



ลักษณะของ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกได้จาก
โรงพยาบาลหาดใหญ่
Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus tdh trh* Isolates
from Hat Yai Hospital

แวนูรมา เจ๊ะเมาะ
Waenurama Chemoh

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์	ลักษณะของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> ที่แยกได้จากโรงพยาบาลหาดใหญ่
ผู้เขียน	นางสาวแวนอรมา เจ๊ะเมาะ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารอักเสบ เนื่องจากการรับประทานอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนเชื้อ สายพันธุ์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่มียื่นสร้างสารพิษ *tdh* หรือ *trh* หรือมีทั้งสองยื่น อย่างไรก็ตาม เชื้อที่แยกจากผู้ป่วยจำนวนหนึ่งตรวจไม่พบยื่น *tdh* และ *trh* งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 76 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่ระหว่างปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 ผลการศึกษาพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบให้ α -hemolysis บน Wagatsuma agar แสดงว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลตไม่มียื่น *tdh* ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำ Southern blot hybridization ยืนยันว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลตไม่มียื่น *tdh* และ *trh* จากการทดสอบซีโรทัยป์ของเชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต พบซีโรทัยป์ O11:KUT สูงที่สุด (23.7%) รองลงมาคือ O5:KUT (10.5%), O12:KUT (9.2%) และ O1:KUT (6.6%) ตามลำดับ เมื่อศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์โดยเทคนิค Arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR) พบว่า เชื้อที่มีซีโรทัยป์เหมือนกันส่วนใหญ่จะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน แสดงว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกจากผู้ป่วยมีความหลากหลายของสายพันธุ์สูงมาก เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จึงทำการตรวจสอบ type III secretion system (TTSS) ในเชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) พบว่า เชื้อทุกไอโซเลตมี TTSS1 แต่มี 2 ไอโซเลต ที่มี TTSS2 ซึ่ง TTSS2 จะพบอยู่ร่วมกับยื่น *tdh* บน pathogenicity island ดังนั้น มีความเป็นไปได้ที่ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 2 ไอโซเลตนี้เคยมียื่น *tdh* แต่เกิดการหายไปของยื่น *tdh* (gene deletion) ในผู้ป่วยขณะที่กำลังติดเชื้อ การศึกษาการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* เทียบกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* และ *tdh⁻ trh⁻* ในลำไส้หนู พบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh⁺* เกาะติดได้มากที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺* ในขณะที่ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh⁻* เกาะติดได้น้อยที่สุดและไม่มีความแตกต่างกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁻* จึงสรุปได้ว่า การเกาะติดมีความสัมพันธ์กับยื่น *trh* แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับยื่น *tdh* เมื่อทดสอบความสามารถในการ

สร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺* ที่แยกจากผู้ป่วยสร้างไบโอฟิล์มได้สูงที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมสร้างไบโอฟิล์มได้สูงกว่าสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากผู้ป่วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไบโอฟิล์มเป็นปัจจัยสำคัญในการอยู่รอดของเชื้อในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายสูง เมื่อตรวจสอบแบบแผนการสร้างโปรตีนในเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* พบโปรตีนขนาดประมาณ 40 kDa ในสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* และ *tdh⁻ trh⁺* แต่ไม่พบในสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ท้ายสุด การศึกษานี้ได้ทำ transposon mutagenesis เพื่อยับยั้งยีนที่ควบคุมการสร้าง hemolysin TLH, flagella, protease และ gelatinase เพื่อศึกษาว่า ยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* หรือไม่ แต่จากการตรวจสอบเชื้อจำนวน 1,800 โคลนที่ได้ พบว่าไม่สามารถยับยั้งยีนดังกล่าวได้ จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากผู้ป่วยส่วนหนึ่งเป็นเชื้อที่มียีน *tdh* แต่ที่ตรวจไม่พบอาจเนื่องมาจากเกิดการหายไปของยีน *tdh* ในผู้ป่วยขณะที่กำลังติดเชื้อ

Thesis Title Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus tdh trh* Isolates from
Hat Yai Hospital
Author Miss Waenurama Chemoh
Major Program Microbiology
Academic Year 2008

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is a causative agent of gastroenteritis due to consumption of contaminated seafood. Pathogenic strains possess *tdh* or *trh* or both. However, some of clinical isolates lack of these genes. In this study, 76 isolates of *tdh trh V. parahaemolyticus* obtained from patients at Hat Yai hospital during 2000-2005 were investigated. All isolates showed α -hemolysis on Wagatsuma agar. The absence of the *tdh* and *trh* genes were confirmed by Southern blot hybridization. *V. parahaemolyticus* O11:KUT was detected predominantly (23.7%) followed by O5:KUT (10.5%), O12:KUT (9.2%) and O1:KUT (6.6%). Using arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR) technique, most DNA profiles of isolates with the same serotypes were different indicated that patients were infected with different clones. In order to investigate whether these *tdh trh* isolates possess other virulence factors, all isolates were investigated for the type III secretion system (TTSS) by polymerase chain reaction (PCR) technique. The result showed all isolates possessed TTSS1 and 2 out of 76 isolates possessed TTSS2. TTSS2 and *tdh* are located in pathogenicity island, therefore it is possible that 2.6% of *tdh trh* isolates harbored *tdh* virulence gene but *tdh* deletion might occur during infection. Adherence to rat intestinal mucosa of *V. parahaemolyticus* was determined. Highest adherence was observed in *V. parahaemolyticus tdh trh*⁺ isolates and it was not significantly different from *tdh*⁺ *trh*⁺ isolates. Adherence of *V. parahaemolyticus tdh trh* isolates was lowest and it was not significantly different from *tdh*⁺ *trh* isolates. These results indicated correlation between *trh* gene and adherence but not *tdh* gene. Biofilm formation of *V. parahaemolyticus* from clinical and environmental isolates was investigated. In clinical isolates, highest biofilm formation was detected in *V. parahaemolyticus tdh trh*⁺ isolates, whereas less biofilm formation was detected in *V. parahaemolyticus tdh trh* isolates. However, *V.*

parahaemolyticus tdh⁻ trh⁻ isolates from environment showed biofilm formation higher than clinical *tdh⁻ trh⁻* isolates. This is probably due to biofilm is an important mechanism of bacteria to survive in natural environment with different conditions. Protein profiles in cell of *V. parahaemolyticus* was determined by SDS-PAGE technique. Approximately 40 kDa protein band was detected in *V. parahaemolyticus tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* and *tdh⁻ trh⁺* isolates but not in *tdh⁻ trh⁻* isolates. To determine whether *tdh⁻ trh⁻* isolates possess other virulence factors such as TLH, flagella, protease and gelatinase, transposon mutagenesis was performed in one *tdh⁻ trh⁻* isolates (PSU1751). A total of 1,800 clones were selected and screened for *tth* gene deletion, motility, protease and gelatinase production. None was found to loss of those characters. In conclusion, this study demonstrated that clinical *V. parahaemolyticus tdh⁻ trh⁻* isolated from some patients possessed *tdh* gene but deletion of this gene might occur during infection.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	32
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	33
อุปกรณ์	35
วิธีการทดลอง	37
3. ผลการทดลอง	53
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	71
5. สรุปผลการทดลอง	76
เอกสารอ้างอิง	78
ภาคผนวก ก	102
ภาคผนวก ข	107
ภาคผนวก ค	115
ภาคผนวก ง	116
ประวัติผู้เขียน	117

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ลักษณะทางชีวเคมีของ <i>Vibrio</i> spp.	4
2.1 ลำดับเบสของ primers และขนาดของผลผลิต PCR	49
3.1 จำนวนและซีโรทัยป์ของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh⁻ trh⁻</i> ใน พ.ศ. 2543 ถึง 2548	60
3.2 ผลการตรวจสอบ TTSS1 และ TTSS2 ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh⁻ trh⁻</i>	66
3.3 ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh⁻ trh⁻</i> เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ <i>tdh⁺ trh⁻</i> , <i>tdh⁺ trh⁺</i> , <i>tdh⁻ trh⁺</i> ซึ่งแยกจากผู้ป่วยและสายพันธุ์ <i>tdh⁻ trh⁻</i> ซึ่งแยกจากสิ่งแวดล้อม	68

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ลักษณะและการทำงานของ TTSS	17
1.2 การเรียงตัวของกลุ่มยีน TTSS1 ของ <i>V. parahaemolyticus</i>	18
1.3 การเกาะติดแบบจำเพาะระหว่างเซลล์เจ้าบ้านและพื้นผิวของแบคทีเรีย	22
1.4 ขั้นตอนการพัฒนาไบโอฟิล์ม	26
1.5 เทคนิค southern blotting	30
2.1 พลาสมิดของเชื้อ <i>E. coli</i> SM10 pSC189	48
2.2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform	50
2.3 ขั้นตอนการตรวจยืนยันยีน <i>tdh</i> , <i>trh1</i> และ <i>trh2</i> โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอ แล้วใช้ดีเอ็นเอตรวจจับด้วยวิธี Southern blot hybridization	51
3.1 ผลการทำ PCR เพื่อตรวจหา ยีน <i>toxR</i> , <i>tdh</i> , <i>trh</i> , <i>vcrD</i> , <i>vopT</i> และ VPA1335	54
3.2 จำนวนเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ทั้งหมด และ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> ที่แยกได้จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ระหว่างปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548	55
3.3 ลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน Wagatsuma agar ของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh⁺ trh⁺</i> , <i>tdh⁺ trh⁻</i> , <i>tdh⁻ trh⁺</i> และ <i>tdh⁻ trh⁻</i>	56
3.4 Southern blot hybridization ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> เมื่อใช้ยีน <i>tdh</i> เป็นตัวตรวจจับ	57
3.5 Southern blot hybridization ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> เมื่อใช้ยีน <i>trh1</i> เป็นตัวตรวจจับ	58
3.6 Southern blot hybridization ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> เมื่อใช้ยีน <i>trh2</i> เป็นตัวตรวจจับ	59
3.7 AP- PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> ซีโรทัยป์ O11:KUT ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 โดยใช้ primer 2	62
3.8 AP- PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> ซีโรทัยป์ O11:KUT ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 โดยใช้ primer 4	63
3.9 AP- PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> ซีโรทัยป์อื่นๆ ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543 ถึง 2544 โดยใช้ primer 2	64
3.10 AP- PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ <i>tdh trh</i> ซีโรทัยป์อื่นๆ ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2548 โดยใช้ primer 2	65

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.11 จำนวน <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$, $tdh^+ trh^-$, $tdh^- trh^+$ และ $tdh^- trh^-$ ที่เกาะติดกับลำไส้เล็กของหนูขาว	67
3.12 รูปแบบของโปรตีนในเซลล์ของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	69

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

μl	=	microliter
ml	=	milliliter
L	=	liter
cm	=	centimeter
mm	=	millimeter
nm	=	nanometer
g	=	gram
ng	=	nanogram
μg	=	microgram
μm	=	micrometer
A	=	adenine
T	=	thymine
C	=	cytosine
G	=	guanine
W	=	wobble A/T
R	=	wobble A/G
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphates
dUTP	=	deoxyuracil triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
Tris	=	Tris (hydroxyl methyl) aminomethane
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
PCR	=	polymerase chain reaction
bp	=	base pair
kb	=	kilobase
kDa	=	kilodalton
NaCl	=	sodium chloride
mA	=	milliampere
KUT	=	untypeable

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

NBT	=	nitroblue tetrazolium chloride
BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
pH	=	hydrogen ion concentration
OD	=	optical density
cfu	=	colony forming unit
%	=	percentage
°C	=	degree celcius
ชม.	=	ชั่วโมง

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง ขอบเกลื่อ เคลื่อนที่ในอาหารเหลวโดยอาศัยแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ขั้ว (single polar flagellum) *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อก่อโรคในคน มีแหล่งธรรมชาติอยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย มักพบได้บ่อยในกุ้ง หอย ปู และปลาหลายชนิด การบริโภคอาหารทะเลดิบที่มีการปนเปื้อนเชื้อจะทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร อักเสบซึ่งมีอาการท้องเสีย ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และมีไข้ต่ำ เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญไปทั่วโลก (Su and Liu, 2007) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยสามารถสร้างสารพิษชนิดทนความร้อน เรียกว่า thermostable direct hemolysin (TDH) และหรือ TDH-related hemolysin (TRH) ซึ่งควบคุมโดยยีน *tdh* และหรือ *trh* ตามลำดับ มีรายงานจากประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อินเดีย และหลายๆ ประเทศทางเอเชียรวมทั้งอเมริกา พบว่า มากกว่าร้อยละ 50 ของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากอาหารทะเลมีสาเหตุจาก *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางบาดแผล 34% และการติดเชื้อในกระแสโลหิต 5% (Daniels *et al.*, 2000)

ใน ค.ศ. 1996 ที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดีย เกิดการระบาดของใหญ่ของสายพันธุ์ O3:K6 และเกิดการระบาดอย่างต่อเนื่องในหลายๆ ประเทศทางทวีปเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน รวมทั้งประเทศอเมริกา จัดได้ว่า O3:K6 นี้เป็น pandemic strain และเป็นสายพันธุ์ใหม่เมื่อเปรียบเทียบกับ O3:K6 ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 สายพันธุ์ใหม่ที่พบนี้เป็นสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* แต่ไม่มียีน *trh* (*tdh*⁺ *trh*⁻) นอกจากนี้ใน ค.ศ. 1998 พบสายพันธุ์ O4:K68, O1:K25, O1:KUT (untypeable) ระบาดใน 12 ประเทศ (WHO, 1999; Chowdhury *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Bhuiyan *et al.*, 2002) และพบการระบาดของสายพันธุ์ O1:K41, O1:K56, O3:K75, O4:K8, O4:K12, O4:KUT และ O5:KUT ในประเทศเวียดนาม (Chowdhury *et al.*, 2004) จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ Group specific polymerase chain reaction (GS-PCR) พบว่า สายพันธุ์เหล่านี้เป็นสายพันธุ์เดียวกับ pandemic strain ซีโรทัยป์ O3:K6 ที่กำลังระบาดอยู่

ในประเทศไทย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ทำการเฝ้าระวังเชื้อสายพันธุ์นี้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 (ค.ศ. 2000) พบว่า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึง

2548 พบเชื้อสายพันธุ์ pandemic strain (*tdh*⁺ *trh*⁻, GS-PCR บวก) แยกจากโรงพยาบาล หาดใหญ่มีจำนวน 64.1%, 67.5%, 69.7%, 68.5%, 56.1% และ 55.5% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบเชื้อจำนวนหนึ่งที่แยกจากผู้ป่วยในช่วงเวลาดังกล่าวไม่มียีน *tdh* และ *trh* (*tdh*⁻ *trh*⁻) เป็นจำนวน 12.5%, 6.5%, 9.8%, 5.5%, 9.3% และ 9.7% ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงสนใจศึกษาลักษณะของเชื้อนี้ว่ามีปัจจัยใดเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรคในคน

การตรวจเอกสาร

1. จีแนส *Vibrio*

จีแนส *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในแฟมิลี *Vibrionaceae* ประกอบด้วย 1 จีแนส คือ *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2004) *Vibrio* มีแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติทั้งในน้ำทะเล น้ำกร่อย และอยู่บนผิวนอก ตลอดจนลำไส้ของสัตว์ทะเล (Fouz *et al.*, 1990) จีแนส *Vibrio* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 69 สปีชีส์ และ 1 biovar (Vuddhakul, 2008) แต่สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Balows *et al.*, 1992) *Vibrio* หลายสปีชีส์ สามารถก่อโรคได้ในสัตว์ทะเลที่มีกระดุกสันหลังและไม่มีกระดุกสันหลัง (Maugeri *et al.*, 2000) โดยสปีชีส์ที่ก่อโรคจะทำให้เกิดความรุนแรงได้แตกต่างกันขึ้นกับปัจจัย ได้แก่ enterotoxin, haemolysin, cytotoxin, protease, lipase, phospholipase, siderophore, adhesive factor และหรือ haemagglutinin (Austin and Austin, 1999; Shinoda, 1999) *Vibrio* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีลักษณะเป็นท่อนหรือโค้งเล็กน้อย (curved rod-shaped) มีขนาดความยาว 1.4 μm ถึง 2.6 μm และกว้าง 0.5 μm ถึง 0.8 μm สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลวโดยอาศัยแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ขั้ว *Vibrio* ไม่สร้างเอนโดสปอร์หรือไมโครซิส (microcyst) สามารถสร้างพลังงานในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) และมีกระบวนการ เมแทบอลิซึมได้ทั้งแบบการหายใจ (respiration) และการหมัก (fermentation) เชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่มีเอนไซม์ oxidase (ยกเว้น *V. metschnikovii*) สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยทั่วไปใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งของไนโตรเจน *Vibrio* หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้แก่ gelatinase, amylase, chitinase และ DNase (Joseph *et al.*, 1982) *Vibrio* ส่วนใหญ่ไวต่อ vibriostatic agent O129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการทดสอบการวินิจฉัยเชื้อ เชื้อในจีแนส *Vibrio* ให้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1.1) *Vibrio* เจริญได้ในสภาวะที่มีระดับของเกลือน้ำดีสูง และต้องการโซเดียมไอออนในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ ซึ่งความเข้มข้นของเกลือมีช่วงที่กว้าง ทำให้สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็มแตกต่างกัน (Oliver *et al.*, 1983) *Vibrio* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20°C ถึง 37°C และสามารถเจริญได้ดีที่ pH เป็นกลางและ pH เป็นด่างได้ถึง pH 9.0 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกเชื้อ (selective media) และเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment media) *Vibrio* จึงมี pH อยู่ระหว่าง 8.0 ถึง 8.6 (Colwell *et al.*, 1974)

ตารางที่ 1.1 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Vibrio* spp.

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
TCBS	Y	Y	Y	G	Y	Y	N	Y	G	G	G
mCPC	N	P	nd	N	N	N	N	N	N	N	Y
AGS	KA	Ka	nd	nd	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA
Growth (0% NaCl)	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Growth (3% NaCl)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth (6% NaCl)	+	-	+	V	+	+	+	+	-	+	+
Growth (8% NaCl)	+	-	-	-	V	+	-	V	-	+	-
Growth (10% NaCl)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	+	-	-	V	-	nd	V	+	+	+
Sucrose	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Cellobiose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	V	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	V
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ONPG	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer	+	V	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	V	-	-	-	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Sensitivity O/129 (10 µg)	R	S	R	S	R	R	nd	S	S	R	S
Sensitivity O/129 (150 µg)	S	S	S	S	S	S	nd	S	S	S	S
Gelatinase	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Urease	-	-	-	+	-	-	-	-	-	V	-

Y, yellow; G, green; P, purple; N, no growth; nd, not determined; K, alkaline; A, acid; a, mildly acid; +, 80% (or more) of strains are positive; 80% (or less) of strains are negative; V, variable reaction; S, sensitive; R, resistant; *V. hollisae* = *G. hollisae*. Adapted from Poda (1997)

2. การเพาะแยกเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อโดยทั่วไปใช้วิธีดั้งเดิม โดยการนำตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ (pre-enrichment) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อแยกเชื้อ (selective media) หลังจากนั้นนำไปศึกษาลักษณะรูปร่าง ปฏิกริยาชีวเคมี และปฏิกริยาทางน้ำเหลือง (serological characterization) วิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อและบ่งชี้เชื้อ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (FDA, 2004) ให้นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบใส่ใน alkaline peptone water (APW) ซึ่งมีเกลือ 1% ถึง 2% เพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงบน Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS) ซึ่งสามารถแยกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักน้ำตาลซูโครสได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสจะมีโคโลนีสีเหลือง ได้แก่ *V. cholerae*, *V. metschnikovii*, *V. fluvialis*, *V. cincinnatiensis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus* และ *V. carchariae* ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสจะให้โคโลนีสีเขียว ได้แก่ *V. parahaemolyticus* และ *V. mimicus* จากนั้นนำโคโลนีที่สงสัย ไปเลี้ยงบนอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) แล้วย้อมสีแกรมและทดสอบปฏิกริยาชีวเคมี ได้แก่ motility, oxidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ortho-nitrophenil-galacto-pyranoside (ONPG), การหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส เซลโลไบโอส (cellobiose) และลักษณะความชอบเกลือ (halophilic characteristics) ตาม Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Tantillo *et al.*, 2004) *Vibrio* หลายสปีชีส์ อาจแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน เช่น cellobiose polymyxin B colistin (CPC) ใช้ในการแยกเชื้อ *V. vulnificus* และ *V. cholerae* โดยโคโลนีของ *V. cholerae* จะมีสีม่วง (ไม่สามารถหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส) เมื่อเทียบกับโคโลนีของ *V. vulnificus* ซึ่งมีสีเหลืองจากการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส (Donovan and van Netten, 1995) Hara-Kudo และคณะ (2001) ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อและอาหารที่ใช้คัดเลือก *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเล โดยนำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหาร salt tryptic soy broth เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ หลังจากนั้นเลี้ยงในอาหาร salt polymyxin broth (selective medium) แล้วถ่ายเชื้อลงบนอาหาร Chromogenic agar medium ที่มีชื่อว่า CHROM agar *Vibrio* (CV) ซึ่งมี substrate สำหรับเอนไซม์ β -galactosidase ผลการทดลองพบว่า *V. parahaemolyticus* ให้โคโลนีสีม่วง ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียอื่นๆ นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อในอาหาร salt tryptic soy broth และ salt polymyxin broth มีประสิทธิภาพมากกว่าการเลี้ยงในอาหาร salt polymyxin broth เพียงอย่างเดียว และการใช้ CV แยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลมีความไวและแม่นยำมากกว่าการใช้ TCBS (Hara-Kudo *et al.*, 2001)

3. *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีขนาดความยาว 1.4 μm ถึง 2.6 μm และกว้าง 0.5 μm ถึง 0.8 μm ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ขั้ว แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งหรือในสิ่งแวดล้อมที่มีความหนืดสูงหรือบนพื้นผิวจะมีการชักนำให้เชื้อสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์ (lateral flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ *V. parahaemolyticus* สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส แต่หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแต่ไม่ให้เกิด ดังนั้นลักษณะโคโลนิบนอาหาร TCBS มีสีเขียวอมน้ำเงินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ถึง 3 mm นอกจากนี้ยังสามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) และแมนโนส (mannose) แต่ไม่สามารถหมักซาลิซิน (salicin) และเซลโลไบโอส สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโน ทริปโตเฟนเป็น indole *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 5°C ถึง 43°C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37°C เวลาที่เชื้อใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (generation time) เท่ากับ 9 นาที ถึง 10 นาที pH ช่วงที่เหมาะสมคือ 7.8 ถึง 8.6 ไม่เจริญในที่ที่มีกรดอะซิติก 0.1% (pH 5.1) และปริมาณความชื้นที่เชื้อใช้ในการเจริญเติบโต (water activity หรือ aw) อยู่ในช่วง 0.940 ถึง 0.996 แต่ aw ที่เหมาะสมคือ 0.980 (Lake *et al.*, 2003) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แต่จะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน นอกจากนี้ NaCl ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของ NaCl ที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.5% ถึง 8% แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2% ถึง 3% (Lee, 1990)

V. parahaemolyticus มีแหล่งธรรมชาติในน้ำทะเลและน้ำกร่อย สามารถแยกได้จากน้ำทะเลทั่วโลกทั้งในโซนเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Joseph *et al.*, 1982) พบได้ทั่วไปในอาหารทะเลหลายชนิด รวมทั้งปลา สัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้ม และสัตว์จำพวกหอย โดยในสัตว์จำพวกหอย เช่น หอยนางรม หอยกาบ และหอยแมลงภู่ ซึ่งกินอาหารโดยการกรองจากน้ำ เชื้อจะเพิ่มจำนวนและเกาะติดอยู่ในลำไส้ (FDA, 2005) นอกจากนี้สามารถพบเชื้อในแพลงก์ตอนสัตว์ (Kaneko and Colwell, 1975) โดยเชื้อดูดซับสารโคตินนบนแพลงก์ตอน เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะย่อยผนังเซลล์ของแพลงก์ตอน และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในทะเล (Kaneko and Colwell, 1975) *V. parahaemolyticus* สามารถดำรงชีวิตได้หลากหลาย เช่น ล่องลอยเป็นอิสระหรือเกาะติดกับหอยแบบพึ่งพาอาศัยกันหรืออยู่ใต้ท้องเรือหรือพื้นผิวอื่นๆ ในทะเลหรือในเซลล์เจ้าบ้าน (host) (Makino *et al.*, 2003) จากการศึกษาพบว่า ฤดูกาลมีอิทธิพลต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเล โดยในช่วงฤดูหนาวเชื้อจะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้น้ำ แต่เมื่อถึงฤดูร้อน น้ำทะเลจะมีอุณหภูมิที่สูงขึ้นซึ่งเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนและมีการปนเปื้อนในน้ำทะเลมากขึ้น ส่งผลให้พบเชื้อได้มากที่สุด อย่างไรก็ตามเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากน้ำทะเลมากกว่า 99% ไม่ทำให้เกิดโรคในคนเนื่องจากตรวจไม่

พบยื่นสร้างสารพิษ (Cook *et al.*, 2002) นอกจากนี้ในช่วงฤดูหนาวเชื้ออาจอยู่ในสภาวะที่เรียกว่า viable but non culturable (VBNC) state ซึ่งเป็นสภาวะที่ยังมีชีวิต แต่มีเมแทบอลิซึมต่ำ และไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งได้ สภาวะ VBNC เป็นการตอบสนองของเชื้อเพื่อให้อยู่รอดได้ในสภาวะที่กดดัน (stress) เช่น อุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ปริมาณสารอาหารน้อย หรือแรงดันออสโมติกสูง (James, 2005) จากการทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร minimum salt medium (MMS) ที่มี 0.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ชักนำให้เชื้อเข้าสู่สภาวะ VBNC โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์ใช้เวลาในการเข้าสู่สภาวะนี้ได้แตกต่างกัน และเมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิที่เลี้ยงจาก 4°C เป็น 25°C เชื้อสามารถฟื้นกลับมาเจริญเติบโตบนอาหารแข็งได้ (Wong *et al.*, 2004) มีรายงานการเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ที่อยู่ในสภาวะ VBNC บนอาหารแข็งที่เติมเอนไซม์ catalase หรือ sodium pyruvate พบว่า เชื้อสามารถฟื้นกลับมาเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ catalase ไปย่อยสลาย H₂O₂ ที่อยู่รอบๆ เซลล์ ทำให้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Mizunoe *et al.*, 2000) นอกจากนี้ เชื้อสามารถทนทานต่ออุณหภูมิสูง (ที่ 42°C และ 47 °C) ความเข้มข้นของเกลือต่ำ (0% NaCl) และสภาวะเป็นกรดได้มากขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะ VBNC (Wong and Wang, 2004)

จากการศึกษาจีโนมของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 ซึ่งแยกจากผู้ป่วย (ซีโรทัยป์ O3:K6 และสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Wagatsuma agar เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า Kanagawa phenomenon (KP) positive หรือ KP บวก) พบว่า *V. parahaemolyticus* มีโครโมโซม 2 ชุด ที่มีขนาด 3,288,558 bp และ 1,877,212 bp และมี 4,832 ยีน แม้ว่า *V. parahaemolyticus* จะมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *V. cholerae* แต่การเรียงตัวของยีนภายในโครโมโซมมีความแตกต่างกัน โครโมโซมชุดที่ 1 มีขนาดไม่แตกต่างมากนักกับ *V. cholerae* แต่โครโมโซมชุดที่ 2 มีขนาดใหญ่กว่า *V. cholerae* มาก ยีนส่วนใหญ่ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดจะอยู่บนโครโมโซมชุดที่ 1 อย่างไรก็ตาม พบยีนหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญอยู่บนโครโมโซมชุดที่ 2 จึงกล่าวได้ว่าโครโมโซมชุดที่ 2 มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการอยู่รอดด้วย นอกจากนี้ภายในโครโมโซมชุดที่ 2 ยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการถอดรหัสของยีนและการขนส่งสารต่างๆ มากกว่าโครโมโซมชุดที่ 1 ซึ่งยีนเหล่านี้มีบทบาทในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่า โครโมโซมชุดที่ 2 น่าจะมีบทบาทในการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้พบ mobile genetic elements, phage region และ บางส่วนของ DNA region ในโครโมโซมชุดที่ 2 ซึ่งมีปริมาณ G+C ต่างจากปริมาณ G+C เฉลี่ยของจีโนม ลักษณะเช่นนี้บ่งชี้ได้ว่า บริเวณเหล่านี้เป็นดีเอ็นเอแปลกปลอมที่มีการถ่ายโอนมาจากแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่น (horizontal transfer) นอกจากนี้ยังพบ pathogenicity island (PAI) อยู่ในโครโมโซมชุดที่ 2 ด้วย (Makino *et al.*, 2003)

V. parahaemolyticus มีโครงสร้างทางแอนติเจน 3 ชนิดคือ แอนติเจนที่แฟลกเจลลา (H antigen) แอนติเจนที่ผนังเซลล์ (O antigen) และแอนติเจนที่แคปซูล (K antigen) โดย K antigen มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อน สามารถกำจัดออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยการให้ความร้อนเป็นเวลา 1-2 ชม. ที่อุณหภูมิ 100°C ขั้นตอนนี้จะทำให้ O antigen ฝอยออกมาเนื่องจาก K antigen บดบัง O antigen ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำจัด K antigen ออกโดยการให้ความร้อนก่อนที่จะตรวจสอบหา O antigen ได้ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์จะมี H antigen ที่เหมือนกัน การบ่งชี้ซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* อาศัยความแตกต่างของโครงสร้าง lipopolysaccharide ของ O antigen และ K antigen (Joseph *et al.*, 1982) โดยการทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) กับแอนติซีรัมที่จำเพาะ ซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปัจจุบัน พบว่า มี O antigen 13 ชนิด และ K antigen มี 71 ชนิด (Iguchi *et al.*, 1995; Iida *et al.*, 2001)

4. การก่อโรค

V. parahaemolyticus เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษหรือทางเดินอาหารอักเสบ เนื่องจากการกินอาหารทะเลพวกกุ้ง หอย ปู ปลา ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ และจากการศึกษาพบว่า ปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่สามารถก่อให้เกิดโรค (infective dose) เท่ากับ 10^6 ถึง 10^9 ตัว (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) อาการมักปรากฏหลังจากได้รับเชื้อภายใน 4 ถึง 96 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (Barker and Gangarosa, 1974) และความเป็นกรดต่างภายในระบบทางเดินอาหาร เชื้อนี้จะเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าทุกๆ 10 นาที ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษสามารถสร้างในร่างกายหรือในอาหาร ก่อนรับประทาน ทำให้มีอาการท้องร่วงรุนแรง มีอุจจาระเหลวเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือนกุ้งเน่า มักมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง ครั้งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการอาเจียนร่วมด้วย อาการอาจคงอยู่นานถึง 10 วัน แต่ส่วนใหญ่จะทุเลาลงภายใน 3 วัน โดยไม่ต้องรักษา อัตราการตายต่ำ โรคนี้มักพบในฤดูร้อน โดยสิ่งที่ช่วยวินิจฉัยคือผู้ป่วยเกือบทุกรายมีประวัติรับประทานอาหารทะเลมาก่อนจะเกิดอาการท้องร่วงไม่กี่ชั่วโมงหรือรับประทานอาหารที่มีอาหารทะเลเกี่ยวข้อง (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550)

ใน ค.ศ. 1973 ถึง 1998 มีรายงานการติดเชื้อที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* ใน 15 รัฐของประเทศสหรัฐอเมริกาและอาณาเขต Guam ซึ่งพบการระบาด 40 ครั้ง ทำให้มีผู้ป่วยมากกว่า 1,000 ราย (Daniels *et al.*, 2000) การระบาดส่วนใหญ่เกิดขึ้นในช่วงฤดูร้อน และมีสาเหตุจากการกินอาหารทะเล โดยเฉพาะสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง ในอดีตการก่อโรคลำไส้อักเสบเนื่องจาก *V. parahaemolyticus* เกิดจากซีโรทัยป์ที่หลากหลาย (Suthienkul *et al.*, 1995) ใน ค.ศ. 1996 ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ พบผู้ป่วยที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดียติดเชื้อ *V.*

parahaemolyticus ซีโรทัยป์ O3:K6 ประมาณ 50% ถึง 80% ของ *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจพบทั้งหมด ซึ่งซีโรทัยป์ดังกล่าวมีเอ็นทีสร้างสารพิษ TDH (Okuda *et al.*, 1997b; Bag *et al.*, 1999) จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี Arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR) พบว่า ซีโรทัยป์ O3:K6 ที่พบใน ค.ศ. 1996 เป็นสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งกำเนิด (clone) เดียวกัน แต่ต่างจากสายพันธุ์ซีโรทัยป์ O3:K6 ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 หลังจากนั้น *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 ได้แพร่ระบาดไปสู่ประเทศอื่นๆ ในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ ลาว ใต้หวัน ญี่ปุ่น บังกลาเทศ เกาหลี และประเทศไทย (Chiou *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000) สายพันธุ์นี้จึงถูกกำหนดให้เป็น pandemic strain (Matsumoto *et al.*, 2000) ในประเทศไต้หวันช่วง ปี ค.ศ. 1996 ถึง 1999 พบการระบาดของเชื้อสายพันธุ์ O3:K6 จำนวน 51%, 79%, 61% และ 65% ตามลำดับ (Wong *et al.*, 2000) สำหรับประเทศไทยจากการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลาใน ค.ศ. 1998 ระหว่างเดือนกันยายนถึงตุลาคม จำนวน 23 สายพันธุ์ พบซีโรทัยป์ O3:K6 จำนวน 20 สายพันธุ์ (Vuddhakul *et al.*, 2000) นอกจากประเทศในแถบทวีปเอเชียแล้วใน ค.ศ. 1998 พบ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 แพร่ระบาดไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีผู้ป่วยจำนวน 416 คน จาก 13 รัฐ ที่มีอาการทางเดินอาหารอักเสบ หลังจากการกินหอยนางรมที่เก็บจากอ่าว Galveston โดยจากการเก็บตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยจำนวน 28 ราย พบซีโรทัยป์ O3:K6 ทั้งหมด (Daniels *et al.*, 2001) ต่อมามีการระบาดในรัฐต่างๆ อีกหลายรัฐ อย่างไรก็ตาม ตรวจไม่พบซีโรทัยป์ O3:K6 ในเชื้อที่มาจากสิ่งแวดล้อมและอาหาร (DePaola *et al.*, 2003)

ต่อมาใน ค.ศ. 1998 ที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดียและบังกลาเทศ พบ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O4:K68 และ O1:KUT ระบาดร่วมกับซีโรทัยป์ O3:K6 เมื่อศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์โดยวิธี AP-PCR, Pulse field gel electrophoresis (PFGE) และ ribotyping พบว่า ทั้งสามซีโรทัยป์มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน แสดงว่า สายพันธุ์ทั้งสามซีโรทัยป์มีแหล่งกำเนิดเดียวกัน (Chowdhury *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000) ในประเทศไทยมีการระบาดของซีโรทัยป์ O4:K68 ร่วมกับซีโรทัยป์ O3:K6 เช่นกัน แต่ไม่มีรายงานการระบาดของซีโรทัยป์ O1:KUT ซึ่งซีโรทัยป์ O4:K68 และ O3:K6 แยกมาจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลบาราศนราตุร จากการทำ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ PFGE พบว่า ทั้งสองซีโรทัยป์มาจากแหล่งเดียวกันกับ O3:K6 ในประเทศอินเดีย (Chowdhury *et al.*, 2000) นอกจากนี้พบการระบาดของซีโรทัยป์อื่นๆ ได้แก่ O1:K25, O1:K41 และ O4:K12 ร่วมกับซีโรทัยป์ O3:K6 ซึ่งแยกมาจากผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียจากโรงพยาบาลหาดใหญ่และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคมใน ค.ศ. 1999 ผลจากการทำ AP-PCR พบว่า ซีโรทัยป์ O1:K25, O1:K41, O4:K12 และ O3:K6 มีแหล่งกำเนิดเดียวกันกับซีโรทัยป์ O3:K6 ในประเทศอินเดีย (Laohaprerthisan *et al.*, 2003) Matsumoto และคณะ (2000) ได้พัฒนาการตรวจสอบแยก pandemic strain ของเชื้อ *V.*

parahaemolyticus ออกจาก non-pandemic strain โดยอาศัยความแตกต่างของยีนส่วน *toxRS* ทำให้สามารถแยก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ O3:K6 ที่พบใน ค.ศ. 1996 และ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์อื่นที่มีแหล่งกำเนิดเดียวกันออกจากสายพันธุ์ O3:K6 ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 เรียกวิธีนี้ว่า GS-PCR (Matsumoto *et al.*, 2000)

5. ปัจจัยที่ก่อความรุนแรงของโรค

5.1 Thermostable direct hemolysin (TDH)

V. parahaemolyticus ที่แยกจากผู้ป่วยซึ่งมีอาการทางเดินอาหารอักเสบ ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ (β -hemolysis) บนอาหารเติมเลือด (blood agar) ชนิดพิเศษชื่อ Wagatsuma agar ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารชนิดนี้เรียกว่า Kanagawa phenomenon (KP) (Kaper *et al.*, 1984; Nishibuchi and Kaper, 1985) ซึ่งเกิดจาก thermostable direct hemolysin (TDH) โดย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยพบ KP บวก ประมาณ 88 ถึง 96% ในขณะที่สายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมพบ KP บวก เพียง 1 ถึง 2% เท่านั้น (Miyamoto *et al.*, 1969) ดังนั้น TDH จึงน่าจะเป็นปัจจัยหลักที่ก่อความรุนแรงของโรคทางเดินอาหารอักเสบ และ KP ใช้เป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นสำหรับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้าง TDH (Miyamoto *et al.*, 1969; Takeda, 1988; Nishibuchi and Kaper, 1995) TDH จัดเป็น pore-forming toxin โดยทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 nm และทำให้เซลล์แตกในเวลาต่อมา ขั้นตอนการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ TDH มี 3 ขั้นตอน คือ จับกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง (Honda *et al.*, 1992) ในขั้นตอนที่ TDH จับกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น พบว่า TDH ชักนำให้เกิด phosphorylation ของโปรตีนขนาด 25 kDa ของเซลล์เจ้าบ้าน (Yoh *et al.*, 1996) TDH สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น คน สุนัข หนู และให้ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงกระต่ายและแกะดำ แต่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงม้า เนื่องจากที่ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงม้าไม่มี neuraminidase-sensitive ganglioside G_{T1} และ G_{D1a} โดยเฉพาะ G_{T1} ซึ่งเป็นบริเวณตัวรับ (receptor) ของ TDH (Takeda *et al.*, 1976) TDH มีผลทำให้ไมโครวิลไลที่อยู่บนพื้นผิวของเซลล์ FL (human amniotic membrane) มีจำนวนลดลงและรูปร่างมีการเปลี่ยนแปลง เกิดการย่อยสลายของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส (Sakurai *et al.*, 1976) TDH ชักนำให้ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ IEC-6 (rat crypt small intestinal cell) อย่างรวดเร็วและไปลดพัฒนาการของการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Fabbri *et al.*, 1999) นอกจากนี้การทำปฏิกิริยาระหว่าง TDH และตัวรับใน rabbit intestinal mucosa มีผลทำให้ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นแล้วไปชักนำให้มีการหลั่งของ Cl^- (Raimondi *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 2000a) นอกจากผลของการย่อยสลาย

เม็ดเลือดแดงและความเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว TDH ยังทำให้สัตว์ทดลองตายเนื่องจากไปเพิ่ม vascular permeability ในผิวหนังของกระต่าย เป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxicity) และทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ (enterotoxicity) เมื่อทดสอบในลำไส้เล็กของกระต่าย (rabbit ileal loop) (Miyamoto *et al.*, 1980)

TDH เป็น tetrameric protein มีน้ำหนักโมเลกุล 75 kDa ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อย แต่ละหน่วย มีขนาดประมาณ 18 kDa (Hamada *et al.*, 2007) TDH ไม่มีไลปิดหรือคาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบ ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที (Taniguchi *et al.*, 1985) และมีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.9 (Honda *et al.*, 1988) แต่ละสายของเปปไทด์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 165 ตัว (เมื่อรวมกับ signal peptide จะมีกรดอะมิโน 189 ตัว) และมีพันธะไดซัลไฟด์ 1 พันธะที่ C-terminal (Zhang and Austin, 2005) บริเวณ N-terminal มีความเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการจับกับเซลล์เป้าหมาย ในขณะที่บริเวณใกล้กับ C-terminal เกี่ยวข้องกับขั้นตอนหลังจากจับกับเซลล์เป้าหมายแล้ว (Tang *et al.*, 1997) TDH ถูกควบคุมโดยยีน *tdh* และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่เป็น KP บวก ส่วนใหญ่มียีน *tdh 2* ชุด คือ *tdh1* และ *tdh2* ส่วนสายพันธุ์ KP ลบ ไม่มียีน *tdh* หรือมียีน *tdh* เพียงชุดเดียว ทำให้มีการแสดงออกของยีนต่ำจึงไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน Wagatsuma agar หรือเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงต่ำ (weak hemolysis) จากการศึกษาาระดับการแสดงออกของยีน *tdh* พบว่า ยีน *tdh2* มีการแสดงออกสูงกว่ายีน *tdh1* ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีน *tdh2* มีความแรงและมีระดับของการถอดรหัสสูงกว่ายีน *tdh1* (Okuda and Nishibuchi, 1998) ดังนั้นยีนที่มีความสำคัญในการทำให้เกิดปรากฏการณ์ KP คือยีน *tdh2* (Nishibuchi and Kaper, 1990; Nishibuchi *et al.*, 1991) ความแตกต่างของความแรงของโปรโมเตอร์ (promoter strength) ระหว่างยีน *tdh1* และ *tdh2* เกิดจากความแตกต่างของเบส ที่อยู่ภายในโปรโมเตอร์ของยีน *tdh2* ในตำแหน่งที่ -24 (G) และ -34 (A) ในขณะที่โปรโมเตอร์ของยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่เป็น KP ลบ มีความแตกต่างกับโปรโมเตอร์ของยีน *tdh2* ตรงเบสในตำแหน่งที่ -34 (G) การแทนที่เบสในตำแหน่ง -34 (จาก G เป็น A) ในโปรโมเตอร์ของยีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP ลบ เพียงตำแหน่งเดียวทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *tdh* เพิ่มขึ้นเป็น KP บวก ดังนั้นยีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP ลบ จึงมีความสำคัญเพราะสามารถเปลี่ยนเป็น KP บวก ได้โดยการกลายพันธุ์เพียงหนึ่งตำแหน่งในบริเวณโปรโมเตอร์ (Okuda and Nishibuchi, 1998) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่างๆ ทำให้พบยีน *tdh1* ถึง *tdh5*, *tdhA*, *tdhS*, *tdhX*, *tdhI* และ *tdh/II* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากกว่า 97% ดังนั้นยีน *tdh* ทั้งหมดน่าจะเป็นยีนกลุ่มเดียวกัน (Nishibuchi and Kaper, 1995) ยีน *tdh* ส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซม ยกเว้นยีน *tdh4* อยู่บนพลาสมิด (Nishibuchi and Kaper, 1990; Okuda and Nishibuchi, 1998) การศึกษาผลของ pH ต่อการสร้าง TDH

พบว่า TDH จะสร้างได้สูงในช่วง pH 5.5-6.5 และสร้างในระยะ late exponential phase หรือ early stationary phase (Cherwonogrodzky and Clark, 1981) ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง TDH ได้แก่ เวลาที่บ่มเชื้อ ความเข้มข้นของ NaCl, น้ำตาล และกรดอะมิโนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Miyamoto *et al.*, 1969; Chun *et al.*, 1975; Cherwonogrodzky *et al.*, 1984) นอกจากนี้กรดน้ำดีมีผลไปเพิ่มการสร้าง TDH ภายในเซลล์ผ่านกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด โดยในน้ำดีมี glycocholic acid (GC) และ taurocholic acid (TC) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่จำเป็นต่อการสร้าง TDH ของ *V. parahaemolyticus* การเติม TC หรือ GC ปริมาณ 5 mM/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สร้าง TDH ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติม 4 ถึง 16 เท่า (Osawa and Yamai, 1996) จากการศึกษาโดยใช้ตัวตรวจจับดีเอ็นเอ พบยีน *tdh* ใน *V. mimicus* และ *V. cholerae* non-O1 บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Honda *et al.*, 1986; Nishibuchi *et al.*, 1990) และพบใน *Grimontia hollisae* (เดิมชื่อ *Vibrio hollisae*) ทุกสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อม (Nishibuchi *et al.*, 1988; Nishibuchi *et al.*, 1985) โดยยีน *tdh* ที่พบในทั้งสามสปีชีส์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *tdh* ถูกขนานข้างด้วย insertion sequence-like elements ซึ่งน่าจะทำให้ยีน *tdh* สามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งได้ (transposable unit) และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีน *tdh* ระหว่างโครโมโซมและพลาสมิดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดย transposition หรือ transduction (Terai *et al.*, 1991)

5.2 Thermostable direct hemolysin related hemolysin (TRH)

จากการระบาดของโรคทางเดินอาหารอักเสบบนเกาะมัลดีฟ พบ *V. parahaemolyticus* ในผู้ป่วยที่เป็นสายพันธุ์ KP ลบ สามารถสร้าง hemolysin ชนิดใหม่ คือ TDH-related hemolysin (TRH) (Honda *et al.*, 1987; Honda *et al.*, 1988) ซึ่งมีคุณลักษณะทาง biological immunological และ physiochemical คล้ายคลึงกับ TDH โดยทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้เล็กของกระต่ายและชักนำให้เกิดอุจจาระร่วง นอกจากนี้ TRH ยังกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ Cl⁻ ในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ของคน (human colonic epithelial cell) เช่นเดียวกับ TDH (Takahashi *et al.*, 2000a; Takahashi *et al.*, 2000b) ดังนั้น TRH จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรค

TRH เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 189 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 48 kDa ประกอบด้วยสองยูนิตที่เหมือนกัน แต่ละยูนิตมีขนาด 23 kDa ไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เวลา 10 นาที และมีค่า pI เท่ากับ 4.6 (Honda *et al.*, 1988) TRH ถูกควบคุมโดยยีน *trh* จากการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trh* พบว่ามี 2 กลุ่มย่อย คือยีน *trh1* และ *trh2* โดยทั้ง 2 กลุ่ม มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 84% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *tdh1* 68.4% และยีน *tdh2* 68.6% TRH มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ TDH 67%

(Nishibuchi *et al.*, 1989) ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ TRH พบว่า TRH1 ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคน กระต่าย แกะ และวัว ส่วน TRH2 ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคนและกระต่ายเท่านั้น และให้ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงต่ำ (Kishishita *et al.*, 1992) จากการตรวจหากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ TDH โดยวิธี mutagenesis ในส่วนของกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ใน TDH และ TRH1 พบกรดอะมิโน ทริปโตแฟน และลิวซีน ตำแหน่งที่ 65 และ 66 ตามลำดับจากปลาย N ของ mature protein มีความสำคัญ ซึ่งกรดอะมิโนสองชนิดนี้มีการอนุรักษ์ใน TRH2 ด้วย ส่วนกรดอะมิโนอื่นๆ อาจมีผลต่อรูปร่างของโมเลกุลหรือความสามารถในการจับกับเม็ดเลือดแดง ทำให้ TRH2 ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงต่ำ (Baba *et al.*, 1992) ยีน *trh1* มีระดับการแสดงออกมากกว่ายีน *trh2* แต่น้อยกว่ายีน *tdh* (Kishishita *et al.*, 1992) การศึกษาการกระจายตัวของยีน *trh1*, *trh2* และ *tdh* โดยวิธี DNA colony blot hybridization และ Southern blot hybridization จาก *V. parahaemolyticus* จำนวน 285 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากผู้ป่วยจำนวน 214 สายพันธุ์และจากสิ่งแวดล้อมจำนวน 71 สายพันธุ์ พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 112 สายพันธุ์มียีน *tdh* เพียงอย่างเดียว (39.3%), 22 สายพันธุ์มีทั้งยีน *tdh* และ *trh1* (7.7%), 2 สายพันธุ์มีทั้งยีน *tdh* และ *trh2* (0.7%), 17 สายพันธุ์มียีน *trh1* เพียงอย่างเดียว (6.0%), 35 สายพันธุ์มียีน *trh2* เพียงอย่างเดียว (12.3%) และ 26 สายพันธุ์ไม่พบทั้ง 3 ยีน (9.1%) ส่วนสายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมมี 5 สายพันธุ์ที่มียีน *trh2* (1.8%) และอีก 66 สายพันธุ์ไม่มีทั้ง 3 ยีน (23.2%) ดังนั้นยีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ผู้วิจัยได้ตรวจหายีน *trh1* และ *trh2* ในเชื้อ *Vibrio* สปีชีส์อื่นๆ จำนวน 113 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. cholerae* (O1 และ non-O1), *V. mimicus*, *G. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. fluvialis* และ *V. furnissii* พบว่า สายพันธุ์ที่ทดสอบไม่มียีน *trh1* และ *trh2* (Kishishita *et al.*, 1992) แต่จากการศึกษาของ Gonzalez-Escalona และคณะ (2006) พบยีน *trh* ใน *V. alginolyticus* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *trh2* ของ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 98% (Gonzalez-Escalona *et al.*, 2006)

โดยทั่วไปเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไม่สร้างเอนไซม์ urease แต่เมื่อไม่นานมานี้ การตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศแถบเอเชียและบราซิล พบว่า อัตราส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ urease เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ (Park, 2004) โดยจากการศึกษาของ Suthienkul และคณะ (1995) ซึ่งได้แยก *V. parahaemolyticus* จำนวน 489 สายพันธุ์จากผู้ป่วยในประเทศไทยที่มีอาการท้องเสีย พบ 81% มียีน *tdh* เพียงอย่างเดียว, 6% มีทั้งยีน *tdh* และ *trh* และ 2% มียีน *trh* เพียงอย่างเดียว ที่น่าสนใจคือ 8% ของเชื้อทั้งหมดที่ทดสอบสร้างเอนไซม์ urease และมียีน *trh* ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ urease จะไม่มียีน *trh* ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า การสร้างเอนไซม์ urease ของ *V. parahaemolyticus* มีความสัมพันธ์กับการมียีน *trh* (Suthienkul *et al.*, 1995) นอกจากนี้ Okuda และคณะ (1997)

ได้ตรวจหายีน *tdh* และ *trh* ในเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยบริเวณ West coast ของประเทศอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1979 ถึง 1995 พบ *V. parahaemolyticus* จำนวน 60 สายพันธุ์สร้างเอนไซม์ urease โดย 98% (59 ใน 60 สายพันธุ์) มียีน *trh* และ 90% (54 ใน 60 สายพันธุ์) มียีน *tdh* ส่วนเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ urease จำนวน 25 สายพันธุ์ พบ 80% (20 ใน 25 สายพันธุ์) มียีน *tdh* เพียงอย่างเดียว จากผลการศึกษาจึงสรุปได้ว่า การสร้างเอนไซม์ urease มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับยีน *trh* มากกว่ายีน *tdh* (Okuda *et al.*, 1997a) และสายพันธุ์ที่มียีน *trh* สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้เสมอ แต่สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *trh* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ ดังนั้นการสร้างเอนไซม์ urease จึงใช้ในการบ่งชี้ความรุนแรงในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *trh* (Suthienkul *et al.*, 1995; Osawa *et al.*, 1996) การศึกษาตำแหน่งของยีน *trh* และยีนโครงสร้างของเอนไซม์ urease (*ure*) ใน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี colony hybridization ด้วยตัวตรวจจับยีน *trh* และ *ure* พบว่า ทุกสายพันธุ์ที่มียีน *ure* จะมียีน *trh* อยู่ด้วย และเมื่อนำโครโมโซมของสายพันธุ์ดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และทำ PFGE แล้ว hybridize ด้วยตัวตรวจจับยีน *trh* และ *ure* พบดีเอ็นเอเพียง 1 band แสดงว่า ยีน *trh* และ *ure* อยู่บนชิ้นส่วนเดียวกัน (Iida *et al.*, 1997) และเมื่อนำโครโมโซมของ *V. parahaemolyticus* จำนวน 115 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดย 81% มียีน *tdh* เพียงอย่างเดียว (*tdh1* และ *tdh2*), 7% มียีน *tdh*, *trh* และ *ure* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และทำ PFGE แล้ว hybridize ด้วยตัวตรวจจับยีน *tdh*, *trh* และ *ure* พบยีน *tdh1* และ *tdh2* อยู่บนชิ้นส่วนเดียวกัน และสายพันธุ์ที่มียีน *tdh*, *trh* และ *ure* ก็มียีนทั้งสามอยู่บนดีเอ็นเอชิ้นเดียวกัน โดยมีขนาด 40 kb และยีน *trh* และ *ure* อยู่ห่างกัน 8.5 kb (Iida *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *tdh* และ *trh* จะสร้าง TDH ได้้น้อยกว่าสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เพียงอย่างเดียว โดยยีน *trh* ไประงับการแสดงออกของยีน *tdh* ผ่านกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด (Okitsu *et al.*, 1997)

5.3 Thermolabile hemolysin (TLH)

นอกจาก TDH และ TRH แล้วมีการค้นพบ TLH ใน *V. parahaemolyticus* ซึ่ง TLH ถูกควบคุมโดยยีน *tlh* TLH เป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เวลา 10 นาที (Taniguchi *et al.*, 1985; Taniguchi *et al.*, 1986) TLH มีสมบัติเป็น phospholipase A2 หรือ lysophospholipase (Shinoda *et al.*, 1991) การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tlh* พบว่า preprotein และ mature protein ประกอบด้วยกรดอะมิโน 418 ตัวและ 398 ตัว ตามลำดับ และมีมวลโมเลกุล 47.5 kDa และ 45.3 kDa ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณ G+C content ของยีน *tlh* เท่ากับ 47.6% ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยปริมาณ G+C content ในจีโนมของ *V. parahaemolyticus* (Taniguchi *et al.*, 1986) TLH สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคนและม้า (Taniguchi *et al.*, 1985) แต่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Wagatsuma agar

(Wong, 2003) จากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2001) พบว่า ยีน *tlh* ของ *V. parahaemolyticus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน *vhhA* และ *vhhB* ที่พบใน *V. harveyi* เท่ากับ 77.5% และ 77.2% ตามลำดับ (Zhang *et al.*, 2001) ยีน *tlh* พบได้ใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ (ทั้ง KP บวก และ KP ลบ) แต่ไม่พบในสปีชีส์อื่นๆ (Sakurai *et al.*, 1974; Taniguchi *et al.*, 1985) ดังนั้นจึงสามารถใช้ยีน *tlh* ในการบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* (Bej *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม บทบาทของ TLH ในการทำให้เกิดโรคในลำไส้ของคนยังไม่ทราบแน่ชัด (Shinoda *et al.*, 1991)

6. ยีน *toxR*

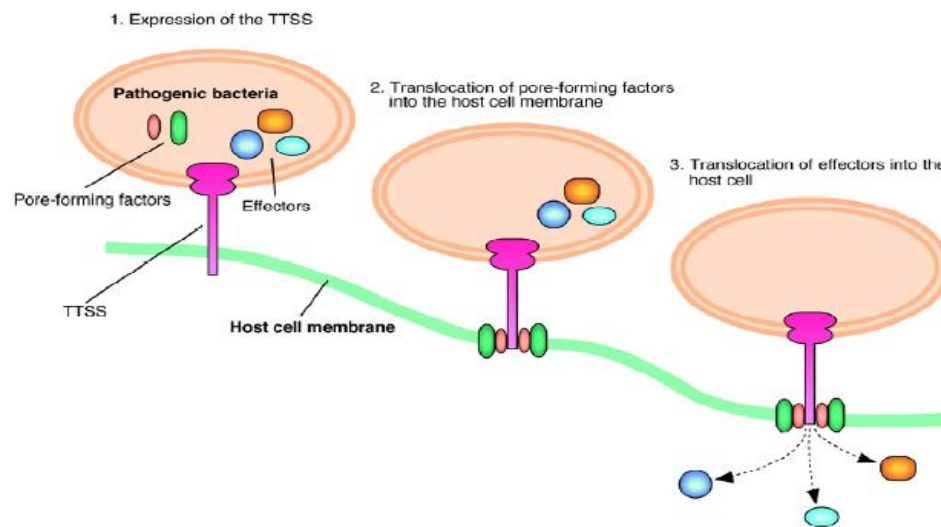
toxR เป็นยีนที่มีการอนุรักษ์ไว้ในแฟมิลี *Vibrionaceae* (Kim *et al.*, 1999; Osorio and Klose, 2000; Franco and Hedreyda, 2006) ยีน *toxR* เป็น transmembrane regulatory protein ที่อาศัยปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวควบคุมกิจกรรม ยีน *toxR* พบครั้งแรกใน *V. cholerae* โดยทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ cholera toxin และต่อมาพบว่าสามารถควบคุมการทำงานของยีนอื่นๆ อีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. cholerae* เช่น ยีน *tcpA* (toxin-regulated pilus), *ompT* และ *ompU* (outer membrane proteins) (Miller and Mekalanos, 1988) โดย *toxR* ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนก่อนความรุนแรงของโรคโดยสร้างโปรตีน ToxR ไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง upstream ของโปรโมเตอร์ของยีนก่อนความรุนแรงของโรค (Lin *et al.*, 1993) กิจกรรมของโปรตีน ToxR ขึ้นกับโปรตีน ToxS และยีนที่เป็นรหัสสำหรับโปรตีน ToxR และ ToxS อยู่ในโอเปอรอนเดียวกัน นอกจากนี้โครงสร้างและหน้าที่ของโอเปอรอน *toxRS* ของ *V. parahaemolyticus* มีความคล้ายคลึงกับโอเปอรอน *toxRS* ของ *V. cholerae* และยีน *toxR* และ *toxS* ของ *V. parahaemolyticus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *toxR* และ *toxS* ของ *V. cholerae* 52% และ 62% ตามลำดับ ต่อมาพบว่า ยีน *toxR* และ *toxS* ที่พบใน *V. parahaemolyticus* ทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *tdh2* แต่ไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *trh* (Lin *et al.*, 1993) นอกจากนี้โปรตีน ToxR ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ AQ3815 (KP บวก) มีความสำคัญต่อการสะสมของน้ำในลำไส้เล็กของกระต่ายที่เกิดจาก TDH จากการศึกษาการกระจายตัวของยีน *toxRS* ใน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี DNA colony hybridization ด้วยตัวตรวจจับยีน *toxR* และ *toxS* พบยีน *toxRS* ใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม (Lin *et al.*, 1993) และมีรายงานการพบยีน *toxR* ในเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *G. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. fischeri* และเชื้อที่ก่อโรคในปลา ได้แก่ *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* และ *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Osorio and Klose, 2000) ยีน *toxR* สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล

(molecular marker) ที่มีความสำคัญในการแยก *Vibrio* สปีชีส์ที่แตกต่างกันได้ (Kim *et al.*, 1999; Franco and Hedreyda, 2006)

7. Type III secretion systems (TTSS)

Type III secretion systems (TTSS) เป็นเครื่องมือที่ทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตีนซึ่งพบในแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคทั้งในพืชและสัตว์ (Cornelis and Wolf-Watz, 1997; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Cornelis, 2002) เชื้อก่อโรคเหล่านี้จะใช้ TTSS เพื่อฉีด virulence factors เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้านโดยตรง TTSS ถูกค้นพบและมีการศึกษาครั้งแรกใน *Yersinia* spp. โดย TTSS ของ *Yersinia* เกิดจากการรวมตัวของโปรตีน Ysc (*Yersinia* secretion) และ Lcr (Low calcium response) ทำหน้าที่ฉีด effector proteins ที่ชื่อว่า YopS (*Yersinia* outer proteins) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner membrane) และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรีย จากนั้นผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านแล้ว effector proteins เหล่านี้ จะทำให้การทำงานของเซลล์เจ้าบ้านเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งทำให้เชื้อมีความสามารถที่จะมีชีวิตรอดและมีการเพิ่มจำนวน (Michiels *et al.*, 1991) พบ TTSS ในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดที่ก่อโรคในสัตว์ ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., enterohemorrhagic *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bordetella* spp. และ *Chlamydia* spp. (Cornelis and Wolf-Watz, 1997; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Cornelis, 2002) ส่วน TTSS ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในพืช ได้แก่ *P. salanacearum*, *P. syringae*, *Erwinia* spp. และ *Xanthomonas* spp. (Fenselau *et al.*, 1992; Preston *et al.*, 1995; Van Gijsegem *et al.*, 1995; Bogdanove *et al.*, 1996) นอกจากนี้มีรายงานการพบ TTSS ในแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันกับพืช (Symbionts) ได้แก่ *Rhizobium* (Viprey *et al.*, 1998) TTSS มีองค์ประกอบ 3 ส่วนคือ secretion apparatus, translocators และ effector proteins โดย secretion apparatus ทำหน้าที่สร้าง injector complex อยู่บริเวณพื้นผิวของแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน translocators เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายเข็มฉีดยา ซึ่งเมื่อแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านแล้วจะทำให้สามารถขนส่ง effector proteins ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในไซโตพลาสซึมหรือส่วนประกอบของเซลล์เจ้าบ้านได้ (Hueck, 1998) (รูปที่ 1.1) โดยทั่วไปแล้วโปรตีนที่จำเป็นต่อการสร้าง secretion apparatus มีมากกว่า 20 ชนิด (Cornelis and Van Gijsegem, 2000) ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน โปรตีนเหล่านี้มีการอนุรักษ์สูงในแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ระบบ TTSS ซึ่งตรงข้ามกับ effector proteins ที่จะมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด (Troisfontaines and Cornelis, 2005) และ effector proteins จากแบคทีเรียที่แตกต่างกันจะก่อให้เกิดผลต่อเซลล์เจ้าบ้านแตกต่างกัน สันนิษฐานได้ว่า แบคทีเรียที่ก่อโรคแต่ละชนิดจะมีการปรับ effector proteins ให้เหมาะสมต่อการคงอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านที่จำเพาะ (Hueck, 1998) ยีนที่เป็นองค์ประกอบของ TTSS จะอยู่เป็นกลุ่มใน

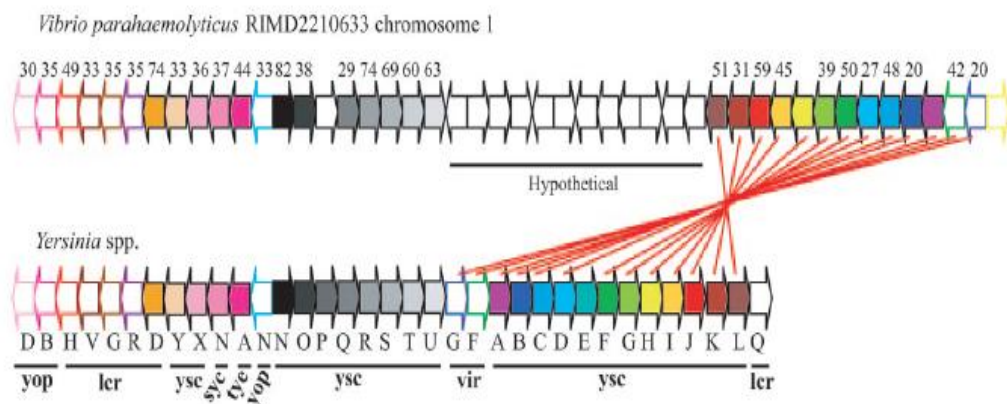
pathogenicity island หรืออยู่บน virulence plasmid และการจัดเรียงตัวของยีนมักจะมีความแตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ (Winstanley and Hart, 2001) จากการศึกษาของ Mecsas และ Strauss (1996) พบว่า ยีนหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบของ TTSS มีความคล้ายคลึงกับยีนใน flagella export machinery ของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก (Mecsas and Strauss, 1996)



รูปที่ 1.1 ลักษณะและการทำงานของ TTSS
(ที่มา: Abe *et al.*, 2005)

จากการศึกษาลำดับเบสในจีโนมของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 (KP บวก) ที่แยกจากผู้ป่วย ทำให้พบ TTSS จำนวน 2 กลุ่มเรียกว่า TTSS1 และ TTSS2 โดย TTSS1 และ TTSS2 อยู่บนโครโมโซม 1 และโครโมโซม 2 ตามลำดับ (Makino *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004) TTSS1 อยู่ที่ตำแหน่ง 1.77 ถึง 1.81 Mb จากจุด replication origin ซึ่งภายในบริเวณนี้ พบ 30 open reading frames ที่มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ TTSS ของแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ และยีนมีการเรียงตัวคล้ายคลึงกับ TTSS ที่พบใน *Yersinia* spp. ดังนั้นจึงมีการตั้งชื่อยีนแต่ละยีนให้คล้ายกับยีนของ *Yersinia* (รูปที่ 1.2) บางกลุ่มยีน TTSS1 ของ *V. parahaemolyticus* มีความแตกต่างจากกลุ่มยีน TTSS ของ *Yersinia* เช่น การพบ hypothetical genes จำนวน 12 ยีน ใน TTSS1 ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งอยู่ระหว่างยีน *vscl1* และ *vscl1* แต่ไม่พบยีนเหล่านี้ใน *Yersinia* spp. หรือสปีชีส์อื่น นอกจากนี้การเรียงตัวของยีนจำนวน 13 ยีน (ยีน *vscA1* ถึง *vscl1* *virG1* และ *virF1*) ที่พบใน TTSS1 ของ *V. parahaemolyticus* มีทิศทางของการถอดรหัสตรงข้ามกับยีนเหล่านี้ที่พบใน *Yersinia* spp. จาก

การตรวจหา TTSS1 ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ตัวตรวจจับดีเอ็นเอ พบ TTSS1 ใน *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย และมีรายงานตรวจพบ TTSS1 ใน *Vibrio* สปีชีส์อื่นด้วยคือ *V. alginolyticus*, *V. harveyi* และ *V. tubiashii* (Park *et al.*, 2004) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ G+C content ของ TTSS1 พบว่าคล้ายคลึงกับค่าเฉลี่ยปริมาณ G+C content ของจีโนม แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไม่ได้รับ TTSS1 มาจากที่อื่นแต่เป็นระบบที่มีอยู่แล้วในจีโนม (Makino *et al.*, 2003)



รูปที่ 1.2 การเรียงตัวของกลุ่มยีน TTSS1 ของ *V. parahaemolyticus* (ตัวเลขที่อยู่เหนือยีน TTSS1 ของ *V. parahaemolyticus* แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ระดับกรดอะมิโนซึ่งสอดคล้องกับ TTSS ของ *Yersinia*)

(ที่มา: Park *et al.*, 2004)

สำหรับ TTSS2 พบใน pathogenicity island (PAI) ขนาดประมาณ 80 kb ในโครโมโซม 2 ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง PAI อยู่ที่ตำแหน่ง 1.38 ถึง 1.47 Mb จากจุด replication origin และมีค่าเฉลี่ยปริมาณ G + C content เท่ากับ 39.8% ซึ่งต่ำกว่าค่าเฉลี่ยปริมาณ G + C content ของจีโนม ดังนั้น *V. parahaemolyticus* น่าจะได้รับ PAI มาจากที่อื่น ในขณะที่ยีน *tdh* ภายในบริเวณ PAI ด้วย ส่วนภายในบริเวณกลุ่มยีน TTSS2 พบ hypothetical genes และบริเวณใกล้เคียงพบ virulence gene และ effector gene ที่คล้ายคลึงกับโปรตีน YopJ ของ *Y. enterocolitica* (36%), cytotoxic necrotizing factor ของ *E. coli* (38%), exoenzyme T ของ *Pseudomonas* (45%) และ OspB ของ *Shigella* (24%) จากการตรวจหา TTSS2 ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ตัวตรวจจับดีเอ็นเอ พบ TTSS2 ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เท่านั้น ดังนั้น การที่ *V. parahaemolyticus* มี TTSS2 อาจมีความเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคในคน (Makino *et al.*, 2003)

Park และคณะ (2004) ได้ศึกษาหน้าที่ของ TTSS ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งสองกลุ่มในเซลล์พวุกยูคาริโอต โดยศึกษา *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 mutant strain ที่ได้ตัดยีนที่เป็นองค์ประกอบของ TTSS ออกแล้วศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ HeLa พบว่า เซลล์ HeLa ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย parent strain และ TTSS2 mutant strain (ไม่มียีน TTSS2) มีลักษณะรูปร่างกลม นิวเคลียส และไซโตพลาสซึมหดตัว ในขณะที่เซลล์ HeLa ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย TTSS1 mutant strain (ไม่มียีน TTSS1) มีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเช่นเดียวกับเซลล์ HeLa ที่ไม่ได้ถูกทำให้ติดเชื้อ (uninfected cell) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์เอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ที่หลั่งออกจากเซลล์ ดังนั้นจึงสรุปว่า TTSS1 เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa (Park *et al.*, 2004) นอกจากนี้มีรายงาน TTSS1 ของ *V. parahaemolyticus* เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ HCT116 (human colon cancer cell line) โดยพบว่าดีเอ็นเอของเซลล์ HCT116 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย TTSS1 mutant strain เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ไม่มีความผิดปกติและเหมือนกับเซลล์ HCT116 ที่ไม่ได้ถูกทำให้ติดเชื้อ ดังนั้น TTSS1 จึงมีบทบาทในการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HCT116 โดยทำให้ดีเอ็นเอเกิดการแตกสลาย (DNA fragmentation) สำหรับกลไกที่ TTSS1 กระตุ้นการตายแบบ apoptosis นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด (Bhattacharjee *et al.*, 2005)

การศึกษามหาหน้าที่ของ TTSS2 ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีผู้ทำการศึกษาความเป็นพิษในลำไส้เล็ก (enterotoxicity) ของกระต่าย โดยใช้สายพันธุ์ parent strain และ mutant strain พบว่า ปริมาณของเหลวที่สะสมในลำไส้ของกระต่ายที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย parent strain และ TTSS1 mutant strain ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ปริมาณของเหลวที่สะสมในลำไส้กระต่ายที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย TTSS2 mutant strain มีปริมาณเล็กน้อยเช่นเดียวกับ negative control ดังนั้นจึงสรุปว่า TTSS2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดการสะสมของของเหลวในลำไส้เล็กของกระต่าย (Park *et al.*, 2004)

การศึกษาโปรตีนที่ถูกขนส่งผ่านระบบ TTSS1 ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยใช้เทคนิค two dimensional gel electrophoresis ทำให้พบ effector proteins ที่ถูกขนส่งผ่านระบบ TTSS1 จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ VP1686, VP1680, VP1683 และ VPA450 ซึ่ง effector proteins เหล่านี้มีความแตกต่างจาก effector proteins ที่พบในระบบ TTSS1 ของแบคทีเรียอื่นๆ นอกจากนี้พบว่า VP1680 มีบทบาทหลักในการทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa (Ono *et al.*, 2006) จากรายงานของ Bhattacharjee และคณะ (2006) ซึ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับการขนส่งโปรตีนผ่านระบบ TTSS1 และการฉีด effector protein VP1686 ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์แมคโครเฟจ (macrophage) พบว่า VP1686 และ TTSS1 กระตุ้นเซลล์แมคโครเฟจให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยไม่ขึ้นกับ Toll-like receptor (TLR) signaling ทั้งนี้เนื่องจาก VP1686 ไปทำปฏิกิริยากับ NF- κ B (transcription

factor nuclear factor kB ซึ่ง NF-kB เป็นสารตัวกลางที่สำคัญของ Toll-like receptor (TLR) signaling ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง cytokines adhesion molecules และ anti-apoptosis factors อื่นๆ เพื่อให้เซลล์มีการอยู่รอดด้วยการป้องกันการตายของเซลล์) ทำให้ NF-kB ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอ (DNA binding activity) ส่งผลให้ดีเอ็นเอของเซลล์เกิดการแตกสลายและแมคโครเฟจเกิดการตายแบบ apoptosis มากขึ้น ดังนั้น VP1686 อาจเป็นปัจจัยหลักในการกระตุ้นให้แมคโครเฟจเกิดการตายแบบ apoptosis (Bhattacharjee *et al.*, 2006) ต่อมา มีการศึกษาผลของ norepinephrine (NE) ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของลำไส้ ต่อการทำให้เกิดโรคของ *V. parahaemolyticus* โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 และความเป็นพิษในลำไส้เล็กของหนู พบว่า NE กระตุ้นความเป็นพิษ (cytotoxic activity) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อเซลล์ Caco-2 โดย NE ไปเพิ่มการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับ TTSS1 รวมทั้งยีน *vscQ* และ *vscU* ส่งผลให้ไปเพิ่มความเป็นพิษ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า NE ควบคุมความเป็นพิษของ *V. parahaemolyticus* สำหรับการทดสอบความเป็นพิษในลำไส้ พบว่า NE กระตุ้นความเป็นพิษของ *V. parahaemolyticus* ในลำไส้เล็กของหนู โดย NE ทำปฏิกิริยากับ α_1 -adrenergic receptor ที่อยู่บนเซลล์เยื่อผิวของลำไส้เล็ก (intestinal epithelial cell) ส่งผลให้ความเป็นพิษในลำไส้ของหนูเพิ่มขึ้น (Nakano *et al.*, 2007)

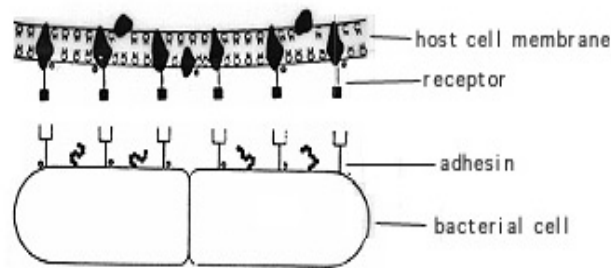
จากรายงานของ Kodama และคณะ (2007) ซึ่งได้บ่งชี้และศึกษาลักษณะของ effector proteins ที่เกี่ยวข้องกับ TTSS2 ของ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ VopP (VPA1346), VopC (VPA1321) และ VopT (VPA1327) โดย VopP มีความคล้ายคลึงกับ YopP ของ *Y. enterocolitica* และ YopJ ของ *Y. pestis* (36%), VopC คล้ายคลึงกับ cytotoxic necrotizing factor (CNF) ของ *E. coli* (38%) และ VopT คล้ายคลึงกับ ADP-ribosylating toxin 2 ชนิดคือ ExoT (45%) และ ExoS (44%) ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดเป็น effector proteins ที่ถูกขนส่งผ่าน TTSS ของ *P. aeruginosa* โดยทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ต่างๆ ได้แก่ เซลล์ HeLa, เซลล์ J774, เซลล์ T84, เซลล์ HT-29, เซลล์ Caco-2 และเซลล์ HCT-8 พบว่า TTSS2 กระตุ้นเซลล์ Caco-2 และ HCT-8 ให้เกิดความเป็นพิษ โดยยีน *vopT* เป็นยีนหนึ่งที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ VopT ไม่เพียงแต่ถูกขนส่งผ่านระบบ TTSS2 แต่还被ฉีดเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้านด้วย นอกจากนี้พบว่า VopT เป็น ADP-ribosyltransferase (ADPRT) ชนิดใหม่ เนื่องจากมีกิจกรรมของ ADP-ribosylation activity ในโปรตีน Ras ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (low molecular weight G proteins) ดังนั้นจึงบ่งชี้ได้ว่า VopT เป็น ADPRT ชนิดใหม่ที่ขนส่งผ่านระบบ TTSS ของ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตาม การที่ VopT มีผลทำให้เซลล์เป็นพิษโดยไปทำลาย Ras signaling หรือไม่นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Kodama *et al.*, 2007)

8. การเกาะติด (Adherence)

ความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อในพื้นผิวของเยื่อบุผิว (epithelial surface) ของลำไส้ ท่อทางเดินหายใจ และท่อทางเดินปัสสาวะเกี่ยวข้องกับเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียหลายๆ ชนิดกับเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเริ่มจากการเกาะติด เพิ่มจำนวน และสร้าง virulence factors บนเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial) ของลำไส้ การเกาะติดของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่กับเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกิดจากฟิมเบรีย (fimbria), พิล (pili) หรือแฟลกเจลลา (Duguid and Gillies, 1957)

จุลินทรีย์ก่อโรคจะมีการพัฒนากลไกการเกาะติดกับเนื้อเยื่อของเซลล์เจ้าบ้าน และอาจมีความสามารถต่อต้าน หรือเอาชนะกลไกการป้องกันของเซลล์เจ้าบ้านที่บริเวณพื้นผิว การเกาะติดของแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน จำเป็นต้องอาศัย 2 ปัจจัย ได้แก่ ตัวรับ (receptor) และ ligand โดยตัวรับเป็นโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีนที่จำเพาะซึ่งอยู่บนพื้นผิวของเซลล์เจ้าบ้าน ส่วน ligand ของแบคทีเรีย เรียกว่า adhesin เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับตัวรับของเซลล์เจ้าบ้านอย่างจำเพาะเจาะจง การเกาะติดอย่างจำเพาะของแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน มีปัจจัยที่สำคัญได้แก่ (1) Tissue tropism โดยแบคทีเรียจะมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เช่น *S. mutans* พบมากในแผ่นคราบฟันและไม่พบบนพื้นผิวของเยื่อบุผิวลิ้น (2) Species specificity แบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดจะก่อโรคในสัตว์บางชนิดเท่านั้น เช่น *N. gonorrhoeae* และ *B. pertussis* ก่อโรคได้ในคนเท่านั้น (3) Genetic specificity โดยเซลล์เจ้าบ้านสปีชีส์เดียวกันอาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เป็นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรค เช่น หมู่บางชนิดไม่ไวต่อการติดเชื้อโดย *E. coli* สายพันธุ์ K-88 (Todar, 2008)

กลไกการเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้านมี 2 ขั้นตอน คือ (1) การเกาะติดแบบไม่จำเพาะ เป็นการเกาะติดชั่วคราวของแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเกี่ยวข้องกับแรงดึงดูดที่ไม่จำเพาะและทำให้แบคทีเรียเข้าไปใกล้กับพื้นผิวของเซลล์เจ้าบ้าน (2) การเกาะติดแบบจำเพาะ เป็นการเกาะติดอย่างถาวรของแบคทีเรียกับพื้นผิว และมักเกิดขึ้นหลังจากการเกาะติดชั่วคราว โดยรูปแบบของการเกาะติดเกี่ยวข้องกับพันธะที่จำเพาะในโมเลกุลที่เข้าคู่กันบนพื้นผิวเซลล์แต่ละชนิด การจับเข้าคู่กันระหว่างตัวรับ และ adhesin ต้องจำเพาะและมีความพอดี (Todar, 2008) (รูปที่ 1.3)



รูปที่ 1.3 การเกาะติดแบบจำเพาะซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างเซลล์เจ้าบ้านและพื้นผิวของแบคทีเรีย (ที่มา: Todar, 2008)

จากการศึกษาคุณสมบัติการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* กับ human fetal intestinal (HFI) cells พบว่า องค์ประกอบที่แตกต่างของแคปซูลของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดประจุลบที่พื้นผิวได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งเสริมให้ระดับการเกาะติดมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แตกต่างกันในสปีชีส์เดียวกัน (Carruthers and Anderson, 1979) จากการศึกษาของ Belas และ Colwell (1982) พบว่า แฟลกเจลลารอบเซลล์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีความเกี่ยวข้องกับการดูดซับกับพื้นผิวของโคติน โดยแฟลกเจลลารอบเซลล์ ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมแบคทีเรียกับพื้นผิวของโคติน (Belas and Colwell, 1982) ต่อมา มีรายงานจาก Nakasone และ Iwanaga (1990) ซึ่งได้ทดสอบการเกาะติดของพิไลที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified pili) กับลำไส้เล็กของกระต่าย พบว่า พิไลที่ทำให้บริสุทธิ์ที่แยกจากสายพันธุ์ KP บวก สามารถเกาะติดกับลำไส้ แต่เมื่อบ่มลำไส้ด้วยพิไลที่ทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะไปทดสอบการเกาะติดกับเชื้อ ผลปรากฏว่า ไม่มีการเกาะติดของเชื้อกับลำไส้เนื่องจากพิไลที่ทำให้บริสุทธิ์ไปจับกับตัวรับบนลำไส้ของกระต่าย ทำให้เชื้อไม่สามารถจับกับตัวรับได้ ผลการทดลองบ่งชี้ว่า พิไลของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ทดสอบมีบทบาทสำคัญในการเกาะติด (Nakasone and Iwanaga, 1990) Nagayama และคณะ (1995) ได้รายงานความสัมพันธ์ด้านบวกระหว่าง mannose-sensitive hemagglutination (MSHA) ซึ่งอยู่บริเวณพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรียกับการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* กับ rabbit enterocytes โดยทำการศึกษา cell-associated hemagglutinin (cHA) ของ *V. parahaemolyticus* จำนวน 35 สายพันธุ์ (30 สายพันธุ์แยกจากผู้ป่วยและ 5 สายพันธุ์แยกจากสิ่งแวดล้อม) แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการเกาะติดกับ enterocyte ผลการทดลองพบว่า MSHA ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 24 สายพันธุ์ สามารถเกาะติดกับ rabbit enterocyte ได้มากกว่า mannose-resistant hemagglutination (MRHA) ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 6 สายพันธุ์ และเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อบ่ม rabbit enterocyte กับ cHA ที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified cHA) ก่อนนำไปทดสอบการเกาะติดกับเชื้อ พบว่า ไม่มีการเกาะติดของเชื้อเนื่องจาก

CHA ที่ทำให้บริสุทธิ์ไปยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ แสดงว่า CHA สามารถเกาะติดกับ rabbit enterocyte ได้โดยตรง จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่า CHA เกี่ยวข้องกับกลไกการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* กับ rabbit enterocyte (Nagayama *et al.*, 1995) นอกจากนี้ Hsieh และคณะ (2003) ได้ศึกษา capsular polysaccharides (CPS) จาก *V. parahaemolyticus* พบว่า เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีโปร่งแสง (translucent) ซึ่งมี CPS น้อย สามารถเกาะติดกับ human intestinal cell line (Int-407) ได้น้อยกว่าเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง (opaque) 10 เท่า และเมื่อปมเชื้อในอาหารที่เติมน้ำดี (bile) ระดับของ CPS และการเกาะติดเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นการปมเชื้อกับ anti-CPS serum ก่อนนำไปทดสอบการเกาะติด พบว่า ระดับการเกาะติดของเชื้อลดลง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CPS มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* กับเซลล์เป้าหมาย (Hsieh *et al.*, 2003)

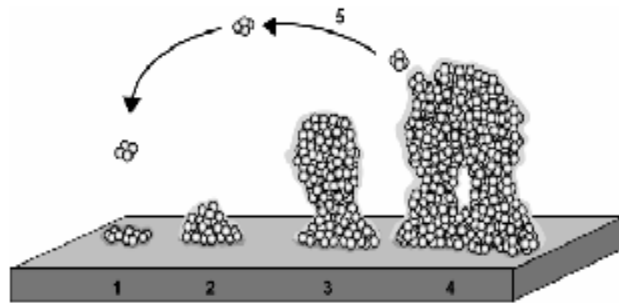
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกาะติดของเชื้อกับการสร้าง hemolysin รายงานโดย Carruthers (1977) เมื่อใช้ microscopic assay พบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP บวก สามารถเกาะติดกับเซลล์ HeLa และเซลล์ HFI ได้ดีกว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP ลบ โดยการเกาะติดเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์เยื่อหุ้มและคาร์โบไฮเดรตที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า ความร้อน แอลกอฮอล์ และ potassium metaperiodate เป็นปัจจัยที่ไปลดการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* (Carruthers, 1977) น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดและ lectin สามารถยับยั้งการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์ HFI ทั้งนี้เป็นเพราะสารเหล่านี้ไปทำลายประจุที่พื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งประจุที่พื้นผิวของเซลล์แบคทีเรียเป็นปัจจัยสำคัญในการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* และส่งผลไปยับยั้งการเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน (Carruthers and Anderson, 1979) อย่างไรก็ตาม จากการทดลองของ Gingras และ Howard (1980) โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์และ radioassay พบว่า การเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP บวก และสายพันธุ์ KP ลบ กับเซลล์ Int-407 และ human intestine cell line 11000 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างจากการทดลองของ Carruthers ดังนั้นการเลือกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการเปรียบเทียบการเกาะติด (Gingras and Howard, 1980) จากการศึกษาการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* กับเซลล์ HFI โดย Hackney และ คณะ (1980) พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ (ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม) สามารถเกาะติดกับเซลล์ HFI ได้แตกต่างกัน โดย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP บวก (ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม) และสายพันธุ์ KP ลบ ที่แยกจากผู้ป่วยสามารถเกาะติดกับเซลล์ HFI ได้ดี ส่วนสายพันธุ์ KP ลบ ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมเกาะติดกับเซลล์ HFI ต่ำ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระดับการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* เกี่ยวข้องกับความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดอาหารเป็นพิษมากกว่าปฏิกิริยา Kanagawa reaction นอกจากนี้ระดับของการเกาะติดยัง

เกี่ยวข้องกับแหล่งที่มาของเชื้อ ระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับเซลล์ HFI องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และอายุของเชื้อ ซึ่งการใช้เชื้อที่อยู่ในระยะ late log phase จะทำให้การเกาะติดดีกว่า เชื้อที่อยู่ในระยะ late stationary phase การเติม ferric ion ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลไปเพิ่มการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* ในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง ทั้งนี้เนื่องจาก ferric ion อาจไปลดประจุลบที่พื้นผิวของเชื้อและลดการผลัดกันระหว่างประจุลบของแบคทีเรียและเซลล์เยื่อหุ้ม ส่วน cation อื่นๆ ที่ช่วยในการเกาะติดได้แก่ แคลเซียม นอกจากนี้ยังพบว่าซีโรทัยป์ไม่มีผลต่อความสามารถในการเกาะติด (Hackney *et al.*, 1980) ปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งเสริมให้มีการเกาะติดได้แก่ การเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหารที่มีน้ำดีหรือ deoxycholate มีผลทำให้ระดับการเกาะติดกับเซลล์เยื่อหุ้ม ขนาดของแคปซูลและการสร้าง uronic acid เพิ่มขึ้น ซึ่ง uronic acid เป็นองค์ประกอบของแคปซูล การที่เชื้อสร้างกรดชนิดนี้ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถรวมกลุ่มและเกาะติดกับเซลล์ของลำไส้เล็กได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า แคปซูลอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเกาะติดและการทำให้เกิดโรคของ *V. parahaemolyticus* (Pace *et al.*, 1997) จากการศึกษาของ Baffone และคณะ (2000) ซึ่งกล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกาะติดกับความเป็นพิษของเซลล์ว่า ความเป็นพิษของเซลล์ที่เกิดจากเชื้อบางสายพันธุ์อาจจะเกี่ยวข้องกับเกาะติดที่แน่นกับเซลล์เยื่อหุ้ม เพราะความเป็นพิษเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์เยื่อหุ้มของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ง่ายต่อการเกาะติดของแบคทีเรีย และเมื่อเชื้อเกาะติดได้มากขึ้นก็ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษมากขึ้น (Baffone *et al.*, 2000) นอกจากนี้มีรายงานโดย Yeung และคณะ (2002) ที่ทำการศึกษากลไกที่เป็นไปได้ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงที่เพิ่มขึ้นของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ O3:K6 โดยทดสอบการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์ HeLa พบว่าสายพันธุ์ในกลุ่ม O3:K6 มีระดับการเกาะติดกับเซลล์ HeLa สูงกว่าสายพันธุ์ non-O3:K6 อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นซีโรทัยป์จึงมีผลต่อความสามารถในการเกาะติดและการทำให้เกิดโรคของเชื้อสายพันธุ์ O3:K6 ที่ระบาดเมื่อไม่นานนี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อสามารถเกาะติดได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น (Yeung *et al.*, 2002)

9. การสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm)

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่อยู่รอดโดยการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (Costerton *et al.*, 1995) เดิมไบโอฟิล์ม หมายถึง กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกาะติดกับพื้นผิวในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน แต่ในความหมายใหม่ ไบโอฟิล์ม หมายถึง กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีการเกาะติด ซึ่งเซลล์มีลักษณะเกาะติดกับ substrate หรือพื้นผิวอื่นๆ และห่อหุ้มด้วยสาร extracellular polysaccharide (EPS) ที่เชื้อสร้างขึ้นมา และเกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตและการถอดรหัสของยีน (Donlan and Costerton, 2002) ไบโอฟิล์มอาจประกอบด้วยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิด และสามารถรวมตัวกันบนพื้นผิวที่มีชีวิต (biotic surface) และไม่มีชีวิต (abiotic surface) แม้ว่าไบโอฟิล์มที่เกิดจากการ

รวมตัวกันของจุลินทรีย์หลายชนิดจะมีความโดดเด่นในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ แต่ไบโอฟิล์มที่เกิดจากจุลินทรีย์ชนิดเดียวจะมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ และปรากฏอยู่บนพื้นผิวของอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น สายสวนปัสสาวะ ดังนั้นการวิจัยในปัจจุบัน จึงให้ความสนใจไบโอฟิล์มที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียว เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างไบโอฟิล์มและมีการศึกษาอย่างมาก คือ *P. aeruginosa* นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาในเชื้อ *P. fluorescens*, *E. coli* และ *V. cholerae* ส่วนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างไบโอฟิล์มและมีรายงานการศึกษา ได้แก่ *S. aureus* และ enterococci การสร้างไบโอฟิล์มอาจช่วยให้แบคทีเรียได้รับประโยชน์ในด้านการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้น ไบโอฟิล์มจึงมีความสำคัญต่อความอยู่รอดของแบคทีเรีย (Kimberly, 2004) การสร้างไบโอฟิล์มในแบคทีเรียแกรมลบเกิดขึ้นโดยมีขั้นตอนที่ต่อเนื่องคือ เซลล์ที่ล่องลอยอย่างอิสระเริ่มต้นเกาะติดกับพื้นผิว ต่อมามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์และเกิดการสะสมเป็นกลุ่มเซลล์หลายๆ ชั้น ขั้นตอนสุดท้ายคือการสร้างเป็นชุมชนแบคทีเรียที่ล้อมรอบด้วย EPS ที่เชื่อมเหล่านั้นสร้างขึ้นมา และเมื่อโครงสร้างมีการพัฒนา แบคทีเรียบางเซลล์จะถูกปล่อย ทำให้ไบโอฟิล์มแพร่ออกไป (รูปที่ 1.4) (Lasa, 2006) เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ภายใน microcolonies ของไบโอฟิล์มยึดเหนี่ยวรวมกันโดยสารที่มีลักษณะเป็นเมือก เรียกว่า EPS โครงสร้างทางเคมีของ EPS ประกอบด้วย polysaccharide, กรดนิวคลีอิกและโปรตีน (Sutherland, 2001) ในแบคทีเรียที่มีสปีชีส์ต่างกัน ส่วนประกอบของ EPS จะมีความซับซ้อนและหลากหลาย หรือแม้แต่แบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันส่วนประกอบของ EPS จะมีความแตกต่างกัน EPS เป็นสารประกอบที่มีความสำคัญของ biofilm matrix โดยเป็นสารที่เข้าไปแทรกอยู่ในโครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์ จากการศึกษาเกี่ยวกับ EPS พบ cellulose และ β -1,6-linked N-acetylglucosamine เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ biofilm matrix ที่พบในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่แตกต่างกัน (Lasa, 2006) EPS มีบทบาทสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น alginate ซึ่งเป็น polysaccharide polymer ที่สร้างโดย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นเมือก (wild type) มีบทบาทสำคัญในโครงสร้างของไบโอฟิล์ม โดยพบว่า โครงสร้างของ microcolonies ในไบโอฟิล์มที่เกิดจาก mucoid mutant strain ถูกยับยั้งและมีลักษณะแตกต่างจากสายพันธุ์ wild type (Nivens *et al.*, 2001) บัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไบโอฟิล์ม ยังรวมถึงกลุ่มของโปรตีนที่ประกอบด้วย GGDEF/EAL domain ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง EPS ในไบโอฟิล์ม และกลุ่มของโปรตีนที่พื้นผิวซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ biofilm associated protein (Bap) ที่พบในเชื้อ *S. aureus* (Lasa, 2006)



รูปที่ 1.4 ขั้นตอนการพัฒนาไบโอฟิล์ม ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ (1) การเริ่มต้นเกาะติดกับพื้นผิว (2) การสร้างสาร EPS (3) การพัฒนาโครงสร้างไบโอฟิล์มระยะแรก (4) การมีโครงสร้างไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (5) การกระจายตัวของเซลล์แบคทีเรียจากไบโอฟิล์ม (ที่มา: Lasa, 2006)

การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการศึกษาน้อย แต่มีรายงานจาก Lawrence และคณะ (1991) ซึ่งศึกษาโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* และ *V. parahaemolyticus* โดยใช้ Scanning confocal laser microscopy (SCLM) พบว่า ไบโอฟิล์มของเชื้อ *Pseudomonas* ทั้งสองสปีชีส์มีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุดที่บริเวณพื้นผิวที่เกาะติด ซึ่งตรงข้ามกับไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่พบความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุดที่บริเวณภายนอกของไบโอฟิล์ม และมีช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ภายใน ซึ่งอาจทำหน้าที่ในการเก็บรักษาก๊าซ และแลกเปลี่ยนสารอาหารที่บริเวณชั้นล่างของไบโอฟิล์ม (Lawrence *et al.*, 1991) ต่อมาปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการศึกษาการพัฒนาไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีโคโลนีลักษณะที่บวมและโปร่งแสง ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่มีโคโลนีทั้งสองแบบมีการสร้างไบโอฟิล์มที่มีความคงตัว แต่มีความแตกต่างกันที่เกี่ยวข้องกับรูปแบบการเกาะติดและการหลุดออกจาก polystyrene การสร้าง pellicle และความคงตัวที่พื้นผิวระหว่างของแข็งกับของเหลว (Enos-Berlage *et al.*, 2005) ปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้ลักษณะโคโลนีมีความแตกต่างกันคือ EPS โดยโคโลนีที่บวมจะสร้าง EPS ได้มากกว่าโคโลนีโปร่งแสงอย่างน้อย 10 เท่า (Enos-Berlage and McCarter, 2000) การศึกษายีนที่จำเป็นสำหรับลักษณะที่บวมและยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง capsular polysaccharide (CPSA) โดยวิธี transposon mutagenesis พบยีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 11 ยีน (Guvener and McCarter, 2003) ความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์มที่พบในเชื้อ *V. parahaemolyticus* แสดงให้เห็นว่า เชื้อชนิดนี้มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า mutant ที่มีความบกพร่องในการสร้าง CPSA ไม่สามารถเกาะติดหรือสร้าง pellicle ตลอดจนไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ ดังนั้น CPSA จึงมีบทบาทสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Enos-Berlage *et al.*, 2005)

การสร้างไบโอฟิล์มจะเริ่มต้นเมื่อแบคทีเรียได้รับสัญญาณจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสิ่งกระตุ้นให้การดำรงชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการล่องลอยเป็นอิสระมาอยู่บนพื้นผิว สัญญาณจากสิ่งแวดล้อมเหล่านี้จะมีความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น *P. aeruginosa* และ *P. fluorescens* จะสร้างไบโอฟิล์มภายใต้สภาวะที่ส่งเสริมให้เชื่อมีการเจริญเติบโต (O' Toole and Kolter, 1998b) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* O157:H7 สร้างไบโอฟิล์มในสภาวะที่มีสารอาหารต่ำเท่านั้น (Denwanti and Wong, 1995) นอกจากนั้นสภาพแวดล้อมอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม ยังรวมถึงอุณหภูมิ ความดันออสโมติก ความเป็นกรด-ด่าง ความสามารถในการใช้ธาตุเหล็ก และ oxygen tension (Nyvad and Kilian, 1990; Fletcher, 1996; O' Toole and Kolter, 1998b; O' Toole and Kolter, 1998a; Pratt and Kolter, 1998) จากการศึกษาของ Davey และ O' Toole (2000) พบว่า การสร้างไบโอฟิล์มมีประโยชน์เมื่อเปรียบเทียบกับ การล่องลอยอยู่อย่างอิสระ คือ (1) ป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อม โดย EPS สามารถป้องกันแบคทีเรียจากสภาวะแวดล้อมที่กดดัน เช่น รังสี, แสงอุลตราไวโอเล็ต, pH, osmotic shock และความแห้งแล้ง (Flemming, 1993) EPS อาจมีประสิทธิภาพในการป้องกันสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์โดยทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออน (ion exchanger) จำกัดการแพร่ของสารจากสิ่งแวดล้อมรอบๆ เข้าไปในไบโอฟิล์ม (Gilbert *et al.*, 1997) (2) ทำให้การแลกเปลี่ยนสารอาหารและสารเมแทบอลิท์ (metabolite) ในไบโอฟิล์มเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ โดยแบคทีเรียสามารถนำสารอาหารไปใช้ได้มากขึ้นเช่นเดียวกับการกำจัดสารเมแทบอลิท์ที่เป็นพิษ (Costerton *et al.*, 1995) และ (3) ทำให้ได้รับลักษณะพันธุกรรมใหม่ๆ ที่มีลักษณะเด่น (Davey and O' Toole, 2000)

การพัฒนาไบโอฟิล์มเกิดขึ้นโดยกลไกหลายกลไก กลไกแรกเกิดจากเซลล์ที่เกาะติดมีการกระจายตัวโดยเคลื่อนที่ไปตามพื้นผิว เช่น การเคลื่อนที่โดยแฟลกเจลลาและ type IV pili ของเชื้อ *P. aeruginosa* มีบทบาทสำคัญในการรวมตัวบนพื้นผิว (O' Toole and Kolter, 1998a) นอกจากนี้แฟลกเจลลา, type I pili และ curli fimbriae (fimbriae ที่ประกอบด้วย amyloid fiber) ในเชื้อ *E. coli* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม (Jackson *et al.*, 2002) ส่วนการเคลื่อนที่โดยแฟลกเจลลาในเชื้อ *V. cholerae* ช่วยในการเกาะติดกับพื้นผิว (Watnick *et al.*, 2001) สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่า type IV pili ได้แก่ mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) pilus และ chitin-regulated pilus (ChiRP) ช่วยส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์มในวิธีที่แตกต่างกัน โดย MSHA pilus ช่วยในการเกาะติดของแบคทีเรียกับพื้นผิวของกระจกปิตสไลด์ ในขณะที่ ChiRP มีบทบาทในการรวมกลุ่มของแบคทีเรียในช่วงที่มีการสร้างไบโอฟิล์ม (Shime-Hattori *et al.*, 2006) สำหรับกลไกอื่นๆ ของการสร้างไบโอฟิล์มเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ที่เกาะติด (Tolker *et al.*, 2000) โดยเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว เซลล์ลูกจะมีการแผ่ขยายไปทางด้านนอกและด้านบนจากจุดที่เกาะติด เพื่อสร้างกลุ่มเซลล์เช่นเดียวกับการสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง จากการศึกษาของ Geesey (2001) พบว่า กลไกการสร้างไบโอฟิล์ม

ขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิต คุณสมบัติของพื้นผิวที่เชื้อสามารถเกาะติด และสภาพแวดล้อมของน้ำ (Geesey, 2001)

มีรายงานจาก Davies และคณะ (1998) พบ quorum sensing (QS) molecule ซึ่งปกติเกี่ยวข้องกับการควบคุม virulence factors สามารถควบคุมการพัฒนาโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (Davies *et al.*, 1998) ตัวอย่าง QS signal ของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น acylated homoserine lactones (AHLs) ของ *Pseudomonas* โดย AHLs เป็นโปรตีนหลักในระบบ QS ของแบคทีเรียแกรมลบและมีบทบาทในการสร้างไบโอฟิล์ม AHLs ถูกสร้างจากเซลล์ในอัตราคงที่และสะสมอยู่ในอาหารที่เชื้อเจริญเติบโต เมื่อมีความเข้มข้นในระดับที่เหมาะสม AHLs จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยแพร่เข้าไปในไซโตพลาสซึมและจับกับ LuxR homolog อย่างจำเพาะ ส่งผลต่อการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนและมีผลต่อโครงสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* (Parsek and Greenberg, 2005) การสร้าง EPS ที่เป็นส่วนประกอบหลักในไบโอฟิล์มของ *V. cholerae* มีชื่อว่า VPS ถูกยับยั้งโดยยีน *hapR* และ *hapR* ถูกยับยั้งโดยโปรตีน LuxO (response regulator) ซึ่งทำงานได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ (Zhu *et al.*, 2002) โปรตีน LuxO ถูกควบคุมโดย QS signal ที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 ชนิดคือ AI-2 (furanosyl borate diester autoinducer 2) และ CAI-1 (acylhomoserine lactone *Cholerae* autoinducer 1) แต่มีเพียง CAI-1 ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์ม จากการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ ระดับของ CAI-1 ต่ำเพียงพอที่จะทำให้ LuxO ไปยับยั้งยีน *hapR* ส่งผลให้มีการสร้าง VPS ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้เริ่มต้นสร้าง EPS ภายใต้สภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำก่อนที่จะสร้างเป็นกลุ่มเซลล์หลายๆ ชั้น (Zhu and Mekalanos, 2003)

9. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

9.1 Polymerase chain reaction (PCR)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ เฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษา ให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง องค์ประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ thermostable DNA polymerase, oligonucleotide primer, dNTPs, divalent cation, ดีเอ็นเอต้นแบบ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ออกเป็นเส้นเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 94-95°C ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการคลายเกลียวจะเกี่ยวข้องกับปริมาณของ G + C โดยถ้าดีเอ็นเอต้นแบบมีปริมาณ G + C สูง จะต้องเพิ่มอุณหภูมิในการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ถ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความยาวมาก จะต้องเพิ่มเวลาเพื่อให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์

2. **Annealing** เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่มีเบสคู่สม โดยทั่วไปใช้ อุณหภูมิ annealing ต่ำกว่าอุณหภูมิแยกตัว (melting temperature; T_m) ของ primer ประมาณ $3-5^\circ\text{C}$

3. **Extension** เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับเบสเข้าที่ปลาย 3' ของ primer และมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase ซึ่งอุณหภูมิปกติประมาณ $72-78^\circ\text{C}$

เมื่อทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของทุกๆ รอบ โดยจำนวนผลผลิต PCR จำนวนได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตโดยนำมาแยกตามขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบนวุ้น agarose หรือวุ้น polyacrylamide เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน จากนั้นย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (วัชรวิ และมนตรี, 2536)

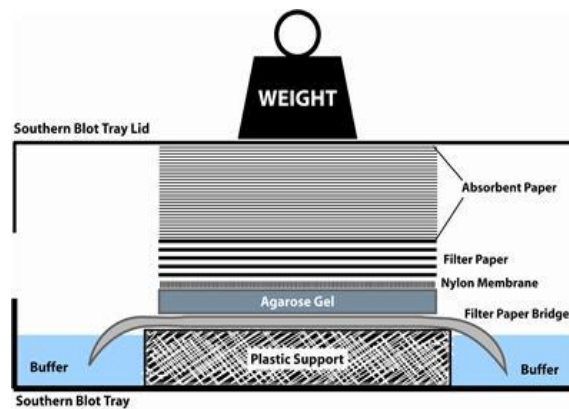
9.2 Arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR)

AP-PCR หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) จากดีเอ็นเอแม่แบบโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอแม่แบบ โดยทั่วไปการทำ PCR ต้องใช้ primer 1 คู่จับกับดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ แต่การทำ AP-PCR เป็นการใช้ primer ที่มีขนาดเพียง 9 ถึง 10 คู่เบสเพียง primer เดียวเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและใช้อุณหภูมิต่ำในขั้นตอนที่ primer จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ทำให้เกิดการจับกันของคู่เบสอย่างไม่จำเพาะเจาะจง จำนวนและตำแหน่งที่ primer ไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบขึ้นกับความแตกต่างของเบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (Olive and Bean, 1999) หลังจากได้ผลผลิต PCR จึงนำไปดูรูปแบบแถบดีเอ็นเอโดยใช้วิธี electrophoresis บนวุ้น agarose หรือวุ้น polyacrylamide เทคนิค AP-PCR ใช้ในการศึกษาความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างสปีชีส์ หรือภายในสปีชีส์เดียวกัน และใช้จำแนกจุลินทรีย์ออกเป็น type หรือ subtype แม้ว่าวิธี AP-PCR สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้ดี แต่ reproducibility ยังไม่ดี (William *et al.*, 1990)

9.3 Southern blotting

ดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกมาได้จากเซลล์ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการหรือสนใจจะปนอยู่ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ ชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถตรวจสอบโดยใช้ตัวตรวจจับ ซึ่งอาจจะเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ที่มีลำดับเบสที่สามารถจะเข้ากับลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่

ต้องการได้ โดยตัวตรวจจับที่ใช้ทั่วไปจะติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเคมีอื่น เมื่อตัวตรวจจับนี้ไปจับหรือเข้ากับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการ (hybridize) ก็ทำให้ทราบการปรากฏของยีนนั้น ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนี้พบครั้งแรกโดย E.M. Southern จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า Southern blotting โดยรายละเอียดของเทคนิคนี้มีดังนี้ เมื่อนำดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จะเกิดขึ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก ทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เหล่านี้ด้วย electrophoresis บนวุ้น agarose และทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอแถบต่างๆ เสียสภาพ จากดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้อยู่ในสภาพสายเดี่ยวโดยการแช่ในสารละลายต่าง แล้วทำให้เป็นกลางด้วย Tris ย้ายแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ไปยังแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสหรือไพลอน โดยวางแผ่นวุ้น agarose ที่มีแถบดีเอ็นเอบนกระดาษกรองหรือฟองน้ำซึ่งจุ่มอยู่ในสารละลายเกลือบัพเฟอร์ที่เข้มข้น และวางแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสบนแผ่นวุ้น agarose อีกทีหนึ่ง แล้วตามด้วยกระดาษกรองและน้ำหนักที่ทับบนกระดาษกรอง สารละลายเกลือจะผ่านวุ้น agarose และย้ายแถบดีเอ็นเอเหล่านั้น ซึ่งอยู่ในสภาพสายเดี่ยวไปยังแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลส (รูปที่ 1.5) ซึ่งจะเกาะกับดีเอ็นเอได้ดี แล้วนำแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสไปทำ hybridization กับตัวตรวจจับที่ติดฉลาก เมื่อตรวจสอบก็จะปรากฏเป็นแถบบนแผ่นกรองตรงตำแหน่งที่ตัวตรวจจับเข้าไปจับชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (ประดิษฐ์พงศ์ทองคำ, 2543)



รูปที่ 1.5 เทคนิค Southern blotting

(ที่มา:

<http://www.gbiosciences.com/EducationalUploads/EducationalProductsImages/mediumimages/Southern%20Blot.jpg>)

9.4 Transposon mutagenesis

เป็นการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการสอดแทรกของดีเอ็นเอ ที่สามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งได้ เรียกดีเอ็นเอนี้ว่า **transposon (Tn)** ซึ่ง Tn เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดระหว่าง 2.6 ถึง 20.0 kb ที่ประกอบด้วยยีนที่ดื้อยาปฏิชีวนะหรือยีนอื่นๆ และขนานข้างด้วยดีเอ็นเอขนาดเล็กที่เรียกว่า **insertion sequences (IS)** ซึ่งมีขนาดประมาณ 38 ถึง 1,500 เบส โดยมีลำดับเบสเหมือนกัน แต่การเรียงลำดับกลับกัน (**Inverted repeats**) Tn สามารถเคลื่อนย้ายและสอดแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอโมเลกุลอื่นโดยที่ไม่จำเป็นต้องมีลำดับเบสเหมือนกัน (**homologous**) กับดีเอ็นเอตัวรับซึ่งอาจเป็นโครโมโซมหรือพลาสมิด โดยกระบวนการที่เรียกว่า **transposition** เมื่อ Tn แทรกเข้าไปในตำแหน่งที่เป็นยีนในโครโมโซมก็จะทำให้ยีนนั้นไม่ต่อเนื่อง ทำให้หน้าที่ของยีนนั้นเสียไป ขณะเดียวกันยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะซึ่งอยู่ใน Tn ที่แทรกเข้าไปก็จะมีการแสดงออก ดังนั้น Tn สามารถก่อให้เกิดสายพันธุ์กลายได้อย่างไม่เฉพาะเจาะจง จึงสามารถคัดเลือกเอาสายพันธุ์กลายที่มีฟีโนไทป์ตามที่ต้องการได้ การย้าย Tn เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อให้แทรกเข้าสู่โครโมโซมนั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น **transformation, transduction** และ **conjugation** (วัฒนาลัย และสรวง, 2536)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่
2. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกได้โดยวิธี Arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR)
3. ตรวจสอบปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*
4. สร้าง *V. parahaemolyticus* mutant strain จากนั้นศึกษาความสามารถในการก่อโรคเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Agar	Difco
Bacto peptone	Difco
Blood agar	Merck
Luria Bertani (LB) broth	Difco
Luria Bertani (LB) agar	Difco
Motility test medium	Difco
Nutrient agar (NA)	Difco
Tryptic soy broth (TSB)	Difco
Tryptic soy agar (TSA)	Difco
Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) Agar	Difco
Xylose lysine decarboxylase (XLD) agar	Merck
Yeast extract	Difco
D-mannitol	Difco
Gelatin	Difco
Glucose	Difco
Skim milk	Difco
Wagatsuma agar	

2. ยาปฏิชีวนะ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Kanamycin	Sigma
Streptomycin	Sigma
Tetracycline	Sigma

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
30% Acrylamide/bis solution	Bio-Rad
Absolute ethanol	Merck
Ammonium persulfate	Bio-Rad
Ammonium sulfate	BDH
Ascorbic acid	CARLO ERBA
Boric acid	Merck
Bromphenol blue	LAB-CHEM
Calcium chloride di-hydrate	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Crystal violet	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck
Di-potassium hydrogen phosphate	Merck
EDTA	Merck
Ethidium bromide	Sigma
Glacial acetic acid	Merck
Glycine	Bio-Rad
Glycerol	Sigma
Isoamylalcohol	Merck
Magnesium sulfate	Mallinckrodt
Maleic acid	Sigma
β -mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Phenol	Sigma
Potassium chloride	Merck
Potassium di-hydrogen phosphate	Merck
Sodium acetate trihydrous	Merck
Sodium chloride	LAB-SCAN
Sodium dodecyl sulfate	Sigma
Sodium citrate dehydrate	Sigma

Sodium hydroxide	Sigma
Sodium hydrogen carbonate	BDH
N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad
Tris base	Promega
Tween-20	Sigma

3.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Agarose	Gibco
dNTPs	Boeheringer Mannheim
Primers	Invitrogen
Magnesium chloride	Promega
Restriction enzyme (<i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i>)	BioLabs
<i>Taq</i> DNA polymerase	Promega
RNase	Merck
<i>Ex taq</i> DNA polymerase	Takara
10X <i>Ex Taq</i> buffer	Takara
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs
100 kb DNA ladder	New England Biolabs
2-log DNA ladder	New England Biolabs
Protein marker	Bio-Rad

4. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วสำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- ชุดเจล Electrophoresis และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) (Bio-Rad)
- เครื่องวัด McFarland standard (Densimat) (bioMerieux)
- เครื่องชั่ง (Denver Instrument, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (KOKUSAN, Japan)
- ตู้แช่แข็ง -20°C และ -70°C (Sanyo, Japan)
- ตู้อบร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้ป่นเชื้อ (Heraeus, Germany)
- ตู้ปลอดเชื้อ (ASTEC microflow, UK)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Perkin Elmer)

- เครื่องวัด pH (pH meter) (Metrohm, Switzerland)
- ตู้เย็น 4°C (Sanyo, Japan)
- ตู้ป่นเชื้อแบบเขย่า (Shaker incubator) (Labline Instrument Inc. USA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Perkin Elmer, UK)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Shel-Lab)
- Hot plate (Fisher Scientific, USA)
- Autoclave (Tomy, Japan)
- Automatic pipette (Gilson, France)
- Microcentrifuge (Eppendorf 5415 C, Brinkman Instrument Inc. Germany)
- Microcentrifuge (Mikro 22R Hettich, Germany)
- Micro hybridization incubator (Robbins Scientific)
- Microplate reader (Bio-Tek Instruments)
- Microtiter plate (Nunclon)
- Ultrasonic cleaner (Branson, Germany)
- UV light transilluminator (San Gabriel Inc. USA)

5. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

5.1 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่ปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 จำนวน 76 ไอโซเลต (ภาคผนวก ง 1)

5.2 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* ที่แยกจากผู้ป่วยและสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม จำนวน 20 ไอโซเลต ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (ภาคผนวก ง 2)

5.3 *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* สายพันธุ์ ATCC 27853

5.4 *Shigella* spp. จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *Shigella* สายพันธุ์ R⁺ ซึ่งมียีนดื้อยาปฏิชีวนะ ampicillin, chloramphenicol, streptomycin และ tetracycline

5.5 *Escherichia coli* จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *E. coli* สายพันธุ์ SM10 pSC189

เชื้อแบคทีเรียในข้อ 5.2 ถึง 5.5 เป็นเชื้อในคลังเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. ลำไส้สัตว์ทดลองที่ใช้ศึกษา

ลำไส้เล็กของหนูขาว ซึ่งเป็นลำไส้ส่วน ileum ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิธีการทดลอง

1. การตรวจยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR ใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย (Kim *et al.*, 1999)

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยมาเลี้ยงใน LB broth (ภาคผนวก ก 4) ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอหลุดออกจากเซลล์ แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g เวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:10 เพื่อลดการรบกวนจากโปรตีนและสิ่งสกปรกอื่น ๆ จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR ตรวจหายีน *toxR* เพื่อยืนยันว่าเป็น *V. parahaemolyticus*

ส่วนผสมในการทำ PCR มีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10x buffer	2.0
25 mM MgCl ₂	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 μM primer-T4 Forward	5.0
2 μM primer-T7 Reverse	5.0
5 U/μl <i>Taq</i> DNA polymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	} 35
3. Annealing	63	1.5	
4. Extension	72	1.5	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิต PCR แสดงในตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด นำผลผลิต PCR มาทำ electrophoresis เพื่อตรวจหายีน *toxR* โดยใช้วุ้น 1.5% agarose ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x Tris Borate EDTA (TBE) (ภาคผนวก ข 1.2) ในการทำ electrophoresis ผสมผลผลิต PCR 8 μ l กับ loading dye (ภาคผนวก ข 1.1) 2 μ l หยอดใส่แผ่นวุ้น แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ ประมาณ 30 นาที เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย ethidium bromide (ภาคผนวก ข 1.3) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่นวุ้น ไปล้าง ethidium bromide ส่วนเกินด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูลักษณะแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต

2. การตรวจยืนยันยีนสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* โดยวิธี PCR (Tada *et al.*, 1992)

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ เช่นเดียวกับข้อ 1 จากนั้นนำมาตรวจหายีน *tdh* และ *trh* โดยใช้ PCR ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μ l)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10x buffer	2.0
25 mM MgCl ₂	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 μ M primer-D1 Forward (ยีน <i>tdh</i>) / R2 Forward (ยีน <i>trh</i>)	5.0
2 μ M primer-D2 Reverse (ยีน <i>tdh</i>) / R6 Reverse (ยีน <i>trh</i>)	5.0
5 U/ μ l Taq DNA polymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	} 35
3. Annealing	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิต PCR แสดงในตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำการตรวจหา ยีน *tdh* และ *trh* โดยการทำให้ electrophoresis เพื่อตรวจหาผลผลิต PCR โดยใช้วุ้น 1.5% agarose

3. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hara-Kudo *et al.*, 2003)

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ใน LB agar (ภาคผนวก ก 3) ที่มี 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชม. เลือกโคโลนีเดี่ยวและตะลงบน Wagatsuma agar (ภาคผนวก ก 10) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชม. แล้วดูลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับ positive control (สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*) และ negative control (สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻*)

4. การตรวจยืนยันยีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอและใช้ดีเอ็นเอตรวจจับด้วยวิธี Southern blot hybridization

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh* (*tdh* probe) (Nishibushi *et al.*, 1985) นำ recombinant plasmid ซึ่งมียีน *tdh* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I แล้วนำไปทำ agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากวุ้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit ของ QIAGEN, Germany) แล้วนำดีเอ็นเอไปติดฉลากแบบสุ่ม (random primed labeling) ด้วย digoxigenin (DIG) dUTP โดยนำดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh* ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม dNTP labeling (DIG High Prime, Roche) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชม.

4.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh1* และยีน *trh2* (*trh1* probe และ *trh2* probe) (Kishishita *et al.*, 1992) นำ recombinant plasmid ซึ่งมียีน *trh1* และ *trh2* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI แล้วนำไปทำ agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากวุ้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit ของ QIAGEN, Germany) แล้วนำดีเอ็นเอไปติดฉลากแบบสุ่มด้วย digoxigenin (DIG) dUTP โดยนำดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh1* และ *trh2* ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม dNTP labeling (DIG High Prime, Roche) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชม.

4.3 การสกัดดีเอ็นเอ ของ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี phenol-chloroform (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al.*, 1989) โดยเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ใน LB agar ที่มี 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. เลือกโคโลนีเดี่ยวใส่ใน LB broth ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบ/นาที นาน 6-8 ชม. จากนั้นดูดเชื้อ 10 μ l ใส่ใน LB broth ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 5 ml หลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C

เขย่า 150 รอบ/นาที นาน 16-18 ชม. แล้วนำเชื้อปริมาตร 1.5 ml ใส่หลอด microcentrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 x g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงเติม PBS pH 8.0 (ภาคผนวก ข 2.1) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 x g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงเติม PBS-EDTA (ภาคผนวก ข 2.3) ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข 2.4) ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา (invert technique) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1; ปริมาตร: ปริมาตร: ปริมาตร) (ภาคผนวก ข 2.5) ปริมาตร 450 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 450 μ l และทำซ้ำเหมือนข้างต้นอีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนใสในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 M NaOAc (ภาคผนวก ข 2.6) ปริมาตร 40 μ l และ absolute ethanol ที่เย็นจัด 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ที่เย็นจัด 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g นาน 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยวางหลอดที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 μ l ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติม RNase (ความเข้มข้น 50 μ g/ml) (ภาคผนวก ข 2.7) ปริมาตร 60 μ l นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการสกัดดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 300 μ l ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนสิ้นสุดขั้นตอนล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl EDTA) (ภาคผนวก ข 2.8) ผสมให้เข้ากันดี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (รูปที่ 2.2) เพื่อหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260} nm) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งมีค่า OD_{260} nm เท่ากับ 1 จะมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 μ g/ml และคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้โดยการหาอัตราส่วนของ OD_{260} nm/ OD_{280} nm ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ แต่ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ ถ้าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่า มีโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่

4.4 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ข้อ 4.3) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 2 μ g เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 unit/ μ l ส่วนผสมในการทำมีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
10x NE buffer 2	3.0
<i>Hind</i> III (20 U/ µl)	1.25
DW + DNA (2 µg)	25.75
ปริมาตรรวม	30.0

นำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชม. แล้วดูดส่วนผสม 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl นำไปทำ agarose gel electrophoresis โดยหยอดใส่แผ่นวุ้น 1% agarose (ขนาด 6 x 10 cm) ใน 1x TBE ผ่านกระแสไฟฟ้าไปในวุ้น ประมาณ 80 โวลต์ นาน 1 ชม. นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที คุณลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต ถ้าการตัดสมบูรณ์ก็นำส่วนผสมที่เหลือประมาณ 25 µl รวมกับ loading dye 5 µl นำไปทำ electrophoresis อีกครั้ง โดยใช้วุ้น 1% agarose (ขนาด 10 x 15 cm) เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 15 โวลต์ 12-14 ชม. เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย ethidium bromide 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 20 นาที คุณลักษณะแถบดีเอ็นเอพร้อมถ่ายรูปภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต หลังจากนั้นนำแผ่นวุ้นไปแช่น้ำต่ออีกประมาณ 30 นาที เพื่อเอา ethidium bromide ส่วนเกินออก เพราะอาจมีผลรบกวนต่อการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.5 การทดสอบ Southern blot hybridization

นำแผ่นวุ้นไปแช่ใน denaturation solution (ภาคผนวก ข 3.1) เขย่าเบาๆ นาน 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วแช่ใน neutralization solution (ภาคผนวก ข 3.2) เขย่าเบาๆ นาน 40 นาที แล้วนำแผ่นวุ้นไปวางบนแผ่นกระดาษที่มีกระดาษกรอง Whatman 3M เป็นสะพานโดยคว่ำด้านหน้าแผ่นวุ้นกับกระดาษ และปลายทั้งสองข้างของกระดาษกรองจุ่มอยู่ในสารละลาย 10x SSC (ภาคผนวก ข 3.3) จากนั้นนำแผ่นไนลอนที่มีขนาดเล็กกว่าแผ่นวุ้นเล็กน้อยแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที แล้ววางทับแผ่นวุ้นด้านหลัง วางกระดาษกรอง Whatman 3M ทับบนแผ่นไนลอน 6 ชั้น โดยวางกระดาษกรองครึ่งละหนึ่งแผ่น โดยสองแผ่นแรกให้หยดบัฟเฟอร์ 10x SSC เล็กน้อยแล้วคลึงให้ทั่ว เพื่อให้แผ่นกระดาษกรองแนบกับแผ่นวุ้นให้สนิทอย่าให้มีฟองอากาศแล้ววางกระดาษกรองที่เหลืออีกสี่แผ่น จากนั้นวางกระดาษซับให้มีความสูงประมาณ 4-6 cm วางแผ่นกระดาษทับบนกระดาษซับ จากนั้นวางของหนักประมาณ 500 g ทับบนกระดาษตั้งทิ้งไว้ 12-18 ชม. หรือข้ามคืน ดีเอ็นเอจะถูกถ่ายลงแผ่นไนลอน จากนั้นนำแผ่นไนลอนไปผ่านแสงอุลตราไวโอเล็ต นาน 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอยึดติดกับแผ่นไนลอน นำแผ่นไนลอนไปแช่ในน้ำกลั่นเขย่าเบาๆ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง สามารถนำไปทำ hybridization ต่อได้ทันทีหรืออาจเก็บไว้ในที่แห้งได้นาน

เป็นปีแต่ก่อนนำไปใช้ต้องแช่ในน้ำกลั่นอีกครั้ง การทำ hybridization ทุกขั้นตอนต้องทำให้ขวดที่ทำหมุนตลอดเวลาเพื่อให้มีการเคลื่อนที่ของสารละลายเสมอ เติมสารละลาย prehybridization (ภาคผนวก ข 3.4) ซึ่งต้อง pre-heat ที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh* (ถ้าใช้ดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh1* และ *trh2* ใช้อุณหภูมิ 30°C) ประมาณ 1 ชม. ลงในขวดที่มีแผ่นไนลอน (ให้ปริมาตรของสารละลายต่อขนาดพื้นที่ของแผ่นไนลอนเท่ากับ 10 ml/100 cm²) นำขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C (ถ้าใช้ดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh1* และ *trh2* ใช้อุณหภูมิ 30°C) นาน 40 นาที อย่าให้มีฟองอากาศระหว่างสารละลายและแผ่นไนลอน เมื่อครบเวลา ให้แทนที่สารละลาย prehybridization ด้วยสารละลาย hybridization (ภาคผนวก ข 3.5) ที่มีดีเอ็นเอตรวจจับที่ต้องการทดสอบซึ่งติดฉลากด้วย DIG (ในสัดส่วน 3.5 ml ต่อแผ่นไนลอน 100 cm²) อย่าให้มีฟองอากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh* (ถ้าใช้ดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh1* และ *trh2* ใช้อุณหภูมิ 30°C) นาน 16 ชม. เมื่อครบเวลานำแผ่นไนลอนมาล้างด้วย 2X SSC ที่เติม 0.1% SDS ที่อุณหภูมิห้องสองครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วล้างด้วย 0.5X SSC ที่เติม 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 65-68°C สองครั้ง ครั้งละ 15 นาที (รูปที่ 2.3)

4.6 การตรวจสอบผลของ hybridization กับแอนติบอดีต่อ DIG

ล้างแผ่นไนลอนใน washing buffer (ภาคผนวก ข 3.6) ประมาณ 5 นาที แล้วแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข 3.7) 100 ml นาน 30 นาที เตรียมสารละลายแอนติบอดีต่อ DIG ที่จับกับ alkaline phosphatase (ภาคผนวก ข 3.8) โดยเจือจางในสัดส่วน 1:5,000 (150 mU/ml) ในสารละลาย blocking solution แช่แผ่นไนลอนในสารละลายแอนติบอดี 20 ml นาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วย washing buffer 100 ml นาน 15 นาที 2 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน detection buffer (ภาคผนวก ข 3.9) นาน 3 นาที เมื่อครบเวลาเทสารทิ้ง แล้วแช่แผ่นไนลอนใน Color substrate solution (ภาคผนวก ข 3.10) 10 ml ทำในที่มืด ปฏิกริยาการเกิดสีจะเห็นภายใน 2-3 นาที และจะสิ้นสุดภายใน 16 ชม. หยุดปฏิกริยาโดยล้างในน้ำกลั่น 50 ml นาน 5 นาที (รูปที่ 2.3) หลังจากนั้นวางแผ่นไนลอนที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง สามารถเก็บแผ่นไนลอนที่เห็นผลได้เป็นระยะเวลานาน

5. การศึกษาลักษณะของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

5.1 การศึกษาซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* โดยเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ใน TSA (ภาคผนวก ก 8) ที่มี 3% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. เลือกโคโลนีเดี่ยวใส่ในสารละลาย 3% NaCl การหา O Ag ทำโดยนำเชื้อไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำลาย K Ag ส่วนการหา K Ag มีขั้นตอนการเตรียมเชื้อเหมือนกับการหา O Ag แต่ไม่ต้องผ่านการ autoclave หลังจากเตรียมเชื้อแล้ว จึงนำไปทดสอบ slide agglutination โดยผสมสารละลายเชื้อ 1 หยด กับ O หรือ

K antisera ในปริมาณเท่ากัน เอียงสไลด์ไปมาแล้วดูการเกาะกลุ่มของเชื้อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ผสมน้ำเกลือ

5.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* โดยวิธี AP-PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ William *et al.*, 1990)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ข้อ 4.3) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/μl เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ AP-PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ primer 2 และ primer 4 ซึ่งส่วนผสมในการทำ PCR มีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	15.0
10x <i>Ex Taq</i> buffer	3.0
2.5 mM dNTPs	4.0
5 mM primer 2 หรือ primer 4	5.0
<i>Ex Taq</i> DNA polymerase	0.5
DNA	2.5
ปริมาตรรวม	30.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	95	4	1
2. Denature	95	1	} 45
3. Annealing	36	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer แสดงในตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยทำ electrophoresis โดยใช้วุ้น 1.5% agarose ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x TBE ในการทำ electrophoresis ผสมผลผลิต PCR 15 μl กับ loading dye 2 μl หยอดใส่แผ่นวุ้นแล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 2 ระดับ คือ 100 โวลต์ นาน 5-7 นาที และ 15 mA ประมาณ 10 ชม. เมื่อสิ้นสุดการทำ

electrophoresis นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูลักษณะแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

6. การตรวจสอบปัจจัยก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

6.1 การตรวจสอบ TTSS1 โดยใช้ยีน *vcrD* เป็นยีนเป้าหมาย โดยวิธี PCR และ TTSS2 โดยใช้ยีน *vopT* (Kodama *et al.*, 2007) และยีน VPA1335 เป็นยีนเป้าหมายโดยวิธี multiplex PCR (Meador *et al.*, 2007)

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ เช่นเดียวกับข้อ 1 จากนั้นนำมาตรวจหายีน *vcrD*, *vopT* และ VPA1335 ดังนี้

6.1.1 การตรวจหายีน *vcrD* มีส่วนผสมในการทำ PCR ดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10x buffer	2.0
25 mM MgCl ₂	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 μM primer-TTSS1 Forward	5.0
2 μM primer-TTSS1 Reverse	5.0
5 U/μl <i>Taq</i> DNA polymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	} 35
3. Annealing	56	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิต PCR แสดงในตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำการตรวจหายีน *vcrD* โดยการนำ electrophoresis เช่นเดียวกับข้อ 1

6.1.2 การตรวจหายีน *vopT* และ VPA1335 มีส่วนผสมในการทำ PCR มีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาณ (μl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10x buffer	2.0
25 mM MgCl ₂	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 μM primer- Vp1327 Forward และ Reverse	5.0
2 μM primer- Vp1335 Forward และ Reverse	5.0
5 U/μl <i>Taq</i> DNA polymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	94	3	1
2. Denature	94	45 วินาที	} 30
3. Annealing	53	45 วินาที	
4. Extension	72	2	
5. Final extension	72	5	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิต PCR แสดงในตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำการตรวจหายีน *vopT* และ VPA1335 โดยการทำ electrophoresis เช่นเดียวกับข้อ 1

6.2 การทดสอบการเกาะติด (Adherence assay) ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ในลำไส้เล็กของหนูขาวเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* และ *tdh⁻ trh⁺* (ดัดแปลงจากวิธีของ Alam *et al.*, 1996) โดยการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* ในอาหาร LB agar ที่มี 1% NaCl สำหรับ *Shigella R⁺* เลี้ยงบน LB agar ที่ผสม ampicillin 10 μg/ml (ภาคผนวก ข 5.1), chloramphenicol 30 μg/ml (ภาคผนวก ข 5.2), streptomycin 10 μg/ml (ภาคผนวก ข 5.3) และ tetracycline 30 μg/ml (ภาคผนวก ข 5.4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม.

ถ่ายเชื้อ *V. parahaemolyticus* โคโลนีเดี่ยวลงใน LB broth ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 3 ml สำหรับ *Shigella R⁺* เลี้ยงใน LB broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชม. เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100 x *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100 x *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง ปรับปริมาณเชื้อเทียบกับ 0.5 McFarland standard โดยใช้ 0.85% NaCl หลังจากนั้น เติมเชื้อปริมาตร 100 μ l ลงใน microtiter plate ขนาด 6 หลุม ซึ่งมีลำไส้เล็กส่วน ileum (ล้างลำไส้ส่วน ileum ด้วย 0.85% NaCl จำนวน 3 ครั้ง แล้วตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 cm นำไปใส่ในสารละลาย Krebs solution (ภาคผนวก ข 6.2) ปริมาตร 2.9 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนใส่เชื้อ) ทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา ล้างลำไส้ด้วย 0.85% NaCl จำนวน 5 ครั้ง เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ไม่เกาะติด หลังจากนั้นนำลำไส้มาใส่ใน 0.85% NaCl ปริมาตร 1 ml บดละเอียดแล้วเจือจางให้ได้ 10^1 ถึง 10^6 นำไป spread plate บน TCBS (ภาคผนวก ก 7) สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* และบน XLD (ภาคผนวก ก 11) ที่ผสม ampicillin 10 μ g/ml, chloramphenicol 30 μ g/ml, streptomycin 10 μ g/ml และ tetracycline 30 μ g/ml สำหรับ *Shigella R⁺* ในการทดลองนี้ใช้ heated *Shigella R⁺* เป็นตัวควบคุม บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบเวลา นับจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว แปลผลเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดแต่ละสายพันธุ์ (adherent bacterial cells) หน่วย cfu/cm² เปรียบเทียบกับ positive control (*Shigella R⁺*), negative control (heated *Shigella R⁺*) และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี One - Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS รุ่น 15.0

6.3 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* (ดัดแปลงจาก Enos-Berlage et al., 2005) โดยการเลี้ยง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (ภาคผนวก ก 8) ที่มี 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. เลือกโคโลนีเดี่ยวใส่ใน TSB (ภาคผนวก ก 9) ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100 x *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100 x *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง ปรับปริมาณเชื้อเทียบกับ 0.5 McFarland standard โดยใช้ 0.85% NaCl จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 cfu/ml แล้วทำการเจือจาง 1:10 จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 1.5×10^7 cfu/ml นำเชื้อปริมาตร 20 μ l ใส่ใน microtiter plate ที่มีอาหาร TSB ที่ผสม 1% NaCl ปริมาตร 180 μ l/หลุม ผสมให้เข้ากัน ทำ 6 ซ้ำ ส่วน positive control ใช้เชื้อ *P. aeruginosa* และ negative control ใช้อาหาร TSB

ที่มี 1% NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อครบเวลาใช้ไม้พันสำลีปราศจาก เชื้อกาวฝ้าเชื้อ (pellicle) ที่เจริญบริเวณผิวหน้าของหลุมออกให้หมด แล้วดูดอาหารออกจาก หลุม หลังจากนั้นล้างแบคทีเรียที่ไม่เกาะติดด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง วางทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชม. เติม 0.1% crystal violet (ภาคผนวก ข 6.3) ปริมาตร 200 μ l ในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ดูดสีย้อมออก ล้างตะกอนสีด้วยน้ำ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชม. เติม DMSO ปริมาตร 250 μ l ในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อละลายสี crystal violet จากนั้นนำ microtiter plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Tek Instruments) แปลผลเป็นค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง (OD_{595}) ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ positive control, negative control และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี One - Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS รุ่น 15.0

6.4 การศึกษาแบบแผนการสร้างโปรตีนในเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* และ *tdh⁻ trh⁺* โดยการเลี้ยง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* ใน TSB ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100 x *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100 x *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง ปรับปริมาณเชื้อเทียบกับ 1.0 McFarland standard (3 x 10⁸ cfu/ml) โดยใช้ 0.85% NaCl แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 150 μ l ลงใน TSB ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชม. นำเชื้อปริมาตร 1 ml ใส่หลอด microcentrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 x *g* ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PBS pH 7.4 (ภาคผนวก ข 6.1) ปริมาตร 50 μ l และเติม 2x sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (ภาคผนวก ข 3.1) ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 4 นาที นำไปทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้วุ้น 12% polyacrylamide เพื่อวิเคราะห์โปรตีน (ภาคผนวก ค)

6.5 การส้อม interrupt ยีนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* โดยวิธี transposon mutagenesis เพื่อศึกษาปัจจัยก่อโรคอื่น ๆ (Chiang and Rubin, 2002) โดยนำโคโลนีของเชื้อ *E. coli* SM10 pSC189 (Ap^r, Km^r) (รูปที่ 2.1) ซึ่งเป็น donor strain และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* PSU1751 (recipient strain) มาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันบน LB agar ที่มี 1% NaCl ในอัตราส่วน 1:1 (จะได้เป็น mating mixture) และนำโคโลนีของเชื้อ donor strain และ recipient strain มาเลี้ยงแยกกันบน LB agar ที่มี 1% NaCl เพื่อใช้เป็น

donor control และ recipient control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชม. จากนั้นนำ mating mixture และ control ใส่ใน LB broth ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้ว spread 100 μ l ลงบน TCBS agar ที่มี kanamycin (Km) (ภาคผนวก ข 5.5) 100 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. นำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงใน LB broth ที่มี 3% NaCl และ Km 100 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นแบ่งเชื้อเป็นสองส่วนโดยส่วนแรกเก็บเชื้อใน 50% glycerol ที่อุณหภูมิ -70°C ส่วนเชื้อที่เหลือถ่ายเชื้อลงบนอาหารต่างๆ ดังนี้

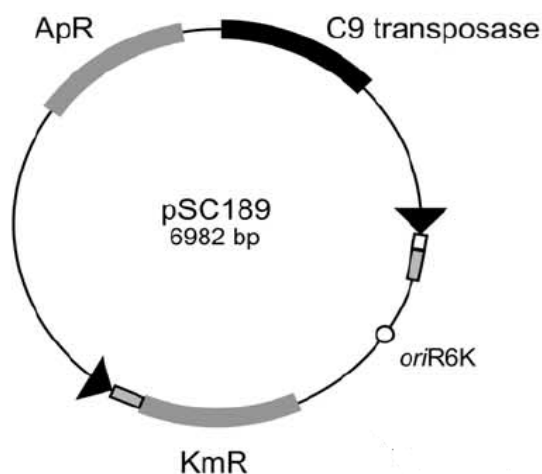
- Blood agar (ภาคผนวก ก 1) ที่มี 1% NaCl และ Km 100 μ g/ml เพื่อตรวจหา mutant strains ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

- Motility medium (ภาคผนวก ก 5) ที่มี 1% NaCl และ Km 100 μ g/ml เพื่อตรวจหา mutant strains ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

- Nutrient agar ที่มี 1% skim milk (ภาคผนวก ก 6), 1% NaCl และ Km 100 μ g/ml เพื่อตรวจหา mutant strains ที่ไม่สร้างเอนไซม์ protease

- Gelatin agar (ภาคผนวก ก 2) ที่มี 1% NaCl และ Km 100 μ g/ml เพื่อตรวจหา mutant strains ที่ไม่สร้างเอนไซม์ gelatinase

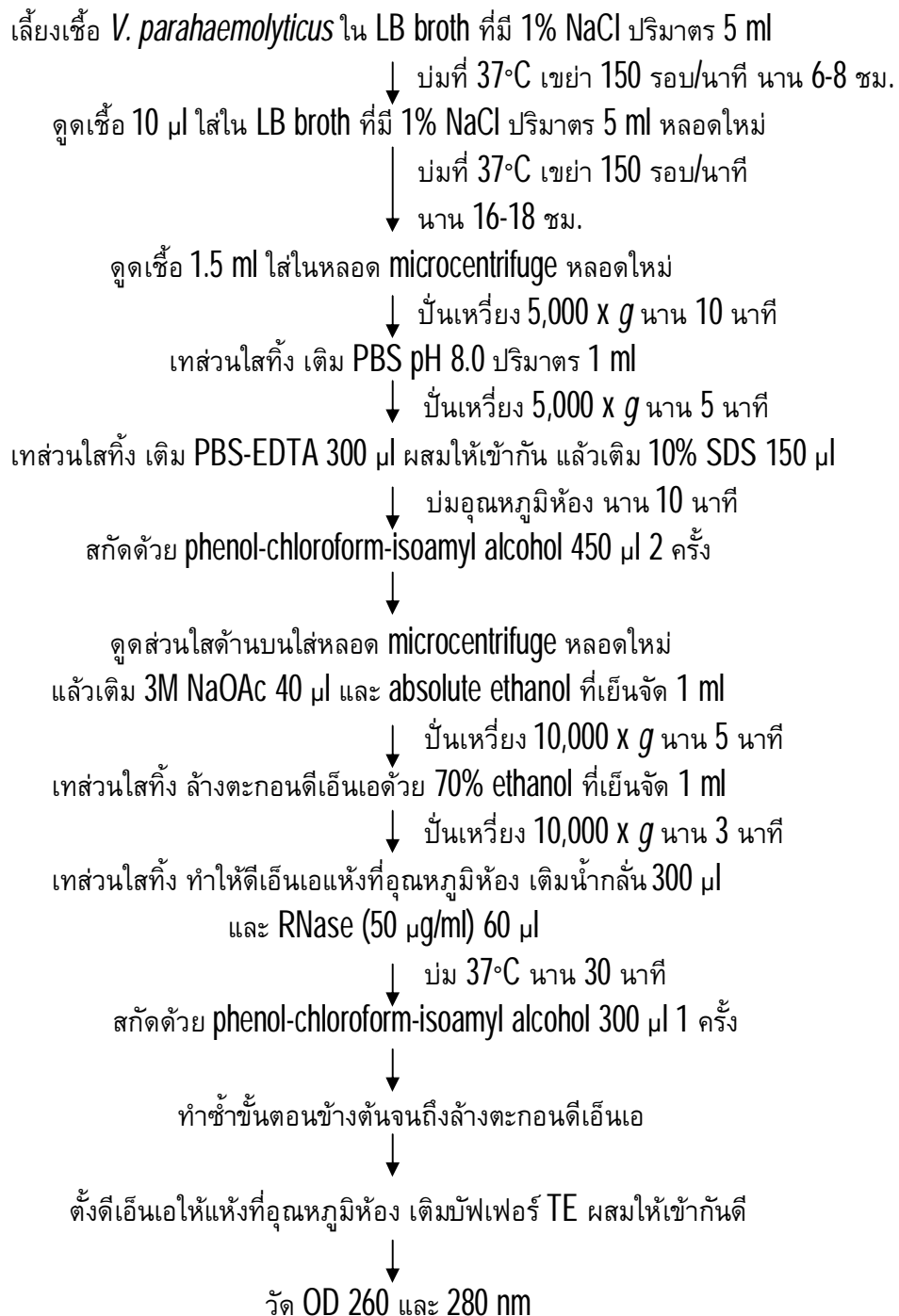
บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ผลของการเคลื่อนที่ ผลการย่อยสลายโปรตีน และ gelatin เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type เพื่อศึกษาบทบาทของ *t1h*, flagella, protease และ gelatinase ว่าเป็นส่วนหนึ่งของปัจจัยก่อโรคหรือไม่



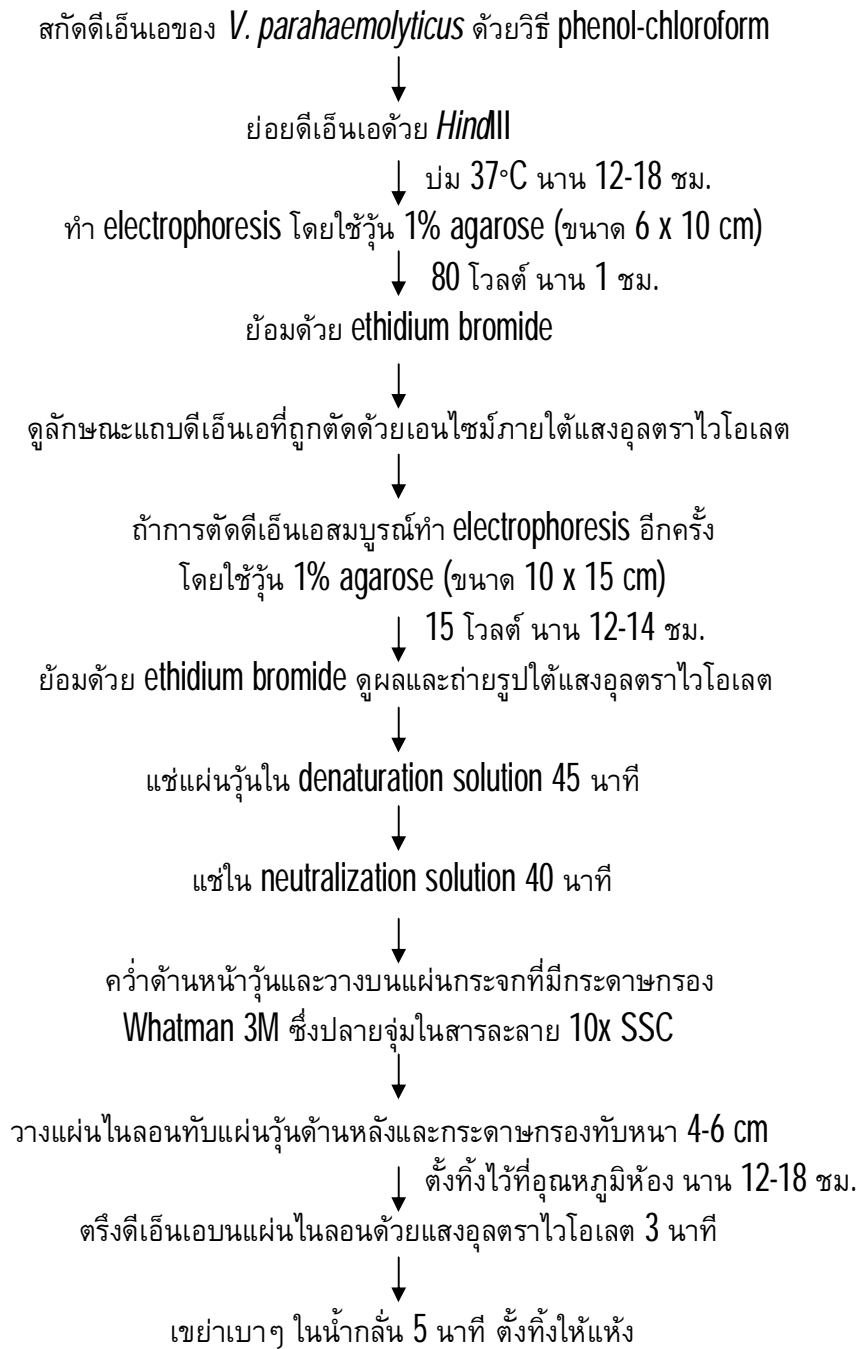
รูปที่ 2.1 พลาสมิดของ *E. coli* SM10 pSC189

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของ primers และขนาดของผลผลิต PCR

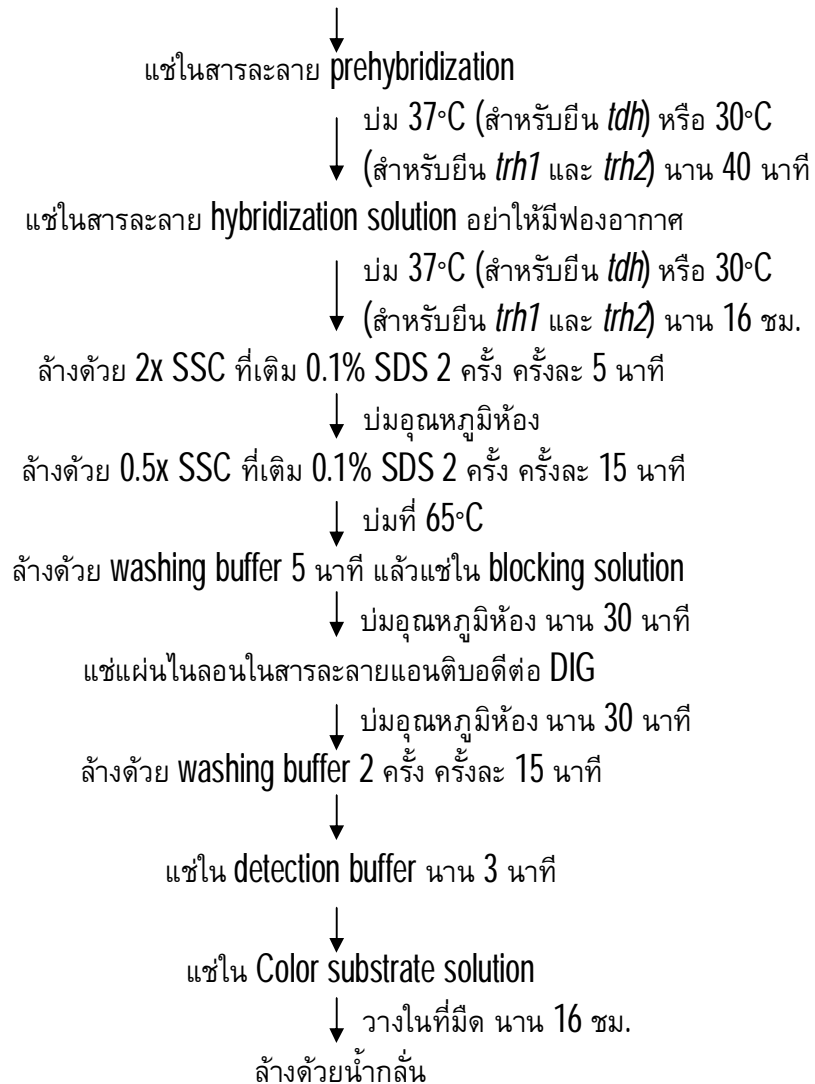
Gene	Primer and sequences (5' to 3')	Amplicon size (bp)	References
<i>toxR</i>	T4 'GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG' T7 'ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG'	367	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>tdh</i>	D1 'GGT ACT AAA TGG CTG ACA TC' D2 'CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC'	251	Tada <i>et al.</i> , 1992
<i>trh</i>	R2 'GGC TCA AAA TGG TTA AGC G' R6 'CAT TTC CGC TCT TCA TAT GC'	250	Tada <i>et al.</i> , 1992
AP-PCR	Primer 2 'GTT TCG CTC C' Primer 4 'AAG AGC CCG T'	-	Okuda <i>et al.</i> , 1997b
<i>vcrD</i>	TTSS1 Forward 'TGW RAC ACG GGT AAC GAT GA' TTSS1 Reverse 'GTA AGC AGA TGA GRA TCG ACG G'	332	-
<i>vopT</i>	Vp1327 Forward 'GTG AAG GTT TGT AGA ATA CAT ACG GAA A' Vp1327 Reverse 'TCA CTT AGC TAA ATC TAG CGC ATC'	690	Kodama <i>et al.</i> , 2007
VPA1335	Vp1335 Forward 'ATG ACG GTT ATT GAT GTA ACG' Vp1335 Reverse 'TTA TAA CTC TTT GAA CAA CAG'	210	Meador <i>et al.</i> , 2007



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการตรวจยืนยันยีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอแล้วใช้ดีเอ็นเอตรวจจับด้วยวิธี Southern blot hybridization

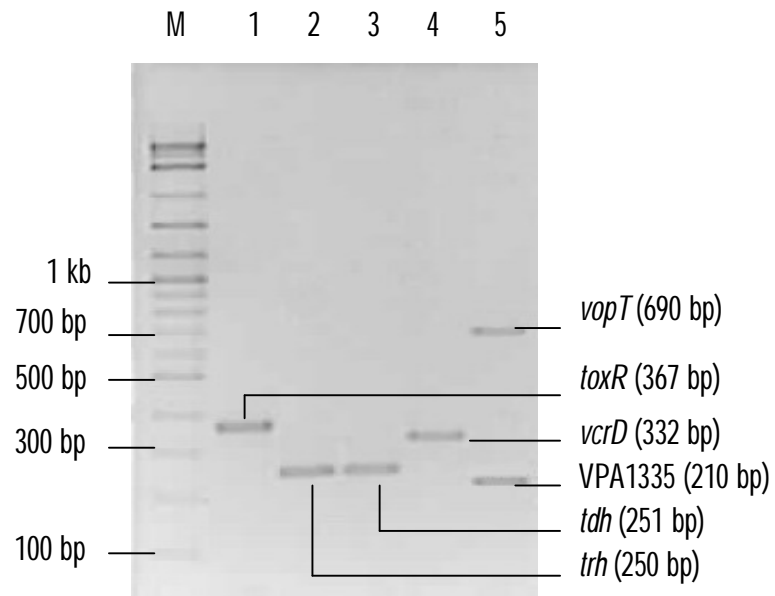


รูปที่ 2.3 (ต่อ) ขั้นตอนการตรวจยีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอแล้วใช้ ดีเอ็นเอตรวจจับด้วยวิธี Southern blot hybridization

บทที่ 3

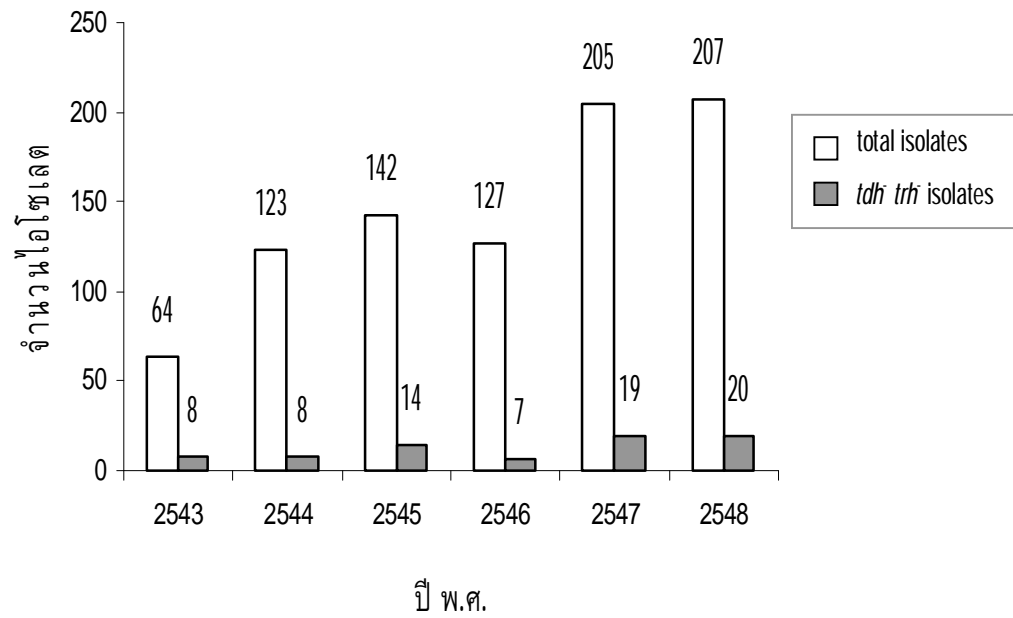
ผลการทดลอง

1. การตรวจยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR ใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย
จากการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากผู้ป่วยจำนวน 868 ไอโซเลต โดยแยกเป็นเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 จำนวน 64, 123, 142, 127, 205 และ 207 ไอโซเลตตามลำดับ (Wootipoom *et al.*, 2007) พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 76 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อทุกไอโซเลตจากคลังเชื้อมาทดสอบ โดยวิธี PCR ใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย ผลการทดสอบพบว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต ให้ผลบวกกับการทดสอบยีน *toxR* แสดงว่า ทุกไอโซเลตเป็น *V. parahaemolyticus* (รูปที่ 3.1 และ 3.2)
2. การตรวจยืนยันยีนสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* โดยวิธี PCR
เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 76 ไอโซเลต นำมาตรวจหายีน *tdh* และ *trh* (รูปที่ 3.1) โดยวิธี PCR พบ 76 ไอโซเลตไม่มียีน *tdh* และ *trh* โดยแยกเป็นเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 จำนวน 8 (12.5%), 8 (6.5%), 14 (9.8%), 7 (5.5%), 19 (9.3%) และ 20 (9.7%) ไอโซเลต ตามลำดับ (รูปที่ 3.2)
3. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
จากการทดสอบพบว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 76 ไอโซเลต สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้เพียงบางส่วน (α -hemolysis) เช่นเดียวกับ negative control (สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻*) ซึ่งแตกต่างจาก positive control (สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*) ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ (β -hemolysis) (รูปที่ 3.3)
4. การตรวจยืนยันยีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอและใช้ดีเอ็นเอตรวจจับด้วยวิธี Southern blot hybridization
ผลการทดสอบพบว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต ไม่มียีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3.4, 3.5, 3.6)

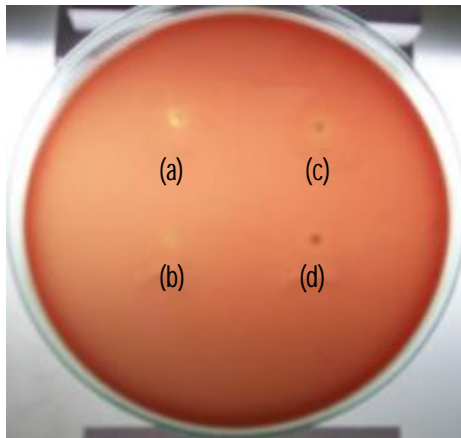


รูปที่ 3.1 ผลการทำ PCR เพื่อตรวจหา ยีน *toxR*, *tdh*, *trh*, *vcrD*, *vopT* และ VPA1335

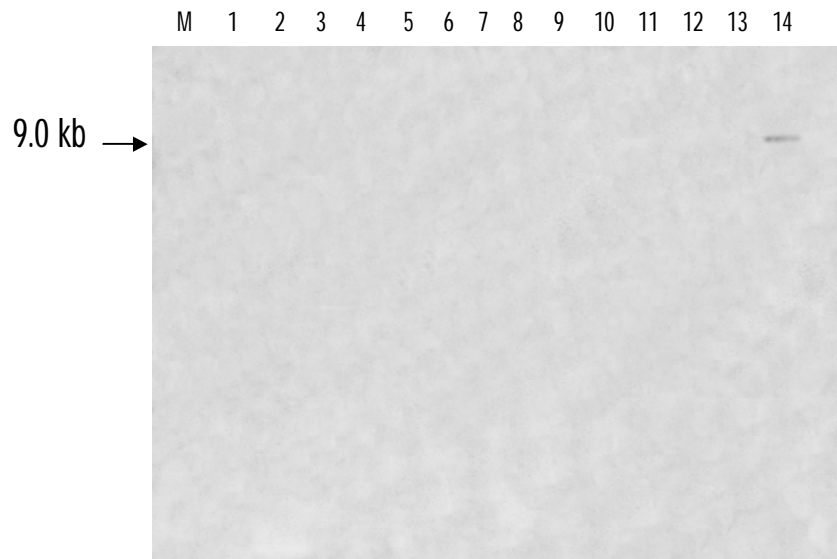
- Lane M : MW marker (2-log DNA ladder)
 Lane 1 : ยีน *toxR* ของ *V. parahaemolyticus* (367 bp)
 Lane 2 : ยีน *trh* ของ *V. parahaemolyticus* (250 bp)
 Lane 3 : ยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* (251 bp)
 Lane 4 : ยีน *vcrD* ของ *V. parahaemolyticus* (332 bp)
 Lane 5 : ยีน *vopT* 690 bp และ VPA1335 210 bp ของ *V. parahaemolyticus*



รูปที่ 3.2 จำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ระหว่างปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548



รูปที่ 3.3 ลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน Wagatsuma agar ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* (d) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁻* (a), *tdh⁺ trh⁺* (b) และ *tdh⁻ trh⁺* (c)



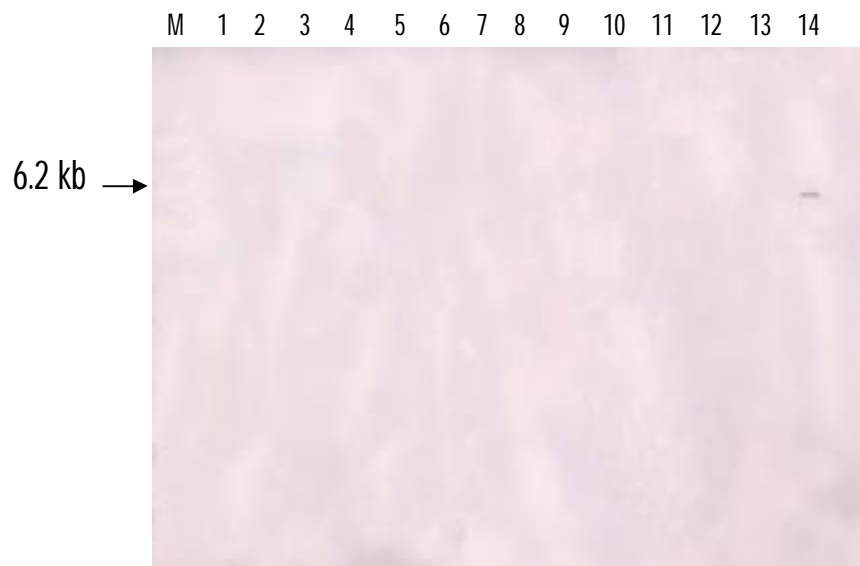
รูปที่ 3.4 Southern blot hybridization ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* เมื่อใช้ยีน *tdh* เป็นตัวตรวจจับ

- Lane M : MW marker (1 kb DNA ladder)
- Lane 1-12 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543-2548
- Lane 13 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁺* control
- Lane 14 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺* control



รูปที่ 3.5 Southern blot hybridization ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* เมื่อใช้ยีน *trh1* เป็นตัวตรวจจับ

- Lane M : MW marker (1 kb DNA ladder)
- Lane 1-12 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543-2548
- Lane 13 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh1+* control
- Lane 14 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh2+* control



รูปที่ 3.6 Southern blot hybridization ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* เมื่อใช้ยีน *trh2* เป็นตัวตรวจจับ

- Lane M : MW marker (1 kb DNA ladder)
- Lane 1-12 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543-2548
- Lane 13 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh1*⁺ control
- Lane 14 : *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh2*⁺ control

5. การศึกษาลักษณะของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

5.1 การศึกษาซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

จากการทดสอบซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 76 ไอโซเลต พบซีโรทัยป์ที่แตกต่างกัน 25 ซีโรทัยป์ โดยซีโรทัยป์ O11:KUT มีจำนวนสูงที่สุดคือ 18 ไอโซเลต (23.7%) รองลงมาคือ O5:KUT จำนวน 8 ไอโซเลต (10.5%), O12:KUT จำนวน 7 ไอโซเลต (9.2%) และ O1:KUT จำนวน 5 ไอโซเลต (6.6%) และที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ พบ KUT สูงถึง 57 ไอโซเลต (75%) นอกจากนี้ยังพบ O11 สูงที่สุดคือ 18 ไอโซเลต (23.7%) (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 จำนวนและซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ใน พ.ศ. 2543 ถึง 2548

พ.ศ. (จำนวนทั้งหมด)	จำนวน ไอโซเลต	O:K serotypes
2543(8)	3	O12:KUT
	1	O1:K69, O3:K6, O3:K54, O3:KUT, O11:KUT
2544(8)	1	O1:K46, O1:K56, O1:KUT, O3:K6, O7:KUT, O8:KUT, O11:KUT, O12:KUT
2545(14)	2	O1:KUT, O10:KUT, O11:KUT, O5:KUT, R:KUT
	1	O1:K56, O3:KUT, O8:KUT, O12:KUT
2546(7)	1	O1:K56, O3:KUT, O5:KUT, O10:KUT, O11:KUT, O12:KUT, R:KUT
2547(19)	4	O11:KUT
	3	O5:KUT
	2	O2:K3, O5:K30, O8:KUT, O12:KUT
	1	O1:KUT, O3:KUT, O3:K54, O5:K17
2548(20)	9	O11:KUT
	2	O5:KUT
	1	O1:KUT, O2:KUT, O3:K57, O4:K4, O4:K13, O4:KUT, O10:K71, R:K34, O12:KUT

KUT: K Untypeable; R: rough

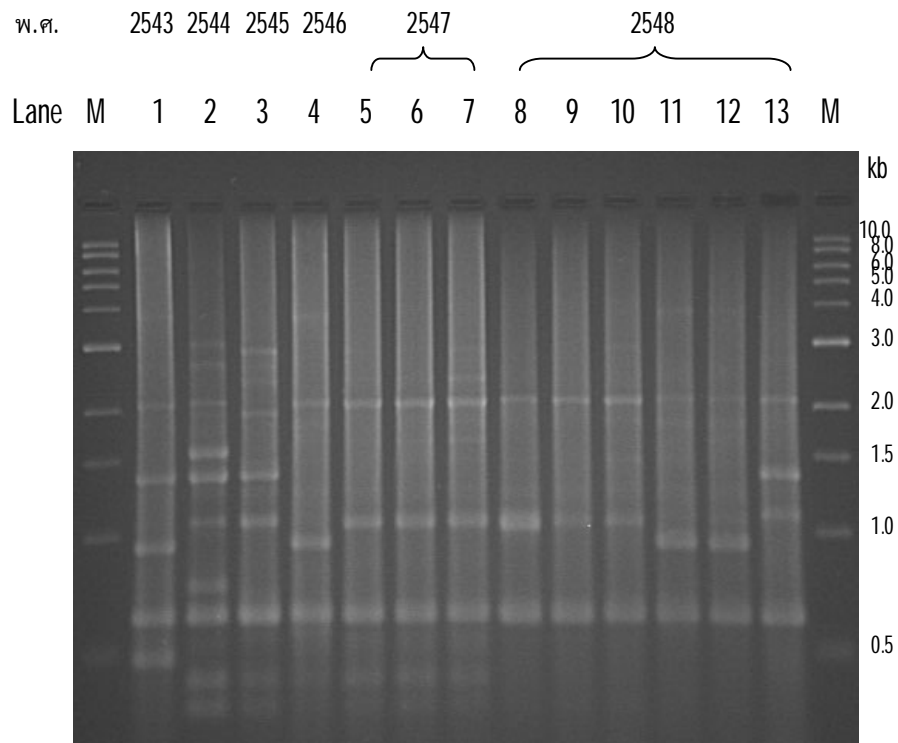
5.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* โดยวิธี AP-PCR

ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 76 ไอโซเลต โดยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ primer 2 และ primer 4 พบว่า แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ในแต่ละปีมีความแตกต่างกัน ยกเว้น ซีโรทัยป์ O11:KUT ที่แยกจากปี พ.ศ. 2548 จำนวน 3 ไอโซเลตที่มีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (รูปที่ 3.7 และ 3.8 lane 8, 9 และ 10) อย่างไรก็ตาม ซีโรทัยป์ที่เหมือนกันส่วนใหญ่จะให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เช่น ซีโรทัยป์ O12:KUT ที่แยกจากปี พ.ศ. 2543 (รูปที่ 3.9 lane 1 และ 2) ซีโรทัยป์ O3:KUT ที่แยกจากปี พ.ศ. 2544 (รูปที่ 3.9 lane 3 และ 5) และซีโรทัยป์ O5:KUT ที่แยกจากปี พ.ศ. 2548 (รูปที่ 3.10 lane 6 และ 8)

6. การตรวจสอบปัจจัยก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

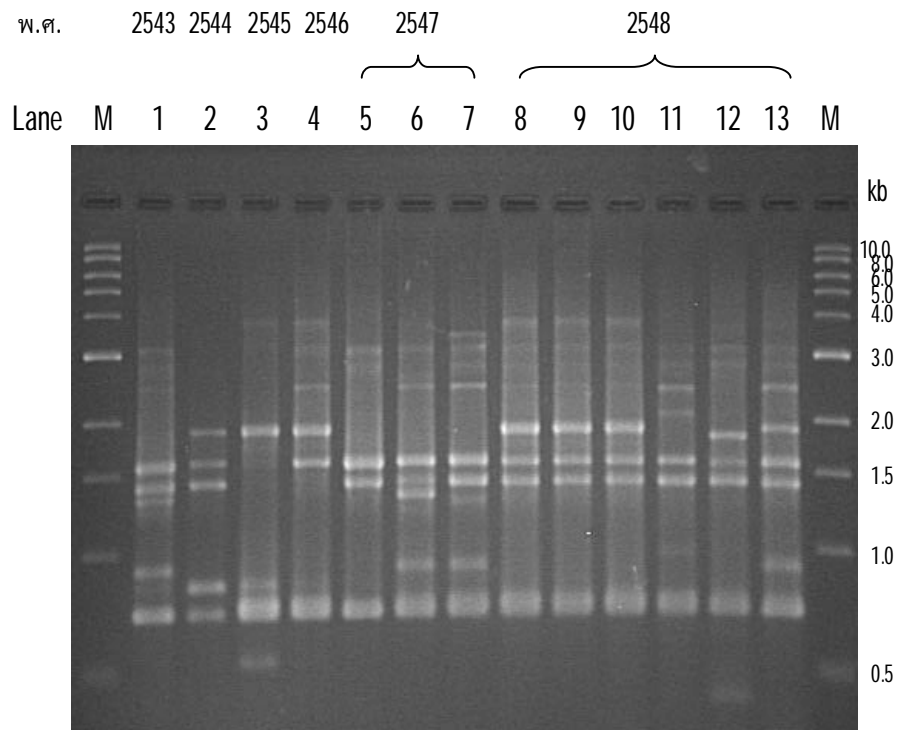
6.1 การตรวจสอบ TTSS1 โดยใช้ยีน *vcrD* เป็นยีนเป้าหมาย โดยวิธี PCR และ TTSS2 โดยใช้ยีน *vopT*, VPA1335 เป็นยีนเป้าหมายโดยวิธี multiplex PCR

จากการตรวจสอบ TTSS1 และ TTSS2 ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทั้ง 76 ไอโซเลต พบว่า ทุกสายพันธุ์มียีน *vcrD* และมี 2 ไอโซเลตคือ PSU602 และ PSU2016 ที่มียีน *vopT* และ VPA1335 (รูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.2)



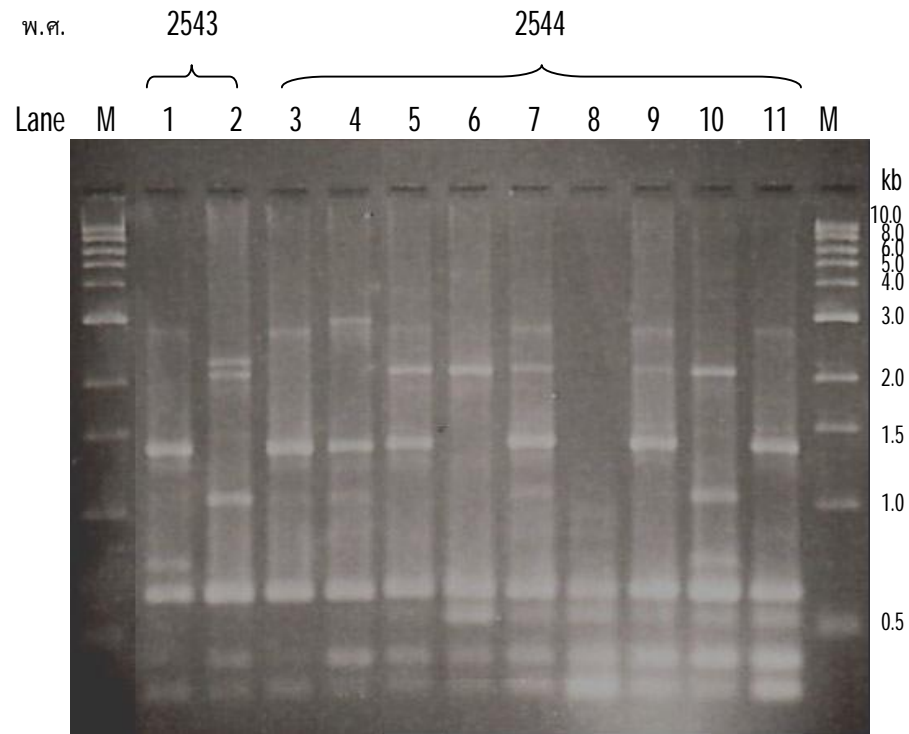
รูปที่ 3.7 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ซีโรทัยป์ O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543 ถึง 2548 โดยใช้ primer 2

- Lane M : MW marker (1 kb DNA ladder)
 Lane 1-4 : *V. parahaemolyticus* O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543, 2544, 2545, 2546
 Lane 5-7 : *V. parahaemolyticus* O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2547
 Lane 8-13 : *V. parahaemolyticus* O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2548



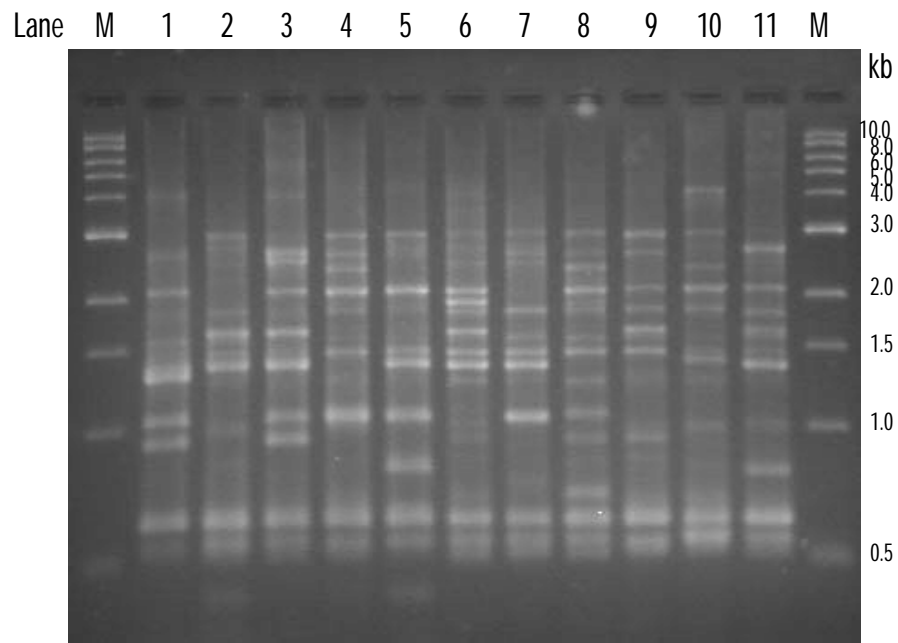
รูปที่ 3.8 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ซีโรทัยป์ O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543 ถึง 2548 โดยใช้ primer 4

- Lane M : MW marker (1 kb DNA ladder)
 Lane 1-4 : *V. parahaemolyticus* O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543, 2544, 2545, 2546
 Lane 5-7 : *V. parahaemolyticus* O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2547
 Lane 8-13 : *V. parahaemolyticus* O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2548



รูปที่ 3.9 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ซีโรทัยป์อื่นๆ ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543 ถึง 2544 โดยใช้ primer 2

- | | |
|--------------|--|
| Lane M | : MW marker (1 kb DNA ladder) |
| Lane 1 และ 2 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O12:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2543 |
| Lane 3 และ 5 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O3:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |
| Lane 4 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O3:K54 ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |
| Lane 6 | : <i>V. parahaemolyticus</i> OUT:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |
| Lane 7 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O1:K46 ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |
| Lane 8 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6 ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |
| Lane 9 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O1:K56 ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |
| Lane 10 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |
| Lane 11 | : <i>V. parahaemolyticus</i> O7:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2544 |



รูปที่ 3.10 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ซึ่งโรทัยป์อื่นๆ ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2548 โดยใช้ primer 2

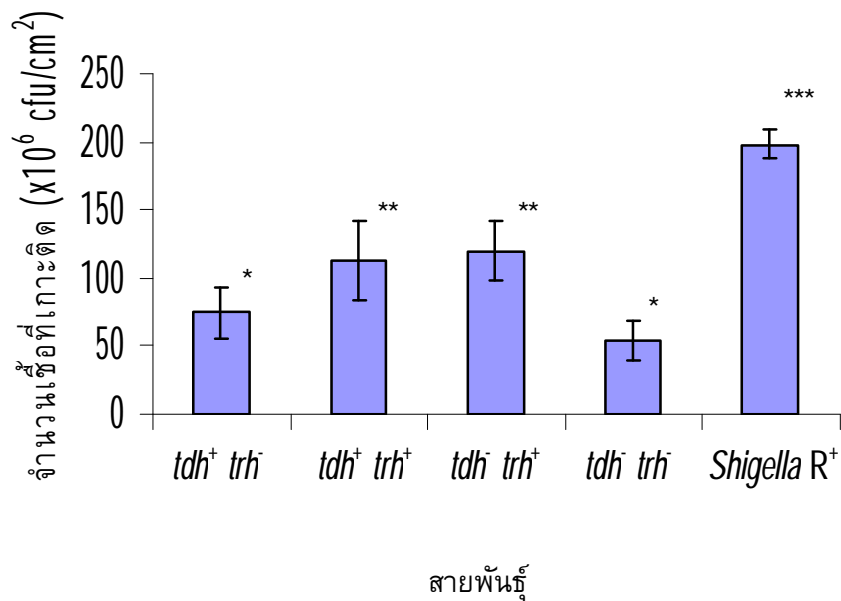
- Lane M : MW marker (1 kb DNA ladder)
- Lane 1 : *V. parahaemolyticus* O4:KUT
- Lane 2 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT
- Lane 3 : *V. parahaemolyticus* OUT:KUT
- Lane 4 : *V. parahaemolyticus* O10:K71
- Lane 5 : *V. parahaemolyticus* O3:K57
- Lane 6, 8 : *V. parahaemolyticus* O5:KUT
- Lane 7 : *V. parahaemolyticus* O4:K13
- Lane 9 : *V. parahaemolyticus* O4:K4
- Lane 10 : *V. parahaemolyticus* R:K34
- Lane 11 : *V. parahaemolyticus* O2:KUT

ตารางที่ 3.2 ผลการตรวจสอบ TTSS1 และ TTSS2 ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

พ.ศ.	จำนวนไอโซเลต ที่ทดสอบ	จำนวนไอโซเลตที่ให้ผลบวก/จำนวนไอโซเลตที่ทดสอบ (%)		
		<i>vcrD</i>	<i>vopT</i>	VPA1335
2543	8	8/8	0/8	0/8
2544	8	8/8	0/8	0/8
2545	14	14/14	1/14	1/14
2546	7	7/7	0/7	0/7
2547	19	19/19	1/19	1/19
2548	20	20/20	0/20	0/20
รวม	76	76/76 (100%)	2/76 (2.6%)	2/76 (2.6%)

6.2 การทดสอบการเกาะติด (Adherence assay) ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ในลำไส้เล็กของหนูขาวเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* และ *tdh⁻ trh⁺*

เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 20 ไอโซเลต แบ่งเป็น *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* สายพันธุ์ละ 5 ไอโซเลต ทั้งหมดถูกนำมาทดสอบการเกาะติดในลำไส้เล็กของหนูขาวเปรียบเทียบกับเชื้อ *Shigella R⁺* พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* เท่ากับ 112.2 ± 29.6 , 74.9 ± 18.9 , 119.9 ± 21.6 และ 53.9 ± 14.3 ($\times 10^6$) cfu/cm² ตามลำดับ (รูปที่ 3.11) โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺* มีค่ามากที่สุด ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* มีค่าน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) การเกาะติดของเชื้อ *Shigella R⁺* ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมมีค่าเท่ากับ 198.3 ± 10.1 ($\times 10^6$) cfu/cm²



รูปที่ 3.11 จำนวน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* ที่เกาะติดกับลำไส้เล็กของหนุขาว

* ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

6.3 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* และ *tdh⁻ trh⁺*

เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 25 ไอโซเลต แบ่งเป็น *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากผู้ป่วย จำนวน 20 ไอโซเลต และสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม จำนวน 5 ไอโซเลต ทั้งหมดถูกนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ผลการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺*, *tdh⁻ trh⁻* และสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม มีค่าเท่ากับ 0.61 ± 0.07 , 0.52 ± 0.08 , 0.34 ± 0.07 , 0.28 ± 0.06 และ 0.60 ± 0.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.3) โดยค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺* มีค่ามากที่สุด ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* มีค่าน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.90 ± 0.07

ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁻ trh⁺* ซึ่งแยกจากผู้ป่วยและสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ซึ่งแยกจากสิ่งแวดล้อม

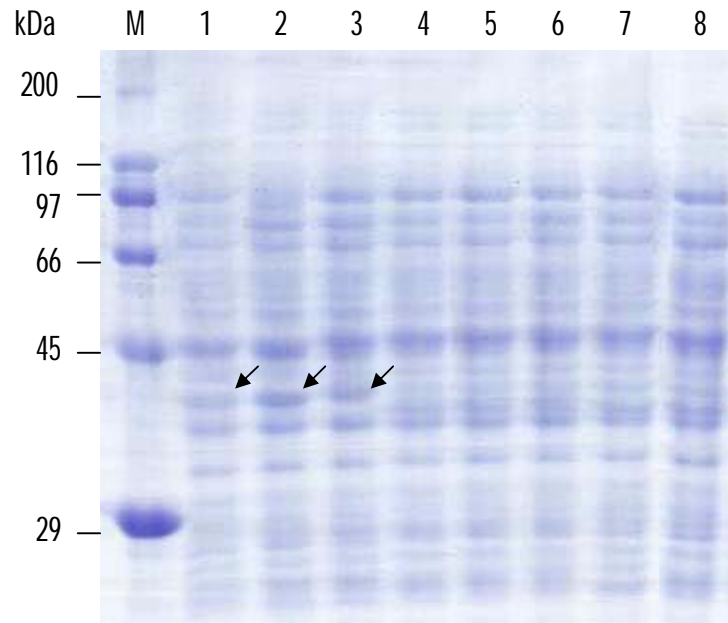
ตัวอย่าง	สายพันธุ์	OD 595 nm (mean \pm sd) *
ผู้ป่วย	<i>tdh⁺ trh⁻</i> isolates	0.52 \pm 0.08 ^a
	<i>tdh⁺ trh⁺</i> isolates	0.61 \pm 0.07 ^b
	<i>tdh⁻ trh⁺</i> isolates	0.34 \pm 0.07 ^c
	<i>tdh⁻ trh⁻</i> isolates	0.28 \pm 0.06 ^d
สิ่งแวดล้อม	<i>tdh⁻ trh⁻</i> isolates	0.60 \pm 0.07 ^b
positive control	<i>P. aeruginosa</i>	0.90 \pm 0.07 ^e

ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลข แสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากเชื้อทั้งหมด 5 ไอโซเลต ที่นำมาเป็นตัวแทนทดสอบจากเชื้อแต่ละกลุ่ม

6.4 การศึกษาแบบแผนการสร้างโปรตีนในเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁺ trh⁺* และ *tdh⁻ trh⁺*

ผลการทดลอง พบว่า แบบแผนการสร้างโปรตีนในเซลล์มีความแตกต่างกันคือ เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁻ trh⁺* (รูปที่ 3.12 lane 1 ถึง 3) พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 kDa (ลูกศรชี้) แต่ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าว (รูปที่ 3.12 lane 4 ถึง 8)



รูปที่ 3.12 รูปแบบของโปรตีนในเซลล์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

- | | | |
|--------------|---|---|
| Lane M | : | MW ของ protein standard |
| Lane 1 | : | <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁺ |
| Lane 2 | : | <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁺ |
| Lane 3 | : | <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻ |
| Lane 4-6 | : | <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁻ |
| Lane 7 และ 8 | : | <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁻ ที่มี TTSS2 (PSU2016 และ PSU602) |

6.5 การสุ่ม interrupt ยีนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* โดยวิธี transposon mutagenesis เพื่อศึกษาปัจจัยก่อโรคอื่นๆ

ผลการทดสอบ พบจำนวนโคลนที่เป็น mutant strains จำนวน 1,800 โคลน หลังจากนั้นนำมาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความสามารถในการเคลื่อนที่ และความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนและ gelatin พบว่า ทุกโคลนสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เคลื่อนที่ได้ ย่อยสลายโปรตีนและ gelatin ได้ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาค้างนี้ ได้ศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ในปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทั้ง 76 ไอโซเลต บน Wagatsuma agar ซึ่งเป็นการทดสอบเพื่อตรวจหาสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ TDH ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต ให้ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน Wagatsuma agar แบบ α -hemolysis แสดงว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต ไม่มียีน *tdh* เพราะสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เท่านั้นที่จะให้ β -hemolysis (Kanagawa phenomenon หรือ KP) บน Wagatsuma agar เนื่องจากอาหารนี้มีการเติมเลือดและเกลือในปริมาณที่สูงถึง 7% ซึ่งเกลือในปริมาณที่สูงนี้จะช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ (Chun *et al.*, 1975) นอกจากนี้การสร้าง TDH บน Wagatsuma agar ยังเกี่ยวข้องกับ pH และชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่มีในอาหาร โดยเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตและมีการย่อยสลายน้ำตาลแมนนิทอลที่อยู่ในอาหาร จะทำให้ pH ของอาหารลดลงอยู่ในช่วง 5.5-6.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้าง TDH สำหรับน้ำตาลบางชนิด เช่น กลูโคสและแมนโนส แม้ว่าเชื้อจะสามารถย่อยสลายได้ แต่จะทำให้ pH ของอาหารต่ำกว่า 5.5 ซึ่งไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้าง TDH ของ *V. parahaemolyticus* (Cherwonogrodzky and Clark, 1981) การศึกษาค้างนี้ยังได้ทำการตรวจยืนยันยีน *tdh* และ *trh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทั้ง 76 ไอโซเลต โดยใช้ตัวตรวจจับที่จำเพาะกับยีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* ด้วยวิธี Southern blot hybridization ซึ่งผลการทดลองปรากฏว่า ไม่พบทั้ง 3 ยีน แสดงว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต ไม่มีทั้งยีน *tdh*, *trh1* และ *trh2* ดังนั้นการทำ Southern blot hybridization จึงเป็นการยืนยันผลของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน Wagatsuma agar ว่า เชื้อทั้ง 76 ไอโซเลตไม่มียีน *tdh*

จากการศึกษาซีโรทัยป์ของเชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต พบซีโรทัยป์ที่แตกต่างกัน 25 ซีโรทัยป์ โดยพบซีโรทัยป์ O11:KUT สูงสุด (23.7%) รองลงมาคือ O5:KUT (10.5%), O12:KUT (9.2%) และ O1:KUT (6.6%) และที่น่าสนใจคือ พบ KUT สูงถึง 57 ไอโซเลต (75%) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Suthienkul และคณะ (1995) ที่ทำการศึกษา *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาล พบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ซีโรทัยป์ O4:KUT สูงสุด (8.9%) และพบ KUT เพียง 35.7% (Suthienkul *et al.*, 1995) ในปัจจุบันการตรวจสอบซีโรทัยป์ของ K antigen ของ *V. parahaemolyticus* สามารถทำได้เพียง 71 ซีโรทัยป์ เนื่องจากบริษัท Denka Seiken ของประเทศญี่ปุ่น ได้ผลิตแอนติซีรัมต่อ K antigen เพียง 71 ชนิด ดังนั้น KUT

ที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้จึงยืนยันว่า *V. parahaemolyticus* ยังมี K antigen ที่แตกต่างกันอีกมากมาย และการที่จำนวน KUT ที่ตรวจพบมีจำนวนมากกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อน อาจแสดงว่า สภาพแวดล้อมในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงสูง ทำให้แอนติเจนบริเวณแคปซูล (K antigen) ซึ่งเป็นผิวนอกสุดของแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมเพื่อความอยู่รอด

การระบาดของ *V. parahaemolyticus* ที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องแยกความแตกต่างของสายพันธุ์เพื่อตรวจสอบแหล่งที่มา โดยทั่วไปสายพันธุ์ที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่เหมือนกันจะใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการแยกความแตกต่าง เช่น การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทั้ง 76 ไอโซเลต โดยวิธี AP-PCR พบว่า แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละปีมีความแตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นซีโรทัยป์เดียวกัน แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ต่างกัน ยกเว้น ซีโรทัยป์ O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2548 จำนวน 3 ไอโซเลต ที่มีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ทั้ง 3 ไอโซเลต มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า *V. parahaemolyticus* ที่มีซีโรทัยป์เหมือนกันมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน แสดงว่า การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความไวกว่าการตรวจซีโรทัยป์

การศึกษาลำดับเบสในจีโนมของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 (KP บวก) ทำให้พบ TTSS (ประกอบด้วยยีนหลายชนิดที่ทำหน้าที่กำหนดโครงสร้างใช้ในการขนส่ง virulence factors จากเชื้อเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์พวุกยูคาริโอต) จำนวน 2 กลุ่ม เรียกว่า TTSS1 และ TTSS2 (Makino *et al.*, 2003) โดย TTSS1 อยู่บนโครโมโซม 1 และตรวจพบใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ ในขณะที่ TTSS2 อยู่บนโครโมโซม 2 โดยอยู่ในบริเวณ pathogenicity island (ขนาดประมาณ 80 kb) ซึ่งมียีน *tdh* อยู่ในบริเวณนี้ด้วย และตรวจพบ TTSS2 ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เท่านั้น (สายพันธุ์ KP บวก) (Makino *et al.*, 2003) เป็นไปได้ว่า *V. parahaemolyticus* ได้รับการถ่ายทอดยีน *tdh* และ TTSS2 พร้อมกัน สำหรับการศึกษานี้ได้ตรวจหายีน *vcrD* (เป็นยีนที่อยู่บน TTSS1) โดยวิธี PCR และยีน *vopT*, VPA1335 (เป็นยีนที่อยู่บน TTSS2) โดยวิธี multiplex PCR ยีน *vcrD* เป็นยีนควบคุมการสร้าง *Vibrio calcium response protein* (VcrD) และมีความคล้ายคลึงกับยีน *lcrD* ของเชื้อ *Yersinia* 74% และมีบทบาททำให้เซลล์ HeLa เกิดความเป็นพิษ (Ono *et al.*, 2006) สำหรับยีน *vopT* ควบคุมการสร้าง *Vibrio outer membrane protein* (VopT) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ effector proteins ที่ถูกขนส่งผ่าน TTSS ของ *P. aeruginosa* ได้แก่ ExoT (45%) และ ExoS (44%) และมีบทบาททำให้เซลล์ Caco-2 และ HCT-8 เกิดความเป็นพิษ (Kodama *et al.*, 2007) ยีน VPA1335 เป็นยีนที่แปลรหัสการสร้างโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (putative type III secretion apparatus protein) แต่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน Spa9 ของ *Shigella flexneri* ประมาณ 37% Spa9 ทำหน้าที่เป็น apparatus protein ใน TTSS และเกี่ยวข้องกับ

สร้างแฟลกเจลลา จากผลการทดลองพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทั้ง 76 ไอโซเลต มี TTSS1 (*vcrD*⁺) แต่ตรวจพบ TTSS2 (*vopT*⁺, VPA1335⁺) ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 2 ไอโซเลต (2.6%) (ตารางที่ 3.2) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Makino และคณะ (2003) และ Park และคณะ (2004) ที่ตรวจพบ TTSS2 ในเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เท่านั้น เป็นไปได้ว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทั้งสองไอโซเลตนี้ น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* มาก่อน (*tdh*⁺ *trh*) แต่มีการหายไปของยีน *tdh* ใน 2 ไอโซเลตนี้ภายหลัง จากการการศึกษาของ Bhoopong และคณะ (2007) ซึ่งศึกษา *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วย พบว่าในผู้ป่วยคนเดียวกัน มีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh* และสายพันธุ์ *tdh trh* โดยที่สายพันธุ์ดีเอ็นเอจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เมื่อศึกษาโดยวิธี PFGE ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่า ทั้งสองสายพันธุ์เป็นเชื้อตัวเดียวกันแต่เกิดการหายไปของยีน *tdh* ในขณะที่เชื้ออยู่ในร่างกายผู้ป่วย (Bhoopong *et al.*, 2007) และเมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกจากผู้ป่วยรายนี้โดยวิธี Southern blot hybridization พบยีน *tdh* ที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมของเชื้อนี้ เมื่อทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *tdh* และยีนที่ใกล้เคียงโดยวิธี Chromosome walking พบบางส่วนของยีน *tdh* ถูกเคลื่อนย้ายไปยังตำแหน่งอื่นบนโครโมโซมโดยยีน transposase ที่ขนานข้างยีน *tdh* (Bhoopong *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาจากการทำ Southern blot hybridization ด้วยตัวตรวจจับยีน *tdh* ไม่พบร่องรอยของชิ้นส่วนของยีน *tdh* บนโครโมโซมของเชื้อทั้งสองไอโซเลต เป็นไปได้ว่า ยีน *tdh* ของเชื้อทั้งสองไอโซเลต น่าจะเกิดการขาดหายไปอย่างสมบูรณ์ งานวิจัยนี้ให้ผลตรงกับงานวิจัยของ Meador และคณะ (2007) ซึ่งตรวจพบ TTSS2 ในเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 2 ไอโซเลตจากเชื้อทั้งหมด 48 ไอโซเลตโดยใช้วิธี microarray hybridization (Meador *et al.*, 2007)

การเกาะติดของแบคทีเรียกับพื้นผิวเยื่อเมือก (mucosal surface) ของลำไส้เป็นขั้นตอนแรกของการทำให้เกิดการติดเชื้อ ดังนั้นการเกาะติดจึงเป็นปัจจัยสำคัญของการก่อโรค จากการทดสอบการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* กับลำไส้เล็กของหนูขาวหลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที (รูปที่ 3.11) ผลปรากฏว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* มีค่าน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh*⁺, *tdh trh*⁺ และ *Shigella R*⁺ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ *tdh trh*⁺ มีค่าสูงสุดและไม่มีความแตกต่างกับสายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh*⁺ เป็นที่ทราบกันดีว่า *V. parahaemolyticus* ใช้แฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ขั้วในการเคลื่อนที่ในอาหารเหลว และใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ในการเคลื่อนที่บนอาหารแข็งหรือในสิ่งแวดล้อมที่มีความหนืดสูงหรือเกาะติดกับพื้นผิว (McCarter, 2004) Park และคณะ (2005) รายงานการพบยีน *vpaH* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *trh* ซึ่งยีน *vpaH* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์ จากการทดลอง เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* มาตัดยีน *vpaH* ออก พบว่า เชื้อ mutant มีความบกพร่องในการสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อ

การแสดงออกของแฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ขั้วและเมื่อนำ mutant นี้ไปทดสอบการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่า ความสามารถในการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type (Park *et al.*, 2005) ดังนั้นเป็นไปได้ว่า การที่เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*⁺ และ *tdh*⁺ *trh*⁺ สามารถเกาะติดได้สูงเกิดจากการมียีน *vpaH* ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อสายพันธุ์ *tdh trh* ที่เกาะติดลำไส้หนู ไม่มีความแตกต่างกับสายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh* อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ซึ่งช่วยยืนยันว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *trh* (*trh*⁻) มีความสามารถในการเกาะติดกับลำไส้ได้น้อยกว่าสายพันธุ์ที่มียีน *trh* (*trh*⁺) และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Hackney และคณะ (1980) ซึ่งรายงานว่าการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* กับเซลล์ HFI (human fetal intestinal cell) ไม่มีความแตกต่างกันในสายพันธุ์ *tdh*⁺ (KP บวก) และ *tdh*⁻ (KP ลบ) ที่แยกจากผู้ป่วย (Hackney *et al.*, 1980) Iijima และคณะ (1981) ทดสอบการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* จำนวน 32 สายพันธุ์กับเซลล์เยื่อบุผิว พบว่า การเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* ขึ้นอยู่กับการมีชีวิตของเชื้อ เนื่องจากเมื่อนำ *V. parahaemolyticus* ไปผ่านความร้อนหรือแสงอัลตราไวโอเล็ตก่อนนำไปทดสอบ พบว่า จำนวนเชื้อที่เกาะติดเซลล์ลดลง (Iijima *et al.*, 1981)

ปัจจุบันแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์ม ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดการติดเชื้อ เช่น เยื่อหุ้มปอดอักเสบ การติดเชื้อในหูส่วนกลาง ต่อมลูกหมากอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากแบคทีเรีย การติดเชื้อเรื้อรังในช่องปอด การติดเชื้อในอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น สายสวน ปัสสาวะ การใส่คอนแทคเลนส์ (Donlan and Costerton, 2002) นอกจากนี้แบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มจะมีความทนทานหรือดื้อยาปฏิชีวนะได้มากกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่ล่องลอยเป็นอิสระ 1,000 เท่า (Gilbert *et al.*, 1997) มาตรฐานในการรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากไบโอฟิล์มทำได้เพียงกำจัดเซลล์ที่ล่องลอยเป็นอิสระ ส่วนเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มยังสามารถเพิ่มจำนวนภายในไบโอฟิล์ม ตลอดจนแพร่กระจายได้อย่างต่อเนื่องแม้ว่าการรักษาจะสิ้นสุดลงแล้วก็ตาม นอกจากนี้ ระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน ไม่สามารถกำจัดเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้ (Costerton *et al.*, 1995) การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ทั้งสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม พบว่า เชื้อทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบมีการสร้างไบโอฟิล์ม (ตารางที่ 3.3) โดย *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh*⁺ สร้างไบโอฟิล์มได้สูงสุด ในขณะที่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh*⁻ *trh*⁻ สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่า *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบรวมทั้ง *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยซึ่งมี virulence gene มาก สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มี virulence gene น้อยกว่าหรือไม่ มี ยกเว้น *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*⁻ *trh*⁻ ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมซึ่งสร้างไบโอฟิล์มได้ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh*⁺ และสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าสายพันธุ์ *tdh*⁻ *trh*⁻ ที่แยกจาก

ผู้ป่วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมจำเป็นต้องสร้างไบโอฟิล์มเพื่อการอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีปัจจัยต่างๆที่หลากหลายมากกว่าในร่างกายผู้ป่วย เช่น สภาวะทางกายภาพ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ที่ทำให้แบคทีเรียเกิดความเครียดหรือกดดัน รวมทั้งการถูกล่าโดยโปรโตซัวหรือแม้แต่พวกแบคทีเรียโอฟาจที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม (Huq *et al.*, 2008) นอกจากนี้ ในทะเลจะพบพื้นผิวที่แตกต่างกันส่งผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มแตกต่างกัน เช่น พื้นผิวเป็นสารพอลิเมอร์อินทรีย์ สัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้มและแพลงก์ตอนสัตว์มีไคติน ซึ่งมีความแตกต่างจากพื้นผิวอื่นๆ นอกจากนี้ ผลจากการทดลองยังพบว่า การเกาะติดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกจากผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* สามารถเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด แต่อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มไม่ได้เป็นปัจจัยเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

จากผลการศึกษาแบบแผนการสร้างโปรตีนในเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* เทียบกับสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻* และ *tdh⁻ trh⁺* โดยวิธี SDS-PAGE พบว่า แบบแผนการสร้างโปรตีนในเซลล์มีความแตกต่างกันคือ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 kDa (รูปที่ 3.12 lane 1 ถึง 3) ส่วนสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าว (รูปที่ 3.12 lane 4 ถึง 8) อย่างไรก็ตามโปรตีนที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต ซึ่งจะช่วยบ่งชี้ได้ว่า โปรตีนนี้อาจมีความสำคัญในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มี virulence gene

จากการสุ่ม interrupt ยีนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* PSU1751 โดยวิธี transposon mutagenesis เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการสอดแทรกพลาสมิด (pSC189) เข้าไปยังยีนใดยีนหนึ่งในโครโมโซม แล้วทำให้การทำงานของยีนนั้นเปลี่ยนไป (Nagy and Chandler, 2004) ในการศึกษานี้ได้พยายามที่จะยับยั้งการแสดงออกของยีน *tlh*, *flagella*, *protease* และ *gelatinase* เพื่อศึกษาว่ายีนเหล่านี้ เป็นส่วนหนึ่งของปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* หรือไม่ จากการทดลองใช้เชื้อ *E. coli* SM10 ซึ่งมีพลาสมิด pSC189 สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* บริเวณที่มีเบส TA และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เป็น mutant strains จำนวน 1,800 โคลน พบว่า ทุกโคลนสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เคลื่อนที่ได้ ย่อยสลายโปรตีนและ gelatin ได้ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type แสดงว่า transposon ไม่ได้เข้าไปแทรกตรงตำแหน่งของยีน *tlh* ยีนที่สร้าง flagella ยีนที่สร้างเอนไซม์ protease และ gelatinase แต่อาจไปแทรกที่ยีนส่วนอื่นในโครโมโซมของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอนาคต การศึกษาตำแหน่งยีนอื่นๆ ที่ transposon เข้าไปแทรกอาจมีประโยชน์ในการช่วยยืนยันการทำงานของยีนเหล่านี้ หรือช่วยให้ทราบว่าปัจจัยก่อโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus*

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ในปี พ.ศ. 2543 ถึง 2548 ทั้ง 76 ไอโซเลต ให้ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Wagatsuma agar แบบ α -hemolysis แสดงว่า เชื้อทุกไอโซเลตไม่มียีน *tdh* ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจยืนยันด้วยวิธี Southern blot hybridization ที่ไม่พบยีน *tdh*

2. เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* จำนวน 76 ไอโซเลต มีซีโรทัยป์ที่แตกต่างกัน 25 ซีโรทัยป์ โดยพบซีโรทัยป์ O11:KUT สูงสุด (23.7%) รองลงมาคือ O5:KUT (10.5%), O12:KUT (9.2%) และ O1:KUT (6.6%) และที่น่าสนใจคือ พบ KUT สูงถึง 57 ไอโซเลต (75%)

3. จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ทั้ง 76 ไอโซเลตโดยวิธี AP-PCR พบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละปีมีความแตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นซีโรทัยป์เดียวกัน แสดงว่า ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ต่างกัน ยกเว้น ซีโรทัยป์ O11:KUT ที่แยกได้ใน พ.ศ. 2548 จำนวน 3 ไอโซเลต ที่มีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ทั้ง 3 ไอโซเลต มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน

4. *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* ที่แยกจากผู้ป่วยทั้ง 76 ไอโซเลต มี TTSS1 แต่มีเพียง 2 ไอโซเลต (2.6%) ที่มี TTSS2 อาจเป็นไปได้ว่า ทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มียีน *tdh* แต่เกิดการหายไป (deletion) ในภายหลัง

5. ยีน *trh* มีความสัมพันธ์กับการเกาะติดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* กับลำไส้ของหนูขาว เนื่องจาก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*⁺ และ *tdh*⁺ *trh*⁺ สามารถเกาะติดกับลำไส้ของหนูขาวได้มากกว่าสายพันธุ์ *tdh trh* และสายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh* อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

6. เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh*⁺ *trh*⁺ สร้างไบโอฟิล์มได้สูงสุดและเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh trh* สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า การเกาะติดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยสายพันธุ์ *tdh trh* มีความสัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* สามารถเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด

7. การตรวจสอบโปรตีนในเซลล์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบโปรตีนขนาดประมาณ 40 kDa ในเชื้อสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh trh⁺* และ *tdh⁺ trh* แต่ไม่พบในสายพันธุ์ *tdh trh* เป็นไปได้ว่า โปรตีนนี้อาจมีความสำคัญในการก่อโรคของเชื้อสายพันธุ์ที่มี virulence gene

8. การสุ่ม interrupt ยีนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh* PSU1751 โดยวิธี transposon mutagenesis พบ mutant strains จำนวน 1,800 โคลน แต่ทุกโคลนสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เคลื่อนที่ได้ ย่อยสลายโปรตีนและ gelatin ได้ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงไม่สามารถทำการศึกษาได้ว่า ยีน *tlh*, *flagella*, *protease* และ *gelatinase* เป็นส่วนหนึ่งของปัจจัยก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh trh*

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2550. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. เข้าถึงได้จาก: <http://webdb.dmsc.moph.go.th>. (วันที่สืบค้น 17 ธ.ค. 2551).
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วัชรวิ อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์: กรุงเทพฯ.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ. 2536. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย: มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Abe, A., Matsuzawa, T. and Kuwae, A. 2005. Type-III effectors: Sophisticated bacterial virulence factors. C. R. Biologies. 328: 413-428.
- Alam, M., Miyoshi, S.I., Yamamoto, S., Tomochika, K.I. and Shinoda, S. 1996. Expression of virulence-related properties by, and intestinal adhesiveness of, *Vibrio mimicus* strains isolated from aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3871-3874.
- Austin, B. and Austin, D.A. 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild Fish. 3rd ed. Springer-Praxis: Godalming.
- Baba, K., Yamasaki, S., Nishibuchi, M. and Takeda, Y. 1992. Examination by site-directed mutagenesis of the amino acid residues of the thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus* required for its hemolytic activity. Microb. Pathog. 12: 279-287.

- Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E. And Citterio, B. 2000. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int. J. Food Microbiol.* 54: 9-18.
- Bag, P.K., Nandi, S., Bhadra, R.K., Rammamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Nishibuchi, M., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, Y. and Nair, G.B. 1999. Clonal diversity among the recently emerged strains of *V. parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2354-2357.
- Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. 1992. *The Prokaryotes*. 2nd ed. Springer-Verlag New York Inc: New York.
- Barker, J.W.H. and Gangarosa, E.J. 1974. Food poisoning due to *V. parahaemolyticus*. *Annu. Rev. Med.* 25: 75-81.
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D. and Kaysner, C.A. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *V. parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods.* 36: 215-225.
- Belas, M.R. and Colwell, R.R. 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. *J. Bacteriol.* 151: 1568-1580.
- Bhattacharjee, R.N., Park, K.S., Kumagai, Y., Okuda, K., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Iida, T., Honda, T., Takeuchi, O. and Akira, S. 2006. VP16861, a *Vibrio* type III secretion protein, induces Toll-like receptor-independent apoptosis in macrophage through NF- κ B inhibition. *J. Biol. Chem.* 281: 36897-36904.

- Bhattacharjee, R.N., Park, K.S., Okada, K., Kumagai, Y., Uematsu, S., Takeuchi, O., Akira, S., Iida, T. and Honda, T. 2005. Microarray analysis identifies apoptosis regulatory gene expression in HCT116 cells infected with thermostable direct hemolysin-deletion mutant of *V. parahaemolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 328-334.
- Bhoopong, P. 2008. Molecular epidemiology and control of *V. parahaemolyticus* in Thailand. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla university, Songkhla.
- Bhoopong, P., Palittapongarnpim, P., Pomwised, R., Kiatkittipong, A., Kamruzzaman, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Ishibashi, M. and Vukkahakul, V. 2007. Variability of properties of *V. parahaemolyticus* strains isolated from individual patients. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1544-1550.
- Bhuiyan, N.A., Ansarizzaman, 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. *J. Clin. Microbiol.* 40: 284-286.
- Bogdanove, A.J., Wei, Z.M., Zhao, L. and Beer, S.V. 1996. *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of *yopN* of *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.* 178: 1720-1730.
- Carruthers, M.M. 1977. In vitro adherence of Kanagawa-positive *V. parahaemolyticus* to epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 136: 588-592.
- Carruthers, M.M. and Anderson, B. 1979. Inhibition by polyanions of adherence by Kanagawa-positive *V. parahaemolyticus*: a physicochemical effect. *J. Infect. Dis.* 140: 119-122.

- Cherwonogrodzky, J.W. and Clark, A.G. 1981. Effect of pH on the production of the Kanagawa hemolysin by *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 34: 115-119.
- Cherwonogrodzky, J.W., Skinner, M.A. and Clark, A.G. 1984. Effect of D-tryptophane on hemolysin production in *V. parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 20:909-911.
- Chiang, S.L. and Rubin, E.J. 2002. Construction of a *mariner*-based transposon for epitope-tagging and genomic targeting. *Gene* 296: 179-185.
- Chiou, C., Hsu, S., Chiu, S., Wang, T. and Chao, C. 2000. *V. parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3981-3986.
- Chowdhury, N.R., Chakraborty, S., Eampokalap, B., Chaicumpa, W.M., Chongsanguan, M., Moolasart, P., Mitra, R., Rammamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Nishibuchi, M., Takeda, Y. and Nair, G.B. 2000. Clonal dissemination of *V. parahaemolyticus* displaying similar DNA fingerprint but belonging to two different serovars (O3:K6 and O4:K68) in Thailand and India. *Epidemiol. Infect.* 125: 17-25.
- Chowdhury, N.R., Ishibachi, M., Thiem, V.D., Tuyet, D.T. N. Tung, T.V., Chien, B.T., Seidlein, L.V., Canh, D.G., Clements, J., Trach, D.D. and Nishibuchi, M. 2004. Emergence and serovar transition of *V. parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol. Immunol.* 48: 319-327.
- Chun, D., Chung, J.K., Tak, R. and Seol, S.Y. 1975. Nature of the Kanagawa phenomenon of *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 12: 81-87.

- Cook, D.W., Oleary, P., Hunsucker, J.C., Sloan, E.M., Bowers, J.C., Blodgett, R.J. and DePaola, A. 2002. *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in U.S. retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999. *J. Food Prot.* 65: 79-87.
- Colwell, R.R., Johnson, R., Wan, L., Lovelace, T.E. and Brenner, D.D. 1974. Numerical taxonomy and deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of some gram-negative fermentation bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 422-423.
- Cornelis, G.R. 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop type III weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 742-752.
- Cornelis, G.R. and Van Gijsegem, F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 735-774.
- Cornelis, G.R. and Wolf-Watz, H. 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 23: 861-867.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Kolber, D.R. and LappinScott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.
- Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Ahekruse, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M. and Slutsker, L. 2000. *V. parahaemolyticus* infection in the United States 1973-1998. *J. Infect. Dis.* 181: 1661-1666.
- Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., MsShan, A.L.II., Del Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, M. A., Pühr, N.D., Wells, J.G. and Angulo, F.G. 2001. Emergence of a new *V. parahaemolyticus* serotypes in raw oyster: a prevention quandary. *JAMA.* 284: 1541-1545.
- Denwanti, R. and Wong, A.C.L. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *E. coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 147-164.

- Davey, M.E. and O' Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C.A, Tenge, B.J., Nordstrom, J.L., Wells, J., Puhr, N. and Gendel, S.M. 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *V. parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3999-4005.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167-193.
- Donovan, T.J. and van Netten, P. 1995. Culture media for isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 77-91.
- Duguid, J.P. and Gillies, R.R. 1957. Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.* 74: 397-411.
- Enos-Berlage, J.L. and McCarter, L.L. 2000. Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *V. parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 182: 5513-5520.
- Enos-Berlage, J.L., Guvener, Z.T., Keenan, C.E. and McCarter, L.L. 2005. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *V. parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* 55: 1160-1182.
- Fabbri, A., Falsano, L., Frank, C., Donelli, G., Matarrese, P., Raimondi, F., Fasano, A. and Fiorentini, C. 1999. *V. parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulated cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. *Infect. Immun.* 67: 1139-1148.

- Fenselau, S., Balbo, I. and Bonas, U. 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 390-396.
- Flemming, H.C. 1993. Biofilms and environmental protection. *Water Sci. Technol.* 27: 1-10.
- Fletcher, M. 1996. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity*, Fletcher, M. ed. New York, N. Y., John Wiley & Sons, Inc. p. 1-24.
- Food and Drug Administration (FDA). 2004. Bacteriological Analytical Manual online Chapter 9 *Vibrio*. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html> (accessed 06/09/06)
- Food and Drug Administration (FDA). 2005. Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. <http://www.foodsafety.gov/~dms/vpra-toc.html>. (accessed 2/09/08)
- Fouz, B., Conchas, R.F., Bolinches, J., Romalde, J.L. and Toranzo, A. 1990. Relationship among pathogenic *V. anguillarum* and *V. tubiashii* with environmental vibrios. In *Pathology in Marine Sciences* ed. Perkins, F.O. and Cheng, T.C. San Diego, CA: Academic Press. pp. 77-89.
- Franco, P.F. and Hedreyda, C.T. 2006. Amplification and sequence analysis of the full length *toxR* gene in *V. harveyi*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52: 281-287.
- Geesey, G.G. 2001. Bacterial behavior at surfaces. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 296-300.
- Gilbert, P., Das, J. and Foley, I. 1997. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11: 160-167.

- Gingras, S.P. and Howard, L.V. 1980. Adherence of *V. parahaemolyticus* to human epithelial cell lines. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 39: 369-371.
- Gonzalez-Escalona, N., Blackstone, G.M. and DePaola, A. 2006. Characterization of a *V. alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *V. parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7925-7929.
- Guvener, Z.T. and McCarter, L.L. 2003. Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *V. parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 185: 5431-5441.
- Hackney, C.R., Kleeman, E.G., Ray, B. and Speck, M.L. 1980. Adherence as a method for differentiating virulent and avirulent strains of *V. parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 652-658.
- Hamada, D., Higurashi, T., Mayanagi, K., Miyata, T., Fukui, T., Iida, T., Honda, T. and Yanagihara, I. 2007. Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *V. parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle x-ray scattering and electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 365: 187-195.
- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J. and Kumagai, S. 2001. Improved method for detection of *V. parahaemolyticus* in seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5819-5823.
- Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, H., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M. and Kumagai, S. 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *V. parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the coastal Environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3883-3891.
- Honda, S., Goto, I., Minematsu, I., Ikeda, N., Asano, N., Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Nishibuchi, M., Honda, T. and Miwatani, T. 1987. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *V. parahaemolyticus*. *Lancet.* 1: 331-332.

- Honda, T., Ni, Y. and Miwatani, T. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *V. parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* 56: 961-965.
- Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T., Adachi, T. and Kim, J. 1992. The thermostable direct haemolysin of *V. parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Can. J. Microbiol.* 38: 1175-1180.
- Honda, T., Nishibuchi, M., Miwatani, T. and Kaper, J. B. 1986. Demonstration of a plasmid-borne gene encoding a thermostable direct hemolysin in *V. cholerae* non-O1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1218-1220.
- Hsieh, Y.C., Liang, S.M., Tsai, W.L., Chen, Y.H., Liu, T.Y. and Liang, C.M. 2003. Study of capsular polysaccharide from *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 71: 3329-3336.
- Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.
- Huq, A., Whitehouse, C.A., Grim, C.J., Alam, M. and Colwell, R.R. 2008. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 244-247.
- Iida, T., Park, K.S., Suthienkul, O., Kozawa, J., Yamaichi, Y., Yamamoto, K. and Honda, T. 1998. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *V. parahaemolyticus*. *Microbiol.* 144: 2517-2523.
- Iida, T., Suthienkul, O., Park, K., Tang, G.Q., Yamamoto, R.K., Ishibashi, M., Yamamoto, K. and Honda, T. 1997. Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *V. parahaemolyticus*. *J. Med. Microbiol.* 46: 639-645.

- Iida, T., Hattori, A., Tagomori, K., Nasu, H., Naim, R. and Honda, T. 2001. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *V. parahaemolyticus*. *Emerg. Infect. Dis.* 7:477-478.
- Iijima, Y., Yamada, H. and Shinoda, S. 1981. Adherence of *V. parahaemolyticus* and its relation to pathogenicity. *Can. J. Microbiol.* 27: 1252-1259.
- Iguchi, T., Kondo, S. and Hisatune, H. 1995. *V. parahaemolyticus* O serotypes from O1 and O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 287-292.
- Jackson, D., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.A. and Romeo, T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global carbon regulator CsrA of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 184: 290-301.
- James, D. 2005. The viable but non culturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93-100.
- Joseph, S.W., Colwell, R.R. and Kaper, J.B. 1982. *V. parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Microbio.* 10: 77-124.
- Kaneko, T. and Colwell, R. R. 1975. Adsorption of *V. parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Appl. Microbiol.* 29: 269-274.
- Kaper, J.B., Campen, K.R., Seidler, R.J., Baldini, M.H. and Falkow, S. 1984. Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon associated haemolysin of *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 45: 290-292.
- Kimberly, K.J. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 163-173.

- Kim, T.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. and Nishibuchi, M. 1999. Identification of *V. parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1173-1177.
- Kishishita, M., Matsuoka, N., Kumagai, K., Yamasaki, S., Takeda, Y. and Nishibuchi, M. 1992. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *V. parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2449-2457.
- Kodama, T., Rokuda, M., Park, K.S., Cantarelli, V.V., Matsuda, S., Iida, T. and Honda, T. 2007. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *V. parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Cell. Microbiol.* 9: 2598-2609.
- Lake, R., Hudson, A. and Cressey, P. 2003. Risk profile: *V. parahaemolyticus* in seafood, prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services. Institute of Environmental Science and Research Limited.
- Laohaprerthisan, V., Chowdhury, A., Kongmuang, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C. and Nishibuchi, M. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *V. parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 130: 395-406.
- Lasa, I. 2006. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int. Microbiol.* 9: 21-28.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W. and Caldwell, D.E. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173: 6558-6567.
- Lee, J.V. 1990. *Vibrio, Aeromonas and Plesiomonas* In: Parker, M.T. and Duerden, B.I. ed. *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. 8th ed. Philadelphia: B. C. Decker. Vol II. pp. 514-527.

- Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J.J. and Nishibuchi, M. 1993. *V. parahaemolyticus* has a homolog of the *V. cholerae* *toxRS* operon that mediates environment induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J. Bacteriol.* 175: 3844-3855.
- McCarter, L.L. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7: 18-29.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M. and Iida, T. 2003. Genome sequence of *V. parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet.* 361: 743-749.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H., Depaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J. and Nishibuchi, M. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *V. parahaemolyticus* and emergence of related strains of evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 578-585.
- Maugeri, T.L., Caccamo, D. and Gugliandolo, C. 2000. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *J. Appl. Microbiol.* 89:261-266.
- Meador, E., Parsons, M., Bopp, C., Gerner-Smidt, P., Painter, J. and Vora, G. 2007. Virulence gene and pandemic group-specific marker profiling of clinical *V. parahaemolyticus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1133-1139.
- Mecenas, J. and Strauss, E.J. 1996. Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg. Infect. Dis.* 2: 271-288.

- Michiels, T., Vanooteghem, J.C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P. and Cornelis, G.R. 1991. Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. 173: 4994-5009.
- Miller, V.L. and Mekalanos, J.J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutation: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *V. cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. 170: 2575-2583.
- Miyamoto, Y., Obara, Y., Nikkawa, T., Yamai, S., Kato, T., Yamada, Y. and Ohashi, M. 1980. Simplified purification and biophysicochemical characteristics of Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *V. parahaemolyticus*. Infect. Immun. 28: 567-576.
- Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K. and Yamai, S. 1969. In vitro hemolytic characteristic of *V. parahaemolyticus*: its close relation with human pathogenicity. J. Bacteriol. 100: 1147-1149.
- Mizunoe, Y., Wai, S.N., Ishikawa, T., Takeda, A. and Yoshida, S. 2000. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *V. parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. FEMS Microbiol. Lett. 186: 115-120.
- Nagayama, K., Oguchi, T., Arita, M. And Honda, T. 1995. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *V. parahaemolyticus*. Infect. Immun. 63: 1987-1992.
- Nagy, Z and Chandler, M. 2004. Regulation of transposition in bacteria. Res. Microbiol. 155: 387-398.
- Nakano, M., Takahashi, A., Sakai, Y. and Nakaya, Y. 2007. Modulation of pathogenicity with norepinephrine related to the type III secretion system of *V. parahaemolyticus*. J. Infect. Dis. 195: 1353-1360.

- Nakasone, N. and Iwanaga, M. 1990. Pili of a *V. parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor. *Infect. Immun.* 58: 61-69.
- Nishibuchi, M. and Kaper, J.B. 1990. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *V. parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* 4: 87-99.
- Nishibuchi, M. and Kaper, J.B. 1985. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *V. parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 162: 558-564.
- Nishibuchi, M. and Kaper, J.B. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *V. parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.* 64: 2093-2099.
- Nishibuchi, M., Khaeomanee-iam, V., Honda, T., Kaper, J. B. and Miwatani, T. 1990. Comparative analysis of the hemolysin genes of *V. cholerae* non-O1, *V. mimicus* and *V. hollisae* that are similar to the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 251-256.
- Nishibuchi, M., Doke, S., Toizumi, S., Umeda, T., Yoh, M. and Miwatani, T. 1988. Isolation from a coastal fish of *V. hollisae* capable of producing a hemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2144-2146.
- Nishibuchi, M., Ishibashi, M., Takeda, Y. and Kaper, J.B. 1985. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in DNA colony hybridization test. *Infect. Immun.* 49: 481-486.
- Nishibuchi, M., Kumagai, K. and Kaper, J.B. 1991. Contribution of the *tdh1* gene of Kanagawa phenomenon-positive *V. parahaemolyticus* to production of extracellular thermostable direct hemolysin. *Microb. Pathog.* 11: 453-460.

- Nishibuchi, M., Taniguchi, T., Misawa, T., Khaeomane-iam, V., Honda, T. and Miwatani, T. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 57: 2691-2697.
- Nivens, D.E., Ohma, D.E., Williams, J. and Franklin, M.J. 2001. Role of alginate and its *O* acetylation in formation of *P. aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.* 183:1047-1057.
- Nyvad, B. and Kilian, M. 1990. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 24: 267-272.
- Okitsu, T., Osawa, R., Pornruangwong, S. and Yama, S. 1997. Urea hydrolysis and suppressed production of thermostable direct hemolysin (TDH) by *V. parahaemolyticus* associated with presence of TDH-related hemolysin genes. *Curr. Microbiol.* 34: 314-317.
- Okuda, J. and Nishibuchi, M. 1998. Manifestation of the Kanagawa phenomenon the virulence-associated phenotype of *V. parahaemolyticus* depend on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct hemolysin gene. *Mol. Microbiol.* 30: 499-511.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S.L., Janda, J.M. and Nishibuchi, M. 1997a. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *V. parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1965-1977.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Garg, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B. and Nishibuchi, M. 1997b. Emergence of a unique O3:K6 clone of *V. parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3150-3155.

- Oliver, J.D., Waener, R.A. and Cleland, D.R. 1983. Distribution of *V. vulnificus* and other lactose - fermenting vibrios in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 985-998.
- Ono, T., Park, K.S., Ueta, M., Iida, T. and Honda, T. 2006. Identification of proteins secreted via *V. parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infection and Immunity.* 74: 1032-1042.
- Osawa, R. and Yamai, S. 1996. Production of thermostable direct hemolysin by *V. parahaemolyticus* enhanced by conjugated bile acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3023-3025.
- Osawa, R., Okitsu, T., Morozumi, H. and Yamai, S. 1996. Occurrence of urease-positive *V. parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 725-727.
- Osorio, C.R. and Klose, K.E. 2000. A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 182: 526-528.
- O' Toole, G.A. and Kolter, R. 1998a. Flagellar and twitching motility are necessary for *P. aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295-304.
- O' Toole, G.A. and Kolter, R. 1998b. Initiation of biofilm formation in *P. fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461.
- Pace, J.L., Chai, T.J., Rossi, H.A. and Jiang, X. 1997. Effect of bile on *V. parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2372-2377.

- Park, K.S., Arita, M., Iida, T. and Honda, T. 2005. *vpaH*, a gene encoding a novel histone-like nucleoid structure-like protein that was possibly horizontally acquired, regulates the biogenesis of lateral flagella in *trh*-positive *V. parahaemolyticus* TH3996. *Infect. Immun.* 73: 5754-5761.
- Park, K.S., Ono, T., Roduda, M., Jang, M.H., Okada, K., Iida, T. and Honda, T. 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 72: 6659-6665.
- Park, M.Y. 2004. Virulence of environmental urease-positive and Kanagawa-phenomenon negative *V. parahaemolyticus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 330-336.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13: 27-33.
- Poda, G. 1997. *Vibrio* 97-117. In *Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari* Dossier del Centro di documentazione per la salute della Regione Emilia-Romagna.
- Pratt, L.A. and Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *E. coli* biofilm formation: defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30: 285-294.
- Preston, G., Huang, H.C., He, S.Y. and Collmer, A. 1995. The HrpZ proteins of *P. syringae* pvs. *Syringae*, *glycinea*, and tomato are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 717-732.
- Raimondi, F., Kao, J.P., Kaper, J.B. Guandalini, S. and Fasano, A. 1995. Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *V. parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model. *Gastroenterol.* 109: 381-386.

- Sakurai, J., Honda, T., Jinguji, Y., Arita, M. and Miwatani, T. 1976. Cytotoxic effect of the thermostable direct hemolysin produced by *V. paraheamolyticus* on FL cells. *Infect. Immun.* 13: 876-883.
- Sakurai, J., Matsuzaki, A., Takeda, Y. and Miwatani, T. 1974. Existence of two distinct hemolysins in *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 9: 777-780.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K.S., Kodama, T. and Honda, T. 2006. Two type IV pili of *V. parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 264: 89-97.
- Shinoda, S. 1999. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. *J. Nat. Toxins.* 8: 259-269.
- Shinoda, S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi, S., Yamamoto, S., Taniguchi, H. and Mizuguchi, Y. 1991. Purification and characterization of a lecithin-dependent hemolysin from *E. coli* transformed by a *V. parahaemolyticus* gene. *J. Gen Microbiol.* 137: 2705-2711.
- Su, Y.C. and Liu, C. 2007. *Vibrio paraheamolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 24: 549-558.
- Sutherland, I.W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9: 222-227.
- Suthienkul, O., Ishibashi, M., Iida, T., Nettip, N., Supavej, S., Eampokalap, B., Makino, M. and Honda, T. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *V. paraheamolyticus* strains isolated in Thailand. *J. Infect. Dis.* 172: 1405-1408.

- Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H., Fugushima, S., Takano, J., Nishibuchi, M. and Takeda, F. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *V. parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probes*. 6: 477-487.
- Takahashi, A., Sato, Y., Shiomi, Y., Cantarelli, V.V., Iida, T., Lee, M. and Honda, T. 2000a. Mechanism of chloride secretion induced by thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus* in human colonic tissue and intestinal epithelial cell line. *J. Med. Microbiol.* 49: 801-810.
- Takahashi, A., Kenjyo, N., Imura, K., Myonsun, Y. and Honda, T. 2000b. Cl-secretion in colonic epithelial cells induced by the *V. parahaemolyticus* hemolytic toxin related to thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* 68: 5435-5438.
- Takeda, Y., Takeda, T., Honda, T. and Miwatani, T. 1976. Inactivation of the biological activities of the thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus* by ganglioside G_{T1}. *Infect. Immun.* 14: 1-5.
- Takeda, Y. 1988. Thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. *Methods Enzymol.* 165: 189-193.
- Tang, G., Iida, T., Yamamoto, K. and Honda, T. 1997. Analysis of functional domains of *V. parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin using monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 289-296.
- Taniguchi, H., Ohta, H., Ogawa, M. and Mizuguchi, Y. 1985. Cloning and expression in *E. coli* of *V. parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J. Bacteriol.* 162: 510-515.

- Taniguchi, H., Hirano, H., Kubomura, S., Higashi, K. and Mizuguchi, Y. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *V. parahaemolyticus*. *Microb. Pathog.* 1: 425-432.
- Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A. and Musti, M. 2004. A review updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 117-126.
- Terai, A., Baba, K., Shirai, H., Yoshida, O., Takeda, Y. and Nishibuchi, M. 1991. Evidence for insertion sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 173: 5036-5046.
- Thompson, C.C., Thompson, F.L., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Dawyndt, P. and Swings, J. 2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 919-924.
- Tolker, N.T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S. and Molin, S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilm. *J. Bacteriol.* 182: 6482-6489.
- Troisfontaines, P. and Cornelis, G.R. 2005. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)*. 20: 326-339.
- Tuda, K. 2008. Colonization and invasion by bacterial pathogens. http://www.textbookofbacteriology.net/colonization_2.html (accessed 28/02/09).
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P. and Boucher, C. 1995. The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol. Microbiol.* 15: 1095-1114.

- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J. and Perret, X. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* 28: 1381-1389.
- Vuddhakul, V. 2008. *V. parahaemolyticus*: an important seafood-borne pathogen. iQue media: Songkhla.
- Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Loahaprerthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C. and Nishibuchi, M. 2000. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *V. parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2685-2689.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L. and Kolter, R. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *V. cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* 39: 223-235.
- William, J.G.K., 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 Res.* 18: 6531-6535.
- Winstanley, C. and Hart, C.A. 2001. Type III secretion systems and pathogenicity islands. *J. Med. Microbiol.* 50: 116-126.
- Wong, H.C. 2003. Detecting and molecular typing of *V. parahaemolyticus*. *J. Food Drug analysis.* 11: 100-107.
- Wong, H.C., Lieu, S.H., Wang, T.K., Lee, C.I., Chiou, C.S., Liu, D.P., Nishibuchi, M. and Lee, B.K. 2000. Characteristics of *V. parahaemolyticus* serovar O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3981-3986.

- Wong, H.C. and Wang, P. 2004. Induction of viable but non culturable state in *V. parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Applied Microbiol.* 96: 359–366.
- Wong, H.C., Wang, P., Chen, S.Y. and Chiu, S.W. 2004. Resuscitation of viable but non-culturable *V. parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiology Letters.* 233: 269-275.
- Wootipoom, N., Bhoopong, P., Pomwised, R., Nishibuchi, M., Ishibashi, M and Uddhakul, V. (2007). A decrease in the propotion of infections by pandemic *V. parahaemolyticus* in Hat Yai Hospital, southern Thailand. *J. Med. Microbiol.* 56: 1630-1638.
- World Health Organization (WHO). 1999. *V. parahaemolyticus*, Japan. 1996-1998. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 74: 357-364.
- Yeung, P.S., Hayes, M.C., DePaola, A., Kaysner, C.A., Kornstein, L. and Boor, K.J. 2002. Comparative phenotypic, molecular, and virulence characterization of *V. parahaemolyticus* O3:K6 isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2901-2909.
- Yoh, M., Tang, G.Q. and Iida, T. 1996. Phosphorylation of a 25 kDa protein is induced by thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 1365-1369.
- Zhang, X.H. and Austin, B. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1011-1019.
- Zhang, X.H., Meaden, P.G. and Austin, B. 2001. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *V. harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3161-3167.
- Zhu, J. and Mekalanos, J.J. 2003. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *V. cholerae*. *Dev. Cell.* 5:647-656.

Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L. and Mekalanos, J.J. 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *V. cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 3129-3134.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Blood agar (BA)

Nutrient substrate (heart extract และ peptones)	20	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง BA 40 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C เติม เลือดคน 5% ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

2. Gelatin agar

Yeast extract	1	g
Peptone	4	g
Gelatin	15	g
Sodium chloride	30	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 1000 ml และนำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

3. Luria Bertani (LB) agar

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง LB agar 35 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

4. Luria Bertani (LB) broth

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง LB broth 20 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

5. Motility test medium

Beef extract	3	g
Pancreatic digest of gelatin	10	g
Sodium Chloride	5	g
Agar	4	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง Motility test medium 22 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเติมยาปฏิชีวนะตามต้องการ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแบ่งใส่หลอดที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 3 ml

6. Nutrient agar (NA) ผสม 1% Skim milk

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง NA 23 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเติม 10% Skim milk ที่นำไป autoclave อุณหภูมิ 110°C เวลา 10 นาที ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% Skim milk ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

7. Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) Agar

Yeast extract	5	g
Proteose peptone no.3	10	g
Sodium citrate	10	g
Sodium thiosulfate	10	g
Oxgall	8	g
Sucrose	20	g
Sodium chloride	10	g
Ferric citrate	1	g
Brom thymol blue	0.04	g
Thymol blue	0.04	g
Bacto agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง TCBS agar 89 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

8. Tryptic soy agar (TSA)

Pancreatic digest of casein	15	g
Papaic digest of soybean	5	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง TSA 40 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

9. Tryptic soy broth (TSB)

Pancreatic digest of casein	15	g
Papaic digest of soybean	5	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง TSB g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

10. Wagatsuma agar

Yeast extract	0.5	g
Bacto peptone	1	g
Sodium chloride	7	g
D-mannitol	0.5	g
Agar	1.5	g
di-potassium hydrogen phosphate	5	g
Crystal violet	0.1	mg
น้ำกลั่น	90	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 90 ml และนำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50-55°C แล้วเติมสารละลายของ 20% เลือดกรู๊ป O (เลือดล้างด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง) ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

11. Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar

Yeast extract	3	g
Sodium chloride	5	g
D-Xylose	3.75	g
Lactose	7.5	g
Sucrose	7.5	g
L-Lysine	5	g
Sodium deoxycholate	1	g
Sodium thiosulfate	6.8	g
Ammonium iron (III) citrate	0.8	g
Phenol red	0.08	g
Agar	14.5	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ชั่ง XLD agar 55 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน
วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

1.1 Loading dye

ชั่ง Bromphenol blue 0.25 g และ Sucrose 4 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

1.2 10x Tris borate EDTA (TBE) buffer

ชั่ง Tris base 108 g และ Boric acid 55 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 ml นำไปต้มพอละลาย อย่าให้เดือด แล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 จำนวน 40 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ml ด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำไปใช้ให้เจือจางในระดับความเข้มข้น 1:10 (1x TBE)

1.3 Ethidium bromide (10 mg/ml)

ชั่ง Ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนโดยใช้แท่งแม่เหล็กจนกว่าจะละลาย (ใช้เวลาหลายชั่วโมง) เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (ต้องสวมถุงมือทุกครั้งเตรียมและระวังอย่าหายใจเอาผง Ethidium bromide ระหว่างการชั่ง)

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform

2.1 Phosphate buffer solution (PBS) pH 8.0

Na ₂ HPO ₄	1.44	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
KCl	0.2	g
Sodium chloride	8	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

2.2 1 M EDTA

ชั่ง EDTA 372.2 g ในน้ำกลั่น 800 ml กวนอย่างแรงโดยใช้แท่งแม่เหล็กแล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH ชนิดเกล็ด ซึ่ง EDTA สามารถละลายได้หมดพอดี จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

2.3 PBS-EDTA

ผสม PBS pH 8.0 ปริมาตร 240 μ l และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 60 μ l จะได้ PBS-EDTA ปริมาตร 300 μ l

2.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่น 90 ml อุ่นเล็กน้อยเพื่อให้ละลายดีขึ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5 Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)

ผสม Chloroform และ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม melted phenol ในอัตราส่วน 25 ผสมให้เข้ากันดี แล้วเติม 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อปิดผิวสารละลาย เขย่าแรงๆ ให้ผสมกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 วัน ปล่อยให้แยกชั้น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

2.6 3 M Sodium acetate (NaOAc)

ละลาย Sodium acetate trihydrate 408.1 g ด้วยน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วย Glacial acetic เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

2.7 เอนไซม์ RNase (10 mg/ml)

ชั่ง เอนไซม์ RNase 100 mg ละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 15 mM Sodium chloride ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

2.8 Tris EDTA (TE) buffer

ผสมสารละลาย 10 mM Tris-HCl และสารละลาย 1 mM EDTA โดยละลาย Tris-HCl 1.211 g ในน้ำกลั่น แล้วเติมสารละลาย 0.5 M EDTA 1 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3. การเตรียมสารละลายสำหรับ Southern blot hybridization

3.1 Denaturation solution

NaCl 87.66 g

NaOH 20.0 g

เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.2 Neutralization solution

NaCl 87.66 g

Tris 60.57 g

น้ำกลั่น 1000 ml

ชั่งสารแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 700 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วยกรด HCl เข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.3 10x Standard saline citrate (SSC)

NaCl 87.5 g

Sodium citrate dehydrate 44.1 g

น้ำกลั่น 1000 ml

ชั่งสารแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 700 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.4 Prehybridization solution (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I; Roche)

ละลาย DIG Easy Hyb Granules (ขวด no. 7) ด้วย double distilled water ปราศจากเชื้อปริมาตร 64 ml โดยเติมน้ำก่อนครั้งหนึ่ง ใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) คนให้ละลาย 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเริ่มละลายดีให้เติมน้ำส่วนที่เหลือ

3.5 Hybridization solution (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I; Roche)

ละลาย DIG Easy Hyb Granules (ขวด no. 7) ด้วย double distilled water ปราดจาก เชื้อปริมาณ 64 ml โดยเติมน้ำก่อนครึ่งหนึ่ง ใช้แท่งแม่เหล็กคนให้ละลาย 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเริ่มละลายดีให้เติมน้ำส่วนที่เหลือ แล้วดูดสารละลายที่ละลายดีแล้วผสมกับดีเอ็นเอ ตรวจจับที่ติดฉลากด้วย DIG (DIG-labeled DNA probe) ตามความเข้มข้นที่กำหนด ก่อนใช้ดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย DIG ให้นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และจุ่มในน้ำแข็งทันทีอีก 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตรวจจับแยกเป็นสายเดี่ยว

3.6 Washing buffer

Maleic acid	5.8	g
NaCl	4.38	g
Tween 20	1.5	ml
น้ำกลั่น	500	ml

ชั่งสารแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย NaOH ชนิด เกลิต เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 500 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม Tween 20

3.7 Blocking solution (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I; Roche)

เจือจาง 10x blocking solution (ขวด no. 6) เป็น 1x blocking solution ด้วย Maleic acid buffer

3.8 Antibody solution (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I; Roche)

ปั่นเหวี่ยง Anti-Digoxigenin-AP Conjugate (ขวด no. 4) 5 นาที ที่ความเร็ว 5,000 x g ก่อนใช้ หลังจากนั้นดูดสารละลายด้วยความระมัดระวัง โดยให้ดูดในปริมาณที่ต้องใช้จากส่วนบนของสารละลาย แล้วเจือจาง Anti-Digoxigenin-AP Conjugate เป็น 1:5,000 (150 mU/ml) ด้วย blocking solution

3.9 Detection buffer

NaCl	0.58	g
Tris base	1.21	g
น้ำกลั่น	100	ml

ชั่งสารแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 60 ml ปรับ pH ให้ได้ 9.5 ด้วยกรด HCl เข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.10 Color substrate solution (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I; Roche)

เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อจะใช้และเก็บในที่มืด โดยใส่ 40 μ l ของ NBT/BCIP stock solution (ขวด no. 5) ใน 2 ml ของ detection buffer

3.11 Maleic acid buffer

Maleic acid	5.8	g
NaCl	4.38	g
น้ำกลั่น	500	ml

ชั่งสารแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย NaOH ชนิด เกล็ด เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 500 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

4. การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

4.1 2x SDS sample buffer (10 ml)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25	ml
50% Glycerol	4.5	ml
10% SDS	2	ml
0.5% Bromphenol blue	200	μ l
น้ำกลั่น	1.55	ml

ผสมสารทั้งหมดแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำไปใช้งานให้เติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 50 μ l เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

4.2 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

ละลาย Tris base 27.23 g ด้วยน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย HCl จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 150 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

4.3 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

ละลาย Tris base 6 g ด้วยน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย HCl จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

4.4 10% Ammonium persulfate (APS)

ละลาย Ammonium persulfate 0.02 g ด้วยน้ำกลั่น 200 μ l เตรียมก่อนใช้งาน

4.5 10x Running buffer

Tris base	30.3	g
Glycine	186.0	g
SDS	10	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4°C (ในระหว่างที่เก็บ ถ้าสารละลายมีการตกตะกอน ให้กวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง) เมื่อนำไปใช้ให้เจือจางในระดับความเข้มข้น 1:10 (1x)

4.6 Staining solution

ละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 0.25 g ด้วย methanol 50 ml และ Glacial acetic acid 10 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml ก่อนนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1

4.7 Destaining solution

ผสม methanol 125 ml กับ Glacial acetic acid 62.5 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml

5. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

5.1 Ampicillin 50 mg/ml

ชั่งยา 0.25 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อจะนำไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวณปริมาตรที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

5.2 Chloramphenicol 50 mg/ml

ชั่งยา 0.25 g ละลายด้วย absolute ethanol จนเข้ากันดี เติมน้ำกลั่นให้ครบ 5 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อจะนำไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวณปริมาตรที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

5.3 Streptomycin 50 mg/ml

ชั่งยา 0.25 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อจะนำไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวณปริมาตรที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

5.4 Tetracycline 50 mg/ml

ชั่งยา 0.25 g ละลายด้วย 0.1 N HCl จนเข้ากันดี เติม 0.1 M Phosphate buffer pH 4.5 ให้ครบ 5 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อจะนำไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวณปริมาตรที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

5.5 Kanamycin 100 mg/ml

ชั่งยา 0.5 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อจะนำไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวณปริมาตรที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

6. การเตรียมสารละลายอื่น ๆ

6.1 Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4

Na ₂ HPO ₄	1.44	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
KCl	0.2	g
Sodium chloride	8	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

6.2 Krebs solution

NaCl	6.92	g
KCl	0.35	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.29	g
CaCl ₂	0.28	g
KH ₂ PO ₄	0.16	g
NaHCO ₃	2.1	g
D-glucose	2	g
Ascorbic acid	0.02	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมด (ยกเว้น CaCl₂ ให้แยกละลายต่างหาก) ละลายในน้ำกลั่น 800 ml จากนั้นนำมารวมกับสารละลาย CaCl₂ ที่ได้ละลายไว้แล้ว ปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm

6.3 0.1% Crystal violet solution

ละลาย Crystal violet 0.1 g ด้วย absolute ethanol จนเข้ากันดี แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

6.4 0.1 M Phosphate buffer pH 4.5

ซึ่ง KH₂PO₄ 13.61 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 900 ml ปรับ pH ให้ได้ 4.5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 ml

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์โปรตีน

1. SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

1.1 การเตรียมวุ้น

ประกอบด้วยแผ่นวุ้น 2 ชั้น คือ วุ้นส่วนบน (stacking gel) ซึ่งมี 4% polyacrylamide และวุ้นส่วนล่าง (separating gel) ซึ่งมี 12% polyacrylamide โดยมีส่วนประกอบดังนี้

ส่วนประกอบ	Separating gel 12%	Stacking gel 4%
30% Acrylamide/bis	1.6 ml	0.33 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.0 ml	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	0.63 ml
10% SDS	40.0 μ l	25.0 μ l
Distilled water	1.34 ml	1.5 ml
TEMED	2.0 μ l	12.5 μ l
10% Ammonium persulfate	20.0 μ l	20.0 μ l
Total volume	4.0 ml	2.5 ml

1.2 การแยกโปรตีน

ประกอบชุดเจล eletrophoresis จากนั้นเติม 1x Running buffer (ภาคผนวก ข 4.5) ให้เต็ม chamber แล้วเติมตัวอย่าง ในแต่ละหลุมปริมาตร 10 μ l ต่อชุดเจล electrophoresis เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ สังเกตสีของโบรโมฟินอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า

1.3 การย้อมสีโปรตีนในแผ่นวุ้น

ย้อมใน staining solution (ภาคผนวก ข 4.6) นาน 2 ชม. จากนั้นนำมาแช่ใน destaining solution (ภาคผนวก ข 4.7) เป็นเวลา 1 ชม. เทสารออก แล้วทำซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

ภาคผนวก ง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

1. เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่ช่วง ปี พ.ศ. 2543-2548 จำนวน 76 ไอโซเลต

พ.ศ. (จำนวนไอโซเลตทั้งหมด)	หมายเลขของไอโซเลต
2543 (8)	PSU 209, 216, 241, 253, 260, 261, 266, 272
2544 (8)	PSU 286, 292, 310, 315, 318, 344, 386, 426
2545 (14)	PSU 599, 600, 602, 617, 627, 643, 648, 667, 686, 695, 708, 709, 717, 718
2546 (7)	PSU 952, 980, 986, 1033, 1039, 1045, 1051
2547 (19)	PSU 1860, 1862, 1869, 1907, 1923, 1928, 1932, 1944, 1945, 1978, 1983, 1985, 1989, 1995, 2005, 2016, 1671, 1751, 1791
2548 (20)	PSU 2054, 2061, 2063, 2064, 2068, 2071, 2073, 2078, 2262, 2264, 2274, 2277, 2458, 2484, 2493, 2526, 2533, 2538, 2591, 2593

2. เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁺*, *tdh⁺ trh⁻*, *tdh⁻ trh⁺* ที่แยกจากผู้ป่วยและสายพันธุ์ *tdh⁻ trh⁻* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม จำนวนทั้งหมด 20 ไอโซเลต ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

แหล่งของตัวอย่าง	สายพันธุ์ (จำนวนไอโซเลต)	หมายเลขของไอโซเลต
ผู้ป่วย	<i>tdh⁺ trh⁺</i> (5)	PSU 2022, 3895, 3923, 3934, 3935
	<i>tdh⁺ trh⁻</i> (5)	PSU 1681, 3894, 3897, 3898, 3900
	<i>tdh⁻ trh⁺</i> (5)	PSU 2490, 3901, 3952, 2523, 2552
สิ่งแวดล้อม	<i>tdh⁻ trh⁻</i> (5)	PSU 2185, 2196, 2198, 2199, 2201

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวแวณูรมา เจ๊ะเมาะ	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4910220080	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) (เกียรตินิยม อันดับ 2)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2544

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Waenurama, C., Rattanarujji, P. and Varaporn, V. 2008. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* *tdh*⁻ *trh*⁻ isolates from Hat Yai hospital. 10th National Graduate Research Conference. 11-12 September 2008. Sukhothai Thammathirat Open University.