



การแยกและการตรวจหาลักษณะของเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จาก
อาหารทะเลในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
Isolation and Characterization of *Vibrio cholerae* Isolates
from Seafood in Hat Yai City, Songkhla

สุธิมา ปรีเปรม
Sutima Preeprem

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและการตรวจหาลักษณะของเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จาก
อาหารทะเลในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ผู้เขียน นางสาวสุธิมา ปรีเปรม

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร)

.....ประธานกรรมการ
(ดร.พวงทิพย์ ภูพงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร)

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....กรรมการ
(ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวสุธิมา ปรีเปรม)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุธิมา ปรีเปรม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกและการตรวจหาลักษณะของเชื้อ <i>Vibrio cholerae</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเลในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ผู้เขียน	นางสาวสุธิมา ปรีเปรม
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

อาหารทะเลเป็นแหล่งหนึ่งของ *Vibrio cholerae* ในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ภาคใต้ การศึกษาครั้งนี้ได้แยก *V. cholerae* จากอาหารทะเลที่วางจำหน่ายในตลาดต่าง ๆ บริเวณเขตอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ จากการศึกษาในตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด 125 ตัวอย่าง สามารถแยก *V. cholerae* ได้ 55 ตัวอย่าง มีจำนวนทั้งหมด 100 ไอโซเลท *V. cholerae* ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *V. cholerae* ซีโรกรุป non-O1/non-O139 การตรวจหาพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่าง ๆ พบว่า *V. cholerae* ที่แยกได้จำนวนร้อยละ 20 และ 96 มียีน *stn/sto* และ *hlyA* El Tor ตามลำดับ และไม่พบยีน *ctxA*, *tcp*, *zot* และ *ace* ในทุกไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบว่ามี *V. cholerae* เพียง 6% ที่มียีน T3SS (*vcsV2*) ส่วนยีน T6SS (*vasH*) พบได้ในเชื้อส่วนใหญ่ ทั้งนี้ได้สุ่มเลือกเชื้อตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลทที่มีรูปแบบยีนก่อโรคต่าง ๆ มาศึกษาความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ความไวต่อยาปฏิชีวนะ การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ การสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิว และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จากการศึกษาพบว่าเชื้อกลุ่มที่ไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้เป็นกลุ่มที่ไม่มียีน *hlyA* (ยกเว้น 1 ไอโซเลท), เชื้อทุกไอโซเลทไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดที่ศึกษา ยกเว้นแอมพิซิลลิน และสามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้ อย่างไรก็ตามเชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวได้แต่ไม่พบความแตกต่างของการสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวในเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบซุซุระและแบบเรียบ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR พบว่า วิธี ERIC-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากกว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี AP-PCR นอกจากนี้วิธี ERIC-PCR ยังสามารถแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อสอดคล้องกับยีนก่อโรคต่าง ๆ ที่พบในเชื้อ

คำสำคัญ: *Vibrio cholerae*, *stn/sto*, *hlyA*, hemolysin, ไบโอฟิล์ม, T3SS, T6SS

Thesis Title Isolation and characterization of *Vibrio cholerae* isolates from seafood in Hat Yai city, Songkhla
Author Miss Sutima Preeprem
Major Program Microbiology
Academic Year 2014

ABSTRACT

Seafood is one of sources of *Vibrio cholerae* in Thailand, especially in the Southern coastal region. In this study, we isolated and characterized *V. cholerae* from seafood obtained from several markets in Hat Yai city, Songkhla province, Thailand. One hundred of *V. cholerae* isolates were obtained from 55 of 125 seafood samples. Dominant serotypes were non-O1/non-O139. The *stn/sto* and *hlyA* El Tor genes were detected in 20% and 96% of the total isolates, respectively. None of the isolates were positive for *ctxA*, *tcp*, *zot* and *ace* genes. Only 6% of the isolates carried the T3SS gene (*vcsV2*). However, majority of the isolates (96%) carried T6SS gene (*vasH*). Representative isolates ($n=35$) that exhibited various virulence gene patterns were randomly selected and analyzed for hemolytic activity, antibiotic susceptibility, polysaccharide production, biofilm formation and genotyping. Hemolytic activity was not detected in all *hlyA*-negative isolates, except for one isolate. Except ampicillin, all isolates were pan susceptible to 5 test antibiotics. Polysaccharide production was detected in all isolates. However, Biofilm production was observed in most of the isolates, and it was not different between the smooth and rugose colony. Molecular typing by AP-PCR and ERIC-PCR showed that ERIC-PCR is more discriminatory method than AP-PCR. Moreover, Correlation between ERIC-PCR and virulence gene patterns was observed.

Keywords: *Vibrio cholerae*, *stn/sto*, *hlyA*, hemolysin, biofilm, T3SS, T6SS

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ดร. พิมลศรี มิตรภาพอาทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและศ.ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำและเสียสละเวลาให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ ดร.พวงทิพย์ ภู่งษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้คำแนะนำและสอนความรู้ทางวิชาการ พร้อมทั้งให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัย และทุนเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ปี 2556 (grant number SCI560370S) ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเป็นผู้ช่วยนักวิจัย (Research Assistant)

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์ด้านวัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณ น.ส. ภาชนิ กิสสัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ และความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ มาโดยตลอด

สุธิมา ปรีเปรม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อไทย	(5)
บทคัดย่ออังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(11)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(12)
สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน	(13)
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
ทฤษฎีและหลักการ	2
ลักษณะทั่วไป	2
ลักษณะของแอนติเจนและการจำแนกเชื้อทางชีวภาพ	2
แหล่งที่อยู่	3
ระบาดวิทยา	4
การติดต่อ	5
พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ	5
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค	6
การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ <i>V. cholerae</i>	8
การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ	8
การรักษา	9
การป้องกันและควบคุม	9
วัตถุประสงค์	10
ผลการทดลอง	11
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	21
สรุปผลการทดลอง	24
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	48

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การทดสอบเพื่อจำแนกไบโอไทป์ของ <i>V. cholerae</i> O1	3
ตารางที่ 2 จำนวน <i>V. cholerae</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ	11
ตารางที่ 3 การกระจายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคใน <i>V. cholerae</i>	14
ตารางที่ 4 ลักษณะของ <i>V. cholerae</i> ตัวแทนที่สุ่มมาจากแต่ละกลุ่ม (A-H) จำนวน 35 ไอโซเลท	15
ตารางที่ 5 แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะใน <i>V. cholerae</i> จำนวน 35 ไอโซเลท	16

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 การปรากฏของยีนก่อโรคใน <i>Vibrio cholerae</i> สายพันธุ์มาตรฐานที่แยกได้จากผู้ป่วย	12
รูปที่ 2 ผลการทำ colony hybridization ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเล เมื่อใช้ยีน <i>hlyA</i> El Tor เป็นตัวตรวจจับ (<i>hlyA</i> ET probe)	13
รูปที่ 3 การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ของ <i>Vibrio cholerae</i> บนอาหาร congo red agar (CRA) ที่อุณหภูมิ 37°C (A.) และ 30°C (B.)	16
รูปที่ 4 ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิว ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose)	17
รูปที่ 5 การสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose)	17
รูปที่ 6 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่ได้จากวิธี AP-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม <i>V. cholerae</i> ตามยีนที่ตรวจพบ	19
รูปที่ 7 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม <i>V. cholerae</i> ตามยีนที่ตรวจพบ	20

สัญลักษณ์และคำย่อ

พ.ศ.	=	พุทธศักราช
%	=	Percentage
°C	=	Degree Celsius
OD	=	Optical density
A	=	adenine
T	=	thymine
C	=	cytocine
G	=	guanine
bp	=	base pair
kb	=	kilobase
PCR	=	Polymerase chain reaction
APW	=	Alkaline peptone water
DMST	=	Department of medical sciences
dNTPs	=	Deoxynucleotide triphosphates
mM	=	millimolar
μM	=	micromolar
μl	=	microliter
min	=	minute
s	=	second

รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

ชื่อบทความ

1. ชื่อภาษาไทย การแยกและการตรวจหาลักษณะของเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเลในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ประเทศไทย

ชื่อภาษาอังกฤษ Isolation and characterization of *Vibrio cholerae* isolates from seafood in Hat Yai city, Songkhla, Thailand
2. ชื่อภาษาไทย การกระจายของยีนก่อโรคและการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

ชื่อภาษาอังกฤษ Distribution of virulence genes and molecular fingerprinting of *Vibrio cholerae* isolated from seafood

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน

[Print](#)[Close](#)

[Fwd: RE: Requesting permission]

From: pimonsri.m@psu.ac.th
Sent: Thursday, July 31, 2014 10:31:52 PM
To: sutima_119@hotmail.com

----- Original Message -----

Subject: RE: Requesting permission
From: "Oliver, Stephen Paul" <soliver@utk.edu>
Date: Thu, July 31, 2014 9:38 pm
To: "pimonsri.m@psu.ac.th" <pimonsri.m@psu.ac.th>

That is fine....please acknowledge that this paper has been
accepted for
publication in FPD.....

-----Original Message-----

From: pimonsri.m@psu.ac.th [<mailto:pimonsri.m@psu.ac.th>]
Sent: Thursday, July 31, 2014 10:28 AM
To: Oliver, Stephen Paul
Subject: Requesting permission

Dear Dr. Oliver,

On the behalf of my co-authors, I would like to express our
sincere
gratitude to you and reviewers for work in editing our
article. We pray
that in future you can provide another opportunity to publish
our work in
the Journal.

Moreover, I am requesting permission to put an article in
M.Sc. thesis of
first author (S. Preeprem). I would be pleased to include a
full citation
to the work and other acknowledgement as you might request.

I would greatly appreciate your permission. If you require
any additional

information, do not hesitate to contact me.

Sincerely,
Dr. Pimonsri Mittraparp-arthorn
Corresponding author on behalf of all the authors

> 31-Jul-2014
>
> Dear Dr. Mittraparp-arthorn:
>
> It is a pleasure to accept your manuscript entitled
> "Isolation and
> characterization of *Vibrio cholerae* isolates from
> seafood in
> Hat Yai city, Songkhla, Thailand" in its current form for
> publication
> in Foodborne Pathogens and Disease.
>
> Please be sure to cite this article to ensure maximum
> exposure of your
> work.
>
> All authors will get a follow-up email with instructions on
> how to
> complete our online Copyright Agreement form. The
> corresponding
> author is responsible for communicating with coauthors to
> make sure
> they have completed the online copyright form. Authors not
> permitted
> to release copyright must still return the forms
> acknowledging the
> statement of the reason for not releasing copyright.
>
> FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A
> DELAY IN
> PUBLICATION.
>
> Consider Liebert Open Option to have your paper made free
> online
> immediately upon publication for a one-time fee. Benefits
> of Liebert
> Open Option include: accelerated e-pub ahead of print
> publication;
> email message highlighting the article; increased readers,
> citations
> and downloads; an identifying icon in the table of contents
> showing
> that the paper is permanently available for free to all

readers; and
> immediate deposition into PubMed Central®. Subsequent
accepted papers
> are eligible for a reduced fee for Open Option. Please
contact Karen
> Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for
more information.
>
> If your institution is not currently subscribing to this
journal,
> please ensure that your colleagues have access to your work
by
> recommending this title
> (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf
) to your
Librarian.
>
> Thank you for your fine contribution. On behalf of the
Editors of
> Foodborne Pathogens and Disease, we look forward to your
continued
> contributions to the Journal.
>
> Sincerely,
> Dr. Stephen Oliver
> Editor-in-Chief, Foodborne Pathogens and Disease
soliver@utk.edu
>
> -----

> -----
> NOTE: Prince of Songkla University will NEVER ask for your
PSU
> Passport/Email Username or password by e-mail.
> If you receive such a message, please report it to report-
phish@psu.ac.th.
> -----

> ----- @@@@ NEVER reply to any email asking
for your
> PSU Passport/Email or other personal details. @@@@
> -----

> -----
>
> For more information, contact the PSU E-Mail Service by
dialing 2121
>
>

--
This message has been scanned for viruses and dangerous
content by
MailScanner, and is believed to be clean.

NOTE: Prince of Songkla University will NEVER ask for your
PSU
Passport/Email Username or password by e-mail.
If you receive such a message, please report it to report-
phish@psu.ac.th.

@@@ NEVER reply to any email asking for your PSU
Passport/Email or other
personal details. @@@@

For more information, contact the PSU E-Mail Service by
dialing 2121

--
This message has been scanned for viruses and
dangerous content by MailScanner, and is
believed to be clean.

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

Vibrio cholerae เป็นสาเหตุสำคัญของอหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในประเทศต่าง ๆ รวมทั้งประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2553 สำนักระบาดวิทยาได้รายงานการพบผู้ป่วยด้วยอหิวาตกโรคในประเทศไทยจำนวน 1,597 ราย ซึ่งจังหวัดสงขลาเป็นจังหวัดที่พบผู้ป่วยอหิวาตกโรคอย่างต่อเนื่องทุก ๆ ปี (AESR, 2010) การติดต่อของอหิวาตกโรคในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลแบบดิบ ๆ หรือมีการปนเปื้อนของ *V. cholerae* ในระหว่างขั้นตอนการเตรียมอาหาร (AESR, 2010; Luo *et al.*, 2013) *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรคคือ *V. cholerae* ซีโรกรุป O1 (*V. cholerae* O1) และ *V. cholerae* ซีโรกรุป O139 (*V. cholerae* O139) เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ส่วนใหญ่มียีนก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ ยีน *ctx* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ cholera toxin ซึ่งเป็นสาเหตุของการหลั่งของสารน้ำในลำไส้ และยีน *tcp* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง toxin-conjugated pili (Tcp) ซึ่งมีบทบาทในการเกาะติดของ bacteriophage (CTX ϕ) และการเกาะติดกับเยื่อบุลำไส้ (Kaper *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998) นอกจากนี้ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 ยังมียีนอื่น ๆ ซึ่งมีส่วนในการส่งเสริมการก่อโรค คือ ยีน *zot* เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ zonula occludens toxin (Zot) และยีน *ace* เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ accessory cholera enterotoxin (Ace) (Kaper *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตาม *V. cholerae* ที่พบมากในสิ่งแวดล้อม คือ ซีโรกรุป non-O1/non-O139 ที่ไม่มียีน *ctx*, *tcp*, *zot* และ *ace* (Kaper *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998) ถึงแม้ว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 ส่วนใหญ่จะไม่มียีนก่อโรคที่พบได้ในสายพันธุ์ระบาดแต่ก็มีการรายงานเกี่ยวกับโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุมาจาก *V. cholerae* non-O1/non-O139 ในประเทศต่าง ๆ เช่น ประเทศจีน, อิตาลี, อินเดีย และ ไทย (Bagchi *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1998; Ottaviani *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2013) จากงานวิจัยของ Bagchi และคณะ ในปี พ.ศ. 2536 และงานวิจัยของ Sharma และคณะ ในปี พ.ศ. 2541 พบว่า ความสามารถในการก่อโรคของ *V. cholerae* non-O1/non-O139 เกี่ยวข้องกับยีน *stn/sto* และ *hlyA* ซึ่งทำหน้าที่สร้างสารพิษ non-O1 heat-stable enterotoxin (NAG-ST) และ El Tor-like hemolysin ตามลำดับ (Bagchi *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1998) NAG-ST เป็นสารพิษที่ผลิตโดย *V. cholerae* non-O1 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับสารพิษที่สร้างจาก *Escherichia coli* และจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *V. cholerae* non-O1 ที่แยกจากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศญี่ปุ่นและไทยมีความสามารถในการสร้าง NAG-ST (Ogawa *et al.*, 1990; Bagchi *et al.*, 1993) ส่วน El Tor-like hemolysin เป็นสารพิษที่มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง และทำลายเซลล์ต่าง ๆ โดยการทำให้ยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* ขาดหายไปจะทำให้เชื้อขาดความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงและทำลายเซลล์ จึงถือได้ว่ายีน *hlyA* เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Coelho *et al.*, 2000; Cinar *et al.*, 2010) นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคดีงที่กล่าวมา ระบบการขนส่งโปรตีนของเชื้อ ได้แก่ type III secretion system (T3SS) และ type VI secretion system (T6SS) ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยในการก่อโรค โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตีนของแบคทีเรียไปสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Chatterjee *et al.*, 2009; Ma

et al., 2009) โดยยีน *vcsV2* เป็นยีนหนึ่งใน T3SS ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *vcrD2* ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดอุจจาระร่วงในโมเดลกระต่าย (Dziejman *et al.*, 2005) และพบว่า *V. cholerae* non-O1 ส่วนใหญ่ที่แยกจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงในประเทศจีน, ไนจีเรีย, เยอรมนี และ ออสเตรเลีย มียีนดังกล่าว (Schirmeister *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2013; Marin *et al.*, 2013) ส่วนยีน *vasH* ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ T6SS (Kitaoka *et al.*, 2011) โดยสรุป *V. cholerae* ในสิ่งแวดล้อมเป็นแหล่งของยีนก่อโรคต่าง ๆ (Rivera *et al.*, 2001) ซึ่งเกิดจากการถ่ายทอดยีนจาก *V. cholerae* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษที่ทำให้เกิดอหิวาตกโรคไปสู่ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ในสิ่งแวดล้อม (Faruque *et al.*, 1998) ดังนั้นการแยกและการตรวจหาลักษณะของ *V. cholerae* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม เช่น อาหารทะเล จึงมีความสำคัญในการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคอุจจาระร่วงจากการรับประทานอาหาร

ทฤษฎีและหลักการ

1. ลักษณะทั่วไป (General Characteristics)

Vibrio cholerae จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae แบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคได้บ่อยและมีความสำคัญทางการแพทย์ คือ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Tarr *et al.*, 2007) โดย *V. cholerae* เป็นสาเหตุของโรคอหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง (Siddiqui *et al.*, 2006) *V. cholerae* เป็นแบคทีเรียที่เรียกรวมรูปร่างแท่งโค้ง (curved rod, comma-shaped rods) มีขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลัมเส้นเดี่ยวที่ขั้ว (single polar flagellum), เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes), ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase), หมักน้ำตาลได้หลายชนิด, เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 0-8%, เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส และมี mol% G+C ของ DNA เท่ากับ 38-51% (Farmer and Janda, 1984)

2. ลักษณะของแอนติเจนและการจำแนกเชื้อทางชีวภาพ (Antigenic Structure and Biological Classification)

แอนติเจนบริเวณแฟลกเจลลา (H-antigen) ของ *V. cholerae* ทุกสายพันธุ์เป็นชนิดเดียวกันและเป็นสารโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน โดยพบว่า แอนติบอดีต่อ H-antigen ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ การจำแนก *V. cholerae* อาศัยแอนติเจนบริเวณลิโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) (O-antigen) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อน *V. cholerae* สามารถแบ่งตาม O-antigen ได้หลากหลายถึง 200 ซีโรกรุป (serogroups) โดยซีโรกรุปที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง หรือ อหิวาตกโรค (cholera) ได้แก่ O1 และ O139 ซึ่งสามารถสร้างสารพิษ cholera toxin ได้ โดย *V. cholerae* non-O1/non-O139 หรือ non-cholera vibrios (NCV) หรือ non-agglutination vibrios (NAG) ส่วนใหญ่ไม่สร้าง cholera toxin แต่สามารถก่อโรคอุจจาระร่วงที่มีความรุนแรงน้อยกว่าอหิวาตกโรคได้ (Van Dellen and Watnick, 2006; Mueller *et al.*, 2007;

Faruque and Mekalanos, 2008) ส่วนการสร้างสารพอลิแซคคาไรด์คล้ายแคปซูล (capsule) พบเฉพาะใน *V. cholerae* O139 และ *V. cholerae* non-O1 เท่านั้น

O-antigen ที่สำคัญของ *V. cholerae* O1 มี 3 ชนิด คือ A, B และ C โดย A เป็น group-specific antigen ที่มีใน *V. cholerae* ทุกชนิด ส่วน B และ C เป็น type-specific antigen จึงแบ่ง *V. cholerae* O1 ออกเป็น 3 ซีโรไทป์ (serotypes) ได้แก่ Ogawa (A, B), Inaba (A, C) และ Hikojima (A, B, C) *V. cholerae* O1 ยังแบ่งตามคุณสมบัติทางชีวภาพได้เป็น 2 ไบโอไทป์ (biotypes) คือ Classical และ El Tor ซึ่งทั้ง 2 ไบโอไทป์นี้มีลักษณะแตกต่างกัน และมักใช้คุณสมบัติดังกล่าวมาจำแนกเชื้อทางระบาดวิทยา (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบเพื่อจำแนกไบโอไทป์ของ *V. cholerae* O1 (Kaper *et al.*, 1995)

การทดสอบ	Classical biotype	El Tor biotype
1. การทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	-	+
2. การสลายเม็ดเลือดแดงเกาะ	-	+
3. ผลการทดสอบ Voges Proskauer	-	+
4. ความไวต่อ Polymyxin B (50 Unit)	ไว	ดื้อ
5. ความไวต่อ phage IV	ไว	ดื้อ

3. แหล่งที่อยู่ (Natural Habitats)

V. cholerae เป็นแบคทีเรียอิสระอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำที่มีโซเดียมไอออน จึงพบเชื้อตามเขตน้กร่อย บริเวณปากแม่น้ำ, สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น ผีวไรน้ำ, ลำไส้ของแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์, สาหร่าย และสัตว์ทะเล จำพวก กุ้ง หอย ปู เป็นต้น (Van Dellen and Watnick, 2006; Mueller *et al.*, 2007) *V. cholerae* สามารถสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะบริเวณพื้นผิวและอยู่รวมกันภายในไบโอฟิล์มนั้น เช่น การเกาะติดของเชื้อบริเวณไข่ และบริเวณปากของแพลงก์ตอนสัตว์ (copepod) หรือ บริเวณผิวหนังของสัตว์ทะเล ทำให้เกิดการถ่ายทอดไปสู่สัตว์ทะเลอื่น ๆ ได้ง่ายผ่านห่วงโซ่อาหาร (Liston, 1957; Aiso *et al.*, 1968; Simidu *et al.*, 1971; Kaneko and Colwell, 1975; Gomez-Gil *et al.*, 1998; Oxley *et al.*, 2002) *V. cholerae* อาศัยสัตว์ทะเลเป็นแหล่งกำบังจากการถูกจับกินด้วยโปรโตซัว (Sherr and Sherr, 1984; Nishiguchi and Nair, 2003) โดยสามารถจับกับไคตินของเปลือกสัตว์น้ำทำให้มีโอกาสที่เชื้อจะปนเปื้อนมาสู่คนและก่อโรคได้ (Doyle and Beuchat, 2007) ปกติจะพบ *V. cholerae* non-O1/non-O139 จากสิ่งแวดล้อมมากกว่า *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 แต่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค อหิวาตกโรคอาจตรวจพบ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 ได้ เพราะอุจจาระของผู้ป่วยอาจมีการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

4. ระบาดวิทยา (Epidemiology)

V. cholerae มีการระบาดใหญ่ทั้งหมด 7 ครั้ง โดยการระบาด 6 ครั้งแรก เกิดในปี พ.ศ. 2414 - พ.ศ. 2466 และมีการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) ส่วนใหญ่เกิดจาก *V. cholerae* O1, ไบโอดีทป์ classical และมักมีจุดเริ่มต้นที่ประเทศอินเดียบริเวณปากแม่น้ำคงคา ส่วนการระบาดครั้งที่ 7 เกิดในปี พ.ศ. 2504 จาก *V. cholerae* O1, ไบโอดีทป์ El Tor มีจุดเริ่มต้นที่เกาะซูลาเวซี (Sulawesi Islands) ประเทศอินโดนีเซีย และระบาดไปสู่ประเทศอื่น ๆ ในทวีปเอเชีย, ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกา ส่วนการระบาดครั้งล่าสุดในปี พ.ศ. 2535 - พ.ศ. 2536 เกิดจาก *V. cholerae* O139 มีจุดเริ่มต้นที่ประเทศอินเดียและบังคลาเทศ และต่อมาปี พ.ศ. 2537 ได้ระบาดไปสู่ประเทศอื่น ๆ ในทวีปเอเชีย (Faruque *et al.*, 1998)

จากรายงานของสำนักงานระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ประเทศไทย พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *V. cholerae* ได้ตลอดทั้งปี โดยพบสูงสุดในช่วงฤดูฝน เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เอื้อและทำให้ยากต่อการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหาร จากผลการสอบสวนการระบาดของอหิวาตกโรคในปี พ.ศ. 2550 ของสำนักงานระบาดวิทยา ได้มีการจัดกลุ่มจังหวัดที่เป็นพื้นที่การระบาด 3 กลุ่มตามปัจจัยเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของเชื้อ ได้แก่

1. จังหวัดที่ติดชายแดนสหภาพพม่าที่ไม่ติดทะเล และไม่มีแหล่งน้ำกร่อยซึ่งเป็นแหล่งโรคในธรรมชาติ เช่น จังหวัดตาก พบว่าปัจจัยเสี่ยงหลักมาจากกลุ่มชาวพม่าซึ่งส่วนหนึ่งอาศัยอยู่ในค่ายอพยพ อีกส่วนหนึ่งเป็นแรงงานรับจ้างในไร่และในชุมชน ซึ่งมีสุขอนามัยส่วนบุคคล และสิ่งแวดล้อม ไม่ดี ไม่มีส้วมที่ได้มาตรฐาน มีการเคลื่อนย้ายของแรงงานตลอดเวลาและควบคุมได้ยาก

2. จังหวัดชายทะเลทางภาคใต้และภาคกลางตอนล่าง เช่น ระนอง นครศรีธรรมราช สมุทรสาคร มีน้ำทะเล และมีแหล่งน้ำกร่อยซึ่งเป็นแหล่งโรคในธรรมชาติ รวมถึงปัญหาเรื่องสุขาภิบาลและสุขอนามัยในกลุ่มแรงงานพม่า และกลุ่มชาวประมง

3. จังหวัดที่ไม่มีพื้นที่ติดต่อทะเล และไม่มีแรงงานต่างชาติ พบว่ามีความสัมพันธ์กับอาหารทะเลที่ส่งมาจากนอกพื้นที่ โดยเฉพาะหอยแครง ซึ่งมีผลการศึกษาระบาดวิทยาเชิงวิเคราะห์ ปัจจัยเสี่ยงร่วมของการระบาดในพื้นที่หลายจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และบางจังหวัดของภาคกลางยืนยันความสัมพันธ์ดังกล่าว

จังหวัดสงขลาเป็นจังหวัดที่มีทั้งพื้นที่ที่มีน้ำทะเลและน้ำกร่อยซึ่งเป็นแหล่งโรคในธรรมชาติ นอกจากนี้จังหวัดสงขลายังเป็นหนึ่งในเมืองเศรษฐกิจของภาคใต้ ดังนั้นจึงมีแรงงานจากประเทศเพื่อนบ้านมาทำงานในจังหวัดมาก โดยแรงงานจะเข้ามารับจ้างในชุมชน ซึ่งกลุ่มแรงงานจะอาศัยอยู่กันเป็นกลุ่ม มีสุขอนามัยส่วนบุคคล และสิ่งแวดล้อมไม่ดี จากรายงานการเฝ้าระวังโรคของสำนักงานระบาดวิทยาพบว่าในปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2552 จังหวัดสงขลาเป็นผู้ติดเชื้อ *V. cholerae* ติดอันดับหนึ่งในสิบของประเทศ

5. การติดต่อ (Routes of Transmission)

การติดเชื้อ *V. cholerae* พบมากในพื้นที่ที่มีประชากรอาศัยอยู่หนาแน่นและสุขาภิบาลไม่ดี โดยเชื้อจะปนเปื้อนในน้ำดื่มและอาหารที่มีการปรุงไม่ถูกสุขลักษณะ *V. cholerae* สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ ความชื้นสูง การปรุงอาหารให้สุกจะช่วยทำลายเชื้อได้ (Doyle and Beuchat, 2007) การปนเปื้อนของอุจจาระที่มี *V. cholerae* ลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติทำให้เกิดการปนเปื้อนในสัตว์น้ำ เมื่อรับประทานอาหารที่ปรุงจากสัตว์น้ำดังกล่าว จึงทำให้เกิดการระบาดของเชื้อในเวลาต่อมา ดังเช่นการระบาดของ *V. cholerae* O1, ไบโอบี EI Tor ในแถบอเมริกาใต้ ที่มีผู้ป่วยจำนวน 70,000 ราย และมีผู้เสียชีวิต 65,000 ราย (Reidl and Klose, 2002) ในประเทศไทยพบว่าการติดเชื้อ *V. cholerae* ส่วนใหญ่มาจากการรับประทานอาหารดิบๆ สุกๆ โดยเฉพาะอาหารทะเล, อาหารประเภทยา ลาบ ก้อย หรือส้มตำ ซึ่งจะมีการปนเปื้อนของเชื้อจากวัตถุดิบที่ซื้อในตลาดซึ่งน้ำที่ใช้อาจไม่ได้เติมคลอรีน หรือ มีการรั่วของท่อน้ำทิ้งจากห้องสุขาในตลาด

6. พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ (Pathogenesis and Pathology)

V. cholerae ติดต่อผ่านทางรับประทานอาหารและน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อ เนื่องจากเชื้อไวต่อการถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร ดังนั้นปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้จะสูงถึง 10^{10} เซลล์ แต่หากติดต่อผ่านทางอาหารจะอาศัยปริมาณเชื้อเพียง $10^2 - 10^4$ เซลล์ พบว่าผู้ที่ได้รับยาหรือในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดต่ำจะไวต่อการติดเชื้อ *V. cholerae* ไม่พบว่าเชื้อแพร่กระจายเข้ากระแสเลือดหรือบุกรุกเซลล์ (non-invasive) เชื้อที่รอดจากการถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร จะผ่านไปยังลำไส้เล็กซึ่งมีสภาพเป็นด่าง เชื้อสายพันธุ์ก่อโรคจะสามารถเกาะติดกับไมโครวิลไล (microvilli) ของเซลล์บุผิวภายในลำไส้เล็ก (intestinal epithelial cells) จากนั้นจะเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษ cholera toxin ออกมา cholera toxin มี 2 หน่วยย่อย (subunit) คือ A และ B โดยหน่วยย่อย B ทำหน้าที่จับกับ GM1 ganglioside ซึ่งเป็นหน่วยรับจำเพาะ (receptor) บนเซลล์บุผิวภายในลำไส้เล็ก จากนั้นหน่วยย่อย A จะถูกนำเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์และออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ adenylyl cyclase (หรือ adenylate cyclase) ส่งผลให้ระดับ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น จึงเกิดการหลั่งน้ำและแร่ธาตุออกจากเซลล์เข้าสู่ทางเดินอาหารปริมาณมาก (Faruque and Mekalanos, 2008)

ระยะฟักตัวของเชื้อ (incubation period) ประมาณ 1-4 วัน ขึ้นกับปริมาณเชื้อที่ได้รับ เริ่มแรกผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ (nausea), อาเจียน (vomiting), ปวดเกร็งช่องท้อง (abdominal cramps) และอุจจาระร่วง (diarrhea) โดยไม่มีมูกและเลือดปนแต่มีลักษณะเหลวคล้ายน้ำซาวข้าว (rice water stool) เนื่องจากประกอบด้วยเยื่อเมือก, เซลล์เยื่อบุผิว และเชื้อจำนวนมาก ผู้ป่วยจะสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็ว (มากกว่า 1 ลิตรต่อชั่วโมง หรือ 20-30 ลิตรต่อวัน) ทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย (lethargy), ตาโหล (sunken eyes), ไม่ถ่ายปัสสาวะ (anuria), เลือดเป็นกรด (acidosis), การไหลเวียนโลหิตล้มเหลว (circulatory collapse), ช็อคจากปริมาตรของเลือดลดลง (hypovolemic shock) และเสียชีวิตในเวลาต่อมา (Reidl and Klose, 2002)

7. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Virulence factors)

7.1 การสร้างสารพิษ (Toxin)

7.1.1 Cholera toxin (Ct)

Ct เป็นสารพิษที่ไม่ทนความร้อน (heat-labile enterotoxin) สร้างโดยยีน *ctx* ขนาด 7.0 กิโลเบส ซึ่งถ่ายทอดมาจาก lysogenic filamentous phage (CTX ϕ) เฉพาะ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่มียีน *ctx* เท่านั้น (toxigenic *V. cholerae*) ที่สามารถทำให้เกิดอหิวาตกโรคได้ Ct มีโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับ heat-labile enterotoxin ที่สร้างโดย enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) แต่อาการที่เกิดจาก *V. cholerae* รุนแรงกว่ามาก การเกาะติดของ CTX ϕ เพื่อถ่ายทอดยีน *ctx* อาศัยกลุ่มของยีนที่ควบคุมการสร้าง toxin coregulated pili (Tcp) ซึ่งพบอยู่บน pathogenicity island (PAI) และกลุ่มยีนดังกล่าวยังมีส่วนช่วยการเกาะติดกับเยื่อผิวลำไส้ด้วย (Waldor and Mekalanos, 1996; Davis and Waldor, 2003)

7.1.2 Zonula occludens toxin (Zot)

Zot เป็นสารพิษที่ไม่ทนความร้อน สร้างโดยยีน *zot* ขนาด 1.3 กิโลเบส ยีน *zot* พบได้ทั้ง *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* non-O1 โดย *V. cholerae* ที่มียีน *ctx* มักจะพบยีน *zot* ด้วยเสมอ การสร้าง Zot ใน *V. cholerae* จะมีผลต่อโครงสร้างของ intercellular tight junction หรือ zonula occludens ทำให้การรั่วไหลของน้ำและแร่ธาตุในลำไส้เล็กเพิ่มขึ้น (Kaper *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998)

7.1.3 Accessory cholera enterotoxin (Ace)

Ace สร้างโดยยีน *ace* ซึ่งอยู่บริเวณ upstream ของยีน *zot* โดยส่วนปลาย 5' มีลำดับเบสที่ทับซ้อนกัน จากการศึกษาในกระต่ายพบว่า Ace มีบทบาทในการเพิ่มการสะสมของเหลวในลำไส้ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Ace ใน *V. cholerae* ยังมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน SpvB ใน *Salmonella dublin* ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคในหนู (Kaper *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998)

7.1.4 El Tor Hemolysin (HlyA)

HlyA สร้างโดยยีน *hlyA* พบใน *V. cholerae* O1, ไบโอะไทป์ El Tor และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 บางสายพันธุ์ โดยมีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง และทำลายเซลล์ต่าง ๆ มีการทดลองฉีด hemolysin ให้หนูพบว่าสามารถทำให้หนูตายได้ จึงถือว่า hemolysin เป็นปัจจัยหนึ่งในการก่อโรคของ *V. cholerae* (Menzl *et al.*, 1996; Saka *et al.*, 2008)

7.1.5 Heat-stable enterotoxin

Heat-stable enterotoxin เป็นสารพิษที่ทนความร้อน มีความคล้ายคลึงกับสารพิษที่สร้างโดย *E. coli* และแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารอื่น ๆ การสร้าง heat-stable enterotoxin ถูกควบคุมโดยยีน *stn/sto* พบได้ทั้ง *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* non-O1 มีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของน้ำ และโซเดียมออกจากลำไส้ (Bagchi *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 2001)

7.1.6 Toxin-conregulated pili (Tcp)

Tcp สร้างโดยยีน *tcp* การแสดงออกของยีนนี้ถูกควบคุมโดยโปรตีน ToxR, ToxT และการกระตุ้นของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น pH และอุณหภูมิ Tcp มีบทบาทในการเกาะติดของ bacteriophage (CTX Φ), การเกาะติดกับเยื่อบุลำไส้ และการสร้างไบโอฟิล์มของ *V. cholerae* (Manning, 1997; Jang *et al.*, 2011)

7.2 การสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm)

ไบโอฟิล์ม คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่รวมกันในเมทริกซ์ที่สร้างขึ้นและมีการเกาะติดกับพื้นผิว การสร้างไบโอฟิล์มเป็นลักษณะการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในสิ่งแวดล้อม (Van Houdt *et al.*, 2004) การสร้างไบโอฟิล์มของ *V. cholerae* ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมหลายประการ เช่น อุณหภูมิ, pH, ความเค็ม และสารอาหาร โดยสารอาหารมีส่วนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการผลิต *Vibrio polysaccharide* (VPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของไบโอฟิล์ม โดยสามารถสังเกตได้จากลักษณะโคโลนี ในสภาวะที่มีสารอาหารน้อยเชื่อจะมีการเปลี่ยนแปลงโคโลนีแบบเรียบ (smooth colony) ไปเป็นโคโลนีแบบขรุขระ (rugose colony) และหากมีสารอาหารอุดมสมบูรณ์เชื่ออาจสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นโคโลนีแบบเรียบได้ (Ali *et al.*, 2002) ไบโอฟิล์มช่วยให้เชื่อสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมในสิ่งแวดล้อม, ทนกรดในกระเพาะอาหาร และช่วยป้องกันเชื่อจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่กินจุลินทรีย์เป็นอาหาร เช่น โปรโตซัว เป็นต้น อีกทั้งยังทำให้เชื่อติดต่อสารต้านจุลินทรีย์มากกว่าเซลล์ที่อยู่อย่างอิสระ (Yildiz and Schoolnik, 1999; Watnick and Kolter, 2002; Zhu and Mekalanos, 2003; Matz *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2007; Annous *et al.*, 2009) *V. cholerae* เป็นเชื่อประจำถิ่นในแหล่งน้ำ และสามารถแยกได้จากผิวของสิ่งมีชีวิตในน้ำ การสร้างไบโอฟิล์มในสัตว์น้ำจึงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนในสิ่งแวดล้อมและการระบาดของโรคในคน (Van Dellen and Watnick, 2006)

7.3 ระบบการขนส่งโปรตีน (Secretion Systems)

7.3.1 Type III secretion system (T3SS)

T3SS เป็นระบบที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค ได้แก่ *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ *Vibrio* spp. เป็นต้น T3SS มีหน้าที่ในการส่งผ่านโปรตีนจากแบคทีเรียไปสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้านโดยอาศัยโครงสร้างที่เรียกว่า needle complex ของแบคทีเรีย การสร้างโครงสร้างของ T3SS ของ *V. cholerae* ควบคุมโดยยีน *vcsV2* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *vcrD2* ใน *V. parahaemolyticus* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารเมื่อทดสอบกับกระต่าย (Dziejman *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2011)

7.3.2 Type VI secretion system (T6SS)

T6SS เป็นระบบที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค ได้แก่ *V. cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Y. pestis*, *E. coli*, *S. enterica*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Francisella tularensis* และ *Burkholderia mallei* (Pukatzki *et al.*, 2007) T6SS ทำหน้าที่ในการส่งผ่านโปรตีนจากแบคทีเรียไปสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยอาศัยโครงสร้าง phage-tail-spike-like injectisome ซึ่ง T6SS มีการทำงานที่เหมือนกับ

T3SS โดยยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของ T6SS คือยีน *vasH* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *rtcR* ของ *E. coli* (Pukatzki *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2009; Miyata *et al.*, 2011)

8. การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* (DNA fingerprinting analysis)

การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* เป็นการแสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยา ปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีที่อาศัยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ทำให้ทราบความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่ถูกตัด เช่น วิธี Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) และวิธี Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) ซึ่งวิธี PFGE มีความไวสูงและมีประสิทธิภาพในการศึกษาดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกันได้ดี แต่วิธีทั้งสองนี้เป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอน จึงมีการพัฒนาวิธีที่อาศัยหลักการของ Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้แก่ วิธี Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) หรือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งอาศัยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์สายสั้น ๆ เพียงเส้นเดียว ทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการนำมาศึกษา แต่ข้อเสียคือมีความไวต่ำ วิธีที่ใช้แยกความแตกต่างของ *V. cholerae* สายพันธุ์ก่อโรคและไม่ก่อโรค อาจใช้วิธี Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันบนโครโมโซมของแบคทีเรียบริเวณที่เรียกว่า ERIC sequences ซึ่งพบเฉพาะใน enteric bacteria และ vibrios ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีความผันแปรไปในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ วิธี ERIC-PCR เป็นวิธีที่ง่ายและมีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้เพื่อติดตามวิวัฒนาการของเชื้อและเฝ้าระวังการระบาดของโรคที่เกิดจาก *V. cholerae* (Rivera *et al.*, 1995)

9. การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory diagnosis)

สิ่งส่งตรวจที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุจจาระ (stools) ควรเก็บตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโดยวิธี rectal swab ก่อนทำการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะและส่งไปยังห้องปฏิบัติการ โดยเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment) ในอาหาร APW (pH 8.4-9.2) เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS) agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โคลินีของเชื้อจะมีลักษณะกลม สีเหลือง ค่อนข้างแบน ขอบเรียบ และนำไปทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบมาตรฐานของเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae และเพิ่มชุดทดสอบการทนเกลือ การทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยทดสอบการเกาะกลุ่มของเชื้อกับแอนติซีรัมจำเพาะบนแผ่นสไลด์ (slide agglutination) เพื่อแยกว่าเป็น *V. cholerae* O1, O139 หรือ non-O1/non-O139 ถ้าเป็น *V. cholerae* O1 จะต้องแยกซีโรไทป์โดยใช้แอนติซีรัมจำเพาะด้วยว่าเป็น Ogawa, Inaba หรือ Hikojima และแยกไปโอไทป์ว่าเป็น Classical หรือ El Tor

10. การรักษา (Treatment)

การรักษาอันดับแรกคือการให้สารน้ำและแร่ธาตุเข้าไปบรรเทาอาการเพื่อแก้ไขภาวะเลือดเป็นกรด ผ่านทางน้ำเกลือหรือสารละลายน้ำตาลเกลือแร่ (oral rehydration salts; ORS) ส่วนการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดอาการของโรค และลดการแพร่เชื้อ ควรพิจารณาจากข้อมูลเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อประกอบการพิจารณา กลุ่มยาหลักที่เลือกใช้ ได้แก่ นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) และเตตราไซคลิน (tetracycline) แต่จากรายงานปี พ.ศ. 2556 ของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย พบ *V. cholerae* nonO1/nonO139 ที่ดื้อต่อยานอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) และ ยาแอมพิซิลลิน (ampicilin) ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง และ บางพื้นที่ที่มี *V. cholerae* ที่มีเชื้อระบาดประจำถิ่น (endemic areas) พบว่าเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน เนื่องจากมีการถ่ายทอดยีนดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิด (plasmid)

11. การป้องกันและควบคุม (Prevention and Control)

เนื่องจาก *V. cholerae* พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำ การป้องกันและควบคุมที่ได้ผลคือการให้ความรู้กับประชาชน และควบคุมเรื่องสุขลักษณะที่ดีของอาหารและน้ำดื่ม สำหรับผู้ติดเชื้อควรแยกออกจากคนปกติ และมีมาตรการทำลายเชื้อในอุจจาระและอาเจียนของผู้ป่วยด้วย สำหรับวัคซีนป้องกันการติดเชื่อนั้นนิยมให้เฉพาะกลุ่มนักท่องเที่ยวหรือเด็กเล็กที่มีการเดินทางไปยังพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเท่านั้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยก *V. cholerae* จากอาหารทะเล ที่วางจำหน่ายในเขต อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
2. เพื่อตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (*ctxA*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *stn/sto*, *hlyA*, *vcsV2* และ *vasH*) ใน *V. cholerae* ที่แยกได้
3. เพื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *V. cholerae* ที่แยกได้
4. เพื่อทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงและการสร้างไบโอฟิล์มของ *V. cholerae* ที่แยกได้
5. เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* ที่แยกได้

ผลการทดลอง

1. การแยกและจำแนก *V. cholerae* จากอาหารทะเล

การแยก *V. cholerae* จากอาหารทะเลที่วางจำหน่ายในตลาดสดเขต อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ได้แก่ ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่, ตลาดคลองเรียน, ตลาดเกษตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ตลาดหาดใหญ่ใน และตลาดเกาะหมี่ จำนวน 125 ตัวอย่าง ประกอบด้วย กุ้ง 94 ตัวอย่าง, หมึก 19 ตัวอย่าง, หอย 8 ตัวอย่าง, ปลา 2 ตัวอย่าง และปู 2 ตัวอย่าง เบื้องต้นได้แยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็ *V. cholerae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ได้จำนวน 254 ไอโซเลท เมื่อยืนยันโดยวิธี PCR ซึ่งใช้ยีน *ompW* เป็นยีนเป้าหมายพบว่าเป็น *V. cholerae* จำนวน 100 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) ซึ่งมาจากอาหารทะเล 55 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 จำนวน *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ

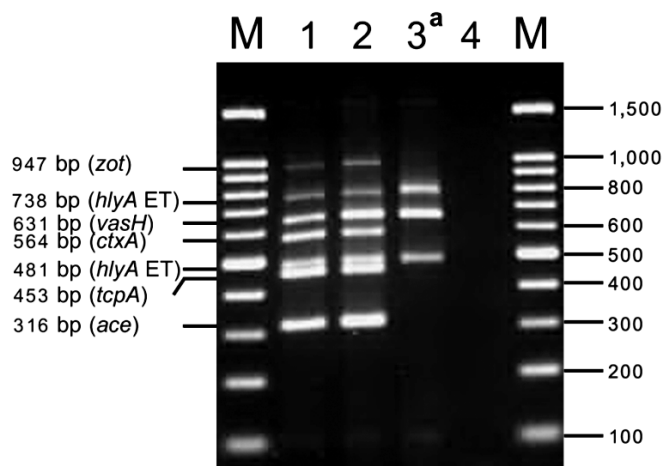
ชนิดอาหารทะเล และแหล่งที่มา	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท ที่คาดว่าจะเป็ <i>V. cholerae</i> (TCBS)	<i>V. cholerae</i> (<i>ompW</i>)
1. กุ้ง (n=94)			
-ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่	26	57	30
-ตลาดคลองเรียน	35	78	49
-ตลาดหาดใหญ่ใน	7	11	1
-ตลาดเกาะหมี่	24	42	16
-ตลาดเกษตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ	2	6	0
2. หมึก (n=19)			
-ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่	6	8	1
-ตลาดคลองเรียน	5	9	0
-ตลาดหาดใหญ่ใน	2	4	0
-ตลาดเกาะหมี่	4	7	1
-ตลาดเกษตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ	2	2	0
3. หอย (n=8)			
-ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่	5	11	0
-ตลาดหาดใหญ่ใน	1	4	0
-ตลาดเกาะหมี่	2	4	0
4. ปลา (n=2)			
-ตลาดเกาะหมี่	2	7	0
5. ปู (n=2)			
-ตลาดเกาะหมี่	2	4	2
รวม	125	254	100

เมื่อจำแนกซีโรกรูปร่างของ *V. cholerae* ที่แยกได้โดยวิธี agglutination พบว่า เป็น *V. cholerae* non-O1/non-O139 จำนวน 94 ไอโซเลท และเป็น *V. cholerae* O1 จำนวน 1 ไอโซเลท นอกจากนี้มี *V. cholerae* จำนวน 5 ไอโซเลทที่ไม่สามารถจำแนกซีโรกรูปร่างได้ด้วยวิธี agglutination เนื่องจากมีลักษณะโคโลนีแบบขรุขระจึงจำเป็นต้องจำแนกซีโรกรูปร่างของเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rfb* ซึ่งพบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทเป็น *V. cholerae* non-O1/non-O139

2. การตรวจหาลักษณะของ *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

2.1 การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (*ctxA*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *stn/sto*, *hlyA*, *vcsV2* และ *vasH*)

จากการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *ctxA*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *stn/sto*, *hlyA*, *vcsV2* และ *vasH* ใน *V. cholerae* ทั้ง 100 ไอโซเลท ด้วยวิธี PCR พบว่า เชื้อที่แยกได้ทุกไอโซเลทไม่มียีน *ctxA*, *tcpA*, *zot* และ *ace* แต่มียีน *stn/sto*, *hlyA* El Tor (ET), *vcsV2* และ *vasH* จำนวนร้อยละ 20, 94, 6 และ 96 ตามลำดับ โดยในการทดลองใช้ *V. cholerae* สายพันธุ์มาตรฐานที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นเชื้อควบคุม ได้แก่ *V. cholerae* O1 และ O139 ซึ่งมียีน *ctxA*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *hlyA* El Tor (ET) และ *vasH* ส่วน *V. cholerae* non-O1/non-O139 มีเฉพาะยีน *hlyA* ET, *vcsV2* และ *vasH* (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การปรากฏของยีนก่อโรคใน *Vibrio cholerae* สายพันธุ์มาตรฐานที่แยกได้จากผู้ป่วย

Lane M: 100 bp DNA Ladder (GeneDireX, Taiwan)

Lane 1: *V. cholerae* O1, El Tor สายพันธุ์ DMST16261

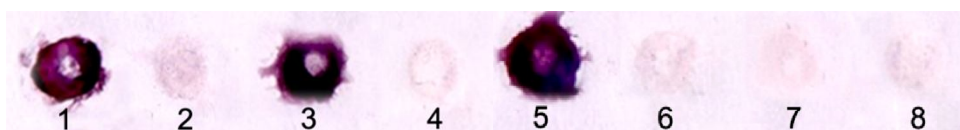
Lane 2: *V. cholerae* O139 สายพันธุ์ DMST9701

Lane 3: *V. cholerae* non-O1/non-O139 สายพันธุ์ DMST2873

Lane 4: reagent control

^a PCR product ที่ได้จากยีน *hlyA* ET (738 bp) และ *vcsV2* (742 bp) เมื่อนำมา run พร้อมกันทำให้แยกไม่ชัดเจน

เนื่องจากมีเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทหมายเลข 7, 8, 30, 33, 34, และ 35 ที่ให้ผลลบกับการตรวจหายีน *hlyA* ET โดยวิธี PCR ดังนั้นจึงทำการยืนยันโดยวิธี colony hybridization เนื่องจากการทดลองถัดไปต้องมีการทดสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ ซึ่งยีน *hlyA* ET มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง และเมื่อนำ *V. cholerae* ทั้ง 6 ไอโซเลทมาตรวจหายีน *hlyA* ET อีกครั้งโดยวิธี colony hybridization พบว่ามี 2 ไอโซเลท (ไอโซเลทหมายเลข 7 และ 30) ให้ผลบวก (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลการทำ colony hybridization ของ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเล เมื่อใช้ยีน *hlyA* El Tor เป็นตัวตรวจจับ (*hlyA* ET probe)

- 1: *V. cholerae* O1, El Tor DMST16261 (*hlyA* ET⁺); positive control
- 2: *V. parahaemolyticus* PSU3881 (*hlyA*⁻); negative control
- 3: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 7
- 4: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 8
- 5: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 30
- 6: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 33
- 7: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 34
- 8: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 35

จากผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่าง ๆ ข้างต้น สามารถจัดกลุ่ม *V. cholerae* ที่แยกได้ตามรูปแบบของการมียีนก่อโรคได้ 8 กลุ่ม (A ถึง H) โดยเชื้อส่วนใหญ่ (72%) จัดอยู่ในกลุ่ม F ซึ่งเป็นเชื้อที่มียีน *hlyA* ET และ *vasH* และมีเพียง 2 ไอโซเลท ที่ไม่มียีนก่อโรคทุกชนิดที่ตรวจสอบ (ตารางที่ 3) ผู้วิจัยได้สุ่มเลือกเชื้อตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลทจากแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 4) เพื่อทำการทดลองถัดไป

2.2 การทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงและการสร้างเอนไซม์เลซิติเนส (lacithinase)

การตรวจหาความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงใน *V. cholerae* ตัวแทนที่สุ่มมาจากแต่ละกลุ่มจำนวน 35 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทที่มียีน *hlyA* ทั้งจากการตรวจหาโดยวิธี PCR และจากการตรวจหาโดยวิธี colony hybridization (ไอโซเลทหมายเลข 7 และ 30) (รูปที่ 2) มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ส่วนเชื้อที่ผ่านการยืนยันโดยวิธี colony hybridization แล้วว่าไม่มียีน *hlyA* จำนวน 4 ไอโซเลท (ไอโซเลทหมายเลข 8, 33, 34, และ 35) (รูปที่ 2) มี 1 ไอโซเลทที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ (ไอโซเลทหมายเลข 33) (ตารางที่ 4)

เนื่องจากมีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท (ไอโซเลทหมายเลข 33) ไม่มียีน *hlyA* แต่มีความสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้จึงทำการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ที่อาจจะมีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง เช่น เอนไซม์เลซิติเนส แต่จากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์เลซิติเนสของเชื้อ *V. cholerae* ไอโซเลทที่ไม่มียีน *hlyA* ทั้งไอโซเลทที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ (ไอโซเลทหมายเลข 33) และไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ (ไอโซเลทหมายเลข 8, 34, และ 35) พบว่า เชื้อทุกไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เลซิติเนสได้เหมือนกัน ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงไม่ใช่ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เชื้อไอโซเลทที่ไม่มียีน *hlyA* มีความสามารถสลายเม็ดเลือดแดง

ตารางที่ 3 กลุ่มของ *V. cholerae* ตามรูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

<i>V. cholerae</i> (ไอโซเลท)	ผลการตรวจหายีน ^a				กลุ่ม
	<i>stn/sto</i>	<i>hlyA</i> ET ^b	<i>vcsV2</i>	<i>vasH</i>	
1	+	+	+	+	A
17	+	+	-	+	B
1	+	+	-	-	C
1	+	-	-	-	D
5	-	+	+	+	E
72	-	+	-	+	F
1	-	-	-	+	G
2	-	-	-	-	H

^a *V. cholerae* ทุกไอโซเลทตรวจไม่พบยีน *ctxA*, *tcpA*, *zot* และ *ace*

^b ET, El Tor

+: ตรวจพบ; -: ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 4 ลักษณะของ *V. cholerae* ตัวแทนที่สุ่มมาจากแต่ละกลุ่ม (A-H) จำนวน 35 ไอโซเลท

กลุ่ม (จำนวน)	ยีนก่อโรคที่ตรวจพบ	หมายเลข ไอโซเลท	ซีโรกรุป	Hemolytic activity
A (1)	<i>stn/sto</i> , <i>hlyA</i> ET ^a , <i>vcsV2</i> ,	1	non-O1/non-O139	+
B (5)	<i>stn/sto</i> , <i>hlyA</i> ET, <i>vasH</i>	2, 3, 4, 5 6	non-O1/non-O139 non-O1/non-O139 ^d	+
C (1)	<i>stn/sto</i> , <i>hlyA</i> ET	7 ^c	non-O1/non-O139	+
D (1)	<i>stn/sto</i>	8	non-O1/non-O139	-
E (5)	<i>hlyA</i> ET, <i>vcsV2</i> , <i>vasH</i>	9, 10, 11, 12, 13	non-O1/non-O139	+
F (19)	<i>hlyA</i> ET, <i>vasH</i>	14, 15, 16, 17 18 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ^c , 31, 32	non-O1/non-O139 ^d O1 non-O1/non-O139	+
G (1)	<i>vasH</i>	33 ^c	non-O1/non-O139	+
H (2)	- ^b	34, 35	non-O1/non-O139	-

^a ET, El Tor

^b ไม่พบยีนก่อโรคทุกชนิดที่ตรวจสอบ

^c เชื้อที่ผ่านการตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธี colony hybridization และให้ผล hemolytic activity เป็นบวก

^d มีลักษณะโคโลนีแบบขรุขระ

2.3 ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะใน *V. cholerae* ตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลท พบว่า เชื้อทุกไอโซเลทไวต่อยาคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol), ไซโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin), โคไตรม็อกซาโซล (cotrimoxazole), นอร์ฟล๊อกซาซิน (norfloxacin) และ เตตราไซคลิน (tetracycline) อย่างไรก็ตามพบว่า มีเชื้อ 5 ไอโซเลท (ร้อยละ14.3) ตื้อต่อยาแอมพิซิลิน (ampicilin) และ 8 ไอโซเลท (ร้อยละ22.9) ไวปานกลางต่อยาแอมพิซิลิน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะใน *V. cholerae* จำนวน 35 ไอโซเลท

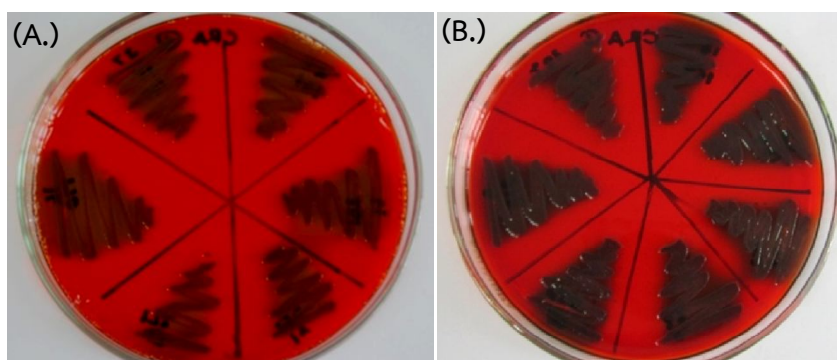
หมายเลขไอโซเลท	แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ¹					
	AMP ²	C	CIP	NOR	SXT	TE
8, 16, 25, 33, 34	R	S	S	S	S	S
18, 21, 22, 24, 26, 28, 29, 31	I	S	S	S	S	S
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 27, 30, 32, 35	S	S	S	S	S	S

¹R, ตื้อต่อยาปฏิชีวนะ; I, ไวปานกลางต่อยาปฏิชีวนะ; S, ไวต่อยาปฏิชีวนะ

²AMP, แอมพิซิลิน; C, คลอแรมเฟนิคอล; NOR, นอร์ฟล๊อกซาซิน; CIP, ไซโปรฟลอกซาซิน; SXT, โคไตรม็อกซาโซล; TE, เตตราไซคลิน

2.4 การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์, ไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิวและปกคลุมพื้นผิวของเหลว

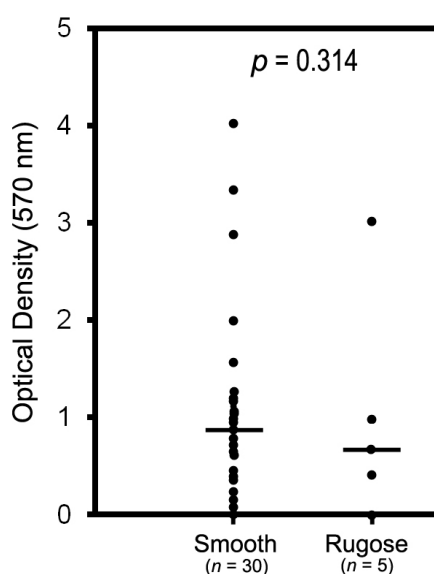
การตรวจสอบการสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ใน *V. cholerae* ด้วยอาหาร congo red agar พบว่า เชื้อทั้ง 35 ไอโซเลท สามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้ โดยสามารถสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C สังเกตจากความเข้มของสีโคโลนี (รูปที่ 3)



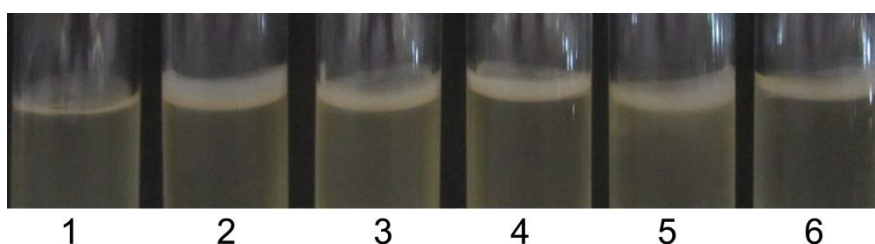
รูปที่ 3 การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ของ *Vibrio cholerae* บนอาหาร congo red agar (CRA) ที่อุณหภูมิ 37°C (A.) และ 30°C (B.)

การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิว พบว่า มีเชื้อจำนวน 32 ไอโซเลทที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₅₇₀ อยู่ในช่วง 0.18-4.03 และเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบขรุขระสร้างไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิวไม่แตกต่างจากเชื้อที่มีโคโลนีแบบเรียบ ($p=0.314$, Mann-Whitney test) (รูปที่ 4)

การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลว พบว่า เชื้อที่มีโคโลนีแบบขรุขระสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวได้มากกว่าเชื้อที่มีโคโลนีแบบเรียบ (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิว ของ *Vibrio cholerae* ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose) โดยแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยของ OD₅₇₀ ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง ส่วนเส้นแนวขวางแสดงค่ามัธยฐานของ OD₅₇₀ ในเชื้อแต่ละกลุ่ม

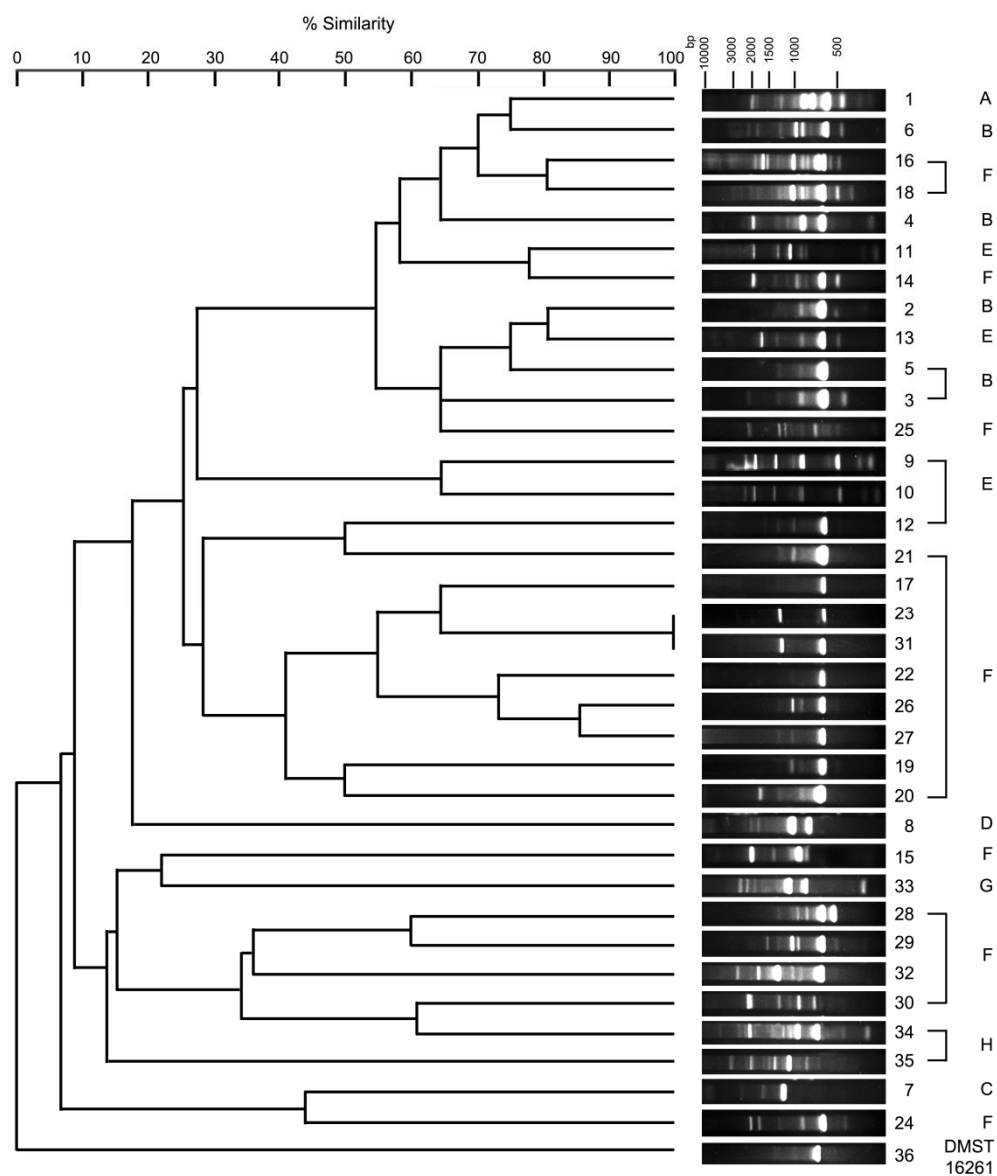


รูปที่ 5 การสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวของ *Vibrio cholerae* ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose)

- 1: *V. cholerae* O1, El Tor DMST16261 (smooth colony)
- 2: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 6 (rugose colony)
- 3: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 14 (rugose colony)
- 4: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 15 (rugose colony)
- 5: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 16 (rugose colony)
- 6: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 17 (rugose colony)

3. การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* โดยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR

การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอใน *V. cholerae* ตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลท โดยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR พบว่า วิธี AP-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนแตกต่างกันเกือบทั้งหมด โดยมีเชื้อ 2 ไอโซเลทที่มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน (lane 23, ไอโซเลทหมายเลข 23 และ lane 31, ไอโซเลทหมายเลข 31) (รูปที่ 6) การจัดกลุ่มของเชื้อโดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวิธี AP-PCR พบว่าไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อในแต่ละกลุ่มได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 6) ส่วนวิธี ERIC-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนแตกต่างกันทั้งหมด (รูปที่ 7) และวิธี ERIC-PCR แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเชื้อสอดคล้องกับการมียีนก่อโรคมกกว่าวิธี AP-PCR โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่มีรูปแบบของยีนก่อโรคในกลุ่ม B, E และ F (รูปที่ 7)

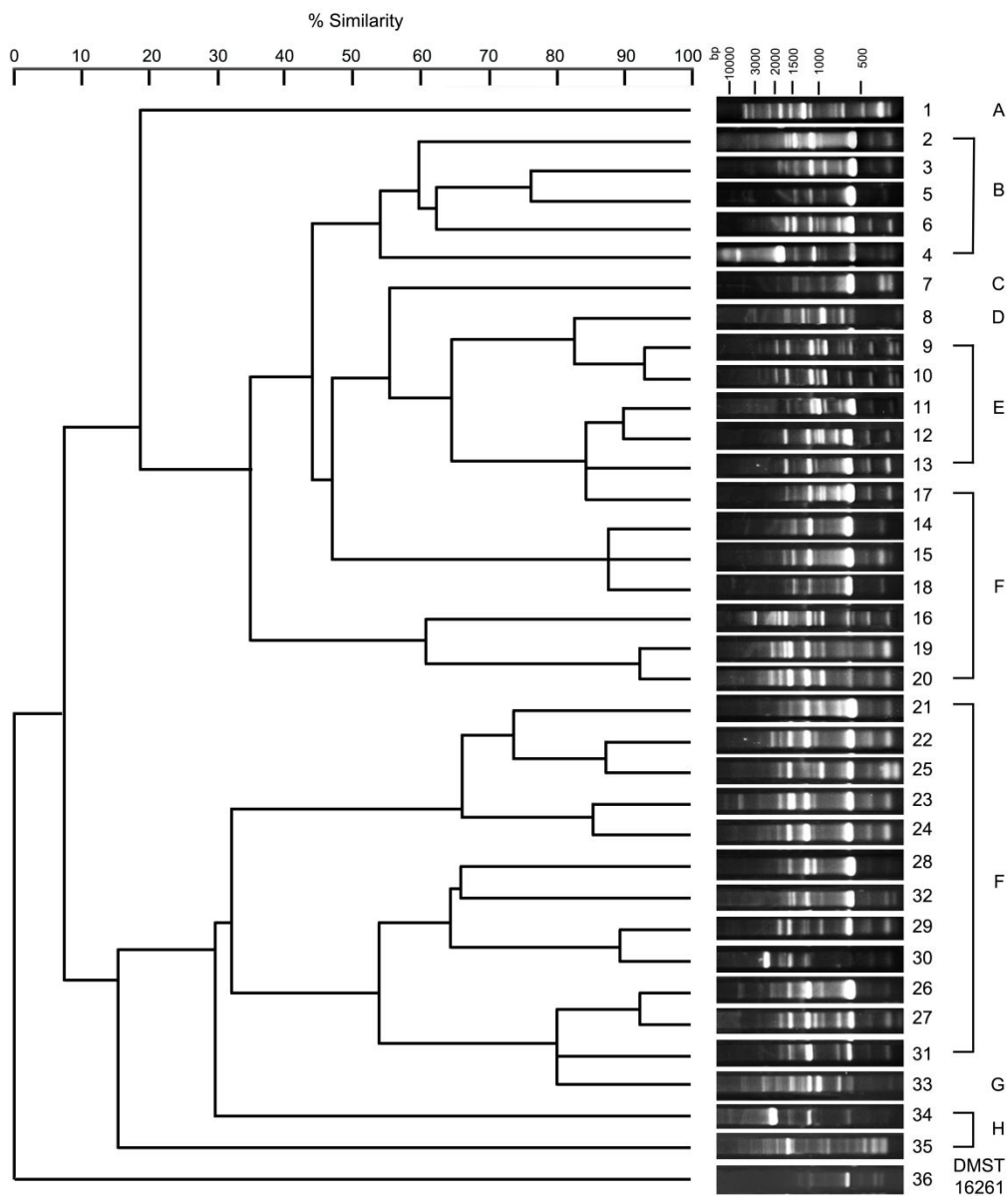


รูปที่ 6 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ *Vibrio cholerae* ที่ได้จากวิธี AP-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม *V. cholerae* ตามยีนที่ตรวจพบ

หมายเลข 1 ถึง 35: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 1 ถึง 35 ตามลำดับ

หมายเลข 36: *V. cholerae* O1 DMST16261

A-H: กลุ่มของ *V. cholerae* แบ่งตามการมียีนก่อโรคต่างๆ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 7 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ *Vibrio cholerae* ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม *V. cholerae* ตามยีนที่ตรวจพบ

หมายเลข 1 ถึง 35: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 1 ถึง 35 ตามลำดับ

หมายเลข 36: *V. cholerae* O1 DMST16261

A-H: กลุ่มของ *V. cholerae* แบ่งตามการมียืนก่อโรคต่างๆ (ตารางที่4)

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

อาหารทะเลเป็นตัวกลางสำคัญที่ทำให้เกิดการติดต่อของ *V. cholerae* ไปสู่มนุษย์ และทำให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรคในประเทศต่าง ๆ เช่น อิตาลี, อินเดีย และไต้หวัน (Ko *et al.*, 1998; Saravanan *et al.*, 2007; Ottaviani *et al.*, 2009) ในประเทศไทยสาเหตุส่วนใหญ่ที่ก่อให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรคก็มีความเกี่ยวข้องกับการรับประทานอาหารทะเล (Suzita *et al.*, 2009) การศึกษานี้ได้แยก *V. cholerae* จากอาหารทะเลที่จำหน่ายในเขต อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา จากการศึกษาพบ *V. cholerae* ในอาหารทะเลจำนวน 55 ตัวอย่าง จากตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด 125 ตัวอย่าง (ร้อยละ 44) ซึ่งมากกว่าการศึกษาในประเทศอิตาลีที่สามารถแยก *V. cholerae* ในอาหารทะเลได้เพียงร้อยละ 4.7 จากตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด 230 ตัวอย่าง (Ottaviani *et al.*, 2009) การจำแนกซีโรกรุปของ *V. cholerae* ที่แยกได้จำนวน 100 ไอโซเลทพบว่า เป็น *V. cholerae* non-O1/non-O139 จำนวน 99 ไอโซเลท และเป็น *V. cholerae* O1 จำนวน 1 ไอโซเลท การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่างๆ พบว่า *V. cholerae* ทุกไอโซเลทไม่มียีน *ctxA*, *tcpA*, *zot* และ *ace* แต่เชื้อจำนวนร้อยละ 96 มียีน *hlyA* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศอินเดียที่ศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 (Singh *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *hlyA* ของเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลทไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี PCR แต่ตรวจพบได้ด้วยวิธี colony hybridization ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะ ยีน *hlyA* เป็นยีนที่มีบทบาทในการสร้าง El Tor-like hemolysin ซึ่งมีผลในการทำลายเม็ดเลือดแดง และมีส่วนในการทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและโรคอุจจาระร่วง (Menzl *et al.*, 1996; Saka *et al.*, 2008) จากการทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงของแคะในการทดลองนี้พบว่า *V. cholerae* ที่มียีน *hlyA* ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง และที่น่าสนใจคือมีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลทซึ่งไม่มียีน *hlyA* แต่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อไอโซเลทดังกล่าวมียีนอื่นที่มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง โดยสารพิษอื่น ๆ ที่มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดงที่มีรายงานมาก่อนหน้า ได้แก่ *hlx*-coding hemolysin, hemolysin (II), lecithinase LEC, *V. cholerae* δ -thermostable hemolysin (Vc- δ TH) และ NAG-rTDH เป็นต้น แต่จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อที่ไม่มียีน *hlyA* ทั้งที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้และไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เลติซิเนสได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสารพิษเหล่านี้ไม่ได้มีส่วนในการส่งเสริมความสามารถในการก่อโรคของ *V. cholerae* (Richardson *et al.*, 1986; Yoh *et al.*, 1986; Nagamune *et al.*, 1995; Fiore *et al.*, 1997; Fallarino *et al.*, 2002)

นอกจากการตรวจพบยีน *hlyA* แล้ว การศึกษานี้ยังพบว่า *V. cholerae* ที่แยกได้จำนวนร้อยละ 20 และ 6 มียีน *stn/sto* และ *vcsV2* (T3SS) ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Rivera และคณะ ในปี พ.ศ. 2544 ซึ่งตรวจพบยีน *stn/sto* ใน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมในประเทศบราซิล จำนวนร้อยละ 28.2 และมีรายงานจาก Rahman และคณะ ในปี พ.ศ. 2551 ซึ่งตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ T3SS(*vcsV2*) ใน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมในประเทศบังคลาเทศจำนวนร้อยละ 11.9 อย่างไรก็ตามการตรวจหายีน

ที่เกี่ยวข้องกับระบบ T3SS ใน *V. cholerae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยในประเทศอินเดีย พบว่ามีเชื้อจำนวนมากถึงร้อยละ 31.5 มียีนดังกล่าว (Chatterjee *et al.*, 2009) จึงเป็นไปได้ว่า T3SS จะเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. cholerae* นอกจากนี้ *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเลในการทดลองนี้ส่วนใหญ่มียีน *vasH* (T6SS) (ร้อยละ 96) ซึ่งการศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไนจีเรียพบว่าส่วนใหญ่ก็มียีน *vasH* (Marin *et al.*, 2013) ดังนั้นบทบาทของยีน *vasH* ในการก่อโรคจึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ที่น่าสนใจคือเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 สายพันธุ์มาตรฐานที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ใช้ในการทดลองนี้ มียีน *hlyA*, *vcsV2* และ *vasH* ซึ่งพบรูปแบบการปรากฏของยีนทั้ง 3 ในเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท (กลุ่ม E) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศอินเดียที่ศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง (Chatterjee *et al.*, 2009) ดังนั้นเชื้อกลุ่มนี้อาจมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้

การศึกษาครั้งนี้พบว่า *V. cholerae* O1 ซึ่งแยกได้จากอาหารทะเลไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษต่าง ๆ ที่พบใน *V. cholerae* O1 สายพันธุ์ระบาด ซึ่งชี้ให้เห็นว่า *V. cholerae* O1 ไอโซเลทนี้ อาจจะมีต้นกำเนิดมาจาก *V. cholerae* non-O1 ที่ไม่สร้างสารพิษ แต่ได้รับการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง O1 antigen ผ่านทางกระบวนการ horizontal transfer (Karaolis *et al.*, 1995) เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *V. cholerae* O1 ไอโซเลทนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *V. cholerae* non-O1/non-O139

การตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ของ *V. cholerae* ตัวแทนที่สุ่มมาจากแต่ละกลุ่มจำนวน 35 ไอโซเลท ได้แก่ การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า เชื้อเกือบทั้งหมดไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิด ยกเว้นเชื้อ 5 ไอโซเลทที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *V. cholerae* ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศอินเดีย (Garg *et al.*, 2000) และงานวิจัยที่ศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากน้ำในทะเลสาบในประเทศสเปน ที่รายงานว่า *V. cholerae* ที่แยกได้ดื้อต่อยาแอมพิซิลลินในเปอร์เซ็นต์ที่สูง ความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับการมี R plasmids (Amaro *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับการดื้อยาปฏิชีวนะใน *V. cholerae* ในสิ่งแวดล้อมว่าเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีนผ่านทางกระบวนการ horizontal transfer (Zhang *et al.*, 2009)

ไบโอฟิล์มเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการทำให้ *V. cholerae* สามารถทนทานต่อสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีและมีส่วนในการเพิ่มความสามารถในการเกาะติดกับลำไส้ของหนู (Zhu and Mekalanos, 2003) การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเบื้องต้นได้ทดสอบการสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ และพบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิว พบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มแตกต่างกัน และบางไอโซเลทไม่สามารถยึดเกาะพื้นผิวได้ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น พื้นผิว หรือ เซลล์เจ้าบ้าน (Mueller *et al.*, 2007) นอกจากนี้พบว่าเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบขรุขระสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวไม่แตกต่างจากเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ ทั้งนี้อาจจะ

เป็นเพราะเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิวแต่ผลของการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวในงานวิจัยนี้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่สร้างโคโลนีแบบซุซเซสส่วนใหญ่มักจะสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวได้มากกว่าเชื้อที่สร้างโคโลนีแบบเรียบ (Yildiz *et al.*, 2004)

วิธี AP-PCR และ ERIC-PCR เป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ *V. cholerae* โดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งวิธี AP-PCR จะอาศัยไพรเมอร์สายสั้น ๆ เพียงเส้นเดียวในการเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อเพิ่มดีเอ็นเอแบบสุ่ม ส่วนวิธี ERIC-PCR จะใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วน ERIC sequence ที่พบได้เพียงในเชื้อกลุ่ม enteric bacteria และ vibrios (Penner *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 1995) Rivera และคณะ ได้รายงานวิธี ERIC-PCR สามารถแยกความแตกต่างของ *V. cholerae* ซึ่งสร้างสารพิษ (ctx^+ , zot^+) และ *V. cholerae* ที่ไม่สร้างสารพิษ (ctx^- , zot^-) ได้ (Rivera *et al.*, 1995) การศึกษาครั้งนี้พบว่า วิธี AP-PCR ให้รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนที่เหมือนกันจำนวน 2 ไอโซเลท แต่วิธี ERIC-PCR ให้รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนทั้งหมดแตกต่างกัน และที่น่าสนใจจากการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธี ERIC-PCR สามารถแสดงความสัมพันธ์ของ *V. cholerae* ที่ไม่สร้างสารพิษได้สอดคล้องกับการมียีนก่อโรคต่าง ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่มียีนก่อโรคใกล้เคียงกันอาจจะมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน โดยการวิวัฒนาการของเชื้อทำให้มีการได้รับยีนก่อโรค หรือ สูญเสียยีนก่อโรคได้ ดังนั้นวิธี ERIC-PCR จึงเป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *V. cholerae* ที่ไม่สร้างสารพิษได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาทางระบาดวิทยา และประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคอุจจาระร่วงที่เกี่ยวข้องกับรับประทานอาหาร

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปว่า *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเลส่วนใหญ่เป็น *V. cholerae* non-O1/non-O139 ซึ่งเป็นเชื้อที่มียีนก่อโรคและรูปแบบลายพิมพ์ของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แม้ว่ากลไกในการก่อโรคของ *V. cholerae* non-O1/non-O139 นั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่ามีกลไกอย่างไร แต่การตรวจพบ *V. cholerae* ที่มียีนก่อโรคหลากหลายในอาหารทะเลก็เป็นการบ่งชี้ถึงความเสี่ยงในการเกิดโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหาร

สรุปผลการทดลอง

1. การแยก *V. cholerae* จากอาหารทะเลทั้งหมด 125 ตัวอย่าง ได้เชื้อซึ่งผ่านการยืนยันโดยวิธี PCR ที่ใช้ยีน *ompW* เป็นยีนเป้าหมาย จำนวน 100 ไอโซเลท จากอาหารทะเล 55 ตัวอย่าง โดยเชื้อส่วนใหญ่เป็น *V. cholerae* non-O1/non-O139 มีเพียง 1 ไอโซเลทเป็น *V. cholerae* O1
2. การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค พบว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้ส่วนใหญ่มียีน *hlyA* (ร้อยละ 95) และ *vasH* (T6SS) (ร้อยละ 95) รองลงมาคือยีน *stn/sto* (ร้อยละ 20) และ *vcsV2* (T3SS) (ร้อยละ 6) ตามลำดับ โดยมีเชื้อ 5 ไอโซเลทที่มีรูปแบบยีนเหมือนกับที่พบในเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้เป็นเชื้อควบคุมในการทดลอง ส่วน *V. cholerae* O1 ที่แยกได้ไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษต่าง ๆ ซึ่งมักพบใน *V. cholerae* O1 สายพันธุ์ระดับที่แยกจากผู้ป่วย
3. *V. cholerae* ตัวแทน ($n=35$) แยกได้จากอาหารทะเลส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบ ยกเว้นเชื้อ 5 ไอโซเลทที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน
4. *V. cholerae* ตัวแทน ($n=35$) ทุกไอโซเลทที่มียีน *hlyA* มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง แสดงให้เห็นบทบาทของยีน *hlyA* กับความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ อย่างไรก็ตามมีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลทที่ไม่มียีน *hlyA* แต่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้อาจมีปัจจัยอื่นที่ช่วยในการสลายเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้เชื้อทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้แต่อย่างไรก็ตามมีเชื้อ 3 ไอโซเลทที่ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มเกาะติดพื้นผิว และเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีแบบขรุขระและแบบเรียบสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวไม่แตกต่างกันแต่จากการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวพบว่าเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีแบบขรุขระสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวได้มากกว่าเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีแบบเรียบ
5. การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* โดยวิธี ERIC-PCR พบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน บ่งชี้ว่าเชื้อดังกล่าวเป็นคนละสายพันธุ์ และยังพบความสัมพันธ์ของเชื้อที่มีรูปแบบยีนก่อโรคเหมือนกัน บ่งชี้ว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวมีวิวัฒนาการร่วมกัน

บรรณานุกรม

- AESR. 2010. Cholera. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health. <http://www.boe.moph.go.th/Annual/aesr2553/Open.html>. (accessed September 19, 2012).
- Aiso, K., Simidu, U. and Hasuo, K. 1968. Microflora in the digestive tract of inshore fish in Japan. *Journal of general microbiology*. 52(3): 361-364.
- Alam, A., Miller, K. A., Chaand, M., Butler, J. S. and Dziejman, M. 2011. Identification of *Vibrio cholerae* type III secretion system effector proteins. *Infection and Immunity*. 79(4): 1728-1740.
- Ali, A., Rashid, M. H. and Karaolis, D. K. 2002. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(11): 5773-5778.
- Amaro, C., Aznar, R., Garay, E. and Alcaide, E. 1988. R plasmids in environmental *Vibrio cholerae* non-O1 strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(11): 2771-2776.
- Annous, B. A., Fratamico, P. M. and Smith, J. L. 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science*. 74(1): R1-R14.
- Bagchi, K., Echeverria, P., Arthur, J., Sethabutr, O., Serichantalergs, O. and Hoge, C. 1993. Epidemic of diarrhea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 that produced heat-stable toxin among Khmers in a camp in Thailand. *Journal of clinical microbiology*. 31(5): 1315-1317.
- Chatterjee, S., Ghosh, K., Raychoudhuri, A., Chowdhury, G., Bhattacharya, M., Mukhopadhyay, A., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S., Klose, K. E. and Nandy, R. 2009. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(4): 1087-1095.
- Cinar, H. N., Kothary, M., Datta, A. R., Tall, B. D., Sprando, R., Bilecen, K., Yildiz, F. and McCardell, B. 2010. *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, developmental delay, and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*. 5: e11558.
- Coelho, A., Andrade, J. R., Vicente, A. C. P. and Dirita, V. J. 2000. Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infection and Immunity*. 68(3): 1700-1705.
- Davis, B. M. and Waldor, M. K. 2003. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Current opinion in microbiology*. 6(1): 35-42.

- Doyle, M. P. and Beuchat, L. R. 2007. Food microbiology. (3rd ed.). ASM Press, United States of America, 1038 pp.
- Dziejman, M., Serruto, D., Tam, V. C., Sturtevant, D., Diraphat, P., Faruque, S. M., Rahman, M. H., Heidelberg, J. F., Decker, J. and Li, L. 2005. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102(9): 3465-3470.
- Fallarino, A., Attridge, S. R., Manning, P. A. and Focareta, T. 2002. Cloning and characterization of a novel haemolysin in *Vibrio cholerae* O1 that does not directly contribute to the virulence of the organism. Microbiology. 148(7): 2181-2189.
- Farmer, J. J. and Janda, M. J. 1984. Family I. *Vibrionaceae* In Bergey's manual of systematic bacteriology (Vol.2). Garrity, editors. Williams & Wilkins, United States of America, pp. 491-519.
- Faruque, S. M., Albert, M. J. and Mekalanos, J. J. 1998. Epidemiology, Genetics, and ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and molecular biology Reviews. 62(4): 1301-1314.
- Faruque, S. M. and Mekalanos, J. J. 2008. Molecular Ecology of *Vibrio cholerae*. In *Vibrio Cholerae: Genomics and Molecular Biology*. Faruque and Nair, editors. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 141-151.
- Fiore, A. E., Michalski, J. M., Russell, R. G., Sears, C. L. and Kaper, J. B. 1997. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. Infection and Immunity. 65(8): 3112-3117.
- Garg, P., Chakraborty, S., Basu, I., Datta, S., Rajendran, K., Bhattacharya, T., Yamasaki, S., Bhattacharya, S., Takeda, Y. and Balakrish Nair, G. 2000. Expanding multiple antibiotic resistance among clinical strains of *Vibrio cholerae* isolated from 1992-7 in Calcutta, India. Epidemiology and Infection. 124(03): 393-399.
- Gomez-Gil, B., Tron-Mayéna, L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V. and Guerra-Flores, A. L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 163(1): 1-9.
- Jang, J., Jung, K.-T., Park, J., Yoo, C.-K. and Rhie, G.-E. 2011. The *Vibrio cholerae* *VarS/VarA* two-component system controls the expression of virulence proteins through ToxT regulation. Microbiology. 157(5): 1466-1473.

- Kaneko, T. and Colwell, R. R. 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Applied microbiology*. 29(2): 269-274.
- Kaper, J. B., Morris, J. G. J. and Levine, M. M. 1995. Cholera. *Clinical microbiology reviews*. 80: 48-49.
- Karaolis, D., Lan, R. and Reeves, P. R. 1995. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxicogenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*. 177(11): 3191-3198.
- Kitaoka, M., Miyata, S. T., Brooks, T. M., Unterweger, D. and Pukatzki, S. 2011. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*. 193(23): 6471-6482.
- Ko, W.-C., Chuang, Y.-C., Huang, G.-C. and Hsu, S.-Y. 1998. Infections due to non-O1 *Vibrio cholerae* in southern Taiwan: predominance in cirrhotic patients. *Clinical Infectious Diseases*. 27(4): 774-780.
- Liston, J. 1957. The occurrence and distribution of bacterial types on flatfish. *Journal of general microbiology*. 16(1): 205-216.
- Luo, Y., Ye, J., Jin, D., Ding, G., Zhang, Z., Mei, L., Octavia, S. and Lan, R. 2013. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *BMC Microbiology*. 13(1): 52.
- Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S. and Mekalanos, J. J. 2009. Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell host & microbe*. 5(3): 234-243.
- Manning, P. A. 1997. The tcp gene cluster of *Vibrio cholerae*. *Gene*. 192(1): 63-70.
- Marin, M. A., Thompson, C. C., Freitas, F. S., Fonseca, E. L., Aboderin, A. O., Zailani, S. B., Quartey, N. K. E., Okeke, I. N. and Vicente, A. C. P. 2013. Cholera Outbreaks in Nigeria Are Associated with Multidrug Resistant Atypical El Tor and Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS neglected tropical diseases*. 7(2): e2049.
- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A. M., Yung, P. Y., Yildiz, F. H. and Kjelleberg, S. 2005. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(46): 16819-16824.
- Menzl, K., Maier, E., Chakraborty, T. and Benz, R. 1996. HlyA Hemolysin of *Vibrio Cholerae* O1 Biotype El Tor. *European Journal of Biochemistry*. 240(3): 646-654.

- Miyata, S. T., Kitaoka, M., Brooks, T. M., McAuley, S. B. and Pukatzki, S. 2011. *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum*. *Infection and Immunity*. 79(7): 2941-2949.
- Mueller, R. S., McDougald, D., Cusumano, D., Sodhi, N., Kjelleberg, S., Azam, F. and Bartlett, D. H. 2007. *Vibrio cholerae* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic surface colonization. *Journal of bacteriology*. 189(14): 5348-5360.
- Nagamune, K., Yamamoto, K. and Honda, T. 1995. Cloning and sequencing of a novel hemolysis gene of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters*. 128(3): 265-269.
- Nishiguchi, M. K. and Nair, V. S. 2003. Evolution of symbiosis in the Vibrionaceae: a combined approach using molecules and physiology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 53(6): 2019-2026.
- Ogawa, A., Kato, J., Watanabe, H., Nair, B. and Takeda, T. 1990. Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from a patient with traveler's diarrhea. *Infection and Immunity*. 58(10): 3325-3329.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., Di Trani, V., Canonico, C., Pianetti, A., Tega, L. and Carraturo, A. 2009. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 132(1): 47-53.
- Oxley, A., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of applied microbiology*. 93(2): 214-223.
- Penner, G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. and Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Research*. 2(4): 341-345.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D. and Mekalanos, J. J. 2007. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(39): 15508-15513.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. and Mekalanos, J. J. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium*

- host model system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103(5): 1528-1533.
- Reidl, J. and Klose, K. E. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS microbiology reviews. 26(2): 125-139.
- Richardson, K., Michalski, J. and Kaper, J. 1986. Hemolysin production and cloning of two hemolysin determinants from classical *Vibrio cholerae*. Infection and Immunity. 54(2): 415-420.
- Rivera, I., Chowdhury, M., Huq, A., Jacobs, D., Martins, M. and Colwell, R. R. 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. Applied and Environmental Microbiology. 61(8): 2898-2904.
- Rivera, I. N., Chun, J., Huq, A., Sack, R. B. and Colwell, R. R. 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Applied and Environmental Microbiology. 67(6): 2421-2429.
- Saka, H. A., Bidinost, C., Sola, C., Carranza, P., Collino, C., Ortiz, S., Echenique, J. R. and Bocco, J. L. 2008. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. Microbial pathogenesis. 44(2): 118-128.
- Saravanan, V., Sanath Kumar, H., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2007. Putative virulence genes of *Vibrio cholerae* from seafoods and the coastal environment of Southwest India. International Journal of Food Microbiology. 119(3): 329-333.
- Schirmeister, F., Dieckmann, R., Bechlars, S., Bier, N., Faruque, S. and Strauch, E. 2014. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 33:767-778.
- Sharma, C., Thungapathra, M., Ghosh, A., Mukhopadhyay, A. K., Basu, A., Mitra, R., Basu, I., Bhattacharya, S., Shimada, T. and Ramamurthy, T. 1998. Molecular Analysis of Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Associated with an Unusual Upsurge in the Incidence of Cholera-Like Disease in Calcutta, India. Journal of Clinical Microbiology. 36(3): 756-763.
- Sherr, B. F. and Sherr, E. B. 1984. Role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In Current perspectives in microbial ecology. Klug and Reddy, editors. Washington, DC: American Society for Microbiology, Washington, pp. 412-423.

- Siddiqui, F. J., Bhutto, N. S., von Seidlein, L., Khurram, I., Rasool, S., Ali, M., Zafar, A., Deen, J. L., Clemens, J. D. and Nizami, Q. 2006. Consecutive outbreaks of *Vibrio cholerae* O139 and *V. cholerae* O1 cholera in a fishing village near Karachi, Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 100(5): 476-482.
- Simidu, U., Ashino, K. and Kaneko, E. 1971. Bacterial flora of phyto-and zoo-plankton in the inshore water of Japan. *Canadian journal of microbiology*. 17(9): 1157-1160.
- Singh, D., Matte, M. H., Matte, G., Jiang, S., Sabeena, F., Shukla, B., Sanyal, S., Huq, A. and Colwell, R. 2001. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2): 910-921.
- Suzita, R., Abdulmir, A., Abu Bakar, F. and Son, R. 2009. Cholera outbreak via shellfish. *Am J Infect Dis*. 5(1).
- 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(1): 134-140.
- Tseng, T.-T., Tyler, B. M. and Setubal, J. C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*. 9(Suppl 1): S2.
- Van Dellen, K. L. and Watnick, P. I. 2006. The *Vibrio cholerae* biofilm: A target for novel therapies to prevent and treat cholera. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 3(2): 261-266.
- Van Houdt, R., Aertsen, A., Jansen, A., Quintana, A. and Michiels, C. 2004. Biofilm formation and cell- to- cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. *Journal of applied microbiology*. 96(1): 177-184.
- Waldor, M. K. and Mekalanos, J. J. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 272(5270): 1910-1914.
- Watnick, P. I. and Kolter, R. 2002. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular microbiology*. 34(3): 586-595.
- Yildiz, F. H., Liu, X. S., Heydorn, A. and Schoolnik, G. K. 2004. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Molecular Microbiology*. 53(2): 497-515.

- Yildiz, F. H. and Schoolnik, G. K. 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(7): 4028-4033.
- Yoh, M., Honda, T. and Miwatani, T. 1986. Purification and partial characterization of a non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin that cross-reacts with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 52(1): 319-322.
- Zhang, X.-X., Zhang, T. and Fang, H. H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82(3): 397-414.
- Zhu, J. and Mekalanos, J. J. 2003. Quorum Sensing-Dependent Biofilms Enhance Colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental cell*. 5(4): 647-656.

ภาคผนวก

รายการผลงานที่ตีพิมพ์

วิธีการทดลองเพิ่มเติม

1. การตรวจหายีน *rfb* โดยวิธี Multiplex PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Hoshino *et al.*, 1998)

ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μ l)
10X Buffer	1X	3
2.5mM dNTPs	0.21 mM	2.52
30.0 μ M O1F2-1 Primer	0.5 μ M	0.5
30.0 μ M O2R2-2Primer	0.5 μ M	0.5
27.0 μ M O139R2 Primer	0.27 μ M	0.3
27.0 μ M O139F2 Primer	0.27 μ M	0.3
5 U/ μ l <i>Taq</i> polymerase	0.05 U/ μ l	0.3
Template DNA	-	3.0
Water	-	19.58
Total volume	-	30.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา (min)	จำนวนรอบ
Hot start	94	5	1
Denature	94	1	35
Annealing	55	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	7	1

2. การตรวจหา ยีน *ctxA*, *tcpA*, *zot* และ *ace* โดยวิธี Multiplex PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Fields *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1998; Rivera *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	5.0
2.5mM dNTPs	1 mM	5.0
16 μM Ctx2 Primer	0.16 μM	0.5
16 μM Ctx3 Primer	0.16 μM	0.5
30 μM 72F Primer	0.3 μM	0.5
30 μM 477R Primer	0.3 μM	0.5
30 μM 647R Primer	0.3 μM	0.5
30 μM 225F Primer	0.3 μM	0.5
30 μM 1129R Primer	0.3 μM	0.5
30 μM ACE-1 Primer	0.3 μM	0.5
30 μM ACE-2 Primer	0.3 μM	0.5
5U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.05 U/ μl	0.5
Template DNA	-	2.5
Water	-	32.5
Total volume	-	50.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (min)	จำนวนรอบ
Hot start	94	2	1
Denature	94	1	20
Annealing	62	1	
Extension	72	1	
Denature	94	1	10
Annealing	54	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	10	1

3. การตรวจหา *stn/sto* ยีน โดยวิธี PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Rivera *et al.*, 2001)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	2.5
2.5mM dNTPs	0.2 mM	2.0
20.0 μM 67F Primer	0.8 μM	1.0
20.0 μM 194R Primer	0.8 μM	1.0
5 U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.025 U/ μl	0.125
Template DNA	-	1.0
Water	-	17.375
Total volume	-	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (min)	จำนวนรอบ
Hot start	94	2	1
Denature	94	2	30
Annealing	55	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	10	1

4. การตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธี PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Rivera *et al.*, 2001)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	2.5
2.5mM dNTPs	0.2 mM	2.0
20.0 μM 489F Primer	0.8 μM	1.0
20.0 μM 744F primer	0.8 μM	1.0
20.0 μM 1184R Primer	0.8 μM	1.0
5 U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.025 U/ μl	0.125
Template DNA	-	1.0
Water	-	16.375
Total volume	-	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (min)	จำนวนรอบ
Hot start	94	2	1
Denature	94	2	30
Annealing	60	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	10	1

5. การตรวจหายีน *vcsV2* โดยวิธี PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Chatterjee *et al.*, 2009)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μ l)
10X Buffer	1X	2.0
2.5mM dNTPs	0.25 mM	2.0
10 μ M <i>vcsV2F</i> Primer	1 μ M	2.0
10 μ M <i>vcsV2R</i> Primer	1 μ M	2.0
5U/ μ l <i>Taq</i> polymerase	0.05 U/ μ l	0.2
Template DNA	-	2.0
Water	-	9.8
Total volume	-	20.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา	จำนวนรอบ
Hot start	95	3 min	1
Denature	95	30 s	10 (annealing -1 $^{\circ}$ C/cycle)
Annealing	70	45 s	
Extension	72	1 min	
Denature	95	30 s	20
Annealing	60	45 s	
Extension	72	1 min	
Final Extension	72	5 min	1

6. การตรวจหายีน *vasH* โดยวิธี PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Marin *et al.*, 2013)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	2.0
2.5mM dNTPs	0.25 mM	2.0
10 μM <i>VasH</i> -F Primer	1 μM	2.0
10 μM <i>VasH</i> -R Primer	1 μM	2.0
5U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.05 U/ μl	0.2
Template DNA	-	2.0
Water	-	9.8
Total volume	-	20.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ
Hot start	94	6 min	1
Denature	94	30 s	30
Annealing	60	30 s	
Extension	72	30 s	
Final Extension	72	5 min	1

7. การตรวจหายีน *hly-A* โดยวิธี colony - blot hybridization

7.1 เตรียม hybridization probes

ดีเอ็นเอแม่แบบใช้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากยีน *hlyA* (El Tor hemolysin) ของเชื้อ *V. cholerae* O1, El Tor biotype สกัด PCR product ที่ได้จาก agarose gel ด้วย Gel/PCR fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan) จากนั้น ตัดฉลากดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้ตามวิธีที่ระบุไว้ใน DIG High Prime DNA labeling and detection starter kits I (Roche, Germany) โดยเติมดีเอ็นเอแม่แบบ 1 ไมโครกรัมลงในหลอดพีซีอาร์ และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 16 ไมโครลิตรแล้วจึงให้ความร้อนเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว และทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในน้ำแข็ง จากนั้นผสมดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับสารละลาย DIG-High prime หมุนเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและวัดประสิทธิภาพการตัดฉลากโพรบ

7.2 ตรวจหายีน *hlyA* family ด้วยวิธี Colony blot hybridization

จุดโคลนของเชื้อ *V. cholerae* ที่ทำการตรวจหายีน *hlyA* ด้วยวิธี PCR ไม่พบลงบนแผ่น nylon membrane ที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญจากนั้นทำให้เซลล์แตกบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีเชื้อเจริญลงบนกระดาษกรอง 3M ที่ชุ่มด้วยสารละลาย lysis solution (0.5 N NaOH) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นคืบแผ่น nylon membrane วางลงบนกระดาษกรอง 3M ที่ชุ่มด้วยสารละลาย neutralization solution (1M Tris pH 5.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้แผ่น nylon membrane แห้งและตรึงดีเอ็นเอของเชื้อบนแผ่นกรองโดยวิธี UV-cross linking จากนั้นตรวจหาการกระจายของยีนกลุ่ม *HlyA* family ตามวิธีที่ระบุไว้ใน DIG High Prime DNA labeling และ detection starter kits I (Roche Applied Science, Germany)

8. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ lecithinase (Fiore *et al.*, 1997)

จุดโคลนของเชื้อ *V. cholerae* ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร TSA + 1%NaCl + 1% Egg Yolk บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ lecithinase ได้จะเกิดตะกอนและเกิดโซนใสรอบโคโลนี

9. การทดสอบการสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ (Freeman *et al.*, 1989)

เลี้ยง *V. cholerae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red Agar (CRA) ซึ่งประกอบด้วย Brain heart infusion broth 37 กรัม/ลิตร, sucrose 50 กรัม/ลิตร, agar 10 กรัม/ลิตร, และสี congo red 0.8 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ หากเชื้อสามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้จะทำให้โคโลนีสีดำ ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้จะทำให้โคโลนีสีชมพูหรือแดง

10. การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลว (Yildiz and Schoolnik, 1999)

เลี้ยง *V. cholerae* ในอาหารเลี้ยง LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลว

9. การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี AP-PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Williams *et al.*, 1990)

สกัดดีเอ็นเอของ *V. cholerae* ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan) แล้วใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 (5'-GTTTCGCTCC-3') และตรวจสอบ AP-PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose โดยใช้กระแสไฟฟ้า 2 ระดับ คือ 100 โวลต์ นาน 5-7 นาที จากนั้นปรับเป็น 15 mA ประมาณ 12-15 ชั่วโมง จากนั้นจึงสร้าง dendrogram จากแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยโปรแกรม Bioprofile image analysis system (Viber Lourmat, France)


บรรณานุกรม

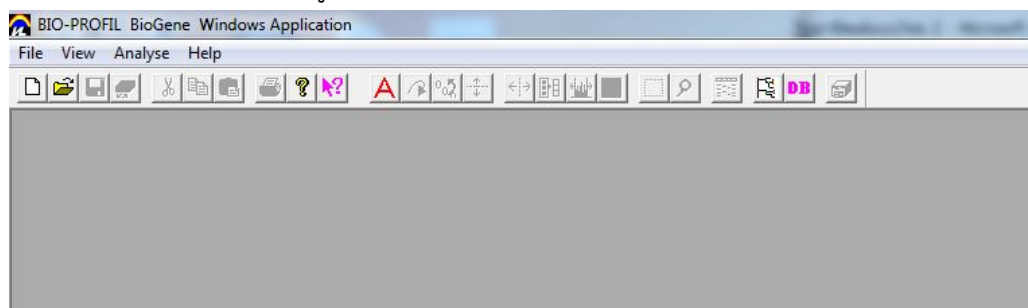
- Chatterjee, S., Ghosh, K., Raychoudhuri, A., Chowdhury, G., Bhattacharya, M., Mukhopadhyay, A., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S., Klose, K. E. and Nandy, R. 2009. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(4): 1087-1095.
- Fields, P., Popovic, T., Wachsmuth, K. and Olsvik, O. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *Journal of clinical microbiology*. 30(8): 2118-2121.
- Fiore, A. E., Michalski, J. M., Russell, R. G., Sears, C. L. and Kaper, J. B. 1997. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. 65(8): 3112-3117.
- Freeman, D., Falkiner, F. and Keane, C. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 42(8): 872-874.
- Hoshino, K., Yamasaki, S., Mukhopadhyay, A. K., Chakraborty, S., Basu, A., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B., Shimada, T. and Takeda, Y. 1998. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 20(3): 201-207.
- Marin, M. A., Thompson, C. C., Freitas, F. S., Fonseca, E. L., Aboderin, A. O., Zailani, S. B., Quartey, N. K. E., Okeke, I. N. and Vicente, A. C. P. 2013. Cholera Outbreaks in Nigeria Are Associated with Multidrug Resistant Atypical El Tor and Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS neglected tropical diseases*. 7(2): e2049.
- Rivera, I. N., Chun, J., Huq, A., Sack, R. B. and Colwell, R. R. 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6): 2421-2429.
- Shi, L., Miyoshi, S.-i., Hiura, M., Tomochika, K.-i., Shimada, T. and Shinoda, S. 1998. Detection of genes encoding cholera toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE) and heat-stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. *Microbiology and immunology*. 42(12): 823.
- Singh, D., Isac, S. R. and Colwell, R. 2002. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Journal of clinical microbiology*. 40(11): 4321-4324.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22): 6531-6535.

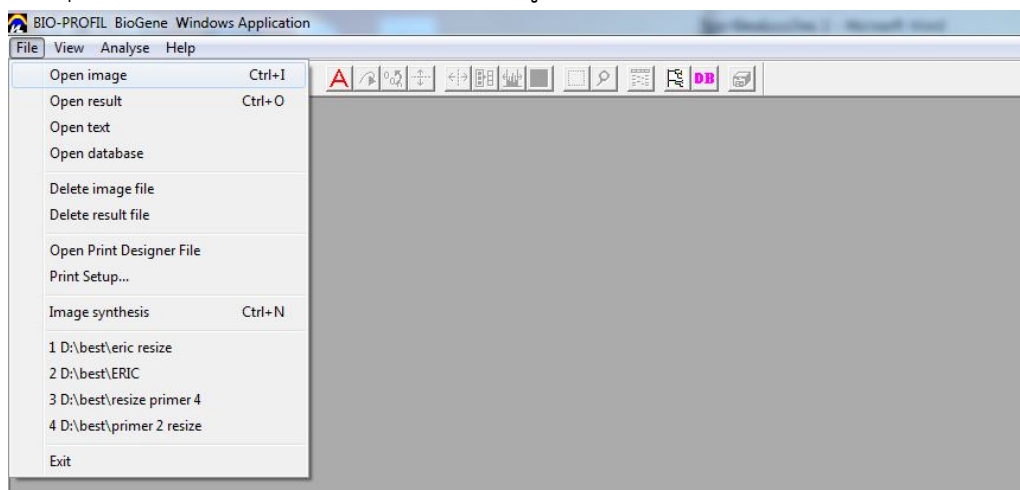
Yildiz, F. H. and Schoolnik, G. K. 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(7): 4028-4033.

วิธีการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Bioprofile image analysis system

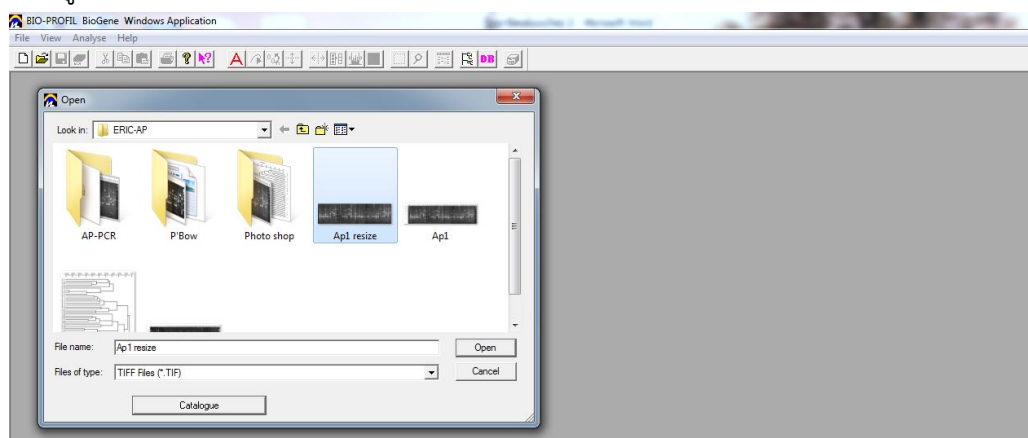
1. คลิก icon  เพื่อเข้าสู่โปรแกรม



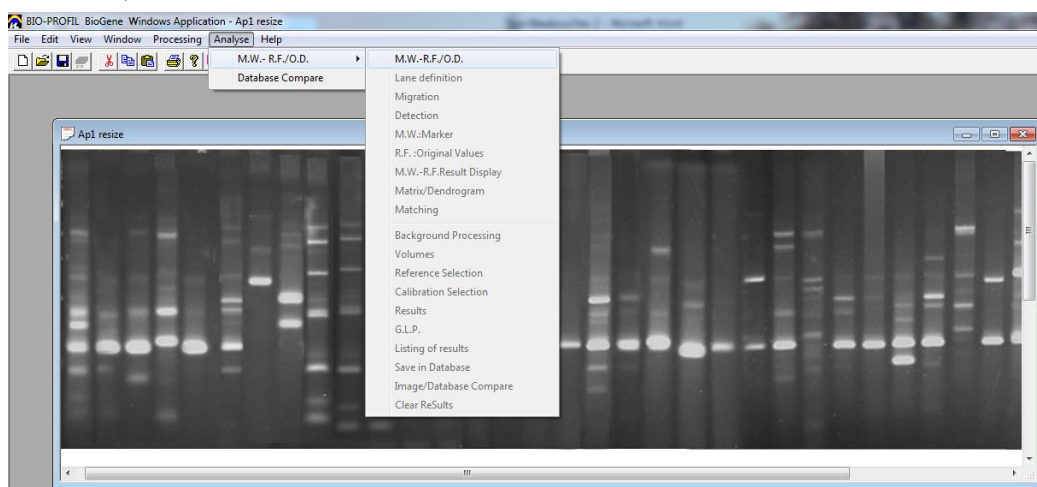
2. คลิกปุ่ม File แล้วคลิก Open image เพื่อเลือกรูปที่ต้องการวิเคราะห์



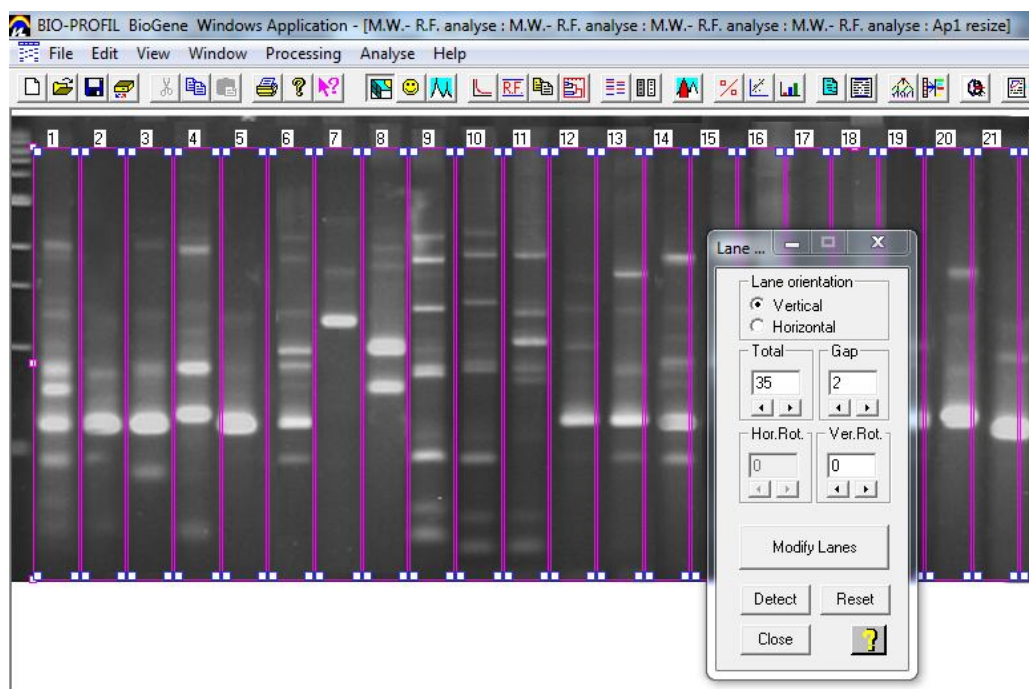
3. เลือกรูปที่ต้องการวิเคราะห์จากไฟล์



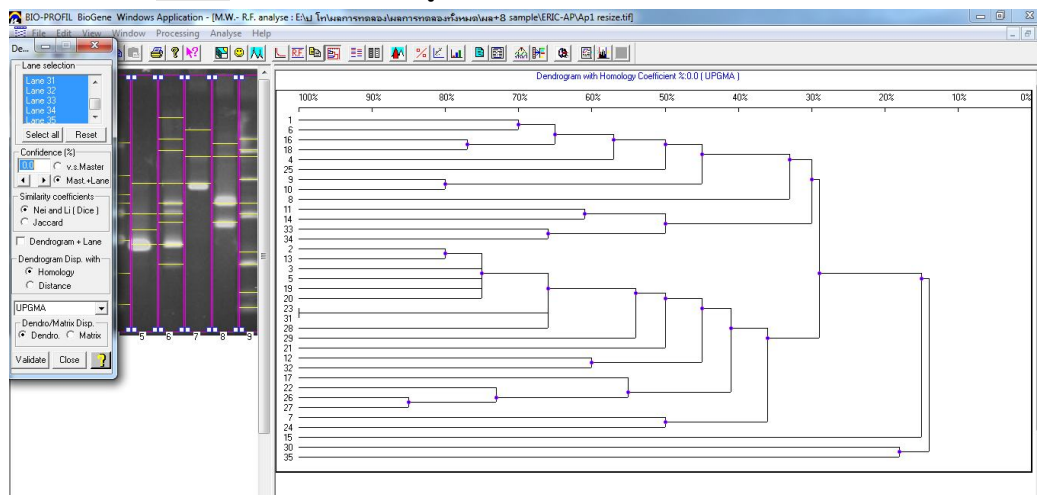
4. คลิก Analyse > M.W.- R.F./O.D. > M.W.- R.F./O.D. เพื่อกำหนด lane ที่ต้องการวิเคราะห์



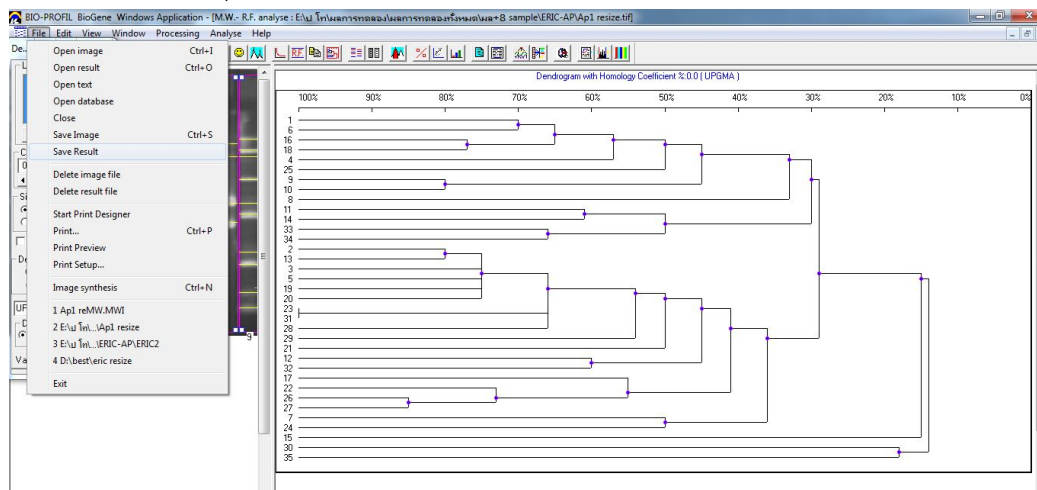
5. กำหนดจำนวน lane ที่ต้องการวิเคราะห์ในช่อง Total และระยะห่างระหว่าง lane ในช่อง Gap หาก lane เอียงสามารถปรับช่องให้เอียงตาม lane ได้โดยคลิกปุ่ม Modify Lane แล้วจึงปรับกรอบของ lane นั้น ๆ



8. คลิก icon เพื่อแสดงผลในรูปแบบ dendrogram



9. การบันทึกผล คลิกปุ่ม File > Save result



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุธิมา ปรีเปรม
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510220119
 วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน (ถ้ามี)

Preeprem, S., Mittraparp-arhorn, P., Bhoopong, P., and Uddhakul, V., 2014.
 Isolation and Characterization of *Vibrio cholerae* Isolates from Seafood in
 Hat Yai City, Songkhla, Thailand. DOI: 10.1089/fpd.2014.1772.