของสายพันธุ์ระดับทั่ว คือ O3:K6, O1:K25 และ O1:KUT จำนวน 54, 11 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รวมทั้งพบซีโรไทป์ใหม่ในเชื้อ 1 สายพันธุ์ คือ ซีโรไทป์ O3:K46 ซึ่งมีลักษณะจีโนไทป์บ่งชี้ว่าเป็นสายพันธุ์ระดับทั่ว เมื่อวิเคราะห์ด้วย PFGE พบว่าสายพันธุ์ระดับทั่วทั้งหมด รวมทั้ง O3:K46 ที่ตรวจพบใหม่นี้มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ซึ่งแตกต่างไปจากเชื้อสายพันธุ์ที่พบทั่วไป

Zulkifli *et al.* (2009) ตรวจ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครงที่เก็บจากบริเวณทะเลสาบและแม่น้ำ เมือง Padong ประเทศอินโดนีเซีย โดยทำการแยกเชื้อบนอาหาร CHROMagar™ Vibrio และคัดเลือกเชื้อที่ขึ้นบนอาหารที่ให้โคโลนีสีม่วง นำเชื้อที่แยกได้มาสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยอาศัยยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย และตรวจสอบ

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ก่อโรคโดยอาศัยยีน *tdh* และ *trh* จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 25 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลท แต่พบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคเพียง 3 ไอโซเลท โดยที่เป็นเชื้อที่มียีน *tdh* 1 ไอโซเลท และมียีน *trh* 2 ไอโซเลท

Changchai & Suanjit (2014) ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในช่วงระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 จำนวน 240 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ใน 219 ตัวอย่าง (91.3 เปอร์เซ็นต์) โดยช่วงฤดูร้อนพบการปนเปื้อนสูงถึง 100 % รองลงมาคือฤดูฝน (84 เปอร์เซ็นต์) และฤดูหนาว (83.7 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังตรวจพบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่มียีนนำรหัสการสร้างโปรตีน TDH ในหอยนางรมจำนวน 29 ตัวอย่าง (12.1 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งรายงานดังกล่าวนี้ถือเป็นครั้งแรกที่มีการระบุถึงการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*⁺ เป็นครั้งแรกในหอยนางรมที่จำหน่ายในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข)

- 1.1 *Vibrio parahaemolyticus* DMST 15285 ($tl^+ tdh^+ trh^-$)
- 1.2 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 ($tl^+ tdh^- trh^+$)
- 1.3 *Vibrio parahaemolyticus* DMST 38340 ซีโรไทป์ O3:K6 ($tl^+ tdh^+ trh^-$)
- 1.4 *Vibrio cholerae* DMST 2873
- 1.5 *Vibrio alginolyticus* DMST 14800
- 1.6 *Aeromonas hydrophila* DMST 21250

2. แบคทีเรียที่แยกได้จากหอยนางรม

แบคทีเรีย จำนวน 1,785 ไอโซเลท แยกได้จากหอยนางรมสด จากร้านค้าปลีกบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลา ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 ซึ่งแต่ละไอโซเลทแยกได้จากอาหาร TCBS agar โดยมีลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวซึ่งคาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* แต่ยังไม่ได้มีการจัดจำแนกและยืนยันชนิด

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

- 3.1 Alkaline Peptone Water (APW)
- 3.2 Cytosine Tryptone Agar (CTA; Himedia[®])
- 3.3 Thiosulphate Citrate Bile Salt agar (TCBS; Oxoid)
- 3.4 CHROMagar[™] Vibrio (Paris, France)
- 3.5 Tryptic Soy Agar (TSA; Difco[™]) + NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ (TSA+ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์)
- 3.6 Triple Sugar Iron agar (TSI; Difco[™])
- 3.7 Lysine Indole Motility (LIM; Difco[™])
- 3.8 Urease Test Broth (BBL[™])

4. สารเคมี บัฟเฟอร์และรีเอเจนต์ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)

- 4.1 Oxidase Reagent (BactiDrop[™] Oxidase; Remel, UK)
- 4.2 Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
- 4.3 Agarose (Seakem[®] LE Agarose)
- 4.4 Gel-loading buffer (6X)
- 4.5 Tris-Acetate-Electrophoresis (TAE) buffer
- 4.6 Tris-HCl EDTA (TE) buffer, pH 8.0
- 4.7 dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP: 100 mM each)

4.8 10X PCR buffer (Vivantis)

4.9 50 mM MgCl₂ (Vivantis)

5. เอนไซม์

- *Taq* DNA Polymerase (Vivantis)

6. ชุดปฏิบัติการสำเร็จรูป

6.1 pGEM-T Easy vector system (Promega)

6.2 Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega)

6.3 Qiaprep spin miniprep kit (QIAGEN)

7. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- Standard molecular weight marker (VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis)

8. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ยีน เป้าหมาย	ขนาดผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ (bp)	แหล่งอ้างอิง
L- <i>tl</i> R- <i>tl</i>	AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	<i>tl</i>	450	Bej <i>et al.</i> , 1999
L- <i>tdh</i> R- <i>tdh</i>	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	<i>tdh</i>	269	Bej <i>et al.</i> , 1999
L- <i>trh</i> R- <i>trh</i>	TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT CAT AAC AAA ACT ATG CCC ATT TCC G	<i>trh</i>	500	Bej <i>et al.</i> , 1999
L- <i>toxRS</i> R- <i>toxRS</i>	TAA TGA GGT AGA AAC A ACG TAA CGG GCC TAC A	<i>toxRS</i>	651	Matsumoto <i>et al.</i> , 2000
L-ORF8 R-ORF8	AGG ACG CAG TTA CGC TTG ATG CTA ACG CAT TGT CCC TTT GTA G	<i>ORF8</i>	369	Myers <i>et al.</i> , 2003
MAS2F MAS1R	TCC TGG CTC AGA TTG AAC GCT CTT GTT ACG ACT TCA CCC CAG	16S rRNA gene	1,500	สุदारัตน์ สนวนจิตร และคณะ, 2554

9. เครื่องมือ

9.1 Gel chamber (BIO-RAD, WIE MINI SUBTM CELL)

9.2 Power supply (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENT, PS 500XT)

9.3 Water bath (SHELLAB, Model 1265)

9.4 UV transilluminator (SPECTROLINE[®] Model TVC-312A)

9.5 Microcentrifuge (Sartorius, GIGMA® 1-14, Germany)

9.6 DNA thermal cycler (Biometra®, TGradient)

วิธีการทดลอง

1. การฟื้นสภาพเชื้อจากเซลล์ที่เก็บรักษา

นำไอโซเลทของแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร TSB + NaCl

3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ใน Microtiterplate (ปริมาตร 180 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่เจริญมาซัดบนอาหาร TSA + NaCl 3 เปอร์เซ็นต์

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวเก็บในหลอดอาหาร CTA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*

(ดัดแปลงจาก ISO/TS 21872-2:2007)

นำเชื้อที่เก็บอยู่ในอาหาร CTA มาซัดลงบนอาหาร TSA+ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาซัดลงบนอาหาร CHROMagar™ Vibrio (CaV) และ TCBS agar คัดเลือกโคโลนีที่มีสีม่วงจาก CaV และโคโลนีสีเหลืองหรือสีเขียวจากอาหาร TCBS agar เพื่อนำไปย้อมสีแกรมและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้ ทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ทดสอบการเจริญบนอาหาร TSI agar เพื่อดูการหมักย่อยน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส และทดสอบการเจริญบนอาหาร LIM เพื่อตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส การผลิตอินดอล และการเคลื่อนที่ ตามลำดับ (วิธีการทดสอบแสดงในภาคผนวก ค) บันทึกลักษณะทางชีวเคมีของการทดสอบต่าง ๆ และนำข้อมูลไปใช้เพื่อการจำแนก *V. parahaemolyticus* ตามวิธีจำแนกเชื้อของ (Farmer *et al.*, 1985)

3. การยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยใช้ยีนเครื่องหมาย *tl*

(สุदारัตน์ สนวนจิตร และคณะ, 2554)

นำไอโซเลทของแบคทีเรียที่ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วบ่งชี้ว่าเป็น *V. parahaemolyticus* มายืนยันผลโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย คือยีน *tl* ซึ่งพบในแบคทีเรียชนิดนี้ทุกสายพันธุ์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมาเพาะเลี้ยงในอาหาร APW (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (pH 8.0) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแขวนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนน้ำใส (สารละลายดีเอ็นเอ) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปใช้เป็น

ดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.2 ปฏิกิริยาพีซีอาร์

จัดเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยมีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tl*

องค์ประกอบ	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	32	
10X PCR buffer	5	1x
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP	1	0.2 mM (แต่ละชนิด)
10 μ M Forward primers (L- <i>tl</i>)	2.5	0.5 μ M
10 μ M Reverse primers (R- <i>tl</i>)	2.5	0.5 μ M
5 U/ μ l Taq DNA Polymerase	0.5	2.5 U
DNA template	5	0.5-0.75 μ g
ปริมาตรรวม	50	

ชุดควบคุมเชิงบวกใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง *V. parahaemolyticus* DMST 15285 เป็นแม่แบบ ชุดควบคุมเชิงลบใช้ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* DMST 2873 เป็นแม่แบบ ส่วนชุดควบคุมรีเอเจนต์ ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ และชุดควบคุมภายใน (Internal control) ใช้คูไพรเมอร์ยูนิเวอร์ซัลสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA เพื่อควบคุมคุณภาพของดีเอ็นเอที่นำมาใช้เป็นแม่แบบ

ดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ภายใต้สภาวะดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายเป็น Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที (ตารางที่ 3-3) เมื่อเสร็จสิ้นการดำเนินปฏิกิริยา ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ TAE เป็นบัฟเฟอร์) ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

ตารางที่ 3-3 สภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *tl*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 (m)	1
Denaturation	94	45 (s)	} 35
Annealing	63	30 (s)	
Extension	72	30 (s)	
Final extension	72	7 (m)	1

4. การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

นำ *V. parahaemolyticus* ทุกไอโซเลทที่ผ่านการยืนยันเชื้อและตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและการระบาดทั่วแล้ว จากอาหาร CTA ใส่ลงในอาหาร TSB+ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ใน Microtiterplate (ปริมาตร 180 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่เจริญชิตลงบนอาหาร T₁N₃ agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง ขูดเชื้อบนอาหาร T₁N₃ agar ใส่ลงในหลอดอาหาร TSB+ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์+กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปิดฝาหลอดให้เรียบร้อยแล้วพันทับด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

5. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมบางประการของ *V. parahaemolyticus*

นำ *V. parahaemolyticus* ที่ยืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้วให้ผลบวกต่อยีน *tl* (*tl*⁺) มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ซึ่งเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรค และตรวจสอบการมีอยู่ของ Group-specific (GS) sequence และ ORF8 ของพาจ f237 ซึ่งเป็นเครื่องหมายบ่งชี้สายพันธุ์ที่เกิดการระบาดทั่ว

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอปฏิบัติตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1

5.2 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยเทคนิคพีซีอาร์

(1) การเพิ่มปริมาณยีน *tdh* (สุदारัตน์ สอนจิตร และคณะ, 2554)

จัดเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยา เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tdh* ดังมีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 3-4 และดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้ในตารางที่ 3-5

ตารางที่ 3-4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *tdh*

องค์ประกอบ	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	32	
10X PCR buffer	5	1x
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP	1	0.2 mM (แต่ละชนิด)
10 μ M Forward primers (L- <i>tdh</i>)	2.5	0.5 μ M
10 μ M Reverse primers (R- <i>tdh</i>)	2.5	0.5 μ M
5 U/ μ l Taq DNA Polymerase	0.5	2.5 U
DNA template	5	0.5-0.75 μ g
ปริมาตรรวม	50	

ตารางที่ 3-5 สภาพะของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tdh*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 (m)	1
Denaturation	94	45 (s)	} 35
Annealing	63	30 (s)	
Extension	72	30 (s)	
Final extension	72	7 (m)	1

(2) การเพิ่มปริมาณยีน *trh* (สุदारัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2554)

จัดเตรียมหลอดปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มปริมาณยีน *trh* โดยมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3-6 จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler และดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่กำหนด ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 3-7

ตารางที่ 3-6 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *trh*

องค์ประกอบ	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	32	
10X PCR buffer	5	1x
50 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP mix (แต่ละชนิด)	1	0.2 mM (แต่ละชนิด)
10 μ M Forward primers (L- <i>trh</i>)	2.5	0.5 μ M
10 μ M Reverse primers (R- <i>trh</i>)	2.5	0.5 μ M
5 U/ μ l <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.5	2.5 U
DNA template	5	0.5-0.75 μ g
ปริมาตรรวม	50	

ตารางที่ 3-7 สภาวะของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *trh*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 (m)	1
Denaturation	94	45 (s)	} 35
Annealing	55	30 (s)	
Extension	72	30 (s)	
Final extension	72	7 (m)	1

(3) การเพิ่มปริมาณ Group-specific DNA (GS-PCR)

จัดเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณจำเพาะของ *toxRS* operon ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3-8 จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler แล้วดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้ดังตารางที่ 3-9

ตารางที่ 3-8 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับ GS-PCR

องค์ประกอบ	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	35.375	
10X PCR buffer	5	1x
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP	0.625	0.125 mM (แต่ละชนิด)
10 μM Forward primers (L-toxRS)	1	0.2 μM
10 μM Reverse primers (R-toxRS)	1	0.2 μM
5 U/μl Taq DNA Polymerase	0.5	0.5 U
DNA template	5	0.5-0.75 μg
ปริมาตรรวม	50	

(ที่มา: Matsumoto *et al.*, 2000)

ตารางที่ 3-9 สภาวะของการดำเนินปฏิกิริยา GS-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 (m)	1
Denaturation	94	45 (s)	} 35
Annealing	45	2 (m)	
Extension	72	30 (s)	
Final extension	72	7 (m)	1

(ที่มา: Matsumoto *et al.*, 2000)

(4) การเพิ่มปริมาณ ORF8 ของฟาจ f237

จัดเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณ ORF8 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ORF8 นั้นอ้างอิงมาจาก Myer *et al.* (2003) ส่วนองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นดัดแปลงมาจากวิธีของ Laohaprerththisan *et al.* (2003) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3-10 จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler แล้วดำเนินปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้ดังตารางที่ 3-11

ตารางที่ 3-10 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณ ORF8

องค์ประกอบ	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	31.5	
10X PCR buffer	5	1x
50 mM MgCl ₂	2	2 mM
10 mM dNTP	1	0.2 mM (แต่ละชนิด)
10 μM Forward primers (L-ORF8)	2.5	0.5 μM
10 μM Reverse primers (R-ORF8)	2.5	0.5 μM
5 U/μl Taq DNA Polymerase	0.5	0.5 U
DNA template	5	0.5-0.75 μg
ปริมาตรรวม	50	

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Laohaprertthisan *et al.*, 2003)

ตารางที่ 3-11 สภาวะของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ORF8

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 (m)	1
Denaturation	94	45 (s)	} 30
Annealing	60	30 (s)	
Extension	72	30 (s)	
Final extension	72	7 (m)	1

5.3 ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาของการเพิ่มปริมาณยีนแต่ละยีน นำมาตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ TAE buffer เป็นบัฟเฟอร์) ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

6. การวิเคราะห์ซีโรไทป์

วิเคราะห์ซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus* โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *atpA* และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ *atpA* (Changchai, 2014) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์มาโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน ตรวจสอบและส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE Pte Ltd. (Malaysia) วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Blastn บน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *atpA* ของ *V. parahaemolyticus* แต่ละไอโซเลทมาทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW ผ่านโปรแกรม BioEdit และสร้างแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2008)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การฟื้นฟูสภาพเชื้อและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนก *V. parahaemolyticus* ในเบื้องต้น

จากการนำไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกจากหอยนางรมสดแกะเปลือก ซึ่งเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จำนวน 1,785 ไอโซเลท มาทำการฟื้นฟูสภาพเชื้อในอาหาร TSB ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และนำมาซิดแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร TSA ที่เติม NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลทมาตรวจสอบลักษณะสัญญาณ การติดสีแกรม ลักษณะโคโลนีบนอาหาร CHROMagar™ *Vibrio* และ TCBS agar และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนก *V. parahaemolyticus* ในเบื้องต้น ได้แก่ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ทดสอบการเจริญบนอาหาร TSI agar และทดสอบการเจริญบนอาหาร LIM โดยในการทดสอบมีแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่นำมาทดสอบร่วมด้วย 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4-1) คือ *V. parahaemolyticus* DMST 15285, *V. vulnificus* DMST 19346, *V. cholerae*, DMST 28173 และ *Aeromonas hydrophila* DMST 21250 พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 1,785 ไอโซเลท ซึ่งมีโคโลนีสีม่วงบนอาหาร CHROMagar™ *Vibrio* มีเชื้อที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีซึ่งสามารถระบุในเบื้องต้นได้ว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 1,374 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-1 ลักษณะทางสัญญาณและชีวเคมีของวิบริโอชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง

Characteristics	<i>V. parahaemolyticus</i> DMST 15285	<i>V. vulnificus</i> DMST 19346	<i>V. cholerae</i> DMST 28173	<i>Aeromonas hydrophila</i> DMST 21250
Morphology	Curved rod-shape	Curved rod-shape	Curved rod-shape	Rod-shape
Gram stain	Negative	Negative	Negative	Negative
CHROMagar™	Mauve	Green blue	Green blue	Mauve
Oxidase test	+	+	+	+
Triple iron sugar ^o	K/A	K/A	K/A	A/A
Motile	+	+	+	-
Indole test	+	+	+	+
lysine decarboxylase	+	+	+	-

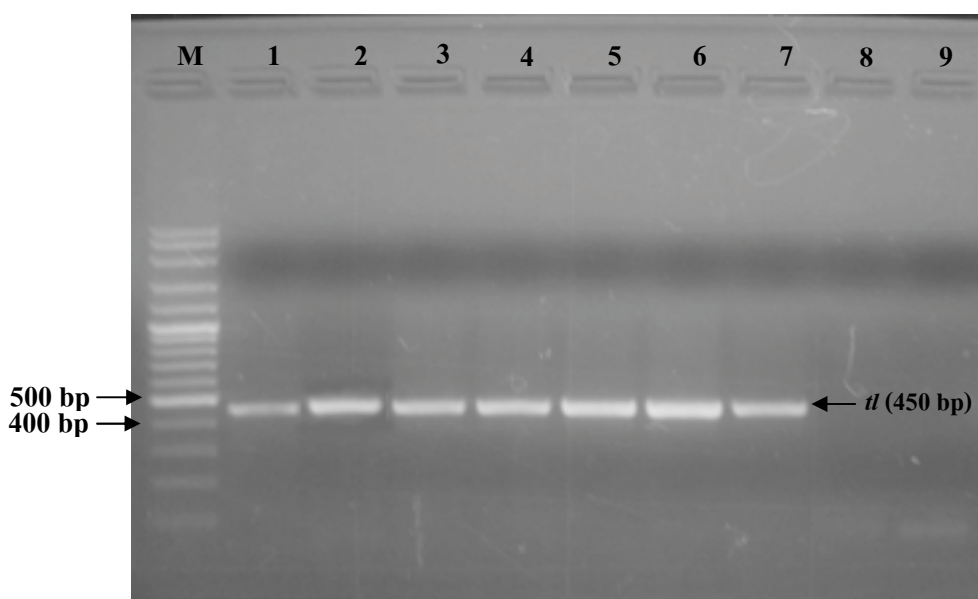
^o K/A, slant alkaline (red) over butt acidic (yellow); A/A, slant acidic (yellow) over butt acidic (yellow); +, positive to reaction; and -, negative to reaction

ตารางที่ 4-2 จำนวนไอโซเลทของ *V. parahaemolyticus* จากการคัดกรองบนอาหาร CHROMagarTM Vibrio และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

เดือน	<i>V. parahaemolyticus</i>	
	CHROMagar TM <i>Vibrio</i>	Biochemical test
ธันวาคม 2552	77	50
มกราคม 2553	146	90
กุมภาพันธ์ 2553	137	66
มีนาคม 2553	99	73
เมษายน 2553	105	87
พฤษภาคม 2553	48	48
มิถุนายน 2553	22	4
กรกฎาคม 2553	98	63
สิงหาคม 2553	120	109
กันยายน 2553	102	95
ตุลาคม 2553	108	94
พฤศจิกายน 2553	156	119
ธันวาคม 2553	175	156
มกราคม 2554	228	195
กุมภาพันธ์ 2554	164	125
Total	1,785	1,374

ตอนที่ 2 การยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 1,374 ไอโซเลท มายืนยันผลการจำแนก โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมายสำหรับระบุเชื้อ *V. parahaemolyticus* คือยีน *tl* ซึ่งยีนดังกล่าวนี้เป็นยีนที่พบในแบคทีเรียชนิดนี้ทุกสายพันธุ์ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *tl* มีขนาดเท่ากับ 450 คู่เบส (ภาพที่ 4-1) พบว่าจากเชื้อจำนวน 1,374 ไอโซเลท เมื่อนำมายืนยันผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีเชื้อจำนวน 1,293 ไอโซเลทแสดงผลบวกต่อการเพิ่มปริมาณยีน *tl* (ตารางที่ 4-3)



ภาพที่ 4-1 การใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมาย *tl* เพื่อยืนยันการจำแนก *V. parahaemolyticus* เลน M คือ VC 100bp Plus DNA Ladder (0.5 ไมโครกรัม) เลนที่ 1 คือ ชุดควบคุมเชิงบวกซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 15285 เลนที่ 2-7 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีซึ่งระบุเป็น *V. parahaemolyticus* เลนที่ 8 เป็นชุดควบคุมเชิงลบซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *V. alginolyticus* DMST 14800 เป็นแม่แบบ และเลนที่ 9 คือ ชุดควบคุมรีเอเจนต์ ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

ตารางที่ 4-3 การยืนยัน *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ยีนเครื่องหมาย *tl* ซึ่งจำเพาะต่อสปีชีส์ โดยเปรียบเทียบกับผลการจำแนกเบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวเคมี

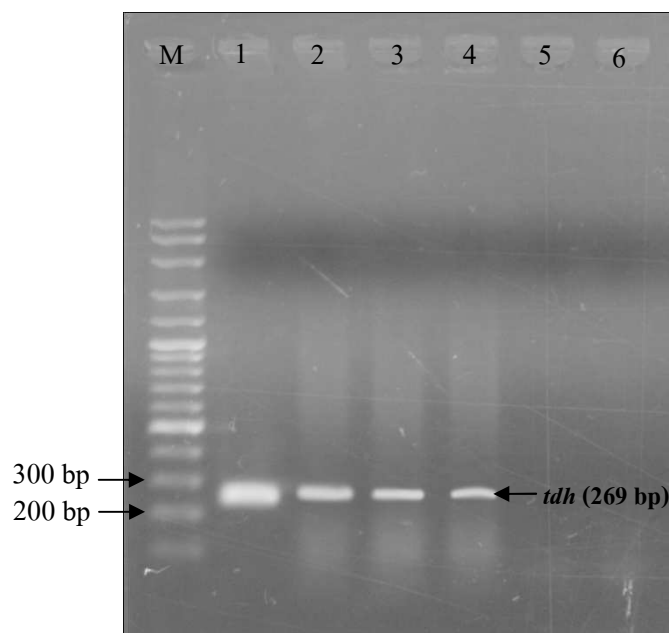
เดือน	<i>V. parahaemolyticus</i>	
	Presumptive ^a	<i>tl</i> ⁺
ธันวาคม 2552	50	50
มกราคม 2553	90	90
กุมภาพันธ์ 2553	66	66
มีนาคม 2553	73	44
เมษายน 2553	87	75
พฤษภาคม 2553	48	46
มิถุนายน 2553	4	4
กรกฎาคม 2553	63	63
สิงหาคม 2553	109	109
กันยายน 2553	95	95
ตุลาคม 2553	94	94
พฤศจิกายน 2553	119	118
ธันวาคม 2553	156	155
มกราคม 2554	195	162
กุมภาพันธ์ 2554	125	122
รวม	1,374	1,293

^a ผลการจำแนกเบื้องต้นโดยการคัดกรองด้วยอาหาร CHROMagarTM *Vibrio* และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

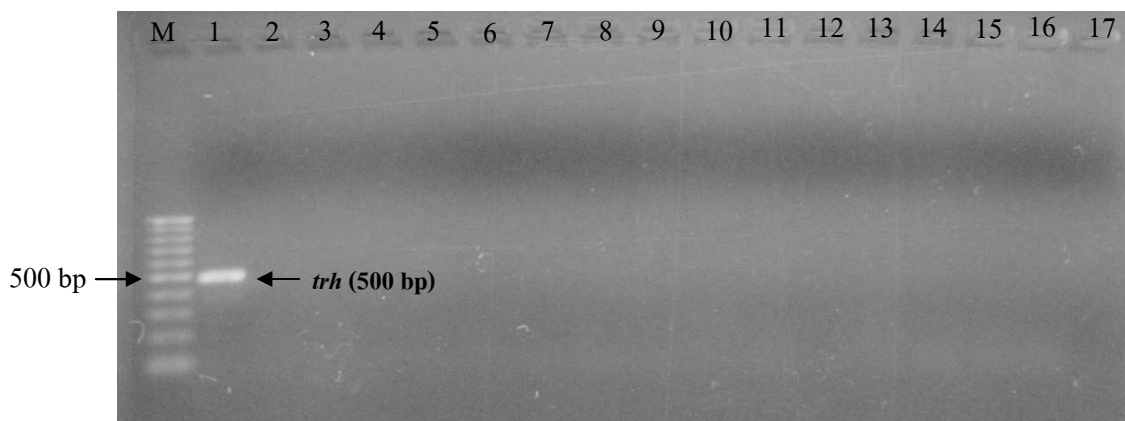
จากผลการตรวจสอบดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า จากเชื้อจำนวนทั้งหมด 1,785 ไอโซเลทที่คัดแยกจากหอยนางรมสดแกะเปลือก ซึ่งจำหน่ายโดยร้านค้าปลีกบริเวณชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบว่าสามารถจำแนกเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 1,293 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลทเหล่านี้จะถูกนำไปตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและการระบาดของเชื้อในลำดับต่อไป

ตอนที่ 3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและการระบาดทั่วของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากหอยนางรมสด

จากการนำ *V. parahaemolyticus* ที่ยืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว (tdh^+) จำนวนทั้งหมด 1,293 ไอโซเลท มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ซึ่งเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรค ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนดังกล่าวที่มีขนาด 269 คู่เบส (ภาพที่ 4-2) และ 500 คู่เบส (ภาพที่ 4-3) ตามลำดับ พบว่ามีเชื้อที่แสดงผลบวกต่อการเพิ่มปริมาณยีน *tdh* จำนวน 17 ไอโซเลท (1.31 เปอร์เซ็นต์; รหัสไอโซเลท NSTH01 - NSTH09, NSTH09-S, NSTH10 - NSTH16) ดังแสดงในตารางที่ 4-4 นอกจากนี้ยังพบไอโซเลทที่มียีน *trh* จำนวน 2 ไอโซเลท (0.15 เปอร์เซ็นต์; รหัสไอโซเลท NSTH17 และ NSTH18) (ตารางที่ 4-4)

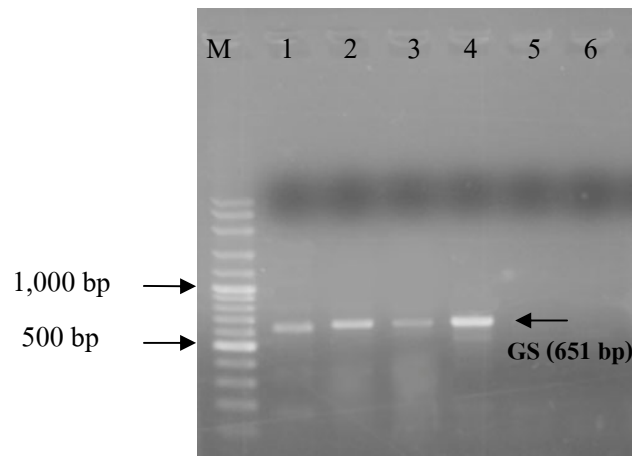


ภาพที่ 4-2 การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากหอยนางรมสดแกะเปลือก เลน M คือ VC 100bp Plus DNA Ladder (0.5 ไมโครกรัม) เลนที่ 1 คือชุดควบคุมเชิงบวกซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 15285 (tdh^+) เลนที่ 2-4 คือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากหอยนางรม (tdh^+) เลนที่ 5 คือชุดควบคุมเชิงลบซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (tdh^-) เลนที่ 6 คือชุดควบคุมรีเอเจนต์ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

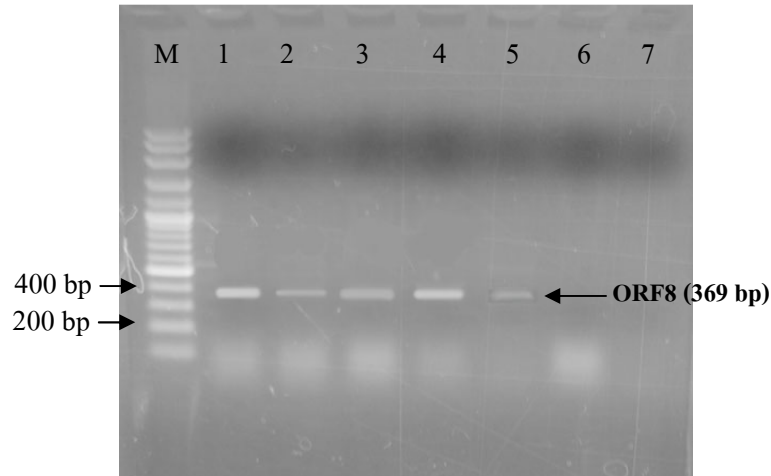


ภาพที่ 4-3 การตรวจสอบยีน *trh* ซึ่งเป็นเครื่องหมายการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* เลน M คือ VC 100bp DNA Ladder (0.5 ไมโครกรัม) เลนที่ 1 คือ ชุดควบคุมเชิงบวก ซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (*trh*⁺) เลนที่ 2-15 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจาก หอยนางรม (*trh*⁺) เลนที่ 16 คือ ชุดควบคุมเชิงลบซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 15285 (*trh*⁻) เลนที่ 17 คือ ชุดควบคุมรีเอเจนต์ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh*⁻ จำนวน 17 ไอโซเลท และสายพันธุ์ *tdh*⁻ *trh*⁺ จำนวน 2 ไอโซเลท ที่ตรวจพบนั้น มาศึกษาการมีอยู่ของ Group-specific (GS) sequence (ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 651 คู่เบส; ภาพที่ 4-4) และ ORF8 ของฟาจ f237 (ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 369 คู่เบส; ภาพที่ 4-5) ซึ่งยีนทั้งสองนี้เป็นเครื่องหมายที่ใช้บ่งชี้สายพันธุ์ O3:K6 ที่เกิดการระบาดทั่ว พบว่ามี *V. parahaemolyticus* จำนวน 9 ไอโซเลท (รหัส NSTH01-NSTH09) ให้ผลบวกต่อ GS-PCR และ ORF8 (GS-PCR⁺ ORF8⁺) ดังแสดงในตารางที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบ Group-specific (GS) sequence (651 คู่เบส) ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่แยกจากหอยนางรม เลน M คือ VC 100bp Plus DNA Ladder (0.5 ไมโครกรัม) เลนที่ 1 คือชุดควบคุมเชิงบวก ซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 38340 ซีโรไทป์ O3:K6 เลนที่ 2-5 คือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *V. parahaemolyticus* (tdh^+ trh^-) ที่แยกจากหอยนางรม เลนที่ 6 คือชุดควบคุมรีเอเจนต์ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ



ภาพที่ 4-5 การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบการมีอยู่ของ ORF8 ของฟาจ f237 ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากหอยนางรม ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 369 คู่เบส เลน M คือ VC 100bp Plus DNA Ladder (0.5 ไมโครกรัม) เลนที่ 1 คือ ชุดควบคุมเชิงบวกซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 38340 ซีโรไทป์ O3:K6 เลนที่ 2-5 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *V. parahaemolyticus* (tdh^+ trh^-) ที่แยกจากหอยนางรม เลนที่ 6 คือ ชุดควบคุมเชิงลบซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *V. parahaemolyticus* DMST 15285 (trh^-) เลนที่ 7 คือ ชุดควบคุมรีเอเจนต์ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

ตารางที่ 4-4 ไอโซเลทของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากหอยนางรม
ที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ระบาดทั่ว

ไอโซเลท	ช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่าง เพื่อคัดแยกเชื้อ	Virulent gene		Pandemic marker	
		<i>tdh</i> ⁺	<i>trh</i> ⁺	GS-PCR ⁺	ORF8 ⁺
NSTH01	มกราคม 2553	+	-	+	+
NSTH02	มกราคม 2553	+	-	+	+
NSTH03	กุมภาพันธ์ 2553	+	-	+	+
NSTH04	มีนาคม 2553	+	-	+	+
NSTH05	มีนาคม 2553	+	-	+	+
NSTH06	มีนาคม 2553	+	-	+	+
NSTH07	มีนาคม 2553	+	-	+	+
NSTH08	มีนาคม 2553	+	-	+	+
NSTH09	กันยายน 2553	+	-	+	+
NSTH09-S	กันยายน 2553	+	-	-	-
NSTH10	มีนาคม 2553	+	-	-	-
NSTH11	มีนาคม 2553	+	-	-	-
NSTH12	มีนาคม 2553	+	-	-	-
NSTH13	มีนาคม 2553	+	-	-	-
NSTH14	มีนาคม 2553	+	-	-	-
NSTH15	มีนาคม 2553	+	-	-	-
NSTH16	มีนาคม 2553	+	-	-	-
NSTH17	พฤศจิกายน 2553	-	+	-	-
NSTH18	พฤศจิกายน 2553	-	+	-	-
รวมจำนวนไอโซเลท (%) ^a		17 (1.31)	2 (0.15)	9 (0.31)	9 (0.31)

^a เปอร์เซ็นต์การพบ คำนวณจากจำนวน *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 1,293 ไอโซเลท

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์ซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus*

เพื่อให้ทราบถึงซีโรไทป์ที่เกี่ยวข้องกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากหอยนางรม ซึ่งอาจเชื่อมโยงกับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่วในการศึกษานี้จึงได้นำ *V. parahaemolyticus* จำนวนทั้งหมด 33 สายพันธุ์ ไปวิเคราะห์ซีโรไทป์ (วิเคราะห์โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) โดยแบ่งเชื้อที่นำมาศึกษาออกเป็นกลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 4-5) (1) กลุ่มเชื้อที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ระบาดทั่ว (GS-PCR⁺, ORF8⁺) จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ NSTH01-NSTH09 (2) กลุ่มเชื้อที่มียีนเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรค (*tdh*⁺ หรือ *trh*⁺) จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ NSTH10-NSTH18 (เชื้อรหัส NSTH09-S ไม่ได้ถูกนำมาทดสอบร่วมด้วย เนื่องจากไม่สามารถฟื้นสภาพเชื้อจากการเก็บรักษาได้) (3) กลุ่มเชื้อสายพันธุ์สิ่งแวดล้อม (ไม่พบยีนเครื่องหมายของการก่อโรค) จำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ NSTH19-NSTH30 และ (4) กลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 (*tdh*⁺, *trh*⁻) *V. parahaemolyticus* DMST 38340 (*tdh*⁺, GS-PCR⁺, ORF8⁺) และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (*tdh*⁻, *trh*⁺)

V. parahaemolyticus สายพันธุ์อ้างอิง DMST 15285, DMST 38340 และ ATCC 17802 มีซีโรไทป์เป็น O8:K41, O3:K6 และ O1:K1 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มเชื้อที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ระบาดทั่ว พบว่ามีซีโรไทป์ที่แตกต่างกัน 7 ซีโรไทป์ ได้แก่ O4:KUT, O11:K36, O4:K4, O8:K41, O1:K68, O1:KUT และ O4:K42 โดยซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดคือ O4:KUT (3 ไอโซเลท; 33.3 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของเชื้อที่นำมาตรวจสอบ ทำให้คาดหมายว่าจะได้พบซีโรไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่ว คือ O3:K6 อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบไม่พบซีโรไทป์ดังกล่าวใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากหอยนางรม แต่สิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือการปรากฏอยู่ของซีโรไทป์ O1:KUT ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ระบาดทั่ว (1 ไอโซเลท; NSTH08) ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานว่าซีโรไทป์นี้เป็นหนึ่งในกลุ่มซีโรไทป์ที่รายงานพบใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดทั่ว ผลการวิเคราะห์ซีโรไทป์ แสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 การวิเคราะห์ซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากหอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายในบริเวณชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

กลุ่ม (จำนวน)	ไอโซเลท	จีโนไทป์	ซีโรไทป์
Strains with pandemic genotype (9)	NSTH01	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O4:KUT
	NSTH02	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O11:K36
	NSTH03	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O4:K4
	NSTH04	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O4:KUT
	NSTH05	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O4:KUT
	NSTH06	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O8:K41
	NSTH07	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O1:K68
	NSTH08	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O1:KUT
	NSTH09	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻ , GS-PCR ⁺ , ORF8 ⁺	O4:K42

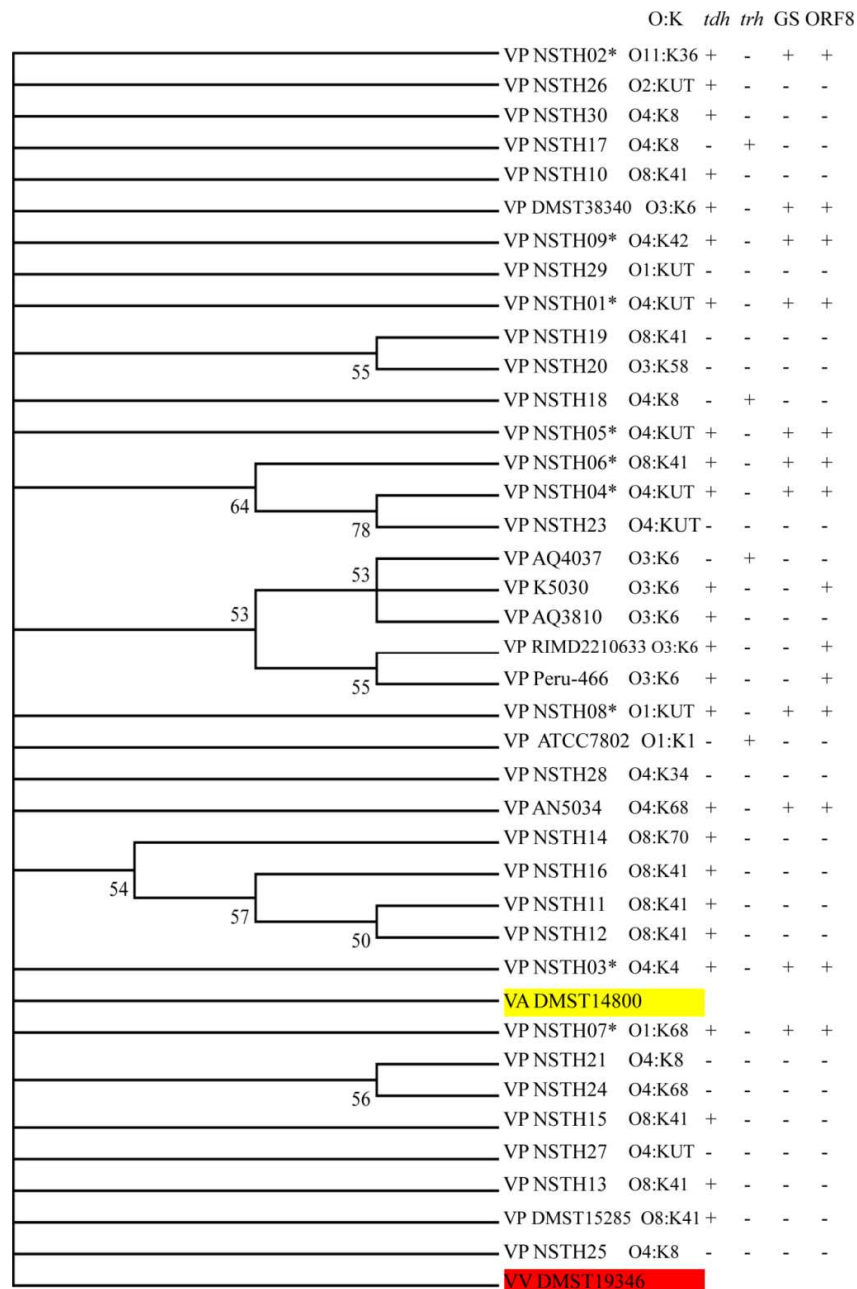
ตารางที่ 4-5 (ต่อ)

กลุ่ม (จำนวน)	ไอโซเลท	จีโนไทป์	ซีโรไทป์
Pathogenic strain (9)	NSTH10	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K41
	NSTH11	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K41
	NSTH12	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K41
	NSTH13	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K41
	NSTH14	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K70
	NSTH15	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K41
	NSTH16	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K41
	NSTH17	<i>tdh</i> ⁻ , <i>trh</i> ⁺	O4:K8
	NSTH18	<i>tdh</i> ⁻ , <i>trh</i> ⁺	O4:K8
Environmental strain (12)	NSTH19	<i>tl</i> ⁺	O8:K41
	NSTH20	<i>tl</i> ⁺	O3:K58
	NSTH21	<i>tl</i> ⁺	O4:K8
	NSTH22	<i>tl</i> ⁺	O4:KUT
	NSTH23	<i>tl</i> ⁺	O4:KUT
	NSTH24	<i>tl</i> ⁺	O4:K68
	NSTH25	<i>tl</i> ⁺	O4:K8
	NSTH26	<i>tl</i> ⁺	O2:KUT
	NSTH27	<i>tl</i> ⁺	O4:KUT
	NSTH28	<i>tl</i> ⁺	O4:K34
	NSTH29	<i>tl</i> ⁺	O1:KUT
	NSTH30	<i>tl</i> ⁺	O4:K8
Reference strain (3)	DMST 15285	<i>tdh</i> ⁺ , <i>trh</i> ⁻	O8:K41
	DMST 38340	<i>tdh</i> ⁺ , GS-PCR+, ORF8+	O3:K6
	ATCC 17802	<i>tdh</i> ⁻ , <i>trh</i> ⁺	O1:K1

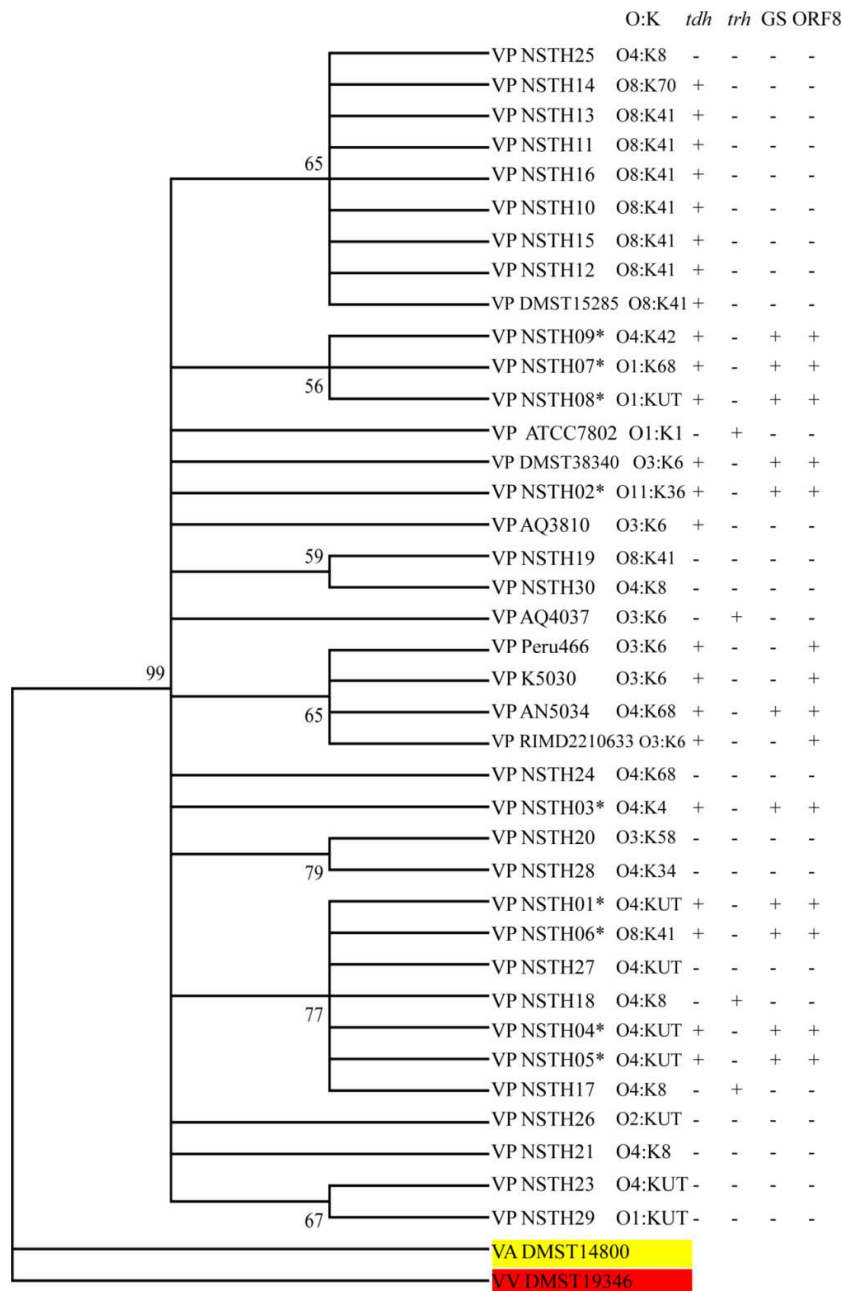
ตอนที่ 5 การวิเคราะห์ความหลากหลายของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจาก หอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายในบริเวณชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

เพื่อสะท้อนความหลากหลายของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จาก
หอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายในบริเวณชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี จึงได้ทำการวิเคราะห์
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ซึ่งพบว่าข้อมูลลำดับ
นิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมาย 16S rRNA ของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์มี
ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (ความคล้ายคลึง 98.1-100 เปอร์เซ็นต์) จนไม่สามารถนำมาใช้บ่งชี้ความ
แตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ (ภาพที่ 4-6)

ในลำดับต่อมาจึงได้เลือกยีน *atpA* ขึ้นมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการศึกษาความ
หลากหลายของ *V. parahaemolyticus* โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลำดับ
นิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว ซึ่งพบว่ายีน *atpA* ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำมา
วิเคราะห์มีระดับความคล้ายคลึงกันมาก (98.2-100 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับยีน 16S rRNA อย่างไรก็ตาม
เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *atpA* พบว่า
topology ของสายสัมพันธ์ระหว่าง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ แยกออกเป็นกลุ่มได้
ชัดเจนกว่าการใช้ข้อมูลของยีน 16S rRNA (ภาพที่ 4-7) ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพของการบ่งชี้ความ
แตกต่างยังไม่สูงมากพอที่จะนำมาใช้ได้ก็ตาม



ภาพที่ 4-6 แผนภูมิต้นไม้แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่าง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งสร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม Mega5 ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี Bootstrapping จำนวน 1000 ซ้ำ (ชุดข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1389 คู่เบส (อักษรย่อ VP แทน *V. parahaemolyticus*, VV แทน *V. vulnificus* และ VA แทน *V. alginolyticus* เครื่องหมาย * บ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ระบาดทั่ว ซึ่งแยกได้จากหอยนางรมสดในพื้นที่ชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี)



ภาพที่ 4-7 แผนภูมิต้นไม้แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่าง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งสร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *atpA* ด้วยวิธี Maximum parsimony บนโปรแกรม Mega5 ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี Bootstrapping จำนวน 1000 ซ้ำ (ชุดข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1541 คู่เบส (อักษรย่อ VP แทน *V. parahaemolyticus*, VV แทน *V. vulnificus* และ VA แทน *V. alginolyticus* เครื่องหมาย * บ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ระบาดทั่ว ซึ่งแยกได้จากหอยนางรมสดในพื้นที่ชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียที่แยกได้จากหอยนางรมสด จากร้านค้าปลีกบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลา ในเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และสามารถฟื้นสภาพได้จำนวนทั้งหมด 1,785 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีใน เบื้องต้น พบว่ามีเชื้อจำนวน 1,374 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น *V. parahaemolyticus* ซึ่ง เมื่อนำมายืนยันผลการจำแนกด้วยการตรวจสอบยีน *tl* โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า 1,293 ไอโซเลทให้ ผลบวกกับยีน *tl* เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* (tl^+) มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนก่อโรค คือ *tdh* และ *trh* พบว่ามี 17 ไอโซเลท (1.31 เปอร์เซ็นต์) แสดงผลบวกกับยีน *tdh* และมี 2 ไอโซเลท (0.15 เปอร์เซ็นต์) แสดงผลบวกกับยีน *trh* เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* ดังกล่าวมาศึกษาลักษณะทาง พันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่พบระบาดทั่ว โดยการทำ GS-PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ ของ *toxRS/new sequence* รวมทั้งตรวจสอบการมีอยู่ของ ORF8 ของฟาจ f237 พบว่ามี 9 ไอโซเลท (0.31 เปอร์เซ็นต์) ที่มีจีโนมไทป์เป็น GS-PCR⁺ ORF8⁺ เมื่อวิเคราะห์ซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus* ที่มีจีโนมไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่ว ร่วมกับสายพันธุ์อื่น พบว่าเชื้อเหล่านี้มี ซีโรไทป์หลากหลาย โดยไม่พบซีโรไทป์ O3:K6 ซึ่งเป็นซีโรไทป์หลักของสายพันธุ์ระบาดทั่ว อย่างไรก็ตามพบ *V. parahaemolyticus* 1 ไอโซเลท (GS-PCR+, ORF8+) มีซีโรไทป์ O1:KUT ซึ่งเป็น ซีโรไทป์หนึ่งที่ได้พบได้ในสายพันธุ์ระบาดทั่ว ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า หอยนางรมเป็นแหล่งสะสมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่สำคัญ รวมทั้งสามารถพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการ ระบาดทั่วโลกได้

อภิปรายผลการทดลอง

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่พบแพร่กระจายทั่วไปในน้ำทะเล และมีการสะสม ตัวอย่างมากในสัตว์ประเภทย่อย โดยเฉพาะหอยนางรม ขวัญฤทัย แสงโนราช (2553) รายงาน อุบัติการณ์ของแบคทีเรียชนิดนี้ในหอยนางรมสดแกะเปลือกจากร้านค้าปลีกบริเวณชายฝั่งทะเล อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจสอบตัวอย่างหอยนางรมซึ่งเก็บ ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 รวมทั้งหมด 120 ตัวอย่างพบว่า ระดับการปนเปื้อนเชื้อในแต่ละเดือนสูงถึง 93-100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Changchai & Suanjit (2014) รายงานการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในหอยนางรมสดแกะเปลือกที่จำหน่ายในพื้นที่ เดียวกัน ในช่วงระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 ว่ามีสูงถึง 91.3 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบ (219/240 ตัวอย่าง) โดยช่วงฤดูร้อน พบการ ปนเปื้อนสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือฤดูฝน (84 เปอร์เซ็นต์) และฤดูหนาว (83.7 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

ในตัวอย่างหอยนางรมที่มีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ยังตรวจพบสายพันธุ์ก่อโรคซึ่งมีถิ่นสำหรับการสร้างโปรตีน TDH (tdh^+) ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่คาดว่าน่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากงานวิจัยของขวัญฤทัย แสงโนราช (2553) และ Changchai & Suanjit (2014) โดยใช้อาหาร TCBS agar และคัดกรองเบื้องต้นโดยใช้อาหาร T_1N_4 agar มีจำนวนทั้งหมด 1,785 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรักษาไว้ในอาหาร TSB ที่มีเกลือ NaCl 2 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในงานวิจัยนี้ได้้นำเชื้อทั้งหมดดังกล่าวมาทำการฟื้นสภาพ เพื่อนำไปจัดจำแนกและยืนยันเชื้อ และศึกษาคุณลักษณะระดับโมเลกุลบางประการที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

เมื่อนำเชื้อทั้งหมด 1,785 ไอโซเลท มาฟื้นสภาพ และตรวจคัดกรองโดยใช้อาหาร CHROMagar™ *Vibrio* และ TCBS agar และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส ทดสอบการเจริญบนอาหาร TSI agar และทดสอบการเจริญบนอาหาร LIM จากนั้นจัดจำแนกโดยอ้างอิงแบบแผนการจัดจำแนก *V. parahaemolyticus* ตามวิธีของ Farmer *et al.* (1985) ผลการศึกษาพบเชื้อที่สามารถระบุได้ว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 1,374 ไอโซเลท (76.97 เปอร์เซ็นต์) สาเหตุที่มีไอโซเลทของเชื้อจำนวนหนึ่ง ไม่ใช่ *V. parahaemolyticus* อาจเนื่องมาจากการเลือกเก็บโคโลนีจากอาหาร TCBS agar ปกติทั่วไปแนะนำให้เก็บโคโลนีสีเขียว (Farmer *et al.*, 1985) ซึ่งแสดงคุณสมบัติการไม่หมักย่อยน้ำตาลซูโครสของแบคทีเรียชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม *Vibrio* บางชนิด เช่น *V. hollisae*, *Vibrio damsela*, *Vibrio mimicus* และ *V. vulnificus* ก็แสดงลักษณะโคโลนีสีเขียวได้เช่นกันเมื่อเจริญบนอาหาร TCBS agar (Farmer *et al.*, 1985) ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อได้

จากรายงานที่กล่าวถึงปัญหาของการใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีในการจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ (Kwok *et al.*, 2002) เช่น การปรากฏของเชื้อต่างชนิดที่มีแบบแผนคุณสมบัติชีวเคมีที่คล้ายคลึงกันมาก หรือลักษณะทางชีวเคมีที่แปรผันในเชื้อชนิดเดียวกัน โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมมีสายพันธุ์ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากลักษณะของสายพันธุ์ส่วนใหญ่ (Atypical stains) อยู่ร่วมด้วยเสมอ (Vieira, Grayer, Paton, & Simon, 2001; Thompson, LiDa, & Swings, 2004; Tarr *et al.*, 2007) จึงทำให้ต้องมีการยืนยันเชื้อด้วยวิธีที่มีความแม่นยำสูงกว่า เช่น การใช้วิธีทางอนุพันธุศาสตร์ (Kim *et al.*, 1999; Nandi *et al.*, 2000; Blackstone *et al.*, 2003; Panicker, Myers, & Bej, 2004; Takahashi, Hara-Kudo, Miyasaka, Kumagai, & Konuma, 2005; Gubala, 2006) เมื่อนำไอโซเลทดังกล่าวทั้ง 1,374 ไอโซเลทมายืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยอาศัยยีน *tl* เป็นเป้าหมาย พบว่าเชื้อจำนวน 1,293 ไอโซเลท (94.10 เปอร์เซ็นต์) แสดงผลบวกต่อยีน *tl* ซึ่งเป็นยีนที่เข้ารหัสการสร้าง TLH ซึ่งพบใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปในการใช้ยีน *tl* สำหรับบ่งชี้และยืนยันแบคทีเรียชนิดนี้ นอกจากยีน *tl* แล้วยังสามารถใช้ยีน *toxR* สำหรับเป็นเครื่องหมายบ่งชี้แบคทีเรียชนิดนี้ได้อีกด้วย ซึ่งยีนนี้เข้ารหัสการสร้างโปรตีนควบคุมสำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างทอกซิน โดยยีนนี้พบได้ใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ (Miller *et al.*, 1987; Matsumoto *et al.*, 2000) จากผลการยืนยันเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการจัดจำแนกเชื้อ

โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการระบุชนิด ซึ่งการใช้เทคนิคพีซีอาร์เข้ามาช่วยยืนยัน จะทำให้ความเชื่อมั่นของการจัดจำแนกมีมากขึ้น

เชื้อ *V. parahaemolyticus* 1,293 ไอโซเลทที่ยืนยันได้นั้น เมื่อนำมาตรวจการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ตามลำดับ พบว่ามี *V. parahaemolyticus* เพียง 17 ไอโซเลท (1.31 เปอร์เซ็นต์) ที่แสดงผลบวกต่อยีน *tdh* และมีเชื้อ 2 ไอโซเลท (0.15 เปอร์เซ็นต์) แสดงการมีอยู่ของยีน *trh* การบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ใช้การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *tdh* และ/หรือ *trh* ซึ่งตามปกติแล้วโอกาสตรวจพบสายพันธุ์ที่มียีนดังกล่าวอยู่มักพบได้ไม่มากนักจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย ดังตัวอย่างงานวิจัยของสุภาทิณี โสบุญ (2546) ที่ได้ทำการคัดแยก *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลและผู้ป่วยในภาคใต้ของประเทศไทยเป็นจำนวน 666 ไอโซเลท และ 188 ไอโซเลท ตามลำดับ พบว่าในกลุ่มไอโซเลทที่แยกได้จากอาหารทะเลตรวจพบยีน *tdh* จำนวน 14 ไอโซเลท (2.1 เปอร์เซ็นต์) และ *trh* จำนวน 2 ไอโซเลท (0.3 เปอร์เซ็นต์) ส่วนเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ตรวจพบยีน *tdh* จำนวน 168 ไอโซเลท (89.4 เปอร์เซ็นต์) ยีน *trh* จำนวน 10 ไอโซเลท (5.3 เปอร์เซ็นต์) และมีเชื้อ 5 ไอโซเลท ตรวจพบว่ามีทั้งยีน *tdh* และ *trh* (2.7 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2008) ซึ่งตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม จำนวน 72 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลท (1.4 เปอร์เซ็นต์) ที่ให้ผลบวกกับยีน *trh* แต่ไม่พบเชื้อที่มียีน *tdh* นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Zulkifli *et al.* (2009) ได้ตรวจ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง โดยอาศัยยีน *tdh* และ *trh* เป็นเป้าหมายจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 25 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลท แต่พบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคเพียง 3 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อที่มียีน *tdh* จำนวน 1 ไอโซเลท และสายพันธุ์มียีน *trh* จำนวน 2 ไอโซเลท โดยไม่พบเชื้อสายพันธุ์ที่มีทั้งยีน *tdh* และ *trh*

นอกจากการตรวจสอบลักษณะจีโนไทป์ที่บ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยนางรมดังกล่าวแล้วข้างต้น การศึกษานี้ยังมีความสนใจที่จะตรวจสอบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่ตรวจพบนั้น มีลักษณะทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกหรือไม่ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา นับตั้งแต่ ค.ศ. 1996 พบว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3:K6 (รวมถึงซีโรไทป์อื่น ๆ ซึ่งแปรผันมาจาก O3:K6 เช่น O4:K68, O1:K25, O1:KUT และ O6:K18) ก่อให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษทั่วโลก โดยจากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อซีโรไทป์ O3:K6 พบว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ (new O3:K6) ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างไปจาก *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่เคยพบก่อนหน้าปี ค.ศ. 1996 (old O3:K6) Okuda *et al.* (1997) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ระบาดทั่วนี้ถูกคัดแยกได้เป็นครั้งแรกจากผู้ป่วยที่ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดีย แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มียีนก่อโรค *tdh* แต่ไม่มียีน *trh* ($tdh^+ trh^-$) แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีแบบแผนดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AP-PCR แตกต่างไปจาก *V. parahaemolyticus* (old) O3:K6 รวมทั้งแตกต่างไปจากซีโรไทป์อื่น ๆ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรค ($tdh^+ trh^-$) ซึ่งแยกได้จากเมืองกัลกัตตาในช่วงเวลาเดียวกัน (Matsumoto *et al.*, 2000) ในเวลาต่อมาพบการระบาดของ *V. parahaemolyticus* (new)

O3:K6 ในหลายประเทศ ได้แก่ บังคลาเทศ ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ ไต้หวันและสหรัฐอเมริกา ประเทศในกลุ่มอเมริกาใต้ ยุโรป และแอฟริกา (Mitsuaki, 2009)

จากการศึกษายีนเครื่องหมาย *toxR* และ *toxS* (*toxRS*) ซึ่งนำรหัสการสร้างโปรตีนควบคุม (Regulatory proteins) ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่ายีนดังกล่าวใน *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 มีบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเอกลักษณ์เฉพาะซีโรไทป์จึงสามารถนำมาใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับตรวจสอบและบ่งชี้ความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 แยกออกจาก (old) O3:K6 รวมทั้งซีโรไทป์อื่น ๆ ได้ Matsumoto *et al.* (2000) จึงได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *toxRS* ที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 เพื่อให้มีความสะดวกในการตรวจสอบและติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เรียกเทคนิคนี้ว่า GS-PCR โดยพบว่านอกจาก *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 แล้วยังมี *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์อื่น ๆ ที่พบว่ามีภาวะขาดในพื้ที่ต่าง ๆ ได้แก่ O4:K68, O1:K25, O1:KUT และ O6:K18 ให้ผลบวกต่อการทำ GS-PCR ด้วยเช่นกัน โดยจากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ AP-PCR, PFGE และ MLST ทำให้สามารถสรุปได้ว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสายพันธุ์ที่มีวิวัฒนาการแปรผันมาจาก *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 (Matsumoto *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2008)

นอกจากการทำ GS-PCR แล้ว ยังมีการใช้โมเลกุลเครื่องหมายอีกชนิดหนึ่งในการบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 คือ ORF8 ของฟาจ f237 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 โดยสามารถตรวจสอบได้จากการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนดังกล่าว (Myers *et al.*, 2003) โดยยีนเครื่องหมายนี้สามารถตรวจพบได้ใน *V. parahaemolyticus* (new) O3:K6 รวมทั้งซีโรไทป์ O1:KUT, O1:K25 และ O4:K68 (Ansaruzzaman *et al.*, 2008; Bhuiyan *et al.*, 2002; Myers *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากลักษณะการปรากฏอยู่ของ ORF8 บนจีโนมของสายพันธุ์ระดับทั่วนั้นพบว่าการผันแปรได้ (บวกหรือลบ) (Bhuiyan *et al.*, 2002; Serichantalerg *et al.*, 2007) โดย Bhuiyan *et al.* (2002) รายงานว่าการปรากฏอยู่ของ ORF8 ใน *V. parahaemolyticus* นั้นไม่มีความสัมพันธ์กับผล การทำ GS-PCR ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการหายไปของจีโนมของฟาจบางส่วน (ซึ่งรวมบริเวณ ORF8) หรือหายไปทั้ง จีโนม ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ ORF8 เพียงชนิดเดียวในการเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็น สายพันธุ์ระดับทั่วของเชื้อนี้

V. parahaemolyticus จำนวน 19 สายพันธุ์ ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ก่อโรค ที่จำแนกได้ใน งานวิจัยนี้ มีจีโนไทป์เป็น *tdh⁺ trh⁻* จำนวน 17 สายพันธุ์ และจีโนไทป์ *tdh⁻ trh⁺* จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการที่จะนำมาศึกษาว่ามีลักษณะของสายพันธุ์ระดับทั่วดังเช่นที่พบใน (new) O3:K6 หรือไม่ โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค GS-PCR และการตรวจสอบการมีอยู่ของ ORF8 ด้วย เทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามี 9 สายพันธุ์ของสายพันธุ์ก่อโรคที่มีจีโนไทป์เป็น *tdh⁺ trh⁻* ที่ให้ผลเป็น GS-PCR⁺ ORF8⁺ จากลักษณะจีโนไทป์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ แยกจากหอยนางรมในพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี นอกจากมีโอกาเป็นสายพันธุ์ก่อโรค

แล้ว ยังมีโอกาสที่จะเป็นสายพันธุ์ที่พบระบาดทั่วได้เช่นกัน กล่าวคือสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น GS-PCR⁺ ORF8⁺

ในการศึกษานี้ได้มีการระบุซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีลักษณะจีโนไทป์สัมพันธ์กับสายพันธุ์ระบาดทั่ว โดยซีโรไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่วตามที่รายงานมาแล้วนั้น ได้แก่ O3:K6, O4:K68, O1:K25, O1:KUT หรือ O6:K18 แต่ด้วยที่ความแปรผันเชิงพันธุกรรมอาจเกิดขึ้นได้ทั่วทั้งจีโนม ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดความแปรผันของซีโรไทป์ในแบคทีเรียนี้ได้เช่นกัน ดังเช่นรายงานของ Serichantalerg *et al.* (2007) ที่วิเคราะห์ลักษณะของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลบำรุงราษฎร์ กรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ (ทั้งที่เป็นนักท่องเที่ยวและที่พำนักอยู่ในประเทศไทยอย่างถาวร) ในช่วงเดือนมกราคม ค.ศ. 2001 ถึงเดือนธันวาคม ค.ศ. 2002 พบว่ามีเชื้อบางส่วนมีลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่ว จากการวิเคราะห์ GS-PCR และ ORF8 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นซีโรไทป์ O3:K6, O1:K25 และ O1:KUT และเป็นที่น่าสนใจว่ามี 1 สายพันธุ์ที่มีลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่ว แต่วิเคราะห์ได้เป็นซีโรไทป์ O3:K46 ซึ่งถือว่าเป็นซีโรทัยใหม่ที่มีลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่วปรากฏอยู่ สำหรับซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่วทั้ง 9 สายพันธุ์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่ามีซีโรไทป์ที่แตกต่างกัน 7 ซีโรไทป์ ได้แก่ O4:KUT, O11:K36, O4:K4, O8:K41, O1:K68, O1:KUT และ O4:K42 โดยซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดคือ O4:KUT (3 ไอโซเลท; 33.3 %) เมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของเชื้อที่นำมาตรวจสอบ ทำให้คาดหวังว่าจะได้พบซีโรไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่ว คือ O3:K6 อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบไม่พบซีโรไทป์ดังกล่าวใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากหอยนางรม แต่สิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือการปรากฏอยู่ของซีโรไทป์ O1:KUT ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนเครื่องหมายของสายพันธุ์ระบาดทั่ว (จำนวน 1 ไอโซเลท; NSTH08) ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานว่าซีโรไทป์นี้เป็นหนึ่งในกลุ่มซีโรไทป์ที่รายงานว่าพบใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดทั่ว

โดยปกติแล้วเชื้อที่มีลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่วมักแยกได้จากผู้ป่วย (Clinical isolates) ในประเทศไทยมีรายงานของการพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดทั่ว (*tdh*⁺ *trh*⁻ GS-PCR⁺) ในอัตรา 55.5-69.7 เปอร์เซ็นต์ โดยแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ช่วงระหว่าง ค.ศ. 2000 ถึง 2005 ในกรณีของเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดลอมหรือแหล่งอื่น ๆ มักตรวจไม่ค่อยพบสายพันธุ์ระบาดทั่ว เช่น รายงานของ Sarkar *et al.* (2003) ซึ่งได้ทำการคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างน้ำทิ้งชุมชนได้จำนวน 8 ไอโซเลท ในจำนวนนี้พบเป็นสายพันธุ์ *tdh*⁺ 2 สายพันธุ์ โดยที่เมื่อนำเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลทมา วิเคราะห์ GS-PCR และ ORF8 พบว่าทั้งหมดให้ผลเป็นลบ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปรากฏอยู่ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดทั่วในตัวอย่างน้ำทิ้งที่นำมาศึกษา นอกจากนี้ Alam *et al.* (2009) คัดแยก *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากบริเวณปากแม่น้ำของอ่าวเบงกอล ประเทศบังคลาเทศ ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม ค.ศ. 2005 ถึงเดือนมกราคม ค.ศ. 2006 ได้เชื้อทั้งหมด 42 ไอโซเลทที่แยกได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์การมีอยู่ของยีนก่อโรค พบสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* จำนวน 18 ไอโซเลท สายพันธุ์ที่มียีน *trh* จำนวน 1 ไอโซเลท โดยไม่พบสายพันธุ์ที่มียีนก่อโรคทั้งสองยีน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่พบเชื้อที่มีลักษณะของสายพันธุ์ระบาดทั่วเมื่อตรวจด้วย GS-PCR และ ORF8

เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค สายพันธุ์ที่มีจีโนมไทป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่ว และสายพันธุ์สิ่งแวดล้อม โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนเครื่องหมาย 16S rRNA และ *atpA* พบว่าข้อมูลของยีนดังกล่าวมีความใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถใช้บ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้

สำหรับงานวิจัยนี้ถือว่าเป็นรายงานวิจัยแรกที่ระบุถึงการตรวจพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมสัมพันธ์กับเชื้อสายพันธุ์ที่มีการระบาดทั่วโลกใน หอยนางรมสดที่วางจำหน่ายในบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ซึ่งถือว่าเป็นพื้นที่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งในเชิงท่องเที่ยวและเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญ โดยเฉพาะหอยนางรม ดังนั้นการมีมาตรการในการเฝ้าระวังและตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในการควบคุมและรักษาความปลอดภัยทางด้านอาหารและความปลอดภัยของผู้บริโภค

ข้อเสนอแนะ

- ควรมีการศึกษายีนเครื่องหมายอื่น ๆ นอกเหนือจากยีน 16S rRNA และ *atpA* เพื่อนำมาใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ก่อโรค สายพันธุ์ระบาดทั่วและสายพันธุ์สิ่งแวดล้อมของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งจะมีประโยชน์ในการตรวจสอบ ติดตาม และบ่งชี้เชิงระบาดวิทยาของแบคทีเรียชนิดนี้ในสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

- ขวัญฤทัย แสงโนราช. (2553). การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์เพื่อตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมสด จากร้านค้าบริเวณ อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. ครงงานทางจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ศรียรรณมา หัตยานานนท์. (ม.ป.ป.). ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค: *Vibrio parahaemolyticus*. วันที่ค้นข้อมูล 26 มีนาคม 2555, เข้าถึงได้จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1134
- สุดารัตน์ สอนจิตร, สุรีย์พร เอี่ยมศรี, ญัฐวี ชั่งชัย และอภิรดี พิรันธนาภักย์. (2554). การตรวจสอบ การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมและ สภาพแวดล้อมชายฝั่งทะเลเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์: รายงานการวิจัย. ชลบุรี: โครงการบัณฑิตศึกษา, สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์ความเป็น เลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พืชวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี.
- สุบัณฑิต นิมรัตน์. (2551). การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน:วงศ์วิบริโอนาสี้อี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุภาทนี โสบุญ. (2546). ความชุกของ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่กำลังระบาดใน อาหารทะเลและสิ่งส่งตรวจในภาคใต้ของประเทศไทย. บัณฑิตวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุภาทนี โสบุญ และทรศนีย์ มาศจรัส. (2548, หน้า 48). การแยกเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคในหอยนางรมสด. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สุราษฎร์ธานี, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข. วันที่ค้นข้อมูล 26 มีนาคม 2555, เข้าถึงได้จาก <http://elib.fda.moph.go.th/kmfda/KmDoc/seminar14.pdf>
- Alam, M., Chowdhury, W. B., Bhuiyan, N. A., Islam, A., Hasan, N. A., Nair, G. B., Watanabe, H., Siddique, A. K., Huq, A., Sack, R. B., Akhter, M. Z., Grim, C. J., Kam, K. M., Luey, C. K., Endtz, H. P., Cravioto, A., and Colwell, R. R. (2009). Serogroup, virulence, and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh.
- Amrita. (2012). Triple Sugar Iron Agar. Retrieved April 24, 2012, from <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=76&sim=216&cnt=2>
- Ansaruzzaman, M., Lucas, M., Bhuiyan, N. A., Safa, A., Sultana, M., Chowdhury, A., Nair, G. B., Seidlein, L. V., Barreto, A., Chaignat, C. L., Sack, D. A., Clemens, J. D., Choi, S. Y., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Lee, H. R., Chun, J., and Kim, D. W. (2008). Characteristics of a pandemic clone of O3:K6 and O4:K68 *Vibrio*

- parahaemolyticus* isolated in Beira, Mozambique. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 1502-1507.
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C., Jones, D. D., and Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *V. parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods*, 36, 215-225.
- Bhuiyan, N. A., Ansaruzzaman, M., Kamruzzaman, M., Alam, K., Chowdhury, N. R., Nishibuchi, M., Faruque, S. M., Sack, D. A., and Takeda, Y. (2002). Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 284-286.
- Bilung, L. M., Radu, S., Bahaman, A. R., Rahim, R. A., Napis, S., Ling, M. W. C. V., Tanil, G. B., and Nishibuchi, M. (2005). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 252, 85-88.
- Blachwell, K. D., and Oliver, J. D. (2008). The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholera* and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. *Journal of Microbiology*, 46, 146-153.
- Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Bowen, M. D., Meyer, R. F., and DePaola, A. (2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 149-155.
- Bhuiyan, N. A., Ansaruzzaman, M., Kamruzzaman, M., Alam, K., Chowdhury, N. R., Nishibuchi, M., Faruque, S. M., Sack, D. A., Takeda, Y., and Nair, G. B. (2002). Prevalence of the pandemic genotype of *V. parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 284-286.
- Changchai, N. (2014). *Incidence and Molecular Characterization of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus Isolated from Raw Oysters in Chon Buri Province, Thailand*. Doctoral Dissertation. Burapha University, Chon Buri, Thailand.
- Changchai, N. and Suanjit, S. (2014). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in retail raw oysters from the eastern coast of Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(3), 662-669.
- Dai, J. H., Lee, Y. S., and Wong, H. C. (1992). Effects of iron limitation on production of a siderophore, outer membrane proteins, and hemolysin and on

- hydrophobicity, cell adherence, and lethality in mice of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 60, 2952-2956.
- Drake, S. L., DePaola, A., and Jaykus, L-A. (2007). An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 120-144.
- Fabbri, A., Falzano, L., Frank, C., Donelli, G., Matarrese, P., Raimondi, F., Fasano, A., and Fiorentini, C. (1999). *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. *Infection and Immunity*, 67(3), 1139-1148.
- Farmer, J. J., Hickman-Brenner, F. W., and Kelly, M. T. (1985). *Vibrio*. In E. H. Lennette, A. Balows, Jr. W. J. Hausler, & H. J. Shadomy (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (pp. 287-289). Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., and Karunasagar, I. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implication for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 151-159.
- Gubala, A. J. (2006). Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Microbiological Methods*, 65(2), 278-93.
- Han, H., Wong, H. C., Kan, B., Guo, Z., Zeng, X., Yin, S., Liu, X., Yang, R., and Zhou, D. (2008). Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group'. *BMC Genomics*, 9, 570.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Honda, T., Ni, Y., and Miwatani, T. (1992). The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 1175-1180.
- Humada, D., Higurashi, T., Mayanagi, K., Miyata, T., Fukui, T., Lida, T., Honda, T., and Yanagihara, I. (2007). Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle X-ray scattering and electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 365, 187-195.
- ISO/TS 21872. (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.

- Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., and Nishibuchi, M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1173-7.
- Kwok, A. Y., Wilson, J. T., Coulthart, M., Ng, L. K., Mutharia, L., and Chow, A. W. (2002). Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 903-910.
- Laohaprerthisan, V., Chowdhury, A., Kongmung, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C., and Nishibuchi, M. (2003). Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiology and Infection*, 130, 395-406.
- Lee, K. J., Jung, D. W., Eom, S. Y., Oh, S. W., Kim, Y., Kwak, H. S., and Kim, Y. H. (2008). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. *Food Control*, 19, 990-994.
- Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J. J., and Nishibuchi, M. (1993). *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology*, 175(12), 3844-3855.
- Liston, J. 1990. Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technology*, 44, 56-62.
- LSUMC. (1995). *Enteric gram-negative short rods*. Retrieved April 10, 2012, from <http://www.medschool.lsuhs.edu/Microbiology/DMIP/dmex12.htm>
- Martinez-Urtaza, J., Bowers, J.C., Trinanes, J., DePaola, A. (2010). Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food research International*, 43, 1780-1790.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H. C., Depaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J., and Nishibuchi, M. (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 578-85.
- McCarter, L. L. (2001). Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. Retrieved March 19, 2012, From <http://mmbr.asm.org/content/65/3/445.full>
- Meador, C. E., Parsons, M. M., Bopp, C. A., Gerner-Smidt, P., Painter, J. A. and Vora, G. J. (2007). Virulence gene and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1133-1139.

- Miller, V. L., Taylor, R. K., and Mekalanos, J. J. (1987). Cholera toxin transcriptional activator *ToxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*, 48, 271-279.
- Mitsuaki, N. (2009). Recent trend in infections by *Vibrio parahaemolyticus* and distribution of this bacterium in shellfish in Asia. *International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, France, 7.
- Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., and Yamai, S. (1969). *In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 100, 1147-1149.
- Myers, M. L., Panicker, G., and Bej, A. K. (2003). PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3, K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2194-2200.
- Nair, G. B., Ramamuethy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., and Sack, D. A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 39-48.
- Nandi, B., Nandy, R. K., Mukhopadhyay, S., Nair, G. B., Shimada, T., and Ghose, A. C. (2000). Rapid method for species-specific identification of *Vibrio* using primers targeted to the gene of outer membrane protein *OmpW*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4145-4151.
- Nasu, H., Iida, T., Sugahara, T., Yamaichi, Y., Park, K. S., Yogayama, K., Makino, K., Shinagawa, H., and Honda, T. (2000). A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2156-2161.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A. K., Grag, S., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B., and Nishibuchi, M. (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3150-3155.
- Oliver, J. D. (2006). *Vibrio vulnificus*. In F. L., Thompson, B. Austin & J. Swings (Eds.), *Biology of Vibrios* (pp. 349-366). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Panicker, G., Myers, M. L., and Bej, A. K. (2004). Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 498-507.
- Raimondi, F., Kao, J. P. Y., Fiorentini, C., Fabbri, A., Donelli, G., Gasparini, N., Rubino, A., and Fasano, A. (2000). Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio*

- parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infection and Immunity*, 68, 3180-3185.
- Ray, B., Hawkins, S. M., & Hackney, C. R. (1978). Method for the detection of injured *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 1121-1127.
- Reich, K. A., and Schoolnik, G. K. (1994). The light organ symbiont *Vibrio fischeri* possesses a homolog of the *Vibrio cholerae* transmembrane transcriptional activator *ToxR*. *Journal of Bacteriology*, 176, 3085-3088.
- Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamai, S., and Hobo, K. (1968). Studies of the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 21, 325-331.
- Sarkar, B., Chowdhury, N. R., Nair, G. B., Nishibuchi, M., Yamasako, S., Takeda, Y., Gupta, S. K., Bhattacharya, S. K., and Ramamurthy, T. (2003). Molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* of similar serovars isolated from sewage and clinical of diarrhoea in Calcutta, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 771-776.
- Serichantalergs, O., Bhuiyan, N. A., Nair, G. B., Chivaranond, O., Srijan, A., Bodhidatta, L., Anuras, S., and Mason, C. J. (2007). The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhoea in Thailand, and a new emergent serovar (O3: K46) with pandemic traits. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 608-613.
- Takahashi, A., Sato, Y., Shiomi, Y., Cantarelli, V. V., Iida, T., Lee, M., and HONDA, T. (2000). Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 801-810.
- Takahashi, H., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Kumagai, S., and Konuma, H. (2005). Development of a quantitative real time polymerase chain reaction targeted to the *ToxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Microbiological Methods*, 61, 77-85.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731-2739.

- Tarr, C. L., Patel, J. S., Puhr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A., and Strockbine, N. A. (2007). Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 134-140.
- Thompson, F., Austin, B., and Swing, J. (2006). *The biology of Vibrios*. Washington, DC: ASM Press.
- Thompson, F. L., Iida, T., and Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 403-31.
- U.S. Food and Drug Administration. (2004). *Vibrio* : In *Bacteriological Analytical Manual (BAM) online*. Retrieved February 16, 2007, from <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>.
- UW-medison. (2012). *Enteric Rods: Oxidase test*. Retrieved October 16, 2012, from <http://www.vetmed.wisc.edu/pbs/courses/bact/labmanual/c4oxidase.html>
- Vieira, R. F., Grayer, R. J., Paton, A., and Simon, J. E. (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 287-304.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Moreno, M., Fabiano, M., Pane, L., and Pruzzo, C. (2009). Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). *Microbial Ecology*, 58, 808-818.
- Vuddhakul, V., Nakai, T., Matsumoto, C., Oh, T., Nishino, T., Chen, C. H., Nishibuchi, M., and Okuda, J. (2000). Analysis of *gyrB* and *toxR* gene sequences of *Vibrio hollisae* and development of *gyrB* and *toxR* targeted PCR methods for isolation of *V. hollisae* from the environment and its identification. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3506-3514.
- Wong, H. C., Liu, S. H., Wang, T. K., Lee, C. L., Chiou, C. S., Liu, D. P., Nishibuchi, M., and Lee, B. K. (2000). Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3981-3986.
- Wong, H. E., and Lee, Y. S. (1994). Regulation of iron on bacterial growth and production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* in intraperitoneal infected mice. *Microbiology and Immunology*, 38, 367-371.
- Wootipoom, N., Bhoopong, P., Pomwised, R., Nishibuchi, M., Ishibashi, M., and Vuddhakul, V. (2007). A decrease in the proportion of infections by pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in Hat Yai hospital, southern Thailand. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1630-1638.

- Yamamoto, S., Okujo, N., Miyoshi, S., Shinoda, S., and Narimatsu, S. (1999). Siderophore production of *Vibrio parahaemolyticus* strains from different sources. *Microbiology and Immunology*, 43, 909-912.
- Yeung, P. S. M., and Boor, K. J. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1, 74-88.
- Zhang, X. H. and Austin, B. (2005). A review hemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1011-1019.
- Zulkifi, Y., Alitheen, N. B., Son, R., Yeap, S. K., Lealey, M. B. and Raha, A. R. (2009). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence gene. *International Food Research Journal*, 16, 289-296.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Alkaline Peptone Water (APW)

ชั่ง Peptone 10.0 กรัม และ NaCl 10.0 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.5 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ในการศึกษา

2. CHROMagar™ Vibrio (Paris, France)

ชั่ง CHROMagar™ Vibrio จำนวน 74.7 กรัม ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หลอมให้วุ้นละลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ปรับ pH เป็น 9.0 ± 0.2 (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ) ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การใช้งาน ใช้สำหรับบ่งชี้ความแตกต่างของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยตรวจสอบจากสีของโคโลนี (*V. parahaemolyticus* มีโคโลนีสีม่วง)

3. Cytosine Tryptone Agar (CTA; Himedia®) with NaCl 2 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง CTA 28.5 กรัม และ NaCl 20.0 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.3 ± 0.2 หลอมให้ละลายด้วยความร้อนจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้หลอดฉีดยาชุด CTA ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษา (ระยะเวลาของการเก็บรักษาประมาณ 3 เดือน)

4. Lysine Indole Motility; (LIM; Difco™) with NaCl 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอาหาร LIM 36.5 กรัม และ NaCl 10.0 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.6 ± 0.2 บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส การผลิตอินดอล และ การเคลื่อนที่

5. Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar (TCBS; Oxoid)

ชั่ง TCBS 88 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย ปรับ pH เป็น 8.6 ± 0.2 (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

การใช้งาน ใช้สำหรับคัดกรองและบ่งชี้ความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* แยกจากเชื้ออื่น ๆ

6. Tryptic Soy Agar (TSA; Difco™) with NaCl 3 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอาหาร TSA 40.0 กรัม และ NaCl 30.0 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.3 ± 0.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus*

7. Tryptic Soy Agar (TSA; Difco™) with NaCl 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอาหาร TSA 40.0 กรัม และ NaCl 10.0 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.3 ± 0.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *V. cholerae* และ *V. alginolyticus*

8. Tryptic Soy Broth (TSB; Difco™) with NaCl 3 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง TSB 30.0 กรัม และ NaCl 30.0 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.3 ± 0.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus*

9. Tryptic Soy Broth (TSB; Difco™) with NaCl 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง TSB 30.0 กรัม และ NaCl 10.0 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.3 ± 0.2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *V. cholerae* และ *V. alginolyticus*

10. Triple Sugar Iron Agar (TSI; Difco™) with NaCl 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง TSI 65.0 กรัม และ NaCl 10.0 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.4 ± 0.2 หลอมให้ละลาย บรรจุหลอดแก้วขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 4 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จนำหลอดอาหารวางเอียง

การใช้งาน ใช้สำหรับตรวจสอบการหมักย่อน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส

11. T₁N₃ agar

ชั่ง Tryptone 10.0 กรัม NaCl 30.0 กรัม และผงวุ้น (Agar) 15 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไป

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเพาะแยกเชื้อ

12. Tryptic Soy Broth (TAB; Difco™)+ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ + กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง TSB 30.0 กรัม และ NaCl 30.0 กรัม ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร และเติมกลีเซอรอลปริมาตร 300 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้ละลายด้วยความร้อน แล้วนำมาบรรจุใส่ในหลอดฝาเกลียวที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การใช้งาน ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อ

13. Urease Test Broth (BBL™) with NaCl 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง Urease Test Broth 3.87 กรัม และ NaCl 1.0 กรัม เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อประมาณ 1.0 มิลลิลิตร คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดที่ปราศจากเชื้อขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร

การใช้งาน ใช้สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี บัฟเฟอร์ และรีเอเจนต์

1. อะกาโรสเจล

อะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะกาโรสเจล 1.5 กรัม ละลายใน 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้ละลายด้วยความร้อนจนอะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงถาด

อะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะกาโรสเจล 1.2 กรัม ละลายใน 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้ละลายด้วยความร้อนจนอะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงถาด

2. Ethylene Diamine Tetraacetic (EDTA) 0.5 โมลาร์

EDTA (disodium salt, MW = 372.24)	18.6	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

กวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) คอยเติมเกล็ด NaOH ลงจนกระทั่งได้ pH เท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA ละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Tris-Cl, pH 8.0 2 โมลาร์

ชั่ง Tris base 242.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย conc.HCl ประมาณ 42 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. 1X Tris/EDTA (TE) buffer

Tris-Cl, pH 8.0 2 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. 50X Tris-acetate-electrophoresis (TAE) buffer

Tris-base	242.0	กรัม
Glycyl acetic acid	57.1	กรัม
EDTA (pH 8.0) 0.5 โมลาร์	100.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. 6X Gel loading-buffer

Bromophenol blue (MW=533.60)	0.25	กรัม
Xylene cyanol (MW=342.30)	0.25	กรัม
Sucrose	40.00	กรัม

นำ Sucrose ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม Bromophenol blue และ Xylene cyanol ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Ethidium bromide solution (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่ง Ethidium bromide 500 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กจนกระทั่งละลาย เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. Kovac's reagent (Metck, Germany)

4-Dimethylaminobenzadehyde	5	กรัม
Hydrochloride acid	25	กรัม
2-Methylbutan-2-ol	75	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา
การใช้งาน ใช้สำหรับทดสอบการผลิตอินดอล

9. Oxidase Reagent

ชุดทดสอบสำเร็จรูป BactiDrop™ Oxidase (Remel, UK)

การใช้งาน สำหรับทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส

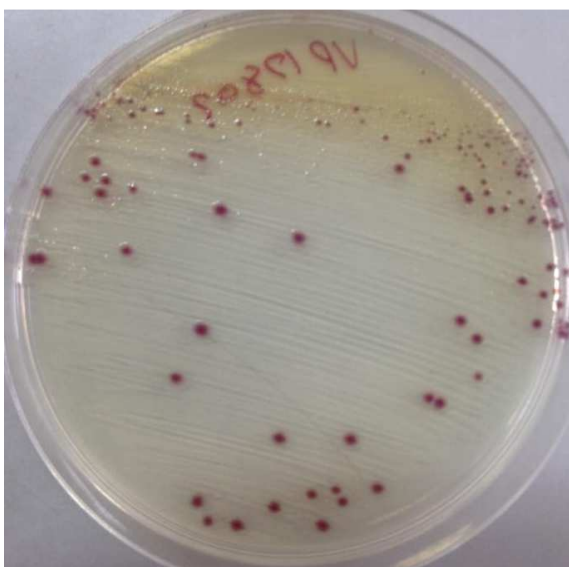
ภาคผนวก ค
การทดสอบทางชีวเคมี

1. การคัดเลือก *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar™ Vibrio

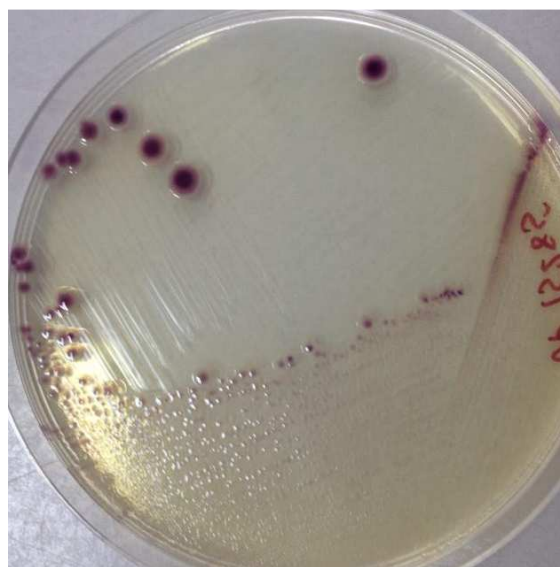
อาหารทดสอบ CHROMagar™ Vibrio

วิธีทดสอบ ขีดเชื้อบนผิวหน้าอาหาร โดยให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

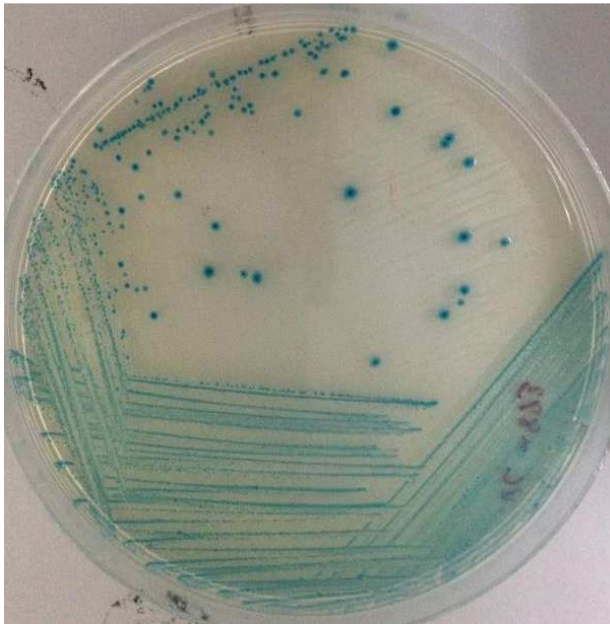
การอ่านผล สังเกตสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร *V. parahaemolyticus* ให้โคโลนีสีม่วง ต่างจากโคโลนีของเชื้อชนิดอื่น ๆ ดังภาพที่ ค-1 ถึง ค-6



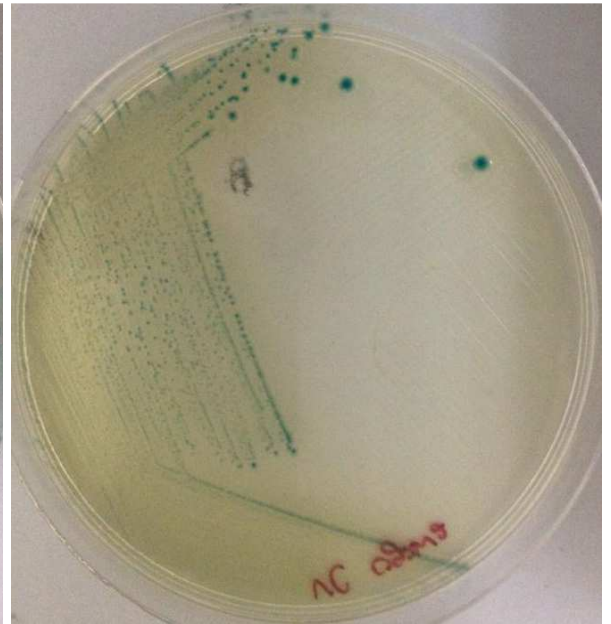
ภาพที่ ค-1 *V. parahaemolyticus* ATCC
17802 โคโลนีมีสีม่วงชมพูอ่อน



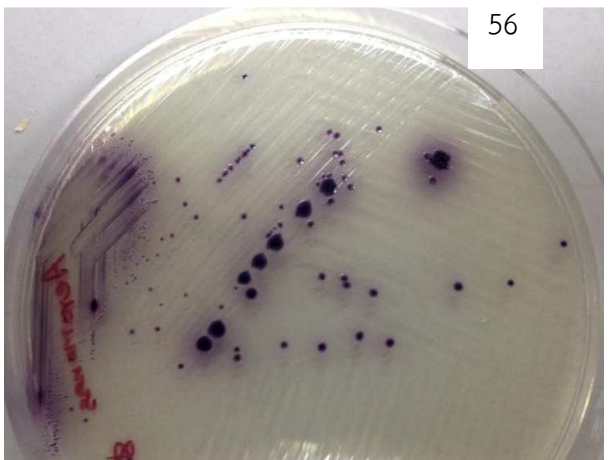
ภาพที่ ค-2 *V. parahaemolyticus* DMST
15285 โคโลนีมีสีม่วงชมพู ขอบใส



ภาพที่ ค-3 *V. cholerae* DMST 2873
โคโลนีสีเขียวน้ำเงิน



ภาพที่ ค-4 *V. cholerae* Ogawa AFRIM
โคโลนีสีเขียว



ภาพที่ ค-5 *A. hydrophila* DMST 21250
โคโลนีสีม่วงน้ำเงิน



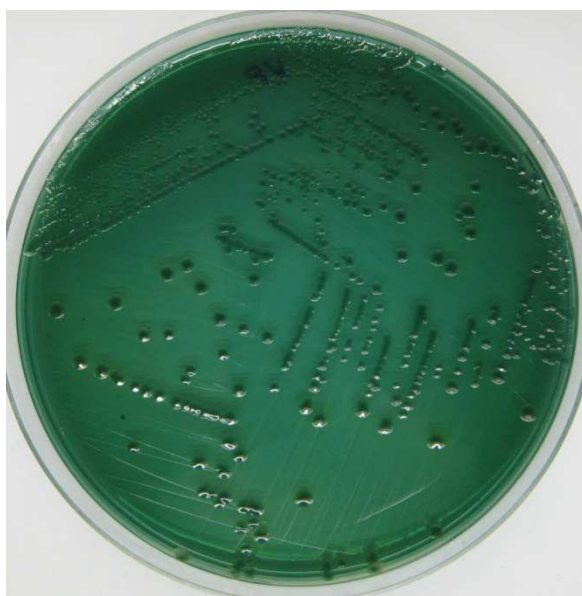
ภาพที่ ค-6 *V. alginolyticus* DMST 14800
โคโลนีสีขาวขุ่น

2. การคัดเลือก *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

อาหารทดสอบ TCBS agar (TCBS; Oxoid)

วิธีทดสอบ ขีดเชื้อบนผิวหน้าอาหาร โดยให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การอ่านผล *V. parahaemolyticus* โคโลนีมีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร มีสีเขียว ส่วนน้อยที่โคโลนีจะมีสีเหลือง (ภาพที่ ค-7)



ภาพที่ ค-7 ลักษณะโคโลนี *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

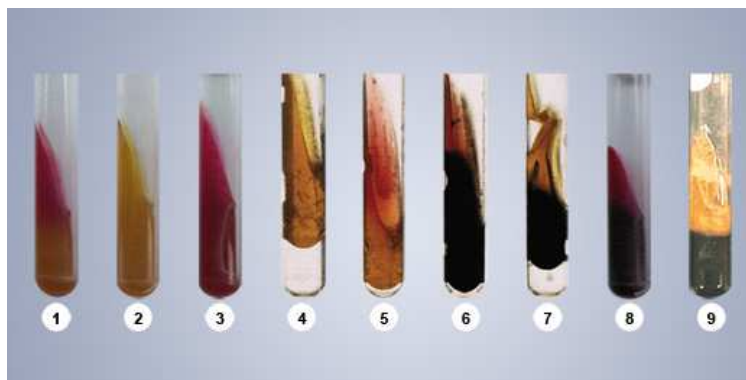
3. การทดสอบการหมักย่อยน้ำตาล (น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส)

อาหารทดสอบ TSI (Difco™)

วิธีทดสอบ ขีดเชื้อบนผิวหน้าอาหารแล้วแทงลงในเนื้อวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การอ่านผล
- (1) ผลการหมักย่อยน้ำตาลต่าง ๆ
 - (1.1) ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวบนผิววุ้นจะเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีแดงเข้ม (Alkaline หรือ K) ส่วนก้นหลอดจะมีสีเหลือง อ่านผลว่า K/A ดังภาพที่ ค-8 (1)
 - (1.2) ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลได้มากกว่า 1 ชนิด จะเกิดสีเหลืองทั้งหลอด อ่านผลว่า A/A ดังภาพที่ ค-8 (2)
 - (1.3) หากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลใด ๆ เลย มีอยู่ 3 รูปแบบ คือ N/N, K/N, K/K (ภาพที่ ค-8(3) (N: ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร และ K: เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)
 - (2) การเกิดก๊าซจะเห็นรอยแตก หรือสังเกตเห็นฟองก๊าซ ดังภาพที่ ค-8 (4-7)

(3) การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะเห็นสีดำอยู่ก้นหลอด ดังภาพที่ ค-8 (6-9)



ภาพที่ ค-8 ลักษณะของเชื้อที่เจริญเมื่อถูกทดสอบด้วย TSI agar
(ที่มา: Amrita, 2012)

4. การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส การผลิตอินดอล และการเคลื่อนที่

อาหารทดสอบ LIM (Difco™)

วิธีทดสอบ เป็นการทดสอบปฏิกิริยาต่าง ๆ 3 ชนิด คือ การผลิตเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส การผลิตอินดอล และการเคลื่อนที่ โดยการแทงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

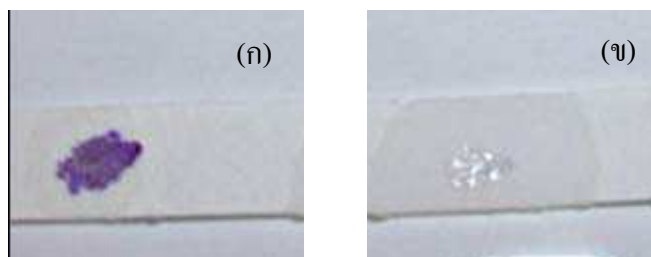
- การอ่านผล
- (1) การผลิตเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส
 - ผลบวก สีอาหารยังคงเป็นสีแดง (สีม่วง)
 - ผลลบ สีอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
 - (2) การผลิตอินดอล
 - ผลบวก เกิดวงแหวนสีแดง เมื่อหยด Kovac's reagent
 - ผลลบ ไม่เกิดวงแหวนสีแดง เมื่อหยด Kovac's reagent
 - (3) การเคลื่อนที่
 - ผลบวก เห็นการเจริญของเชื้อมนกรอยที่แทงไว้ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น
 - ผลลบ เห็นการเจริญของเชื้ออยู่เฉพาะตรงรอยที่แทงเท่านั้น

5. การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส

รีเอเจนต์ทดสอบ BactiDrop™ Oxidase (Remel, UK)

วิธีทดสอบ หยดน้ำยาทดสอบออกซิเดสลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อเขี่ยเชื้อลงบนกระดาษกรอง แล้วบันทึกผลการทดลอง (ภายในระยะเวลา 30 วินาที)

การอ่านผล ผลบวก เกิดสีม่วง (ภาพที่ ค-9ก) ผลลบ ไม่เกิดสี (ภาพที่ ค-9ข)



ภาพที่ ค-9 ผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (ก) การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสที่ให้ผลบวก (ข) การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสที่ให้ผลลบ
(ที่มา: UW-medison, 2012)

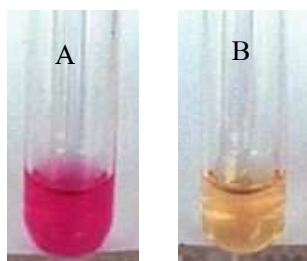
6. การทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

อาหารทดสอบ Urease Test Broth (BBL™)

วิธีทดสอบ เชื้อเชื้อลงในหลอดอาหาร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู (ภาพที่ ค-10ก)

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี (ภาพที่ ค-10ข)



ภาพที่ ค-10 ผลการทดสอบยูรีเอส (ก) ผลของยูเรียที่เป็นผลบวก (ข) ผลของยูเรียที่เป็นผลลบ
(ที่มา: LSUMC, 1995)

ภาคผนวก ง

ลำดับขั้นตอนการจำแนก *V. parahaemolyticus* โดยวิธีทางชีวเคมี
และการยืนยันผลด้วยพีซีอาร์

