ลักษณะของ *Vibrio alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

Characteristics of *Vibrio alginolyticus* Isolated from Clinical and Environmental Samples

ปานสุรีย์ จริยวิจิตร

Pansuree Jariyavijit

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
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ลักษณะของ *Vibrio alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม
ผู้เขียน นางสาวปานสุรีย์ จริยวิจิตร
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……
(รองศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ
(ดร.พวงทิพย์ ภู่พงษ์)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

……กรรมการ
(ดร.ณัฐวรรณ คงเกิด)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

……
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ลักษณะของ *Vibrio alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม
ผู้เขียน นางสาวปานสุรีย์ จริยวิจิตร
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

Vibrio alginolyticus เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคน เช่น การติดเชื้อทางบาดแผล การติดเชื้อในกระแสโลหิต และก่อโรคระบบทางเดินอาหารอักเสบ และเป็นเชื้อสำคัญที่ก่อโรคในสัตว์ทะเลจำพวก ปลา กุ้ง หอย ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในหลายประเทศเป็นอย่างมาก สายพันธุ์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่มียีนสร้างสารพิษ ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรง คือ ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และสร้างโปรตีเอส นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *trh* ซึ่งเป็นยีนก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหายีน *tdh* และ *trh* จากเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. alginolyticus* จำนวน 436 ไอโซเลต ที่แยกได้จากสัตว์ทะเล น้ำทะเล และดินตะกอนบริเวณเกาะตะรุเตา เกาะยอ และตลาดคลองเรียน โดยวิธี colony hybridization พบว่ามี 12 ไอโซเลต และ 8 ไอโซเลตที่ให้ผลบวก เมื่อทดสอบด้วย *tdh* และ *trh* probe ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบยืนยันด้วยวิธี Southern blot hybridization ไม่พบยีนทั้ง 2 ชนิด และจากการศึกษาลักษณะของ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่จำนวน 6 ไอโซเลต และแยกจากกุ้งและปลาที่ติดเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลต ผลการบ่งชี้ทางชีวเคมีพบว่าเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลตเป็น *V. alginolyticus* แต่การบ่งชี้ทางระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ยีน *tox*R, collagenase และ *omp*K เป็นยีนเป้าหมาย พบว่าเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลต ให้ผลแตกต่างกันโดยเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย 4, 5 และ 3 ไอโซเลต ให้ผลบวกต่อยีน *tox*R, collagenase และ *omp*K ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่แยกจากกุ้งและปลาที่ติดเชื้อทุกไอโซเลตให้ผลลบทั้งหมด และจากการทำ Southern blot hybridization พบว่าเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลตไม่มียีน *tdh* และ *trh* เมื่อศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์โดยเทคนิค Arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน แสดงว่า *V. alginolyticus* มีความหลากหลายของสายพันธุ์สูงมาก

Thesis Title	Characteristics of *Vibrio alginolyticus* Isolated from Clinical and Environmental Samples
Author	Miss Pansuree Jariyavijit
Major Program	Microbiology
Academic Year	2011

ABSTRACT

Vibrio alginolyticus is one of human *Vibrio* pathogens which causes wound infections, septicemia and gastroenteritis. In addition it also causes infects marine animals, such as fish, shrimp and shellfish that and causes a large damage in economy. Most of pathogenic strains produced extracellular products such as hemolysin and protease. A report demonstrated that virulence gene (*trh* gene) of *V. paraheamolyticus* was detected in an *V. alginolyticus* isolate. In this study, a total of 436 suspected *V. alginolyticus* isolates obtained from Tarutao island, Yor island and Klong rein market were examined for *tdh* and *trh* gene using colony hybridization. Twelve and eight isolates showed weakly positive with *tdh* and *trh* probes, respectively. These isolates were confirmed by Southern blot hybridization and they were negative for both genes. Six of *V. alginolyticus* isolates obtained from patients at Hat-Yai hospital and 6 isolates of *V. alginolyticus* obtained from diseased marine animals identified by biochemical tests were confirmed by PCR targeted to the *tox*R gene, collagenase gene and *omp*K gene. It was found that 4, 5 and 3 isolates obtained from patients were positive for *tox*R gene, collagenase gene and *omp*K gene, respectively. However, all isolates obtained from diseased marine animals were negative. Southern blot hybridization revealed that all isolates were negative for *tdh* and *trh* genes. Using AP-PCR technique, DNA profiles of all isolates were different which indicated high diversity among *V. alginolyticus* strains.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บททรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	28
2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	29
อุปกรณ์และเครื่องมือ	30
วิธีการทดลอง	32
3. ผลการทดลอง	47
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	60
5. สรุปผลการทดลอง	63
เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก ก	76
ภาคผนวก ข	80
ประวัติผู้เขียน	86

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 อาการทางคลินิกที่เกิดจากการติดเชื้อในจีนัส *Vibrio*	6
1.2 ลักษณะทางชีวเคมีของ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus*	11
1.3 โรคที่เกิดจาก *V. alginolyticus* ในคน	14
2.1 ลำดับเบสของ primers และขนาดของผลผลิต PCR	34
3.1 ผลการแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อมบนอาหาร CV	47
3.2 หมายเลขไอโซเลตที่ให้ผลบวกอ่อนๆ ในการตรวจหายีน *tdh* และ *trh*2 ด้วยวิธี colony hybridization	48
3.3 ผลการตรวจหายีน *tdh* และ *trh* และผลการทดสอบทางชีวเคมี ของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค	50
3.4 ผลการบ่งชี้ลักษณะของ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค โดยวิธี PCR	57

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 ขั้นตอนของเทคนิค PCR	22
1.2 ขั้นตอนของเทคนิค Southern blot hybridization	24
1.3 ขั้นตอนของเทคนิค colony hybridization	26
2.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform	39
2.2 เทคนิค Southern blotting	40
2.3 การจัดเรียงลำดับเบส และตำแหน่งของไพรเมอร์ *tox*R1	44
2.4 การจัดเรียงลำดับเบส และตำแหน่งของไพรเมอร์ *tox*R2	45
3.1 ผลการทำ colony hybridization ของ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมด้วยตัวตรวจจับยีน *tdh* และ *trh*2 (*tdh* และ *trh*2 probe)	51
3.2 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อมเมื่อใช้ยีน *tdh* เป็นตัวตรวจจับ	52
3.3 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อมเมื่อใช้ยีน *trh*2 เป็นตัวตรวจจับ	53
3.4 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคเมื่อใช้ยีน *tdh* เป็นตัวตรวจจับ	54
3.5 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคเมื่อใช้ยีน *trh*1 เป็นตัวตรวจจับ	55
3.6 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคเมื่อใช้ยีน *trh*2 เป็นตัวตรวจจับ	56
3.7 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค โดยใช้ primer 2	59

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

L	=	liter
ml	=	milliliter
µl	=	microliter
cm	=	centimeter
mm	=	millimeter
µm	=	micrometer
nm	=	nanometer
g	=	gram
µg	=	microgram
ng	=	nanogram
A	=	adenine
T	=	thymine
C	=	cytosine
G	=	guanine
dNTPs	=	deoxyribonucleic triphosphate
dUTP	=	deoxyuracil triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNA	=	ribonucleic 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
°C	=	degree celcieus
NaCl	=	sodium chloride

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

OD	=	optical density
Taq	=	*Thermus aquaticus*
Hind III	=	*Haemophilus influenzae*
NBT	=	nitroblue tetrazolium chloride
BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
pH	=	hydrogen ion concentration
Cfu	=	colony forming unit
CV	=	CHROMagar™ Vibrio
LB	=	Luria-Bertani
TCBS	=	thiosulfate citrate bile salt sucrose agar
TSA	=	tryptic soy agar
CA	=	Chromagar vibrio
%	=	percentage
ชม.	=	ชั่วโมง

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* ประกอบด้วยเชื้อประมาณ 69 สปีชีส์ (Vuddhakul, 2008) มีทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค สายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่พบบ่อยว่าทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ สายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการก่อโรครองลงมาคือ *V. alginolyticus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* การติดเชื้อส่วนใหญ่มาจากการบริโภคอาหารทะเลที่ไม่ปรุงให้สุก หรือผ่านกระบวนการปรุงที่ไม่สะอาด ทำให้เกิดโรคอหิวาต์ (cholera) โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง เกิดการติดเชื้อทางบาดแผล และเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด บางครั้งอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ (Di Pinto *et al.,* 2006)

Vibrio alginolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึง 10% เคลื่อนที่ในอาหารเหลวโดยอาศัยแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ขั้ว (single polar flagellum) มีแหล่งที่อยู่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำทะเล น้ำกร่อย สามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากน้ำทะเลทั่วโลก และยังพบได้ในกุ้ง หอย ปู และปลาหลายชนิด (marine flora) *V. alginolyticus* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคได้ในคนและสัตว์ โดยพบรายงานการก่อโรคในสัตว์ทะเลจำพวกกุ้ง หอย และปลาหลายชนิด ทำให้หลายประเทศ เช่น อินเดีย ไต้หวัน จีน ประสบปัญหาทางด้านอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก (Qian *et al*., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า *V. alginolyticus* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคในคนได้ โดยในปี ค.ศ. 1973 พบการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในคนครั้งแรก จากการเปรียบเทียบเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 79 ไอโซเลต จากประเทศสหรัฐอเมริกากับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบในประเทศญี่ปุ่น พบว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* 63 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *Vibrio* อื่นๆ 10 ไอโซเลต และเป็นเชื้อ *V. alginolyticus* จำนวน 6 ไอโซเลต (Yoji *et al*., 1973) ในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานการแยกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ประมาณ 0.5% จากอุจจาระของผู้ป่วยที่รับประทานอาหารทะเลแล้วเกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) (Schmidt *et al*., 1979) ที่รัฐฟลอริดาประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า *V. alginolyticus* ทำให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผล (wound infection) 71% และทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ 12% จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 690 ราย นอกจากนี้ยังมีโรคอื่นๆ ที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้แก่

โรคติดเชื้อในหู (ear infections) ทำให้หูชั้นกลางอักเสบ หูอักเสบเรื้อรัง โรคติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) เยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) โรคท้องร่วงเรื้อรัง(chronic diarrhea)ในผู้ป่วยเอดส์ และโรคเยื่อบุตาอักเสบ (conjunctivitis) เป็นต้น (Hlady and Klontz, 1996) สายพันธุ์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่มียีนสร้างสารพิษ เช่น ยีน collagenase และปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงจากการติดเชื้อ คือ ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และสร้างโปรตีเอส (Juan *et al*., 2003) ยีน 16S RNA และยีน *tox*R ใน *V. alginolyticus* มีลำดับเบสใกล้เคียง (homology) กับใน *V. parahaemolyticus* ถึง 99.8% และ 61.7% ตามลำดับ (Osorio and Klose, 2000) มีรายงานการพบยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ใน vibrio สปีชีส์อื่นๆ ที่แยกได้จากสัตว์ทะเลและทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคน เช่น *V. mimicus* และ *V. cholerae* non-O1 โดยยีน *tdh* ของ *V. mimicus* มีลำดับเบสแตกต่างกับยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* เพียง 2.1-3.0% และมีลำดับเบสเหมือนกันมากกว่าในระหว่างยีน *tdh*1 และยีน *tdh*2 ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์เดียวกัน ยีน *tdh* บนพลาสมิดของ *V. cholerae* non-O1 มีลำดับเบสเหมือนกับยีน *tdh*4 บนพลาสมิดของ *V. parahaemolyticus* ถึง 100% แสดงว่ายีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* สามารถถูกถ่ายโอนไปยัง vibrio สปีชีส์อื่นๆ ได้ผ่านทางพลาสมิดและ/หรือ insertion sequence-like elements (ISVs) (Tarai *et al*., 1990; Nishibuchi and Kaper, 1995) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะตรวจหายีน *tdh* ใน *V. alginolyticus* นอกจากนี้ในปี 2006 มีรายงานการพบยีน *trh* ใน *V. alginolyticus* ที่แยกจากหอยนางรมในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นครั้งแรก ซึ่งยีน *trh* เป็นยีนก่อโรค พบได้ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยพบว่ายีน *trh* ที่พบใน *V. alginolyticus* มีลำดับเบสเหมือนกับยีน *trh*2 ของ *V. parahaemolyticus* ถึง 98% จึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีการถ่ายโอนยีน *trh* จาก *V. parahaemolyticus* ไปยัง *V. alginolyticus* (Escalona *et al*., 2006) มีรายงานการตรวจหายีนก่อโรคของ *V. alginolyticus* ที่แยกจากกุ้งและปลาที่เป็นโรค จำนวน 64 สายพันธุ์ ด้วยวิธี PCR และใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ (*tlh*, *trh*, *tdh*, *tox*R, *tox*RS และ *ctx*A) พบว่า 33 strains มียีน *tox*R และ 6 strains มียีน *tlh* ชนิดเดียวกับที่พบใน *V. parahaemolyticus* แสดงว่า *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* มีลำดับเบสคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ *V. alginolyticus* ยังมีความสามารถในการเป็นแหล่งเก็บสะสมยีน (reservoir) และสามารถรับการถ่ายโอนยีนก่อโรคจาก vibrios สายพันธุ์อื่นในธรรมชาติได้ (Xie *et al.,* 2005)

ในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในคนอย่างชัดเจน จึงมีความสนใจที่จะศึกษาลักษณะของเชื้อชนิดนี้ ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม (clinical and environmental specimens) ข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ในการศึกษาเชื้อนี้ต่อไปในอนาคต

บทตรวจเอกสาร

1. จีนัส *Vibrio*

จีนัส *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในแฟมิลี่ Vibrionaceae ประกอบด้วย 1 จีนัส คือ *Vibrio* (Thompson *et al*., 2004) *Vibrio* มีแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติทั้งในน้ำทะเล น้ำกร่อย น้ำจืด และพบเป็นเชื้อประจำถิ่นในสัตว์ทะเล (normal microbiota) โดยอยู่บนผิวนอก ตลอดจนลำไส้ของสัตว์ทะเล (Fouz *et al*., 1990) จีนัส *Vibrio* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 69 สปีชีส์ และ 1 biovar (Vuddhakul, 2008) มีทั้งที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรค ซึ่งสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *V. alginolyticus, V. carchariae, V. cholerae, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. furnissii, V. metschnikovii, V. mimicus, V. parahaemolyticus และ V. vulnificus* (Oliver and Kaper, 1997) หลายสปีชีส์ เช่น *V. harveyi และ V. anguillarum* สามารถก่อโรคได้ในสัตว์ทะเลที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Maugeri *et al*., 2000) โดยสปีชีส์ที่ก่อโรคจะทำให้เกิดความรุนแรงได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ enterotoxin, haemolysin, cytotoxin, protease, lipase, phospholipase, siderophore, adhesive factor และ/หรือ haemagglutinin (Austin and Austin, 1999; Shinoda, 1999)

Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนหรือโค้งงอ (curved rod-shaped) มีขนาดความยาว 1.4 ถึง 2.6 μm กว้าง 0.5 ถึง 0.8 μm สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลวโดยอาศัยแฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ขั้ว (single polar flagellum) และหลายสปีชีส์เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella ในการเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างเอนโดสปอร์หรือไมโครซิส (microcyst) เชื้อนี้สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีกระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ได้ทั้งแบบการหายใจ (respiration) และการหมัก (fermentation) โดยใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถสร้าง indole, catalase และ oxidase (ยกเว้น *V. metschnikovii*) เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ และสามารถใช้ D-glucose เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานหลัก (Baumann and Schubert, 1984) โดยทั่วไปใช้ ammonium salts เป็นแหล่งของไนโตรเจน เชื้อ *Vibrio* หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์และหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzymes) ได้แก่ protease, gelatinase, chitinase, amylase, lecitinase และ DNase *Vibrio* ส่วนใหญ่ไวต่อ vibriostatic agent O129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการทดสอบการวินิจฉัยเชื้อ เชื้อในจีนัส *Vibrio* ต้องการเกลือและโซเดียมไอออนในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งความเข้มข้นของเกลือมีช่วงที่กว้าง ทำให้สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็มแตกต่างกัน (Oliver *et al*., 1983) นอกจากนี้เชื้อ *Vibrio* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20°C ถึง 37°C และสามารถเจริญได้ดีที่ pH ที่เป็นกลางและที่ pH เป็นด่างได้ถึง 9.0 ดังนั้น

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือก (selective media) และเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment media) จึงมี pH อยู่ระหว่าง 8.0 ถึง 8.6 (Colwell *et al*., 1974) เชื้อในจีนัส *Vibrio* มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในแฟมิลี่ Enterobacteriaceae ซึ่งให้ผล oxidase เป็นลบ และจากการศึกษาทางชีวโมเลกุลพบว่า *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีปริมาณ mol% G+C ของดีเอ็นเอมีค่าระหว่าง 39 ถึง 51 (Lee, 1990)

1.1 การเพาะแยกเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อโดยทั่วไป ทำโดยการนำตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ (pre-enrichment) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีสารยับยั้งเชื้ออื่นยกเว้นเชื้อในจีนัส *Vibrio* (selective media) จากนั้นนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical tests) และปฏิกิริยาทางน้ำเหลือง (serological characterization) เชื้อในจีนัส *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถเจริญบน nutrient agar ที่มีเกลือ 0.5% ถึง 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายในเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ สีครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 2 ถึง 5 mm แต่บางสปีชีส์ เช่น *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โคโลนีมีลักษณะแผ่ (swam) *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส แมนโนส หรือคาร์โบไฮเดรตต่างๆ ซึ่งช่วยในการบ่งชี้เชื้อ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดีและ pH สูง มีความสามารถในการใช้ tellurite thiosulphate และ citrate จึงมีการนำสารเหล่านี้มาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเป็น selective medium

วิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาและบ่งชี้เชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *V. vulnificus* (FDA, 2004) ให้นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเลี้ยงใน alkaline peptone water (APW) ที่มีเกลือ 1% ถึง 2% เพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงบน Thiosulfate citrate bile-salt sucrose agar (TCBS) ซึ่งสามารถแยกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักน้ำตาลซูโครสได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้จะมีโคโลนีสีเหลือง ได้แก่ *V. cincinnatiensis*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii* และ *V. carchariae* ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสจะมีโคโลนีสีเขียว ได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus* และ *V. mimicus* จากนั้นนำโคโลนีที่สงสัยไปเลี้ยงบนอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ oxidase, gelatinase, motility, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, ortho-nitrophenil-galacto-pyranoside (ONPG), ลักษณะความชอบเกลือ (halophilic characteristics) และทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส แมนโนส เซลโลไบโอส เป็นต้น ตาม Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Baumann and Schubert, 1984) นอกจากนี้เชื้อในจีนัส *Vibrio* อาจแยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้ออื่น เช่น Cellobios Polymyxin B Colistin (CPC) ใช้ในการแยกเชื้อ *V. cholerae* และ *V.*

vulnificus โดยโคโลนีของ *V. cholerae* จะมีสีม่วง เนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส เมื่อเทียบกับโคโลนีของ *V. vulnificus* ซึ่งมีสีเหลืองจากการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส (Donovan and van Netten, 1995) ในปี ค.ศ. 2001 ได้มีการพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อและอาหารที่ใช้คัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเล โดยนำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหาร salt tryptic soy broth เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในอาหาร salt polymyxin broth ซึ่งเป็น selective media แล้วถ่ายเชื้อลงบนอาหาร Chromogenic agar medium ที่มีชื่อว่า CHROMagar Vibrio (CV) ซึ่งมี substrate สำหรับเอนไซม์ β-galactosidase และจากผลการทดลองพบว่า *V. parahaemolyticus* ให้โคโลนีสีม่วง *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ให้โคโลนีสีฟ้า และ *V. alginolytocus* ให้โคโลนีสีขาว นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อในอาหาร salt tryptic soy broth และ salt polymyxin broth ร่วมกันมีประสิทธิภาพมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร salt polymyxin broth เพียงอย่างเดียว และการใช้อาหาร CV แยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลมีความไวและแม่นยำกว่าการใช้ TCBS (Hara-Kudo *et al*., 2001)

1.2 การก่อโรคและการระบาด

เชื้อในจีนัส *Vibrio* พบได้บริเวณแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วโลก และปนเปื้อนในสัตว์ทะเล สามารถแบ่งการก่อโรคเป็น 2 แบบหลัก คือ การติดเชื้อภายในลำไส้ (intestinal infection) และการติดเชื้อภายนอกลำไส้ (extraintestinal infection) (Dalsgaard, 1998) การติดเชื้อภายในลำไส้ มักเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อโดยไม่ปรุงให้สุก หรือผ่านกระบวนการปรุงที่ไม่สะอาด ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อุจจาระอาจมีมูกเลือดปน การติดเชื้อภายในลำไส้ที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ อหิวาห์ตกโรค ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อจาก *V. cholerae* ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง ถ่ายเหลวเป็นน้ำซาวข้าว (rice water stool) (Gorbach *et al*., 1970) *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง อาการมักปรากฏหลังจากได้รับเชื้อภายใน 4 ถึง 96 ชม. ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (Barger and Gangarosa, 1974) และมีรายงานพบผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียจากการติดเชื้อ *V. vulnificus*, *V. mimicus, V. fluvialis* และ *V. hollisae* เช่นกัน (Daniels *et al*., 2000) ในรายที่ติดเชื้อไม่รุนแรงสามารถหายเองได้ แต่ในรายที่ติดเชื้อรุนแรงผู้ป่วยจะมีอาการหนาวสั่น อุจจาระมีมูกหรือเลือดปน กรณีนี้ผู้ป่วยต้องได้รับยาปฏิชีวนะหรือน้ำเข้าไปทดแทน ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *Vibrio* มีหลายชนิด ได้แก่ protease, siderophore, adhesion factors, haemagglutinin, enterotoxin, cytotoxin และ hemolysin เป็นต้น (Baffone *et al*., 2003) นอกจากนี้บางสปีชีส์ เช่น *V. cholerae, V. mimicus, V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis, V. vulnificus, V. metschnikovii* และ *V. carchariae* ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อภายนอกลำไส้ เช่น การติดเชื้อทางบาดแผล การติดเชื้อในหู และการติดเชื้อในกระแสเลือด (ตารางที่ 1.1) การติด

เชื้อทางบาดแผล เกิดจากน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อผ่านเข้าไปทางบาดแผลที่ผิวหนัง ดังนั้น เมื่อมีบาดแผลที่ผิวหนังควรหลีกเลี่ยงน้ำทะเล สัตว์ทะเล หรือถ้าสัมผัสต้องรีบล้างบริเวณที่สัมผัสให้สะอาดทุกครั้ง อาการของโรคคือ มีแผลบวมแดงเนื่องจากมีการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง มีตุ่มน้ำพองใส และหลังจากนั้นจะมีการตายของเนื้อเยื่อตามมาด้วยการติดเชื้อในกระแสเลือด (Johnson *et al*., 1984; Collier, 2002) การติดเชื้อในกระแสเลือดเกิดเนื่องจาก เชื้อเข้าสู่กระแสเลือดผ่านหลอดเลือดดำใหญ่จากทางเดินอาหารไปยังตับ หรือผ่านทางระบบน้ำเหลืองของลำไส้ ผู้ป่วยจะมีอาการความดันต่ำ อ่อนแรง หนาวสั่น มักมีอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียนร่วมด้วยเสมอ (Tacket *et al*., 1984) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดมากกว่า 70% จะมีตุ่มน้ำพองใสที่ผิวหนังบริเวณปลายแขน ขา เนื่องจากมีน้ำและโปรตีนออกมาจากเลือด เชื้อที่พบบ่อย คือ *V. vulnificus* เนื่องจากเชื้อสร้างสารพิษได้หลายชนิด มีโพลีแซคคาไรด์และแคปซูล และสามารถใช้เหล็กในรูป transferrin ได้ (Heelan, 2001)

ตารางที่ 1.1 อาการทางคลินิกที่เกิดจากการติดเชื้อในจีนัส *Vibrio*

สปีชีส์	อาการทางคลินิก			
	ลำไส้อักเสบ	ติดเชื้อทางบาดแผล	ติดเชื้อในหู	ติดเชื้อในกระแสเลือด
V. cholerae O1	+++	+		
V. cholerae non-O1	+++	++	+	+
V. mimicus	++		+	
V. fluvialis	++			
V. paraheamolyticus	+++	+	+	+
V. alginolyticus	(+)	++	++	+
V. cincinnatiensis				+
V. vulnificus	+	++		++
V. furnissii	(+)			
V. metschnikovii	(+)			(+)
V. carchariae		+		

+++ = มีการรายงานบ่อยครั้ง, ++ = มีการรายงานน้อย (6-100 ครั้ง), + = มีการรายงานน้อยมาก (1-5 ครั้ง) และ (+) = มีอาการทางคลินิกไม่ชัดเจน

(แหล่งที่มา: ดัดแปลงจาก Dalsgaard, 1998 และ Daniels, 2000)

จากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *Vibrio* พบว่าคนที่มีสุขภาพดีเมื่อได้รับเชื้อมีโอกาสต่ำมากที่จะติดเชื้อในกระแสเลือด กลุ่มเสี่ยงคือ ผู้ที่ป่วยเป็นโรคเรื้อรัง โรคเบาหวาน ตับไต มะเร็ง การติดเชื้อในกระแสเลือดผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตสูงกว่าการติดเชื้อที่บริเวณอื่น ดังนั้นเมื่อมีบาดแผลที่ผิวหนังควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสน้ำทะเล และสัตว์ทะเล หรือถ้าสัมผัสต้องล้างบริเวณที่สัมผัสทุกครั้ง เชื้อที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงและรวดเร็ว คือ *V. vulnificus* อาการของโรคคือ แผลจะบวมแดง มีการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง มีตุ่มน้ำ จากนั้นจะมีการตายของเนื้อเยื่อตามมาด้วยการติดเชื้อในกระแสเลือด ส่วนการติดเชื้อจาก *V. cholerae* non-O1, *V. paraheamolyticus* และ *V. alginolyticus* จะมีอาการรุนแรงน้อยกว่า (Levine and Griffin, 1993; Strom and Paranjpye, 2000; Collier, 2002)

มีรายงานพบการติดเชื้อจาก *Vibrio* ทั่วโลก ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือปรุงแบบสุกๆ ดิบๆ ตัวอย่างเช่น ที่กรุงจาการ์ตา ประเทศอินโดนีเซีย ได้มีการศึกษาการแยกเชื้อ *Vibrio* จากสัตว์ทะเลพวก กุ้ง ปลา ปลาหมึก พบมีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. alginolyticus* มากในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง ธันวาคม และ *V. paraheamolyticus* พบได้มากตลอดทั้งปี และพบผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงจากการติดเชื้อเหล่านี้เป็นจำนวนมาก (Molitoris *et al*., 1985; Lesmana *et al*., 2002) ในประเทศไต้หวันได้มีการศึกษาการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ ในระหว่างปี ค.ศ. 1986 ถึง 1995 พบว่าเกิดจากเชื้อ *V. paraheamolyticus* มากถึง 35% เมื่อเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น โดยพบการระบาดในช่วงฤดูร้อนมากที่สุด (Pan *et al.,* 1997) ในประเทศอิตาลี Baffone และคณะ (2000) ได้ทำการตรวจหาเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* จากอาหารทะเลพบเชื้อ *V. alginolyticus* (81.48%) รองลงมาคือ *V. paraheamolyticus* (14.8%) และ *V. cholerae* non-O1 (3.7%) และได้ทำการศึกษากุ้งทะเลสดแช่แข็งพบว่า 30% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 129 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. paraheamolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* และ *V. cholerae* non-O1 (Baffone *et al*., 2000) ในประเทศฝรั่งเศส จากการศึกษา *Vibrio* ในหอยและน้ำทะเลจำนวน 189 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน ปี ค.ศ. 1999 พบ *V. alginolyticus* มากที่สุด 99 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *V. paraheamolyticus* 41 ตัวอย่าง *V. vulnificus* 20 ตัวอย่าง และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 จำนวน 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ (Hervio-Heath *et al*., 2002) ประเทศออสเตรเลีย สามารถแยกเชื้อ *Vibrio* จากน้ำทะเล ดินตะกอน พืชและอุจจาระ จากแถบชายฝั่งแม่น้ำ 8 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของรัฐควีนแลนด์ พบเชื้อส่วนใหญ่เป็น *V. cholerae, V. fluvialis* และ *Aeromonas* spp. (Myatt and Davis, 1989)

ในประเทศไทยระหว่างปี ค.ศ. 1980-1981 พบผู้ป่วย 660 ราย มีอาการท้องร่วงซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Shigella* spp. 27%, *V. paraheamolyticus* 19%, *Escherichia coli* 5%, *Salmonella* spp. 3%, *V. cholerae* non-O1 3%, *Campylobacter jejuni* 1% และ *Vibrio* อื่นๆ น้อยกว่า 1% (Echeverria *et al*., 1983) ในปี 1999 มีรายงานการตรวจแยกเชื้อ *V.*

parahaemolyticus ในอาหารทะเลส่งออกจำนวน 686 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และเวียดนาม พบ *V. parahaemolyticus* สูงถึง 45.9% โดยส่วนใหญ่พบเชื้อที่มาจากฮ่องกงและประเทศไทยสูงกว่าตัวอย่างที่มาจากอินโดนีเซียและเวียดนาม ซึ่งตัวอย่างที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกกุ้ง ปู ปลา และหอย (Wong *et al*., 1999) นอกจากนี้ในเดือนธันวาคมปี 1998 ถึงมกราคมปี 1999 ได้มีการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในตลาดสดอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 114 ตัวอย่าง แบ่งเป็นหอย 54 ตัวอย่าง กุ้ง 30 ตัวอย่าง และปลา 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากหอย 51 ตัวอย่าง (94%) กุ้ง 25 ตัวอย่าง (83%) ปลา 22 ตัวอย่าง (73%) โดยพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนสร้างสารพิษในตัวอย่างหอย 2 ตัวอย่าง (Vuddhakul *et al*., 2000) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาแยกเชื้อ *Vibrio* จากเลือดและอุจจาระของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2537 ถึงธันวาคม พ.ศ. 2544 พบ *V. cholerae* (Ogawa) 279 สายพันธุ์ (23.6%), *V. cholerae* O139 240 สายพันธุ์ (20.3%), *V. cholerae* non-O1/non-O139 167 สายพันธุ์ (14.1%), *V. fluvialis* 44 สายพันธุ์ (3.7%), *V. alginolyticus* 22 สายพันธุ์ (1.9%) และ *V. cholerae* (Inaba) 11 สายพันธุ์ (0.9%) จากการศึกษาแยกเชื้อ *Vibrio* spp. ได้สูงสุดคือร้อยละ 76.01 ในปี พ.ศ. 2538 แล้วลดลงเรื่อยๆ จนถึงร้อยละ 30.51 ในปี พ.ศ.2544 (สมพร ศรีเฟื่องฟุ้ง, 2547) จากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ตั้งแต่ปี 2544- 2549 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *V. vulnificus* ในกระแสเลือดรวม 56 คน ในปี 2544, 2545, 2546, 2547, 2548 และ 2549 พบผู้ป่วย 12, 9, 8, 10, 11 และ 6 ราย ตามลำดับ โดยพื้นที่ภาคกลางพบผู้ป่วยมากที่สุด 34 ราย (60.7%) รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้พบผู้ป่วยเท่ากัน 9 ราย (16.1%) ภาคเหนือพบผู้ป่วย 4 ราย (7.1%) พบอัตราป่วยในเพศชายสูงกว่าเพศหญิงถึง 3 เท่า และพบมากในผู้ป่วยช่วงอายุ 46-55 ปี และ 36-45 ปี จำนวน 12 และ 10 ราย ตามลำดับ (ศรีวรรณา หัทยานานนท์ และคณะ, 2549) ในปี 2550 พบการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในกลุ่มนักศึกษาพยาบาลชั้นปีที่ 1 วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี สุราษฎร์ธานี จำนวน 26 ราย อาการที่พบ คือปวดมวนท้อง ถ่ายเหลว/เหลวเป็นน้ำ (88.46%) คลื่นไส้อาเจียน (65.38%) คลื่นไส้ (50%) และเป็นไข้ (11.53%) สาเหตุของการระบาดคือ พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในข้าวผัดปู ซึ่งมีวิธีการปรุงที่ไม่ถูกต้อง ใช้ความร้อนและเวลาไม่เหมาะสมในการผัดเนื้อปู (พงษ์ศักดิ์ เสือมาก และคณะ, 2551)

2. *Vibrio alginolyticus*

V. alginolyticus มีทั้งชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค การติดเชื้อเกิดได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยพบเชื้อชนิดที่ก่อโรคในคนครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1973 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (Yoji *et al*., 1973) การก่อโรคของเชื้อนี้มักเกิดในเดือนที่มีอากาศอบอุ่นจะส่งผลให้อัตราการติดเชื้อสูง เนื่องจากมีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ และการนำอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อไปแช่ในน้ำแข็งหรือที่ที่มีการควบคุมอุณหภูมิไม่ดี จะเปิดโอกาสให้เชื้อดังกล่าวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เชื้อนี้เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผล ติดเชื้อในกระแสโลหิต การติดเชื้อที่หูทำให้เกิดหูชั้นกลางอักเสบ โรคหูอักเสบเรื้อรัง และการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (Daniels *et al*., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า *V. alginolyticus* ทุกสายพันธุ์ไวต่อยา ciprofloxacin ดื้อต่อยา ampicillin และบางสายพันธุ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline และ chloramphenicol (French, 1990)

2.1 ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป

V. alginolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย อยู่เดี่ยวๆ หรืออาจอยู่เป็นกลุ่ม มีความคล้ายคลึงกันทางสายพันธุ์ (phenotype) กับ *V. parahaemolyticus* ทำให้แยกออกจากกันได้ยาก (Montieri *et al*., 2010) ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ *V. alginolyticus* เปรียบเทียบกับ *V. parahaemolyticus* ดังแสดงในตารางที่ 1.2 *V. alginolyticus* ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาเส้นเดี่ยวที่ขั้ว แต่เมื่ออยู่ในอาหารแข็งหรือในสิ่งแวดล้อมที่มีความหนืดสูงหรือบนพื้นผิว จะมีการชักนำให้เชื้อสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์ (lateral flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ *V. alginolyticus* สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ ดังนั้นลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS จึงมีสีเหลืองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังสามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) และแมนโนส (mannose) แต่ไม่สามารถหมักแลคโตส (lactose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และอะราบิโนส (arabinose) สามารถผลิต acethyl methyl carbinol จากกลูโคสทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อทดสอบด้วย Voges-proskaver test สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโตแฟน (tryptophan) เป็นอินโดล (indole) *V. alginolyticus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5°C ถึง 42°C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37°C ช่วง pH ที่เหมาะสม คือ 7.8 ถึง 8.6 (Hörmansdorfer *et al*., 2000) เชื้อนี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แต่จะสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน นอกจากนี้เกลือ (NaCl) ก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของเชื้อชนิดนี้ โดยความเข้มข้นของ NaCl ที่เชื้อ

สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.5% ถึง 10% แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2% ถึง 3% (Lee, 1990; Hörmansdorfer *et al*., 2000) *V. alginolyticus* มีแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในน้ำทะเลและน้ำกร่อย สามารถแยกได้จากน้ำทะเลทั่วโลกทั้งในโซนเขตร้อนและเขตอบอุ่น พบปนเปื้อนในอาหารทะเล รวมทั้งพวกสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปลา สัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้ม หอย โดยในสัตว์จำพวกหอย เช่น หอยกาบ หอยแครง หอยนางรม และหอยแมลงภู่ ซึ่งกินอาหารโดยการกรองจากน้ำ เชื้อจะเพิ่มจำนวนและเกาะติดอยู่กับลำไส้ของหอย (Marshall *et al*., 1971) *V. alginolyticus* สามารถดำรงชีวิตได้หลากหลาย เช่น ล่องลอยเป็นอิสระอยู่ในน้ำ เกาะติดกับสัตว์ทะเลแบบพึ่งพาอาศัย เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในสัตว์ทะเล (microflora) อยู่ร่วมกับแพลงตอน (bacterioplankton) หรือเกาะติดอยู่ใต้ท้องเรือและพื้นผิวอื่นๆ ในทะเล เป็นต้น (Kahla-Nakbi *et al*., 2007) จากการศึกษาพบว่าฤดูกาลมีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลเช่นกัน ในฤดูหนาวเชื้อจะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้ทะเล โดยอาจอยู่ในสภาวะที่ยังมีชีวิต แต่มีอัตราการเมตาบอลิซึมต่ำ และไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งได้ เรียกว่า viable but non culturable (VBNC) state สภาวะ VBNC เป็นการตอบสนองของเชื้อเพื่อให้สามารถมีชีวิตรอดได้ เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่กดดัน (stress) เช่น อุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูง และปริมาณสารอาหารน้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญ เป็นต้น (James, 2005) แต่เมื่อเข้าสู่ฤดูอบอุ่น หรือฤดูร้อน น้ำทะเลจะมีอุณหภูมิสูงขึ้นซึ่งเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนและล่องลอยปนเปื้อนอยู่ในน้ำทะเลมากขึ้น ส่งผลให้พบเชื้อได้มากที่สุดในฤดูนี้

ตารางที่ 1.2 ลักษณะทางชีวเคมีของ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus*

การทดสอบ	***V. alginolyticus***	***V. parahaemolyticus***
TCBS	Y	G
CHROMagar Vibrio	W	P
Growth (0% NaCl)	-	-
Growth (3% NaCl)	+	+
Growth (6% NaCl)	+	+
Growth (8% NaCl)	+	+
Growth (10% NaCl)	+	-
Fermentation		
Gas from Glucose	-	-
Sucrose	+	-
Lactose	-	-
Cellobiose	-	V
Arabinose	-	+
Mannose	+	+
Mannitol	+	+
ONPG	-	-
Oxidase	+	+
Indole	+	+
Voges-Proskauer	+	-
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Urease	-	V

Y, yellow; G, green; W, white; P, purple;

+, 80% (or more) of strains are positive; -, 80% (or less) of strains are negative; V, variable

แหล่งที่มา: ดัดแปลงจาก Alsina and Blanch, 1994 และ Poda, 1997

2.2 การก่อโรค

2.2.1 การก่อโรคในคน

การติดเชื้อ *V. alginolyticus* มี 2 แบบคือ superficial infection และ deep infection (ตารางที่ 1.3) การติดเชื้อในคนส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อทางบาดแผล (wound infection) ขณะสัมผัสกับน้ำทะเล (Hlady *et al*., 1993) การบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนเชื้อโดยไม่ปรุงให้สุกก่อนรับประทาน มีรายงานการติดเชื้อทางบาดแผลหลายรายงาน ยกตัวอย่างเช่น คนไข้เพศหญิงอายุ 48 ปีที่มีประวัติการป่วย โดยตรวจพบว่าเป็นโรคหอบหืด เมื่อ 27 ปีที่แล้ว ได้รับยาฉีดพ่นแก้หอบหืด 6 เดือน และก่อนที่ติดเชื้อได้รับยาประเภทสเตอรอยด์ สำหรับการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ผู้ป่วยได้รับเชื้อทางบาดแผลขณะที่ลงไปเล่นน้ำแถบทะเลแคริบเบียน แพทย์ได้ทำการรักษาโดยเย็บบาดแผลและให้ยา clindamycin (600 mg) 2 ขนาด และ dicloxacillin (500 mg) 3 ขนาด แล้วแผลก็ทวีการบวมช้ำขึ้นเรื่อยๆ แผลมีลักษณะบวมแดง เป็นแผลลึกขึ้น และแพทย์ได้ให้ยา ampicilin-sulbactam ครั้งละ 3 กรัม 4 ครั้งต่อวัน 2 วันต่อมาหลังคนไข้ได้รับการรักษาตัวที่โรงพยาบาล แพทย์ได้เก็บชิ้นตัวอย่างโดยการลอกเนื้อเยื่อเซลล์ที่อักเสบไปตรวจ ปรากฏว่าพบเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ย้อมติดสีแกรมลบ ให้ผล oxidase บวก และได้ทำการบ่งชี้โดย VITEK automated system (Biomerieux) พบว่าเป็น *V. alginolyticus* เชื้อนี้เจริญบนอาหาร TCBS ให้โคโลนีสีเหลือง และให้ผลบวก string test เมื่อทดสอบยืนยันโดย TSI และทดสอบทางชีวเคมีให้ผลบวกกับการย่อยเจลาติน อินโดล อาร์จินีน ไลซีน กลูโคส ซูโครส อะราบิโนส การใช้ซิเตรด เชื้อนี้ไวต่อยาปฏิชีวนะ trimethoprim/sulfamethoxalone (MIC 0.12 µg/ml), tetracycline (MIC 0.5 µg/ml), chloramphenicol (MIC 8.0 µg/ml) และให้ zone diameter มากกว่า 16 มิลลิเมตรกับยา ciprofloxacin (Janda *et al*., 1988) คนไข้ชายชาวอเมริกันอายุ 71 ปี ซึ่งเดิมป่วยเป็นโรคความดันโลหิตสูงและโรคไตระยะสุดท้าย (end state renal disease - ESRD) ติดเชื้อ *V. alginolyticus* ทางบาดแผล มีลักษณะเป็นแผลเปิดกว้าง ลึกเข้าไปถึงผิวหนังชั้นใน บวม แดง การรักษาทำโดยใช้ยาปฏิชีวนะ gentamycin เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Claudia and Agraharkar, 2003) อีกตัวอย่างเป็นคนไข้ชายชาวอเมริกัน โดนมีดบาดที่น่อง ได้ทำความสะอาดแผลและปิดบาดแผลเรียบร้อยแล้ว อีก 20 วันต่อมาพบมีการบวมแดง และปวดบริเวณที่โดนบาด สอบถามพบว่าหลังจากเกิดแผล 24 ชม. คนไข้ได้ไปเล่นน้ำทะเล แพทย์ได้ทำการเจาะน้ำเหลืองออกและนำไปตรวจพบเชื้อ *V. alginolyticus* ทำการรักษาโดยทำความสะอาดแผลและให้ทายา gentamicin ointment ทุกครั้งที่มีอาการปวด (Rubin and Tilton, 1975) การบวมแดงอักเสบเกิดจากกลไกการตอบสนองของร่างกายเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ในกรณีที่มีการติดเชื้อ *V. alginolyticus* อย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า necrotizing fasciitis หรือโรคผังผืดใต้ผิวหนังอักเสบอีกด้วย (Juan *et al.,* 2003) นอกจากนี้ *V. alginolyticus* ยังทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritis) ในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานพบว่าสามารถแยกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ประมาณ

0.5% จากอุจจาระของผู้ป่วยที่รับประทานอาหารทะเลแล้วเกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Schmidt *et al*., 1979) โรคอื่นๆ ที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้แก่ โรคติดเชื้อในกระแสเลือด เยื่อบุช่องท้องอักเสบ โรคท้องร่วงเรื้อรังในผู้ป่วยเอดส์ และโรคเยื่อบุตาอักเสบ แต่โรคที่มักพบบ่อย คือ การติดเชื้อทางบาดแผล รองลงมาคือโรคติดเชื้อในหู และโรคที่รักษาไม่ทันท่วงทีอาจทำให้ผู้ป่วยมีอันตรายถึงชีวิตได้ คือ โรคติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยมีความดันเลือดลดลง อัตราการเต้นของหัวใจสูง มีปัญหาต่อระบบทางเดินหายใจ และมีอาการช็อคได้ ปี ค.ศ. 1984 พบการติดเชื้อ *V. alginolyticus* บริเวณดวงตาครั้งแรกในผู้ป่วยเพศชาย อายุ 80 ปี เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลเนื่องจากมีอาการตาแห้ง พบหนองในดวงตาและมีภาวะสายตายาว แพทย์ได้ทำการเก็บตัวอย่างหนองไปตรวจโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) พบว่าเป็นเชื้อ *V. alginolyticus* จึงทำการรักษาโดยให้หยอดตาด้วยยา gentamicin ophthalmic 3 mg/ml ทุกชั่วโมงเป็นเวลา 25 วัน จนไม่พบการเจริญของเชื้อ (Lessner *et al.,* 1985) มีรายงานการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ทำให้เกิดเยื่อบุช่องท้องอักเสบครั้งแรกในผู้ป่วยชายโรคไตระยะสุดท้าย เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* จากการดำน้ำที่บริเวณชายฝั่งประเทศออสเตรเลีย หลายวันต่อมาเริ่มมีอาการปวดช่องท้องอย่างรุนแรง มีไข้สูง แพทย์ทำการวินิจฉัยพบว่าเป็นเยื่อบุช่องท้องอักเสบ และเก็บตัวอย่างน้ำในช่องท้องและเนื้อเยื่อไปตรวจในตอนแรกไม่พบเชื้อ จึงได้ทำการล้างช่องท้องด้วยยา flucloxacillin (50 mg/l) และให้ยา gentamicin 4 mg/l แต่อาการยังไม่ดีขึ้น เมื่อนำตัวอย่างตัวอย่างน้ำในช่องท้องและเนื้อเยื่อไปตรวจอีกครั้งพบเชื้อย้อมติดสีแกรมลบ รูปแท่ง ทำการบ่งชี้โดยใช้ระบบ API พบว่าเป็นเชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งมีความไวต่อยากลุ่ม aminoglycosides, co-trimazole, cephalothin และ cephalexin แต่ดื้อต่อยา ampicillin 4 วันต่อมาอาการเยื่อบุช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ *V. alginolyticus* จึงหาย (Taylor *et al*., 1981) ในประเทศเกาหลี พบผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อ *V. alginolyticus* เนื่องจากผู้ป่วยได้รับการรักษาช้าเกินไป จากการสอบถามพบว่า ก่อนเข้ารับการรักษา ผู้ป่วยได้รับประทานปลาดิบจำนวนมาก และมีอาการไข้สูง หนาวสั่น มีอาการปวดแผลเป็นตุ่มแดงบวมน้ำที่บริเวณขา หายใจติดขัด หัวใจเต้นเร็วผิดปกติ เชื้อเข้าสู่กระแสเลือด ช็อค และเสียชีวิต (Lee *et al.,* 2008)

ตารางที่ 1.3 โรคที่เกิดจาก *V. alginolyticus* ในคน (Hörmansdorfer *et al*., 2000)

บริเวณที่เกิด	**โรค**
ผิวหนัง	แผลติดเชื้อ เกิดหนอง
ตา	เยื่อบุตาอักเสบ มีหนองในตา
หู	หูอักเสบเรื้อรังและติดเชื้อที่หูชั้นกลาง
กระดูก	ติดเชื้อที่กระดูกและไขกระดูก
กะโหลกศีรษะ	ติดเชื้อที่สมอง สมองบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ
ระบบทางเดินอาหาร	ท้องร่วงอย่างรุนแรง
วงจรโลหิต	ติดเชื้อในกระแสโลหิต เชื้อแพร่ไปทั่วร่างกาย

มีรายงานการแยกเชื้อ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงและอาหารทะเล โดยพบชายรักร่วมเพศอายุ 38 ปีมาพบแพทย์ เนื่องจากมีอาการท้องเสียแต่ไม่มีเลือดปน กลืนอาหารลำบาก น้ำหนักลด 25 ปอนด์ภายในระยะเวลา 3 เดือน เมื่อตรวจอย่างละเอียดพบว่าผู้ป่วยเป็นโรคเริมจากการติดเชื้อ *Candida* และเมื่อนำตัวอย่างอุจจาระไปตรวจพบมีเชื้อ *V. alginolyticus* แพทย์จึงทำการรักษาโดยให้ยา acyclovir และ fluconazole รักษาโรคเริม และให้ยา ciprofroxacin รักษาโรคท้องเสียจาก *V. alginolyticus* ควบคู่กันไป (Caccamese and Rastegar, 1999) ที่ประเทศจีน หญิงอายุ 23 ปีคนหนึ่งเข้ามารักษาที่ห้องฉุกเฉิน เนื่องจากมีอาการปวดกล้ามเนื้อ ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ สอบถามพบว่าได้รับประทานปูดิบ เมื่อนำตัวอย่างอุจจาระไปตรวจพบว่าให้โคโลนีสีเหลืองบนอาหาร TCBS เกิด β-hemolysin บน blood agar และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่ามีเชื้อ *V. alginolyticus* ปนเปื้อนในอุจจาระ เชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยา ampicillin และไวต่อยา tetracycline, chloramphenicol และ co-trimoxazole เมื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion (Uh *et al.,* 2001) ที่กรุงจาการ์ตา ประเทศอินโดนีเซีย ได้มีการศึกษาการแยกเชื้อ *Vibrio* จากสัตว์ทะเลพวก กุ้ง ปลา ปลาหมึก พบมีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. alginolyticus* มากในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง ธันวาคม และพบผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงจากการติดเชื้อเหล่านี้เป็นจำนวนมาก (Molitoris *et al*., 1985; Lesmana *et al*., 2002) ที่ประเทศอิตาลีและฝรั่งเศส พบการปนเปื้อนของเชื้อนี้มากที่สุด ในอาหารทะเลจำพวกหอยระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน (Baffone *et al*., 2000; Hervio-Heath *et al*., 2002)

การรักษาโรคที่เกิดจาก *V. alginolyticus* โดยส่วนมากใช้ยาปฏิชีวนะ และรักษาตามอาการ *V. alginolyticus* ทุกสายพันธุ์มีความไวต่อยา ciprofroxacin (French, 1990) และบางสายพันธุ์มีความไวต่อยา ampicillin, levofloxacin, meropenem, cefoxitin, imipenem, cefepime, cefuroxime, cefotaxime, cefoperazone, ceftazidime, cefazolin, piperacillin และ

amikacin มีรายงานการรักษาโดยใช้ ciprofroxacin ถ้าอาการของโรคมีความรุนแรงมาก กรณีของการติดเชื้อที่บาดแผล และโรคผังผืดใต้ผิวหนังอักเสบ (necrotizing fasciitis) แพทย์จะทำการรักษาโดยผ่าตัดเอาเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายทิ้งไป คนที่เป็นกลุ่มเสี่ยงของการติดเชื้อได้แก่ ผู้ที่รับประทานอาหารทะเลสุกๆ ดิบๆ โดยเฉพาะหอยนางรมดิบ ผู้ที่เป็นโรคตับ ไต ผู้ที่มีบาดแผลตามร่างกายแล้วไปเล่นน้ำทะเล หรือมีกิจกรรมทางน้ำอื่นๆ และผู้ที่ได้รับสารสเตอรอยด์เป็นประจำ (Janda *et al*., 1988) การป้องการการติดเชื้อชนิดนี้สามารถทำได้โดยการ เลือกซื้อสัตว์ทะเลที่สด ใหม่ และเก็บไว้ในที่เย็นก่อนนำมาประกอบอาหาร รับประทานอาหารทะเลที่ปรุงสุกโดยการใช้ความร้อนสูงและผ่านการปรุงที่สะอาด สำหรับผู้ที่ต้องสัมผัสกับสัตว์ทะเล เช่น ชาวประมง ควรใส่ถุงมือทุกครั้ง เพื่อป้องกันเปลือกของสัตว์น้ำบาด และหลีกเลี่ยงการสัมผัสหรือเล่นน้ำทะเลขณะที่มีบาดแผลบริเวณผิวหนัง

2.2.2 การก่อโรคในสัตว์

V. alginolyticus เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ทะเล พบรายงานการก่อโรคในสัตว์ทะเลจำพวกกุ้ง หอย และปลาหลายชนิด ทำให้หลายประเทศ เช่น อินเดีย ไต้หวัน จีน ประสบปัญหาทางด้านอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก (Qian *et al*., 2008) การติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในสัตว์ประเภทกุ้ง พบว่ากุ้งมีการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือด (hemocyte) ในระดับต่างๆ คือ การจับกลุ่มกันของฮีโมซัยท์บริเวณที่มีหย่อมเนื้อตายตรงกลาง และมีการแทรกกระจายของฮีโมซัยท์อย่างอิสระและรวมตัวเป็นกลุ่มฮีโมซัยท์อยู่รายรอบ แต่ไม่พบอุบัติการณ์ของรงควัตถุเมลานินในบริเวณที่มีการอักเสบ รอยอาการของโรคที่เด่นชัดพบได้ที่เหงือก ต่อมที่หนวด อวัยวะลิมฟอยด์ ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ในกุ้งที่ป่วยรุนแรงจะเกิดภาวะโลหิตเป็นพิษและพบจำนวนฮีโมซัยท์ลดลง และอีกโรคที่พบคือโรคเสี้ยนดำในกุ้ง โดยกุ้งจะมีอาการเบื่ออาหาร กินอาหารได้น้อยลง มีรอยไหม้ดำตามระยางค์ โรคนี้จะระบาดเฉพาะในพื้นที่ที่มีความเค็มประมาณ 20 ถึง 30 ppt ในประเทศอินเดีย มีการระบาดของโรคจุดขาวในกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ส่งผลให้มีกุ้งตายเป็นจำนวนมาก ลักษณะที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อคือ มีจุดขาวบริเวณผิวหนังและเปลือกทั่วตัว และมีรอยแดงบริเวณหาง (Salvin and Lipton, 2003) การติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในปลาชนิดต่างๆ มักเกิดที่บริเวณเหงือก ผิวหนัง ทำให้ปลาเกิดภาวะมีน้ำในโพรงเยื่อบุช่องท้อง และเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ (Hörmansdorfer *et al*., 2000) *V. alginolyticus* ก่อโรคในปลา (yellow croker) โดยเข้าไปเกาะที่เยื่อบุเมือกบริเวณลำไส้เล็ก การยึดเกาะได้ดีขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ pH ความเค็มของน้ำ นอกจากนี้ความเข้มข้นของโซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียมยังมีส่วนช่วยให้เกิดการยึดเกาะได้ดียิ่งขึ้น ความร้อนและสภาวะที่เป็นกรดสามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อได้ โดยอุณหภูมิที่สามารถยับยั้งการเกาะติดได้ดีคือ 56°C ถึง 60°C และกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเกาะติดได้ดีกว่าทริปซิน และโปรตีเนส เค (Yan *et al.,* 2007)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อ

ปัจจัยหลักที่นำไปสู่ความรุนแรงของเชื้อ *V. alginolyticus* ประกอบด้วย extracellular products (ECPs), hemolysin/hemagglutinin (Janda *et al*., 1988) และความสามารถใช้ธาตุเหล็กที่อยู่ในโฮสต์

1. Extracellular products (ECPs) ความสามารถของเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ เช่น caseinase, lecitinase, collagenase และ protease แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ไปย่อยสารประกอบพวกโปรตีน ไขมัน คอลลาเจน และเจลาติน ที่รวมตัวกันเป็นเนื้อเยื่อเซลล์ ECPs มีคุณสมบัติเป็น hydrolytic คือ สามารถละลายน้ำได้ดี ดังนั้นจึงทำให้เชื้ออยู่รอดในเนื้อเยื่อของโฮสต์ได้ นอกจากนี้สารเมือก (mucus) เป็นอีกแหล่งที่เชื้อสามารถอยู่ได้ เพราะเชื้อใช้สารเมือกเป็นแหล่งอาหาร และมักพบเชื้อบริเวณเมือกที่ผิวของสัตว์ทะเล (skin mucus) เมือกในลำไส้ (intestinal mucus) alkaline serine protease เป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่ *V. alginolyticus* สร้างขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุล 33 kDa ออกฤทธิ์โดยการทำลายเนื้อเยื่อ หรือทำให้ติดเชื้อที่ดวงตา ในประเทศไต้หวันสารพิษนี้ทำให้กุ้งตายมากกว่า 50% เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งด้วย ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Lee *et al*., 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเอนไซม์ metalloprotease ใน *V. parahaemolyticus* มีความเหมือนกันของลำดับเบสใกล้เคียงกับเอนไซม์ collagenase ใน *V. alginolyticus* ถึง 77% (Di Pinto *et al*., 2005)
2. Hemolysin/ hemagglutinin ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและตกตะกอน เนื่องจากเชื้อผลิต exoenzyme
3. ความสามารถใช้ธาตุเหล็ก เหล็กเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของ *V. alginolyticus* แต่พบว่าในเนื้อเยื่อของโฮสต์มีปริมาณธาตุเหล็กต่ำ ดังนั้นเชื้อจึงมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถรับธาตุเหล็กได้ โดยการผลิต siderophores สารตัวนี้ดึงธาตุเหล็กออกจาก chelating host proteins สาร siderophores เป็นสารสำคัญที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค

2.4 ยีนสำคัญที่ใช้ในการบ่งชี้ *V. alginolyticus*

2.4.1 ยีน *tox*R

*tox*R เป็นยีนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved sequence) ในแฟมิลี่ Vibrionaceae ยีน *tox*R เป็น transmembrane regulatory protein ที่อาศัยปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวควบคุมกิจกรรม ยีน *tox*R พบครั้งแรกใน *V. cholerae* โดยทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ cholera toxin และต่อมาพบว่าสามารถควบคุมการทำงานของยีนอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น *tcp*A (toxin-regulated pilus), *omp*T และ *omp*U (outer membrane proteins) (Miller and Makalanos, 1988) โดยยีน *tox*R ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนก่อความรุนแรงของโรค โดยสร้างโปรตีน ToxR ไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง upstream ของ

โปรโมเตอร์ของยีนก่อความรุนแรงของโรค (Lin *et al*., 1993) จากการศึกษาพบว่า ToxR เป็น integral memebrane protein ที่มีขนาด 32 kDa ประกอบด้วย 3 domain คือ N-terminal cytoplasmic DNA-binding domain, central transmemebrane domain และ C-terminal periplasmic domain มีรายงานการพบยีน *tox*R ใน *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fisheri* และเชื้อที่ก่อโรคในปลา ได้แก่ *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* และ *P. damselae* subsp. *piscicida* (Osario and Klose, 2000) การเปรียบเทียบ 16 S rRNA แทน *tox*R ใน *V. parahaemolyticus* กับ *V. cholerae* และ *V. alginolyticus* พบว่าคล้ายกัน 92% และมากกว่า 99% ตามลำดับและถ้าใช้ยีน *gyr*B พบว่า *V. parahaemolyticus* จะเหมือนกับ *V. alginolyticus* 86.8% (Kim *et al*., 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน *tox*R ใน *V. alginolyticus* มีลำดับเบสใกล้เคียงกับใน *V. parahaemolyticus* 61.7% (Osorio and Klose, 2000) ยีน *tox*R สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่มีความสำคัญในการแยก *Vibrio* สปีชีส์ที่แตกต่างกันได้ (Kim *et al*., 1999; Franco and Hedreyda, 2006)

2.4.2 ยีน collagenase

ยีน collagenase ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ collagenase ใน *V. alginolyticus* พบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้สูงกว่าในแบคทีเรียชนิดอื่น และมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อการนำไปใช้รักษาโรคเกี่ยวกับผิวหนัง อุตสาหกรรมอาหาร ยา และทางการเกษตรได้ open reading frame ของยีน collagenase ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 2442 bp กรดอะมิโน 739 ชนิด และมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนเท่ากับ 81704 dalton (Takeuchi *et al.,* 1992) ยีน collagenase สามารถใช้เป็นยีนเป้าหมายที่มีความสำคัญในการแยก *V. alginolyticus* ออกจาก *Vibrio* อื่นได้ (Di Pinto *et al*., 2005)

2.4.3 ยีน *omp*K

*omp*K เป็นยีนหนึ่งในกลุ่ม OMPs (outer membrane proteins) พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียจีนัส *Vibrio* และ *Photobacterium* ยีน *omp*K มีตำแหน่งอยู่บนผิวเซลล์ จึงมีบทบาทสำคัญของเชื้อที่ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการติดเชื้อและการชักนำการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ดังนั้นยีนนี้จึงเหมาะต่อการนำไปสร้างเป็นวัคซีนต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ในการแยก *Vibrio* สปีชีส์ที่แตกต่างกันได้ ในภาวะปกติ OMPs จะอยู่ในรูป large-channel porin แต่จะอยู่ในรูป smaller-channel porin เพื่อลดการผ่านเข้าออกของสารเมื่ออยู่ในภาวะที่ไม่ปกติ (Xu *et al*., 2004) open reading frame ของยีน *omp*K ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 846 bp และกรดอะมิโน 261 ชนิด มีรายงานพบยีน *omp*K ทำหน้าที่เป็น receptor ต่อ KVP40 ซึ่งเป็น vibriophage ใน *V. parahaemolyticus* (Qian *et al.,* 2008)

3. วิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

3.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส หรือ *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีน หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1984 โดย ดร.คาร์รี มัลลิส (Karry Mallis) และคณะ ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกัน เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแบบวงจร อาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เร็วกว่าการโคลนที่ใช้พลาสมิด (plasmid) หรือฟาจ (phage) มาก โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติของกระบวนการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ในหลอดทดลองต้องอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น โดยอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ หรือ primer จับคู่เข้ากับดีเอ็นเอต้นแบบ และมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยต่อสายดีเอ็นเอโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น เมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบ จะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นองค์ประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา (DNA template), primer ซึ่งเป็น oligonucleotide ท่อนสั้นๆ ขนาดประมาณ 18-30 bp, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), thermostable DNA polymerase และ buffer ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) เป็นขั้นตอนการคลายเกลียวของดีเอ็นเอสายคู่ออกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90 ถึง 95°C จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการคลายเกลียวจะเกี่ยวข้องกับปริมาณ G+C โดยถ้าดีเอ็นเอต้นแบบมีปริมาณ G+C สูง จะต้องเพิ่มอุณหภูมิในการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ แต่ไม่ควรให้อุณหภูมิสูงเกินไป หรือใช้เวลานานเกินไป เพราะจะนำไปสู่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ถ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความยาวมาก จะต้องเพิ่มเวลาเพื่อให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยวได้อย่างสมบูรณ์ ขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (Helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

2. การจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 40 ถึง 62°C เมื่อแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40 ถึง 62°C เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15 ถึง 25 เบส ที่เรียกว่า ไพรเมอร์

(primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไม่สามารถที่จะเริ่มจากศูนย์ได้เนื่องจากเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ต้องการปลาย-OH ทางด้าน 3' เพื่อนำนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่มาต่อ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในการ annealing ต่ำกว่าอุณหภูมิแยกตัว (temperature melting; Tm) ของไพรเมอร์ประมาณ 5 ถึง 10°C ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ที่มีชื่อว่าไพรเมส (primase) เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) เป็นขั้นตอนขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับเบสเข้าที่ปลาย 3' ของ primer และมีการขยายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase ซึ่งอุณหภูมิปกติประมาณ 70 ถึง 75°C

ขั้นตอนทั้ง 3 รวมเป็นปฏิกิริยา 1 รอบ ถ้าเริ่มต้นปฏิกิริยาจากดีเอ็นเอแม่แบบ 1 โมเลกุล เมื่อปฏิกิริยานี้ผ่านไป 1 รอบ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นสายคู่ 2 โมเลกุล ถ้าปฏิกิริยานี้ผ่านไป 2 รอบ จะได้จำนวนผลผลิต (PCR product) ที่ต้องการเป็นสายคู่ 2^2 หรือ 4 โมเลกุล และถ้าปฏิกิริยานี้ผ่านไป n รอบ จะได้จำนวนผลผลิต PCR ที่ต้องการเป็นสายคู่ 2^n โมเลกุล (n = จำนวนรอบ) เทคนิค PCR มักจะทำให้เกิดปฏิกิริยา 20-40 รอบ ดังนั้นจะได้จำนวนผลผลิต PCR 2^{20} ถึง 2^{40} โมเลกุล (รูปที่ 1.1) (Sambrook and Russell, 2001)

3.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ได้แก่

ก) ดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบหรือดีเอ็นเอเป้าหมายควรมีความยาวตั้งแต่ 100 ถึง 1,000 bp เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดีกว่าและสามารถตรวจสอบผลผลิต PCR ได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอที่มีความยาวมากกว่า 10 kb นอกจากนี้รูปร่างและลำดับของดีเอ็นเอต้นแบบก็มีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย กล่าวคือดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปปลายเปิด (linear DNA) หรือมีค่า G+C content ต่ำๆ จะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีกว่า relax DNA หรือ circular DNA หรือดีเอ็นเอที่มีค่า G+C content สูงๆ เนื่องจากง่ายต่อการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมได้ง่ายและมีผลผลิตที่ไม่จำเพาะ (non specific product) ลดลง ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในวิธี PCR ขึ้นอยู่กับจำนวนชุด (copy number) ของยีนที่ต้องการเพิ่มจำนวน โดยยีนที่จำนวนชุดมากจะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีกว่ายีนที่มีจำนวนชุดน้อย

ข) *Taq* DNA polymerase

Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติหลายอย่างคล้ายกับ DNA polymerase I ที่แยกได้จาก *E. coli* แต่ทนความร้อนได้ดีกว่า แต่ขาดคุณสมบัติ 3' ไป 5' exonuclease activity ที่ทำหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้อง (proofreading) มีอัตราสูงสุดในการนำนิวคลีโอไทด์เชื่อมต่อในสายดีเอ็นเอเท่ากับ 60 โมเลกุล

ต่อวินาที หรือโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2,000 ถึง 4,000 โมเลกุลต่อนาที อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 75°C ถึง 80°C ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 1.0 ถึง 2.5 unit ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ dNTPs และส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ การใช้เอนไซม์ในปริมาณมากเกินไปมีผลทำให้เกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้าใช้ปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตน้อยลงด้วย (Arnheim and Erlich, 1992) นอกจากนี้ยังมีสารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) และ formamide ที่ความเข้มข้นของสารเหล่านี้ 20% มีอัตรายับยั้งเท่ากับ 89 และ 61% ตามลำดับ ในขณะที่ sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้นเพียง 0.01% (W/V) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 99.9% (Eckert *et al*., 1990)

ค) ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ที่ใช้ในวิธี PCR ปกติอยู่ระหว่าง 50 ถึง 200 μm ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs รวม 4 ชนิด จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 μm ซึ่งเพียงพอสำหรับการสร้างดีเอ็นเอได้ประมาณ 20 ถึง 26 μm ต่อ 100 μl ของปฏิกิริยา ดังนั้นควรเลือกใช้ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ต่ำสุดที่เพียงพอสำหรับความยาวและส่วนประกอบของสายดีเอ็นเอ dNTPs ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ควรปรับ pH ให้เป็นกลาง และมีความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดที่สมดุลกันเพื่อให้ผลผลิต PCR ที่ได้เกิดขึ้นอย่างจำเพาะและได้ปริมาณสูง ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมผิดพลาด (misincorporation) การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น primary stock solution ที่เจือจาง 10mM แล้วเจือจางต่อให้มีความเข้มข้น 1 mM แล้วแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ - 20°C

ง) Oligonucleotide primer

ปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบ ได้แก่ ความยาวและลำดับเบสของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) และอุณหภูมิในการ annealing ความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR จะต้องมากพอที่จะทำให้ไพรเมอร์เกิดการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ สามารถจับและทำให้เกิดการเข้าคู่ที่สมบูรณ์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิ ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายตัวของเบสอย่างสม่ำเสมอ ไม่ควรใช้ลำดับเบสที่เรียงตัวไม่ปกติ และพยายามหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurine หรือ polypyrimidine ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี G+C content อยู่ระหว่าง 50 ถึง 60% หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure คือต้องไม่จับกับลำดับเบสของตัวเอง (self complementary) โดยเฉพาะที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ หลีกเลี่ยงลำดับเบสของไพรเมอร์ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง เพื่อป้องกันการ annealing กันเองกับไพรเมอร์อีกสายหนึ่ง โดยเฉพาะต้องไม่มีปลาย 3' overlap ในคู่ไพรเมอร์เพื่อช่วยลดการเกิด primer dimer ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 55 ถึง 58°C ไพรเมอร์

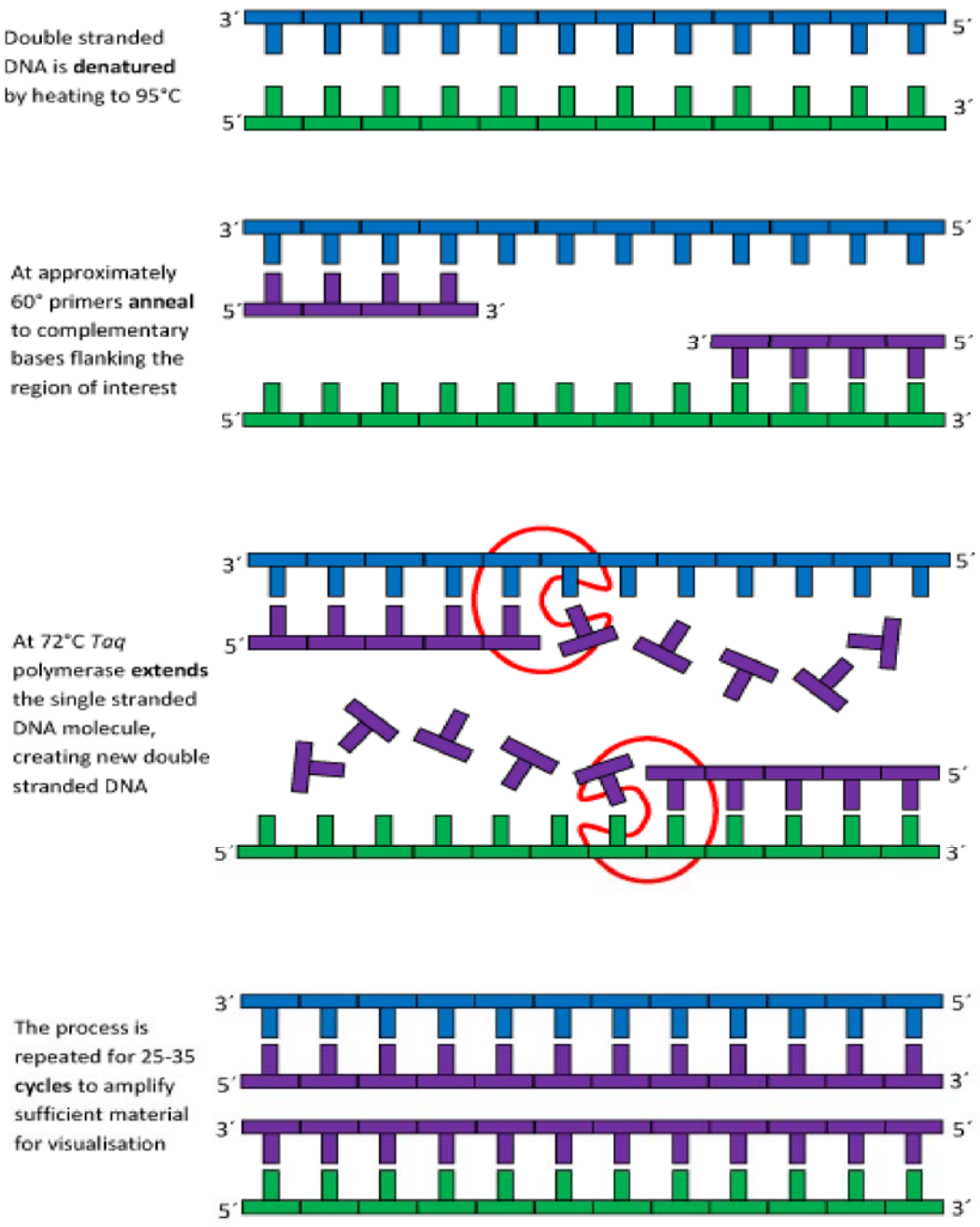
ควรมีความยาวประมาณ 18 ถึง 30 นิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้ และการใช้ไพรเมอร์ปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิด primer dimer และการจับคู่ผิดพลาด

จ) ปริมาณและความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)

แมกนีเซียมคลอไรด์ มีส่วนช่วยในการจับกันระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งมีผลทำให้เกิดการขยายสายดีเอ็นเอในขบวนการ extension ปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์จะมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ dNTPs ถ้า dNTPs มีความเข้มข้นสูง ก็ต้องปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ให้สูงตาม เพราะแมกนีเซียมไอออนบางส่วนจะจับกับ dNTPs ดังนั้นถ้าแมกนีเซียมคลอไรด์มีปริมาณน้อยเกินไป จะทำให้ผลผลิต PCR เกิดขึ้นน้อย ถ้าแมกนีเซียมคลอไรด์มีความเข้มข้นมาก จะทำให้เกิดผลผลิต PCR มากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันก็ทำให้มีผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะและ primer dimer เกิดขึ้นมากด้วย โดยทั่วไปความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR มีค่าเท่ากับ 1.5 mM

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR product) สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้แบ่งเป็น 2 เทคนิคใหญ่ ๆ คือ

1) Gel electrophoresis คือ การนำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกตามขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน จากนั้นย้อมชิ้นดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หรือซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรงตามขนาดที่ต้องการ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบหาผลผลิตของปฏิกิริยาที่ทราบขนาดแน่นอน
2) Nucleic acid hybridization ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจนหรือต้องการเพิ่มความมั่นใจ วิธีนี้ต้องใช้ตัวติดตาม (probe) ที่มีเบสคู่สมกับผลผลิต PCR และจะจับเบสคู่สมกันในสภาวะที่เหมาะสม ตัวติดตามอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอก็ได้ นำผลผลิต PCR ที่ได้มาถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) หรือแผ่นไนลอน (nylon membrane) ด้วยเทคนิค Southern blotting จากนั้นนำตัวติดตามที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารปลอดรังสีมาจับ (hydridization) และทำการตรวจสอบผลโดยใช้ฟิล์ม X-ray หรือดูสีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา



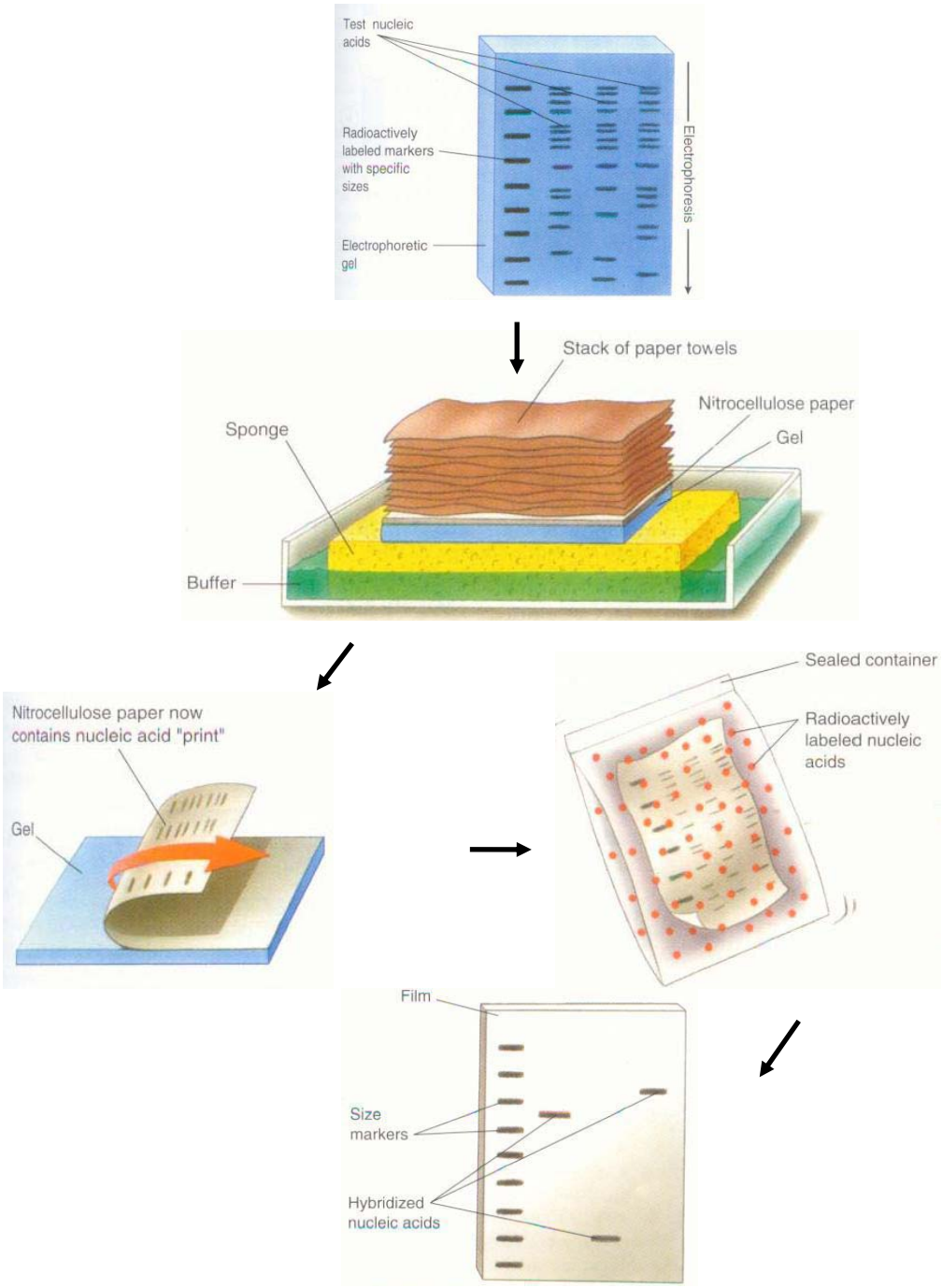
รูปที่ 1.1 ขั้นตอนของเทคนิค PCR

(ที่มา : http://www2.le.ac.uk/departments/emfpu/genetics/explained/pcr)

3.2 เซาเทิร์น บลอตติง (Southern blotting)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนภายในจีโนม โดยนำดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกได้จากเซลล์ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กๆ เป็นจำนวนมาก ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการหรือสนใจก็จะปะปนอยู่ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ ชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถแยกออกมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดได้โดยการใช้ตัวติดตาม (probe) ซึ่งอาจเป็นดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสที่สามารถจะไปเข้าคู่กับลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการได้ โดยตัวติดตามที่ใช้ทั่วไปจะติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเคมี เมื่อตัวติดตามนี้ไปจับหรือเข้าคู่กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการ (hybridize) ก็จะทำให้ทราบตำแหน่งของยีนนั้น ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนี้ค้นพบครั้งแรกในปีค.ศ. 1975 โดย เอ็ดเวิร์ด เอ็ม เซาเทิร์น (Edward M. Southern) จากมหาวิทยาลัยเอดินเบอร์ก สหราชอาณาจักร ด้วยหวังว่าจะใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์ดีเอ็นเอ ในตัวกลางวุ้นโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า เซาเทิร์น บลอตติง โดยรายละเอียดของการทดสอบทำโดย นำดีเอ็นเอที่แยกได้จากแบคทีเรียมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก ทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เหล่านี้ด้วย electrophoresis บน agarose gel และทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอแถบต่าง ๆ เสียสภาพจากดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้อยู่ในสภาพที่แยกออกเป็นสายเดี่ยวโดยการแช่ในสารละลายด่าง แล้วทำให้เป็นกลางด้วย Tris ย้ายแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ที่ต้องย้ายดีเอ็นเอเพราะ แผ่นไนโตรเซลลูโลสมีความคงทนมากกว่า ทั้งนี้เพราะระหว่างการทำไฮบริไดเซชั่นต้องมีการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอแยกสายก่อนที่จะจับคู่เบสใหม่กับ DNA probe ความร้อนที่ใช้นี้สามารถทำลาย agarose gel ให้หลอมละลายหายไปได้ การเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส ทำโดยวาง agarose gel ที่มีแถบดีเอ็นเอบนกระดาษที่จุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เข้มข้น และวางแผ่นไนโตรเซลลูโลส บน agarose gel อีกทีหนึ่ง จากนั้นวางทับด้วยกระดาษกรอง แล้ววางกระดาษซับหลายๆ ชั้นบนกระดาษกรองอีกทีหนึ่ง และใช้น้ำหนักทับบนกระดาษซับ แผ่นกระดาษซับที่แห้งจะดูดซับสารละลายบัฟเฟอร์ที่อยู่ข้างล่างให้เคลื่อนที่ขึ้น ชะผ่าน agarose gel แผ่นไนโตรเซลลูโลส กระดาษกรอง สู่กระดาษซับ ในขณะที่เคลื่อนที่สารละลายบัฟเฟอร์จะชะเอาชิ้นดีเอ็นเอ ให้หลุดออกจาก agarose gel ไปเกาะติดกับแผ่นไนโตรเซลลูโลส ไปด้วย โดยวิธีนี้เราจึงสามารถย้ายชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้นซึ่งอยู่ในสภาพสายเดี่ยว จาก agarose gel ไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสได้ วิธีการนี้เรียกว่า Southern blot ตรวจสอบแถบกัมมันตรังสีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส สามารถทำได้โดยเอาแผ่นไนโตรเซลลูโลสนำไปฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะปรากฏแถบที่แสดงถึงการเกิดไฮบริไดเซชันบนฟิล์มเอกซเรย์ หรือนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปทำปฏิกิริยากับโพรบ (hybridization) ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) แล้วนำไปตรวจสอบผลบวกโดยนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี DIG ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ปฏิกิริยาสุดท้ายเติม substrate ไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะปรากฏเป็นแถบบนแผ่นไนโตร

เซลลูโลสตรงตำแหน่งที่โพรบเข้าไปจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสที่เป็นคู่สมกันต่ออีกทีหนึ่ง (รูปที่ 1.2) วิธีการทั้งหมดที่ประกอบด้วย agarose gel electrophoresis, Southern blot และ hybridization จะเรียกว่า Southern blot hybridization (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2546)



รูป 1.2 ขั้นตอนของเทคนิค Southern blot hybridization

(www.rmuti.ac.th/user/thanyaphak/contacts/Heredity/chapter7.1.pdf)

การติดฉลากกรดนิวคลีอิกหรือโพรบ

เมื่อคัดเลือกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่จะใช้เป็นโพรบได้แล้ว จะต้องนำมาติดฉลากเพื่อการติดตามในขั้นต่อไป การติดฉลากอาจใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive labels) หรือติดฉลากโดยใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive labels) ก็ได้ วิธีการที่ใช้ติดฉลากจะคล้ายคลึงกัน มีหลายวิธี เช่น random primer หรือ nick translation

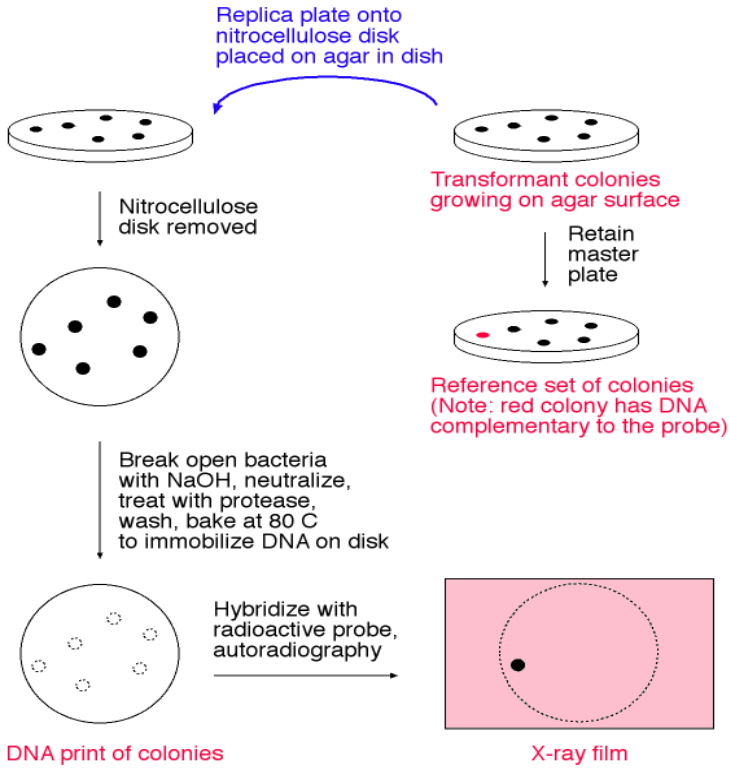
1. วิธี random primer โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากมาทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยว แล้วใช้ primer ที่มีความยาวประมาณ 6 นิวคลีโอไทด์และมีการเรียงตัวของเบสแบบสุ่ม (random primer) ให้เข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้น แล้วใช้เอนไซม์ Klenow ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถดึง Digoxigenin-dNTP เข้าร่วมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยใส่นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากลงไป วิธีนี้มีผู้นิยมใช้มาก ปัจจุบันไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขนาดความยาวเป็น 9 นิวคลีโอไทด์

2. วิธีที่นิยมมาก คือ nick translation (Rigby *et al.,* 1997) โดยใช้เอนไซม์ *E. coli* DNA polymerase I ร่วมกับเอนไซม์ DNase เอนไซม์ DNase จะทำให้เกิดรอยขาดแบบสุ่มในโมเลกุลของดีเอ็นเอ และเอนไซม์ DNA polymerase I จะใช้คุณสมบัติ 5' ไป 3' exonuclease ตัดนิวคลีโอไทด์ออกทางปลาย 5' ขณะเดียวกันก็ใช้คุณสมบัติ polymerase ต่อนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่เข้าที่ปลาย 3' ของรอยขาด จึงมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เดิมด้วยนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลาก จะได้สายดีเอ็นเอที่ติดฉลากในบางตำแหน่งใช้เป็นโพรบต่อไป

3. การติดฉลากโดยใช้สารปลอดรังสี สารที่สามารถนำมาใช้ติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสีมีหลายชนิด เช่น สารพวกไบโอติน (biotin), อนุพันธ์ของไบโอติน, digoxigenin และ fluorescein เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะใช้ติดฉลากโดยทำให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ของนิวคลีโอไทด์ก่อน เช่น biotin 11-dUTP, digoxigenin-dUTP หรือ fluorescein-dUTP แล้วเติมเข้าไปในสายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ต่างๆ ตามวิธีเดียวกับการใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีนั่นเอง คือ วิธี nick translation หรือ random primer เมื่อติดฉลากด้วยสารเหล่านี้แล้ว เวลาที่ต้องการตรวจสอบนั้น สำหรับไบโอตินจะตรวจสอบโดยการทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ avidin หรือ streptavidin ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ ส่วน digoxigenin หรือ fluorescein จะตรวจสอบโดยนำมาทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนติบอดีที่จำเพาะที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ แล้วจึงทดสอบโดยดูจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อีกทีหนึ่ง เอนไซม์ที่ใช้กันมาก คือ alkaline phophatase (AP) ซึ่งทดสอบได้โดยนำมาทำปฏิกิริยากับ substrate คือสาร 5' bromo-4-cloro-3-indolyl phosphate (BCIP) และ nitro blue tetrazolium (NBT) ทำให้เกิดสารสีฟ้าขึ้น (สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล, 2536)

3.3 โคโลนี ไฮบริไดเซชั่น (Colony hybridization)

เทคนิคนี้ถูกคิดค้นขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1975 โดย Granstiens และ Hogness เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เอ็นไซม์ โปรตีน หรือ แอนติบอดีที่สนใจจากโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือเป็นการตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายเนื่องจากดีเอ็นเอที่เกิดจากการโคลนมีความแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นต้องเลือกดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอหรือจีนที่ต้องการซึ่งวิธีนี้ต้องทำการเลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นจึงทำการถ่ายโอนโคโลนีของแบคทีเรียลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส หรือ แผ่นไนลอนเมมเบรน เนื่องจากประจุลบบนผิวเซลล์สามารถจับกับแผ่นเมมเบรนได้ ล้างเซลล์และแยกสายคู่เป็นสายเดี่ยว ทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดแน่นบนแผ่นเมมเบรนโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิสูง จากนั้นดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนจะถูกนำไปไฮบริไดส์กับดีเอ็นเอตรวจจับ (probe) เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีความจำเพาะกับโพรบ ตรวจสอบตำแหน่งโคโลนีบนแผ่นเมมเบรนที่สามารถจับกับโพรบได้อย่างจำเพาะโดยวิธี autoradiography หรือวิธี biotin วิธีนี้เรียกว่าการทำโคโลนีไฮบริไดเซชั่น (Granstiens and Wallis, 1979; Sayler *et al.*, 1985) (รูปที่ 1.3)



รูปที่ 1.3 ขั้นตอนของเทคนิค colony hybridization

(ที่มา : http://oregonstate.edu/instruction/bb331/lecture04/FigF9.html)

3.4 Arbitrarily Primed-Polymerase Chain reaction (AP-PCR)

Arbitrarily Primed-Polymerase Chain reaction (AP-PCR) หรือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคการศึกษาความแปรผันของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตและศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเฉพาะตัว โดยเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR เพื่อนำมาใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอต้นแบบโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปการทำ PCR ต้องใช้ไพรเมอร์ 1 คู่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ แต่ในการทำ AP-PCR เป็นการใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นๆ ประมาณ 9 ถึง 10 คู่เบสเพียงไพรเมอร์เดียว และเป็นแบบสุ่ม (random primers หรือ universal primers) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย ขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในสภาวะ low stringency คือ ใช้อุณหภูมิต่ำอยู่ในช่วง 36 ถึง 45°C ในขั้นตอนที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) และมีปริมาณของ $MgCl_2$ มากกว่าหรือเท่ากับ 2 mM ทำให้เกิดการจับกันของคู่เบสอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งสองสายได้หลายตำแหน่ง ในจีโนมอาจจะมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะในบริเวณที่ห่างไกลกันมากๆ หรือในทิศทางเดียวกัน จะไม่เกิดผลผลิตหลังจากการทำ PCR แต่ถ้าไปเกาะได้ในบริเวณใกล้กันและทิศทางเข้าหากัน จะเกิดผลผลิตขึ้นหลังจากการทำ PCR ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มชิ้นส่วนได้ และตำแหน่งที่ไพรเมอร์ไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบจะแตกต่างกันทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์มีการเรียงตัว จำนวน และตำแหน่งที่ไพรเมอร์ไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบก็แตกต่างกัน (Olive and Bean, 1999) ผลผลิตที่ได้สามารถตรวจสอบได้ด้วยการทำ electrophoresis ข้อดีของ AP-PCR คือ ทำได้ง่าย ได้ผลรวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อหรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่ต้องการนำมาศึกษา และไม่จำเป็นต้องนำเอาผลผลิต PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถดูผลรูปแบบของดีเอ็นเอได้โดยด้วยวิธี electrophoresis บน polyacrylamide gel หรือ agarose gel นักวิจัยส่วนใหญ่มักใช้เทคนิค AP-PCR ในการศึกษาความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างสปีชีส์หรือสปีชีส์เดียวกัน และใช้จำแนกจุลินทรีย์ออกเป็น type หรือ subtype แม้ว่าวิธี AP-PCR จะมีความสามารถในการแยกความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้ดี แต่ยังขาด reproducibility มีข้อจำกัดในด้านความไวในการตรวจหา และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา และการแยกด้วยวิธี electrophoresis อาจไม่แน่นอนโดยอาจแปรผันไปตามการทดลองในแต่ละครั้ง และแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้บางครั้งแปลผลได้ยาก โดยเฉพาะเมื่อต้องการเปรียบเทียบในแต่ละสายพันธุ์ที่ต่างกัน ดังนั้นในแต่ละขั้นตอนการทดสอบควรทำโดยบุคคลเดียวกัน รวมทั้งสภาวะที่ใช้ในการทดสอบแต่ละครั้งต้องใกล้เคียงกันที่สุด (William *et al.,* 1990)

วัตถุประสงค์

1. แยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อมโดยใช้ CHROMagar vibrio และทำการตรวจหายีน *tdh* และ *trh* ของเชื้อนี้
2. ทำการตรวจหายีน *tdh* และ *trh* และบ่งชี้เชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ที่เป็นโรคโดยใช้วิธีทางอณูวิทยาโมเลกุล
3. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ที่เป็นโรคโดยวิธี Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัท
Agar	Difco
CHROMagar vibrio	CHROM agar Microbiology
Luria Bertini (LB) broth	Novagen
Luria Bertini (LB) agar	Novagen
Nutrient broth (NB)	Difco
Tryptic soy agar (TSA)	Merck
Tryptic soy broth (TSB)	Difco
Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar	Difco
Urea agar base	BBL

2. สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

ชนิด	บริษัท
Absolute ethanol	Merck
Boric acid	Merck
Chloroform	Merck
EDTA	Merck
Ethidium bromide	Sigma
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Sigma
Isoamyl alcohol	Merck
Maleic acid	Sigma
Methanol	Merck
Phenol	Sigma
Sodium chloride	Merck

Sodium citrate dehydrate	Sigma
Sodium dodecyl sulfate	Sigma
Sodium hydroxide	Sigma
Sodium hydrogen carbonate	BDH
Tris base	Promega
Tween-20	Sigma

3. สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

ชนิด	**บริษัท**
Agarose	Gibco
dNTPs	Boeheringer Mannheim
Primers	Invitrogen
Restriction enzyme (*Hind*III)	BioLabs
Magnesium chloride	Promega
Taq DNA polymerase	Promega
RNase	Merck
Ex taq DNA polymerase	Takara
10X *Ex Taq* buffer	Takara
λ *Hind*III ladder	New England Biolabs
100 kb DNA ladder	New England Biolabs

4. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด microcentrifuge (eppendorf 5415 C, Brickman Instrument Inc. Germany)
- หลอด PCR ขนาด 1.5 ml
- Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 µl (Gilson, France)
- ชุด Electrophoresis และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น 200/2.0(Bio-Rad, USA)
- เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
- เครื่องวัด McFarland standard (Densimat) (bioMerieux)
- เครื่องชั่ง (Denver Instrument, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge Eppendorf) (Centrifuge 5415 C, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (KOKUSAN, Japan)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (MIKRO 22R, Germany)
- เครื่อง vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -20°C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -80°C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็น 4°C (Sanyo, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaker incubator) (Labline Instrument Inc. USA)
- เครื่องทำ Hybridization (Micro hybridization incubator) (Robbins Scientific, USA)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet) รุ่น ABS 1200A (ASTEC microflow, UK)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer, UK)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Metrohm, Switzerland)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Perkin Elmer, UK และ ASTEC, Japan)
- เครื่อง UV light transilluminator (UVP) (San Gabriel Inc. USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1235 (Shel-Lab, USA)
- เครื่อง Hot plate & Steirrer (Fisher Scientific, USA)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)

5. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

5.1 *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมบริเวณเกาะตะรุเตา เกาะยอ และตลาดคลองเรียน จำนวน 436 ไอโซเลต สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่โรงพยาบาลหาดใหญ่ จำนวน 6 ไอโซเลต และสายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์ทะเลที่ป่วย จำนวน 6 ไอโซเลต

5.2 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^{+}$ *trh*$^{-}$, *tdh*$^{-}$ *trh*1^{+}, *tdh*$^{-}$ *trh*2^{+} ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (positive control) ซึ่งเป็นเชื้อในคลังเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการคัดเลือกเชื้อ *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อม

เก็บตัวอย่างดินตะกอน 500 กรัม และน้ำทะเลปริมาตร 1 ลิตร หลายๆ จุด จากบริเวณหมู่เกาะตะรุเตา และเกาะยอ โดยเก็บตัวอย่างให้ลึกลงไปใต้ผิวน้ำประมาณ 30 ซ.ม. ห่างจากชายฝั่งประมาณ 500 ม. ถึง 1 กม. จากนั้นเก็บตัวอย่างในกระติกน้ำแข็ง นำตัวอย่างดินตะกอนมาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 1% ในอัตราส่วน 1: 10 นำความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-3} ถึง 10^{-5} มา spread บน อาหารแข็ง CHROMagar vibrio (CV) ส่วนตัวอย่างน้ำทะเลให้นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 µm ก่อน แล้วนำกระดาษกรองมาวางบนอาหาร CV (ภาคผนวก ก 7) ตัวอย่างหอยแครงจากตลาดคลองเรียน ทำการบดหอยให้ละเอียด นำเลือดและเนื้อไป streak บน CV จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 mm ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น *V. alginolyticus* มาเก็บเป็น stock เชื้อ การเก็บ stock ทำโดยเลี้ยงเชื้อใน LB broth ที่มี 1% NaCl (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำมาผสมใน 20% glycerol อัตราส่วน 1: 1 เก็บที่อุณหภูมิลบ 80°C ก่อนนำมาตรวจหายีน *tdh* และ *trh*

2. การทดสอบ urease activity

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสและการมียีน *trh* ของเชื้อ ซึ่งเอนไซม์ยูรีเอสจะสลายยูเรียเป็นแอมโมเนีย การทดสอบทำโดย streak เชื้อ *V. alginolyticus* บน LB agar+ 1% NaCl (ภาคผนวก ก 1) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เขี่ยเชื้อมาลงบนอาหาร urea base agar (ภาคผนวก ก 8) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. ถ้าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูบานเย็น

3. การตรวจหายีนสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* โดยวิธี PCR (Tada *et al*., 1992)

นำเชื้อ *V. alginolyticus* มาเลี้ยงใน LB broth ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 16-18 ชม. จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอหลุดออกจากเซลล์ นำไปแช่น้ำแข็งทันที 10 นาที เพื่อป้องกันดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาเข้าคู่กัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 xg 5 นาที เพื่อให้เศษเซลล์ตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนใสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 เพื่อลดการรบกวนจากโปรตีนและสิ่งสกัดอื่นๆ จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR ตรวจหายีน *tdh* และ *trh* ลำดับเบสของ primer ของยีนทั้งสองแสดงในตารางที่ 2.1

ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

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-D1 Forward (ยีน *tdh*) หรือ R2 Forward (ยีน *trh*)	5.0
2 µM primer-D2 Reverse (ยีน *tdh*) หรือ R6 Reverse (ยีน *trh*)	5.0
5 U/µl *Taq* 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	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ตรวจหาผลผลิต PCR โดยการทำ electrophoresis เพื่อตรวจหายีน *tdh* และ *trh* โดยใช้ 1.5% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x Tris Borate EDTA (TBE) (ภาคผนวก ข 1.2) ในการทำ electrophoresis ผสมผลผลิต PCR 8 µl กับ loading dye (ภาคผนวก ข 1.1) 2 µl หยอดใส่แผ่นเจล แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 80 โวลต์ ประมาณ 30-40 นาที เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (ภาคผนวก ข 1.3) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของ primers และขนาดของผลผลิต PCR

Genes	Primers and sequences (5' to 3')	Amplicon sizes (bp)	References
tdh	D1 'GGT ACT AAA TGGCTG ACA TC' D2 'CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC'	251	Tada *et al*., 1992
trh	R2 'GGC TCA AAA TGG TTA AGC G' R6 'CAT TTC CGC TCT TCA TAT GC'	250	Tada *et al*., 1992
*tox*R1	VA1-Forward 'GTG ACG CGC CGT CAA CAG AAG' VA2-Reverse 'AGC AGT AGA GAC AAA AGA ACG'	142	This study
*tox*R2	VA toxR2-Forward 'AAG CGC CAG CAG TGG AGT' VA toxR2-Reverse 'AAC AGG AAG CAG CAG AGA CAA A'	175	This study
*tox*R3	VA1-Forward 'GTG ACG CGC CGT CAA CAG AAG' VA toxR2-Reverse 'AAC AGG AAG CAG CAG AGA CAA A'	150	This study
collagenase	VA-Forward 'CGA GTA CAG TCA CTT GAA AGC C' VA-Reverse 'CAC AAC AGA ACT CGC GTT ACC'	737	Di Pinto *et al*., 2004
*omp*K	Forward 'GGC GGT CGC TCT GGT ATT' Reverse 'TTG CCA TCG TAA GTG CTG TA'	319	Cai *et al*., 2009
AP-PCR	Primer 2 'GTT TCG CTC C'	-	Okuda *et al*., 1997

4. การตรวจหายีน *tdh* และ *trh* ด้วยวิธี Colony hybridization

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh* (*tdh* probe) (Nishibushi *et al*., 1985)

นำ recombinant plasmid ซึ่งมียีน *tdh* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ P*st*I แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากวุ้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (QIAGEN, Germany) แล้วนำไปติดฉลากแบบสุ่มด้วย 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 *trh*1 และยีน *trh*2 (*trh*1 probe และ *trh*2 probe) (Kishishita *et al*., 1992)

นำ recombinant plasmid ซึ่งมียีน *trh*1 และยีน *trh*2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI ตามลำดับ แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากวุ้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (QIAGEN, Germany) แล้วนำไปติดฉลากแบบสุ่มด้วย digoxigenin (DIG) dUTP โดยนำดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh*1 และยีน *trh*2 ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม dNTP labeling (DIG High Prime, Roche) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชม.

4.3 ขั้นตอนการทำ colony blot

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบน LB agar ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อไปจุดลงบนแผ่นไนลอน หรือ แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nylon membrane หรือ nitrocellulose membrane) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และวางอยู่บน TSA +1% NaCl (ภาคผนวก ก 5) โดยเว้นระยะห่างแต่ละเชื้อเท่าๆกัน เพื่อให้เชื้อมีพื้นที่ในการเจริญ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อบนแผ่นไนลอนมาทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และทำการแยกสายดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยนำกระดาษกรอง Whatman 3M วางในถาด แล้วนำแผ่นไนลอนที่มีเชื้อเจริญวางบนกระดาษกรอง จากนั้นจึงค่อยๆ เท 0.5 M NaOH (ภาคผนวก ข 3.1) ปริมาตร 3.5 ml ลงไปบนแผ่นไนลอน วางทิ้งไว้ 10 นาที ย้ายแผ่นไนลอนไปวางบนกระดาษกรองแผ่นใหม่ เท 1 M Tris pH 7 (ภาคผนวก ข 3.2) ปริมาตร 3.5 ml ลงไป วางทิ้งไว้ 1 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ครั้งโดยทุกครั้งต้องเปลี่ยนกระดาษกรอง จากนั้นย้ายแผ่นไนลอนไปวางบนกระดาษกรองแผ่นใหม่ เท 1 M Tris pH 7 ที่มี 1.5 M NaCl (ภาคผนวก ข 3.3) ผสมอยู่ปริมาตร 3.5 ml ลงไป วางทิ้งไว้ 10 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นไนลอนไปวางบนกระดาษกรองที่แห้งที่อยู่บนกระดาษซับ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 1 ชม. จากนั้น

นำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2-3 ชม. เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้อยู่บนแผ่นไนลอน แล้วจึงนำไป hybridize กับ *tdh* และ *trh* probe

4.4 ขั้นตอนการ hybridization

การทำ hybridization ทุกขั้นตอนต้องทำในขวดที่ทำหมุนตลอดเวลาเพื่อให้มีการเคลื่อนที่ของสารละลายเสมอ เติมสารละลาย prehybridization (ภาคผนวก ข 3.7) ซึ่งต้อง pre-heat ที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh* (ถ้าใช้ดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh* ใช้อุณหภูมิ 30°C) ประมาณ 1 ชม. ลงในขวดที่มีแผ่นไนลอน (ให้ปริมาตรของสารละลายต่อขนาดพื้นที่ของแผ่นไนลอนเท่ากับ 10 ml/100 cm^2) นำขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C (ถ้าใช้ดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh* ใช้อุณหภูมิ 30°C) นาน 40 นาที ระวังอย่าให้มีฟองอากาศระหว่างสารละลายและแผ่นไนลอน เมื่อครบเวลา ให้แทนที่สารละลาย prehybridization ด้วยสารละลาย hybridization (ภาคผนวก ข 3.8) ที่มีดีเอ็นเอตรวจจับที่ต้องการทดสอบซึ่งติดฉลากด้วย DIG (ในสัดส่วน 3.5 ml ต่อแผ่นไนลอน 100 cm^2) อย่าให้มีฟองอากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh* (ถ้าใช้ดีเอ็นเอตรวจจับยีน *trh* ใช้อุณหภูมิ 30°C) นาน 16 ชม. จากนั้นนำแผ่นไนลอนมาล้างด้วย 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

4.5 การตรวจสอบผลของ hybridization กับแอนติบอดีต่อ DIG

ล้างแผ่นไนลอนด้วย washing buffer (ภาคผนวก ข 3.9) ประมาณ 5 นาที แล้วแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข 3.10) ปริมาตร 100 ml นาน 30 นาที เตรียมสารละลายแอนติบอดีต่อ DIG ที่จับกับ alkaline phosphatase (ภาคผนวก ข 3.11) โดยเจือจางในสัดส่วน 1:5,000 (150 mU/ml) ในสารละลาย blocking solution แช่แผ่นไนลอนในสารละลายแอนติบอดี 20 ml นาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วย washing buffer 100 ml 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำไปแช่ใน detection buffer (ภาคผนวก ข 3.12) 3 นาที เมื่อครบเวลาเทสารทิ้ง แล้วแช่แผ่นไนลอนใน color substrate solution (ภาคผนวก ข 3.13) 10 ml (ทำในที่มืด) ปฏิกิริยาการเกิดสีจะเห็นภายใน 2-3 นาทีและสิ้นสุดภายใน 16 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยล้างในน้ำกลั่น 50 ml 5 นาที วางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บแผ่นไนลอนที่เห็นผลได้เป็นระยะเวลานาน โคโลนีของเชื้อที่เกิดสีไม่ชัดเจนจึงนำมาทดสอบซ้ำโดยวิธี southern blot hybridization

5. การตรวจยืนยันยีน *tdh*, *trh*1 และ *trh*2 โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอและใช้ดีเอ็นเอตรวจจับด้วยวิธี Southern blot hybridization

5.1 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับยีน *tdh*, *trh*1 และยีน *trh*2 (*tdh* probe, *trh*1 probe และ *trh*2 probe) ใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 4.1 และ 4.2

5.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี phenol-chloroform extraction (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al*., 1989) (รูปที่ 2.1)

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบน LB agar ที่มี 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เขี่ยเชื้อใส่ในอาหาร LB broth ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 5 ml เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 6-8 ชม. นำเชื้อปริมาตร 1.5 ml ใส่ในหลอด microcentrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,600 xg นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม PBS pH 8.0 (ภาคผนวก ข 2.1) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,600 xg นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม PBS-EDTA (ภาคผนวก ข 2.3) ปริมาตร 300 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข 2.4) ปริมาตร 150 µl ผสมให้เข้ากันอีกครั้งโดยการกลับหลอดไปมา (inverted technique) แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1; ปริมาตร: ปริมาตร: ปริมาตร) (ภาคผนวก ข 2.5) 450 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 19,000 xg นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 450 µl และทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 M NaOAc (ภาคผนวก ข 2.6) ปริมาตร 40 µl และ absolute ethanol ที่เย็นจัด 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 19,000 xg นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 19,000 xg นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยวางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 300 µl ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติม RNase (ความเข้มข้น 1 mg/ml) (ภาคผนวก ข 2.7) ปริมาตร 3 µl นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการสกัดดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 300 µl ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนสิ้นสุดขั้นตอนการล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้ววางทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCL EDTA) (ภาคผนวก ข 2.8) ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm เพื่อหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ การคำนวณหา

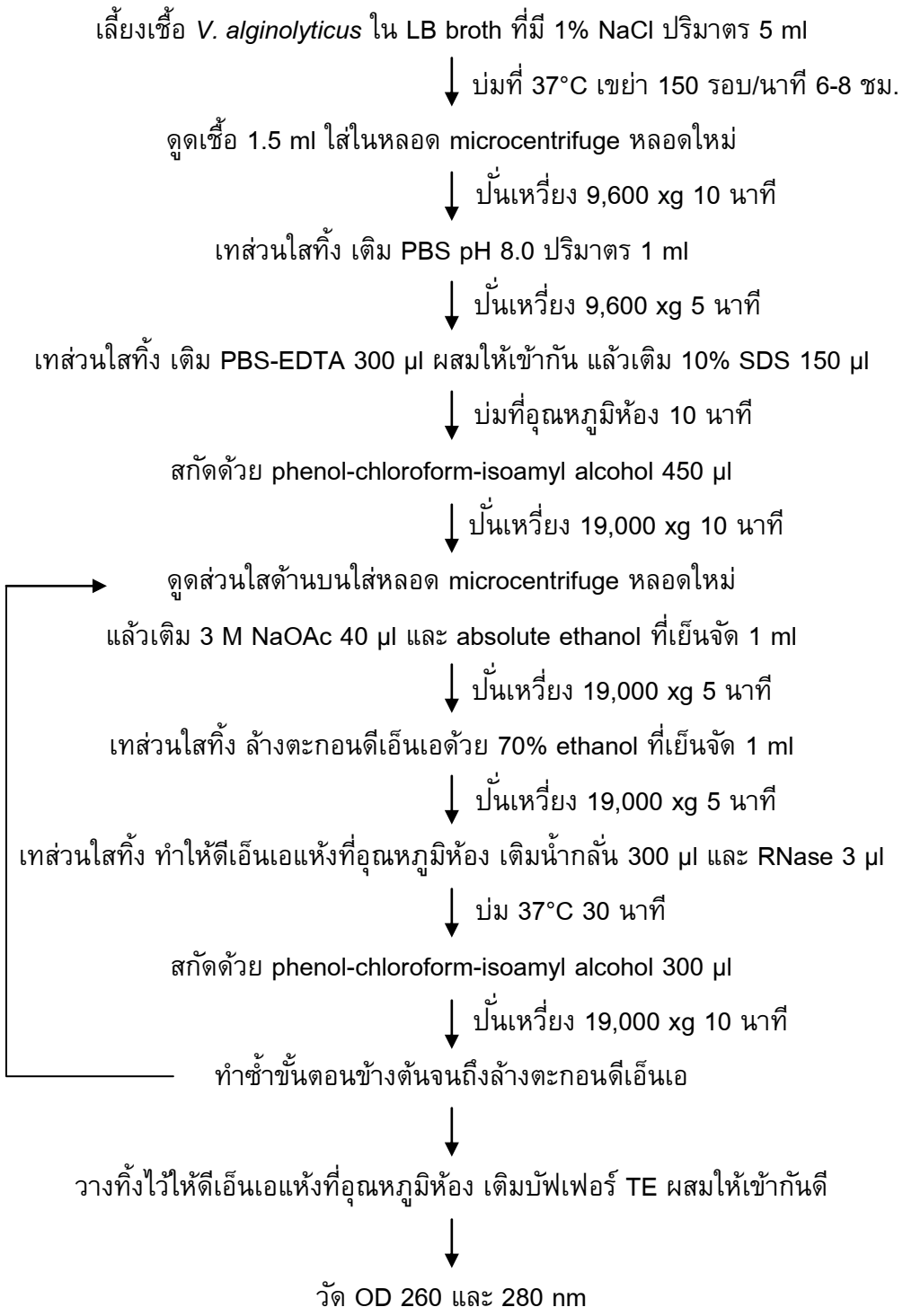
ปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ สามารถคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 nm ($OD_{260\ nm}$) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งมีค่า $OD_{260\ nm}$ เท่ากับ 1 จะมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 µg/ml และคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้โดยการหาอัตราส่วนของ $OD_{260\ nm}$/ $OD_{280\ nm}$ ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ แต่ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในระหว่างการเตรียมดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ ถ้าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่

5.3 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

นำดีเอ็นเอที่ได้จาก ข้อ 5.2 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 2 µg เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 Unit/µl ส่วนผสมในการทำมีดังต่อไปนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
10x NE buffer 2	3.0
*Hind*III (20 U/µl)	1.5
DW + DNA (2 µg)	25.5
ปริมาตรรวม	30.0

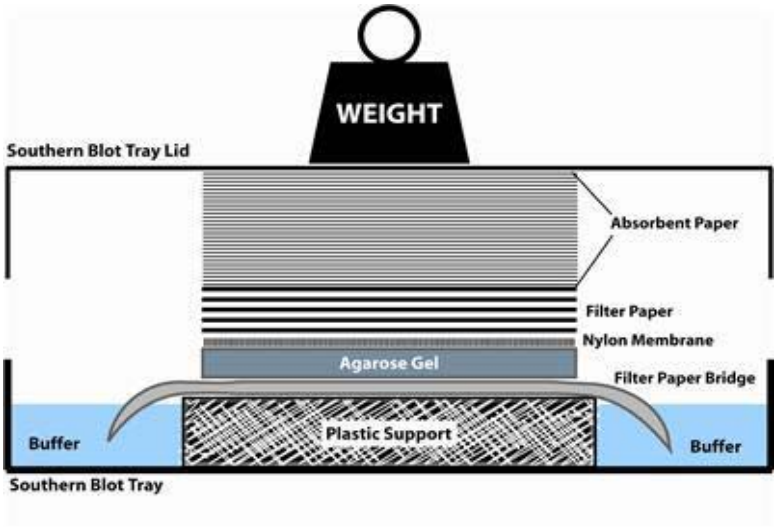
จากนั้นนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชม. แล้วดูดส่วนผสม 5 µl รวมกับ loading dye 1 µl นำไปทำ agarose gel electrophoresis โดยหยอดใส่แผ่นเจลที่มีความเข้มข้น 1% agarose gel ใน 1x TBE ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปในเจล ประมาณ 80 โวลต์ นาน 1 ชม. นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ดูลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใต้แสงอุลตราไวโอเลต ถ้ามีการตัดสมบูรณ์ก็นำส่วนผสมที่เหลือประมาณ 25 µl รวมกับ loading dye 5 µl นำไปทำ electrophoresis อีกครั้ง โดยใช้ 1% agarose gel (ขนาด 10 x 15 cm) เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 15 โวลต์ ประมาณ 12-14 ชม. เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 20 นาที นำมาดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอพร้อมถ่ายรูปใต้แสงอุลตราไวโอเลต หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่น้ำกลั่นต่อประมาณ 30 นาที เพื่อเอา ethidium bromide ส่วนเกินออก เพราะอาจมีผลรบกวนต่อการทดสอบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform

5.4 การทดสอบ Southern blot hybridization

นำแผ่นเจลจากข้อ 5.3 ไปแช่ใน denaturation solution (ภาคผนวก ข 3.4) เขย่าเบาๆ นาน 40 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วแช่ใน neutralization solution (ภาคผนวก ข 3.5) เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปวางโดยคว่ำด้านหน้าแผ่นเจลลงบนแผ่นกระจกที่มีกระดาษกรอง Whatman 3M วางเป็นสะพาน โดยมีปลายทั้งสองข้างจุ่มอยู่ในสารละลาย SSC ความเข้มข้น 10 เท่า (10x SSC) (ภาคผนวก ข 3.6) จากนั้นนำแผ่นไนลอนที่มีขนาดเล็กกว่าแผ่นเจลเล็กน้อยแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 5 นาที แล้ววางทับบนแผ่นเจล ด้านหลัง วางกระดาษกรอง Whatman 3M ทับบนแผ่นไนลอน 6 ชั้น โดยวางกระดาษกรองครั้งละหนึ่งแผ่น สองแผ่นแรกให้หยดบัฟเฟอร์ 10x SSC เล็กน้อยแล้วคลึงให้ทั่ว เพื่อให้แผ่นกระดาษกรองแนบกับแผ่นเจลให้สนิทอย่าให้มีฟองอากาศ แล้ววางกระดาษกรองที่เหลืออีกสี่แผ่นลงไป จากนั้นวางกระดาษซับให้มีความสูงประมาณ 4-6 cm วางแผ่นกระจกทับบนกระดาษซับ แล้วจึงวางของหนักประมาณ 500 g ทับลงไปบนกระจก (รูปที่ 2.2) ทิ้งไว้ 12-18 ชม. หรือข้ามคืน ดีเอ็นเอจากแผ่นเจลจะถูกถ่ายลงบนแผ่นไนลอน หลังจากนั้นนำแผ่นไนลอนไปผ่านแสงอุลตราไวโอเลต 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอยึดติดกับแผ่นไนลอน แล้วนำแผ่นไนลอนไปแช่ในน้ำกลั่น เขย่าเบาๆ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปทำ hybridization ต่อตามวิธีการในข้อ 4.4 และ 4.5



รูปที่ 2.2 เทคนิค Southern blotting

(ที่มา : http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=17)

6. ศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสัตว์ทะเลที่เป็นโรคโดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *tox*R, collagenase และ *omp*K เป็นยีนเป้าหมาย

นำเชื้อ *V. alginolyticus* มาเลี้ยงใน LB broth ที่มี 1% NaCl ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 16-18 ชม. จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอหลุดออกจากเซลล์ นำไปแช่น้ำแข็งทันที 10 นาที เพื่อป้องกันดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาเข้าคู่กัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 xg 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนใสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 เพื่อลดการรบกวนจากโปรตีนและสิ่งสกัดอื่นๆ จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR เพื่อหายีน *tox*R, collagenase และ *omp*K เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. alginolyticus* ลำดับเบสของ primers แสดงในตารางที่ 2.1

6.1 การตรวจยืนยันยีน *tox*R1, *tox*R2 และ *tox*R3

ทำการออกแบบไพรเมอร์ *tox*R1 และ *tox*R2 เพื่อใช้ในการตรวจหาและแยกความแตกต่างระหว่าง *V. alginolyticus* กับ *Vibrio* spp. ชนิดอื่นๆ โดยใช้ฐานข้อมูลลำดับเบสจาก Genbank (National Center for Biotechnology Information, NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) นำลำดับเบสทั้งหมดที่ได้จาก Genbank มาจัดเรียงเป็นเส้น (alignment) และเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม MacVector 10.6 (รูปที่ 2.3 และ 2.4) ไพรเมอร์ *tox*R3 ใช้ forward primer จากยีน *tox*R1 และ reverse primer จากยีน *tox*R2

ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	8.3
5x buffer with (7.5 mM $MgCl_2$)	4.0
2.5 mM dNTPs	1.6
2 µM primers (F+R)	4.0
5 U/µl go *Taq* DNA polymerase	0.1
DNA	2.0
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	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

6.2 การตรวจยืนยันยีน collagenase (ดัดแปลงจาก Di Pinto *et al*., 2005) ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	10.6
10x buffer	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.2
2.5 mM dNTPs	1.6
2 µM primer (F+R)	2.5
5 U/µl *Taq* DNA polymerase	0.1
DNA	2.0
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	95	5	1
2. Denature	94	0.5	35
3. Annealing	57	0.5	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	5	1

6.3 การตรวจยืนยันยีน *omp*K (ดัดแปลงจาก Cai *et al*., 2009)

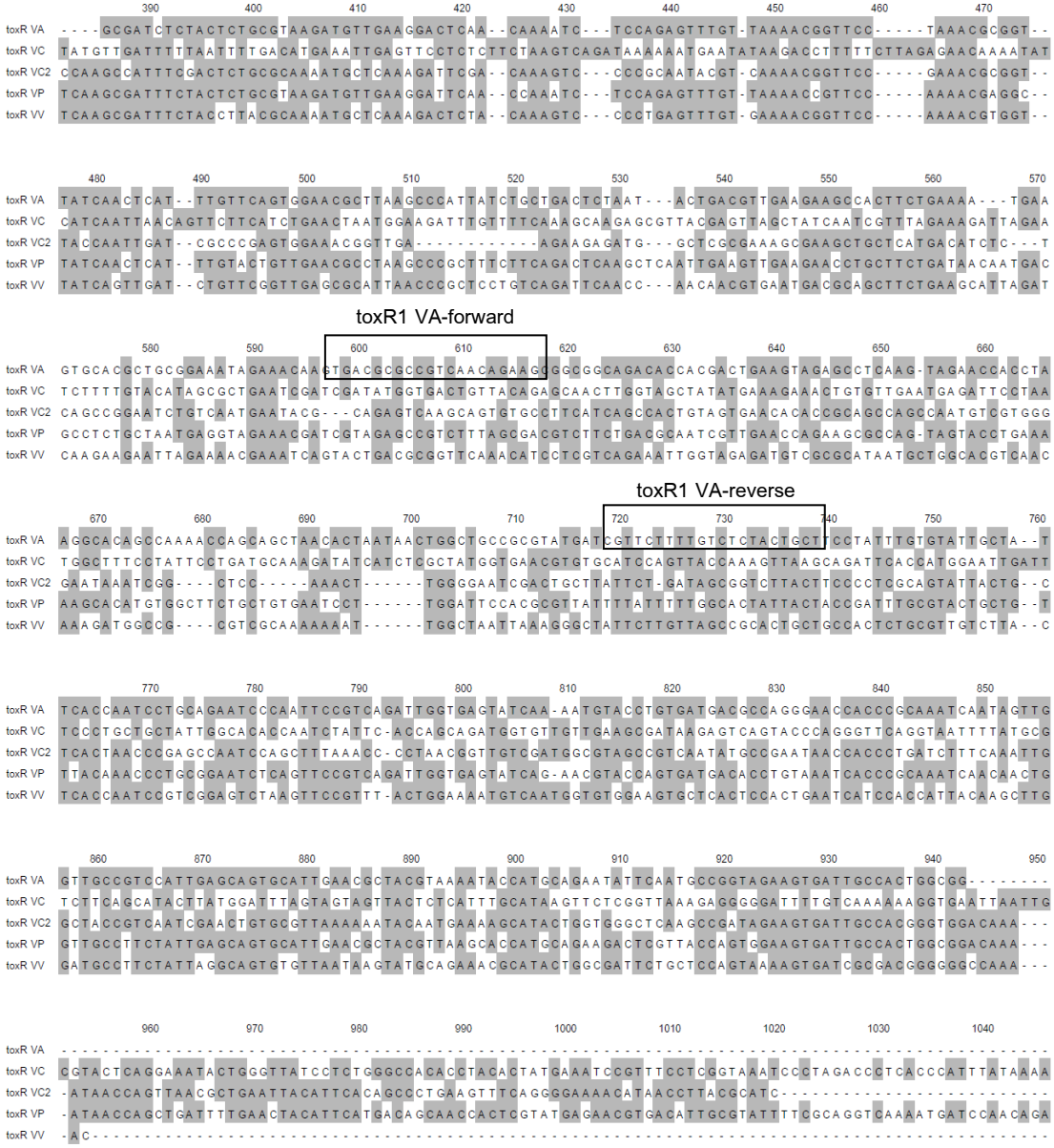
ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	9.3
5x buffer with (7.5 mM $MgCl_2$)	3.0
2.5 mM dNTPs	1.6
2 µM Forward primer	2.0
2 µM Reverse primer	2.0
5 U/µl go *Taq* DNA polymerase	0.1
DNA	2.0
ปริมาตรรวม	20.0

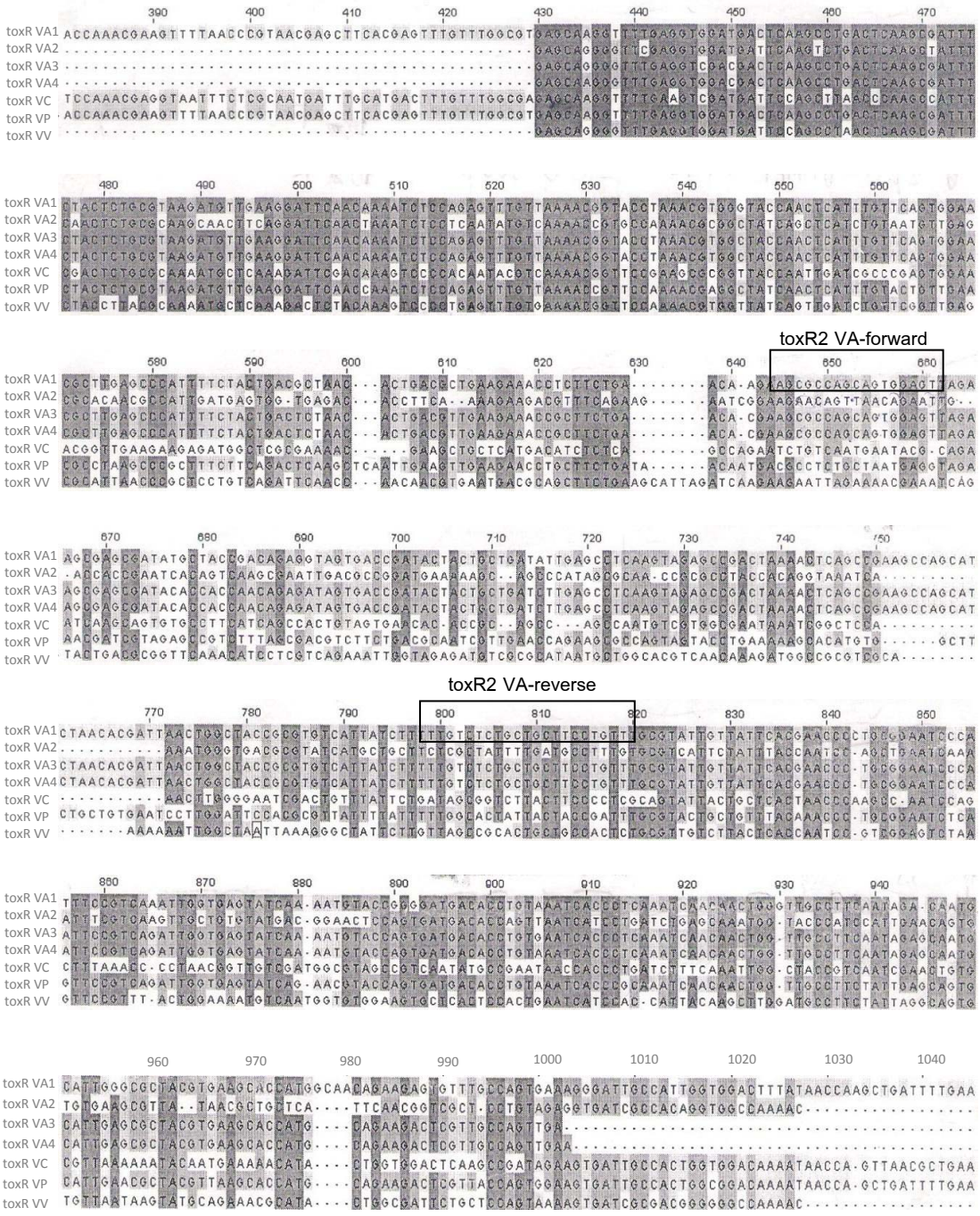
สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	94	5	1
2. Denature	94	1	30
3. Annealing	60	1	
4. Extension	72	1.5	
5. Final extension	72	10	1

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ตรวจหาผลผลิต PCR โดยการทำ electrophoresis เพื่อตรวจหายีน *tox*R, collagenase และ *omp*K โดยใช้ 1.5% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x Tris Borate EDTA (TBE) (ภาคผนวก ข 1.2) ในการทำ electrophoresis ผสมผลผลิต PCR 8 µl กับ loading dye (ภาคผนวก ข 1.1) 2 µl หยอดใส่แผ่นเจล แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 80 โวลต์ ประมาณ 30-40 นาที เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (ภาคผนวก ข 1.3) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต



รูปที่ 2.3 การจัดเรียงลำดับเบส และตำแหน่งของไพรเมอร์ *tox*R1
accession no. ของสายพันธุ์มาตราฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ *V. alginolyticus* (VA) EU155576; *V. cholerae* (VC) U07173, (VC2) HM042642; *V. parahaemolyticus* (VP) L11929 และ *V. vulnificus* (VV) AF170883



รูปที่ 2.4 การจัดเรียงลำดับเบส และตำแหน่งของไพรเมอร์ *tox*R2
accession no. ของสายพันธุ์มาตราฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ *V. alginolyticus* (VA1) AB11259, (VA2) AF1549, (VA3) FM1554, (VA4) FM151555; *V. cholerae* (VC) U11357; *V. parahaemolyticus* (VP) L11589 และ *V. vulnificus* (VV) AF157951

7. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสัตว์ทะเลที่เป็นโรคโดยใช้วิธี AP-PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ William *et al*., 1990)

นำเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสัตว์ทะเลที่เป็นโรคมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/µl เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ AP-PCR โดยใช้ primer 2 ซึ่งการทำ AP-PCR มีส่วนผสมดังต่อไปนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	15.0
10x *Ex Taq* buffer	3.0
2.5 mM dNTPs	4.0
5 mM primer 2	5.0
Ex Taq 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 ตรวจหาผลผลิต PCR โดยการทำ electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x TBE ในการทำ electrophoresis ผสมผลผลิต PCR 15 µl กับ loading dye 2 µl หยอดใส่แผ่นเจล แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 2 ระดับ คือ 100 โวลต์ นาน 5-7 นาที จากนั้นปรับเป็น 15 mA ประมาณ 12-15 ชม. เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการคัดเลือกเชื้อ *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อม

เชื้อที่แยกได้จากดินตะกอน น้ำทะเล และสัตว์ทะเลที่บริเวณหมู่เกาะตะรุเตา เกาะยอ และตัวอย่างหอยแครงจากตลาดคลองเรียน จำนวน 424 ตัวอย่าง พบเชื้อที่ให้โคโลนีสีขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 mm ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น *V. alginolyticus* บน CHROMagar vibrio (CV) จำนวน 436 ไอโซเลต (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ผลการแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อมบนอาหาร CV

ชนิดของตัวอย่าง และแหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่าง	โคโลนีสีขาวบน CV
1. ดินตะกอน		
- เกาะตะรุเตา	6	5
- เกาะยอ	12	13
2. น้ำทะเล		
- เกาะตะรุเตา	198	166
- เกาะยอ	175	173
3. สัตว์ทะเล		
- เกาะยอ	3	3
- ตลาดคลองเรียน	30	76
รวม	424	436

2. การศึกษาสมบัติของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม

2.1 การทดสอบ urease activity

เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 436 ไอโซเลตโดยใช้ CV และคาดว่าเป็น *V. alginolyticus* ถูกนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease พบว่าเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 65 ไอโซเลต หรือ 0.15% มีการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

2.2 การตรวจหายีน *tdh* และ *trh* ด้วยวิธี Colony hybridization

นำเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 436 ไอโซเลต มาตรวจหายีน *tdh* และ *trh*2 ด้วยวิธี colony hybridization ผลการทดลองพบว่า จากจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ตรวจ มี 12 ไอโซเลต และ 8 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกอ่อนๆ บนแผ่นไนลอน (ตารางที่ 3.2) เมื่อทดสอบด้วย *tdh* และ *trh*2 probe ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3.1)

2.3 การตรวจยืนยันยีน *tdh* และ *trh* โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอและใช้ดีเอ็นเอตรวจจับด้วยวิธี Southern blot hybridization

เมื่อนำเชื้อในข้อ 2.2 มาทดสอบยืนยันยีน *tdh* และ *trh*2 โดยวิธี southern blot hybridization ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้งหมดไม่มียีน *tdh* และ *trh*2 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3.2 และ 3.3)

ตารางที่ 3.2 หมายเลขไอโซเลตที่ให้ผลบวกอ่อนๆ ในการตรวจหายีน *tdh* และ *trh*2 ด้วยวิธี colony hybridization

หมายเลขไอโซเลต	
ยีน *tdh*	ยีน *trh*2
T143, T241, T247, T1145, T1147, T1149, T1151, Y135, Y137, Y1123, Y1132, Y174	T143, T241, T247, T1145, T1147, T1149, Y1149, Y2144

หมายเหตุ : T เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากเกาะตะรุเตา
Y เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากเกาะยอ

3. การศึกษาสมบัติของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค

3.1 การทดสอบ urease activity

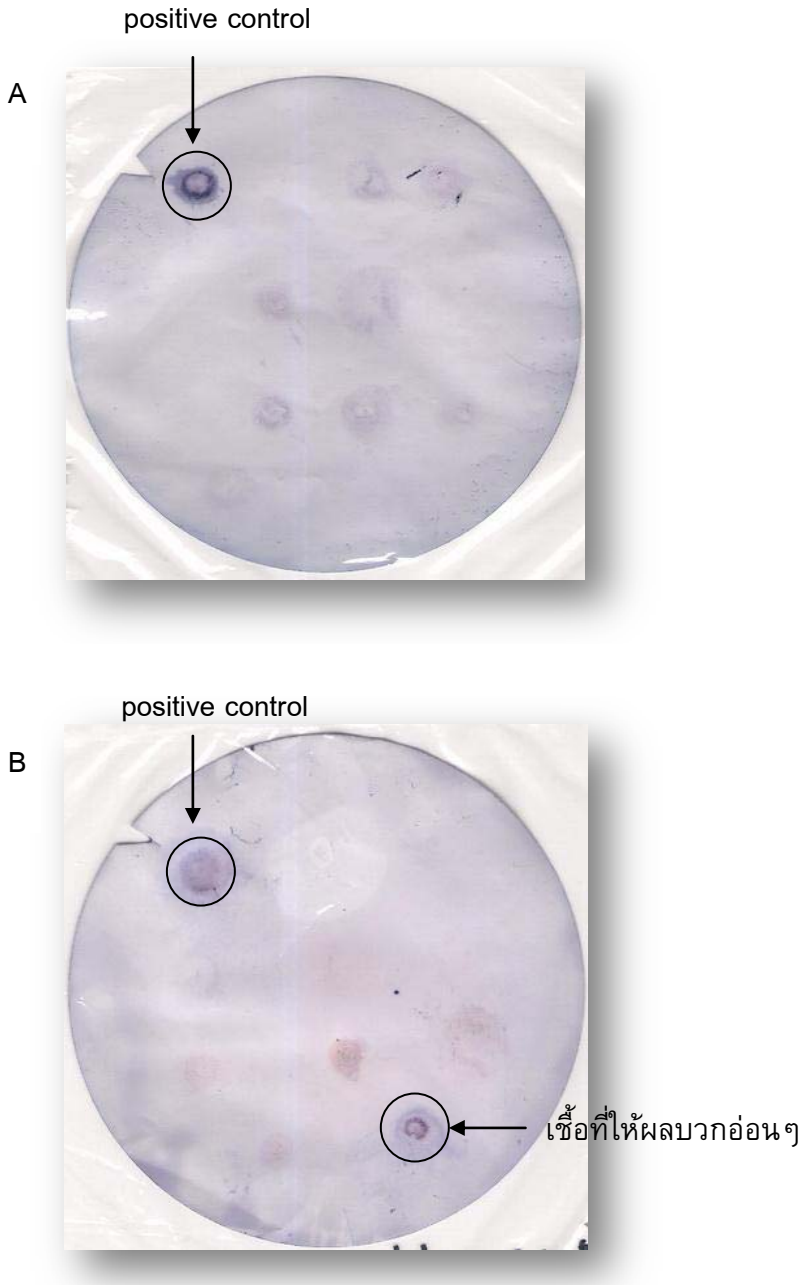
เชื้อทั้งหมด 12 ไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็น *V. alginolyticus* โดยการทดสอบทางชีวเคมี (ตารางที่ 3.3) เป็นเชื้อจากผู้ป่วย 6 ไอโซเลตและเชื้อจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรค 6 ไอโซเลต พบเชื้อจากผู้ป่วย และสัตว์ที่เป็นโรคมีการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสเท่ากับ 1 และ 3 ไอโซเลต ตามลำดับ

3.2 การตรวจหายีนสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* โดยวิธี PCR และ Southern blot hybridization

เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 6 ไอโซเลต และจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรค 6 ไอโซเลต ถูกนำมาตรวจหายีนสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* โดยวิธี PCR พบว่าทุกไอโซเลตไม่มียีนสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* (ตารางที่ 3.3) และเมื่อทำการตรวจยืนยันโดยใช้วิธี Southern blot hybridization ก็ไม่พบว่ามียีน *tdh* และ *trh* (รูปที่ 3.4, 3.5 และ 3.6)

ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจหายีน *tdh* และ *trh* และผลการทดสอบทางชีวเคมี ของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค

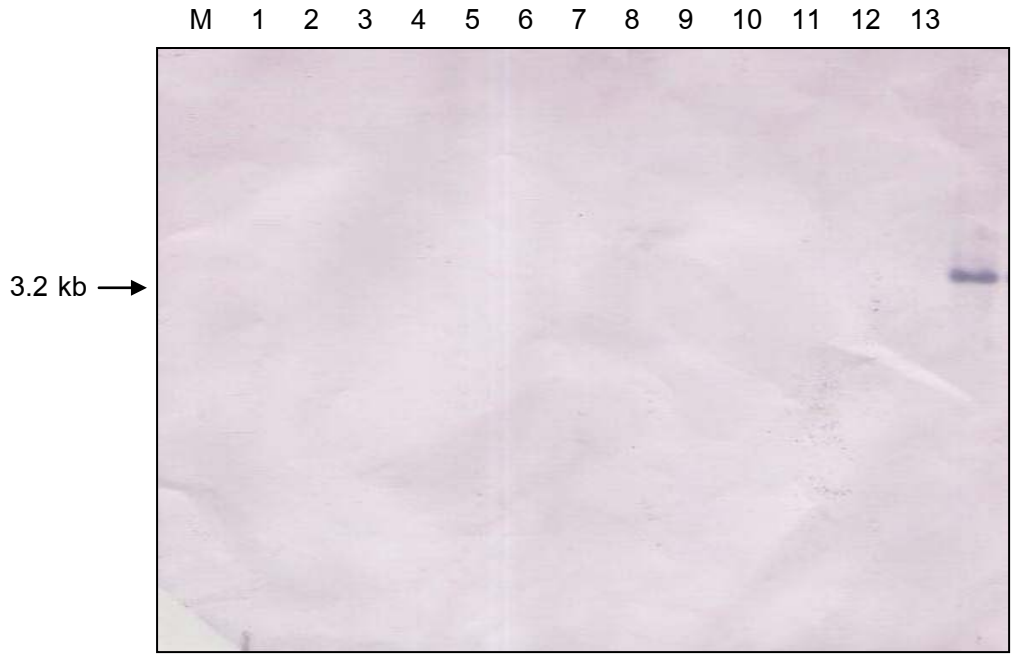
Samples	PSU no.	Virulence genes		Biochemical tests										
		tdh	*trh*	CA	TCBS	arabinose	mannitol	arginine dihydrolase	lysine decarboxylase	ornithine decarboxylase	indole	VP	oxidase	urease
ผู้ป่วย	3978	-	-	W	Y	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	4537	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	4543	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	4718	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	4794	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	4912	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	-
สัตว์ทะเลที่เป็นโรค	4109	-	-	W	Y	-	-	-	+	-	+	-	+	-
	4110	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	4111	-	-	W	Y	-	-	-	+	-	+	-	+	-
	4112	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	4130	-	-	W	Y	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	4246	-	-	W	Y	-	-	-	+	+	+	+	+	+
VA reference strain	6	-	-	W	Y	-	+	-	+	+	+	+	+	-



รูปที่ 3.1 ผลการทำ colony hybridization ของ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ด้วยตัวตรวจจับยีน *tdh* และ *trh*2 (*tdh* และ *trh*2 probe)

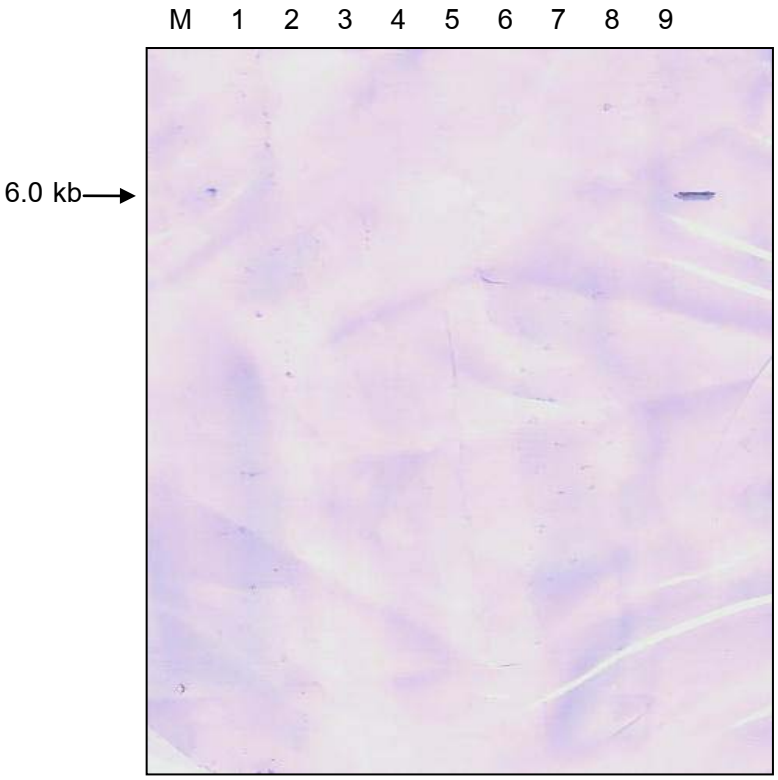
A : positive control คือ *V. paraheamolyticus* strain 2426 (*tdh* probe)

B : positive control คือ *V. paraheamolyticus* strain 2480 (*trh* probe)



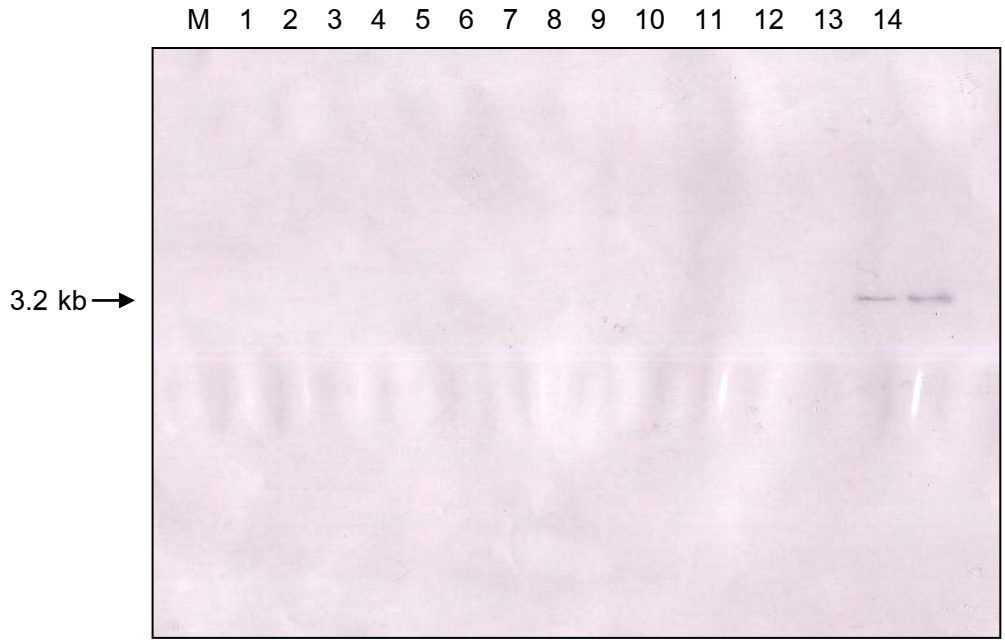
รูปที่ 3.2 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อมเมื่อใช้ยีน *tdh* เป็นตัวตรวจจับ

Lane M	:	MW marker (1kb DNA ladder)
Lane 1	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T143
Lane 2	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T241
Lane 3	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T247
Lane 4	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T1145
Lane 5	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T1147
Lane 6	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T1149
Lane 7	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T1151
Lane 8	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข Y135
Lane 9	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข Y137
Lane 10	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข Y1123
Lane 11	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข Y1132
Lane 12	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข Y174
Lane 13	:	*V. paraheamolyticus* strain 2426 (*tdh*$^{+}$ *trh*$^{-}$) control



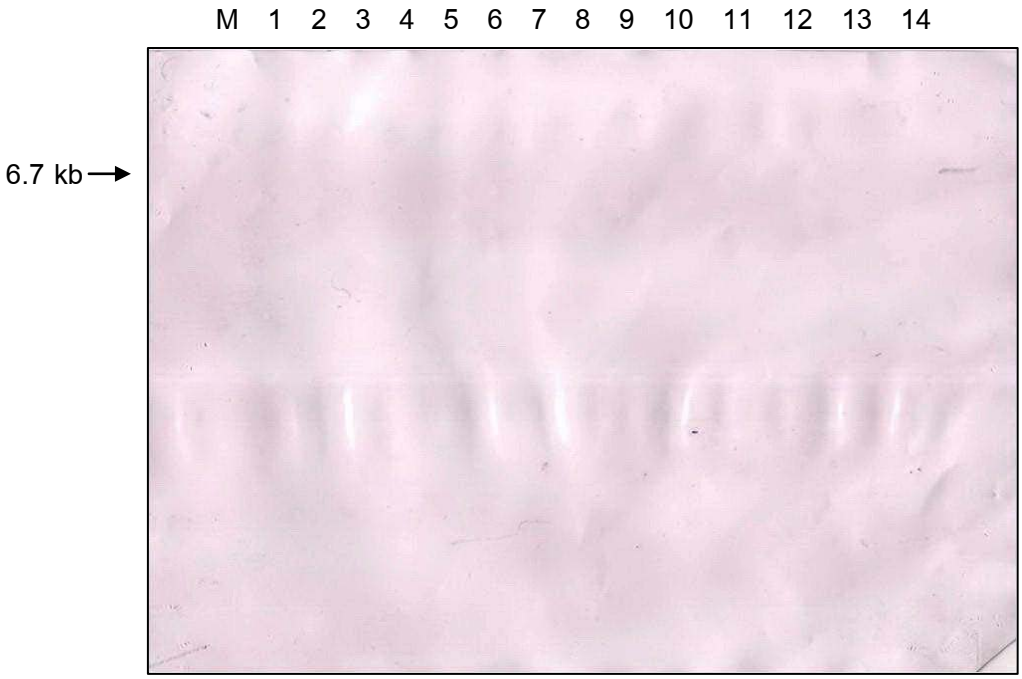
รูปที่ 3.3 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากสิ่งแวดล้อมเมื่อใช้ยีน *trh*2 เป็นตัวตรวจจับ

Lane M	:	MW marker (1kb DNA ladder)
Lane 1	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T143
Lane 2	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T241
Lane 3	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T247
Lane 4	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T1145
Lane 5	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T1147
Lane 6	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข T1149
Lane 7	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข Y1149
Lane 8	:	เชื้อไอโซเลตหมายเลข Y2144
Lane 9	:	*V. paraheamolyticus* strain 2480 (tdh^- trh^+) control



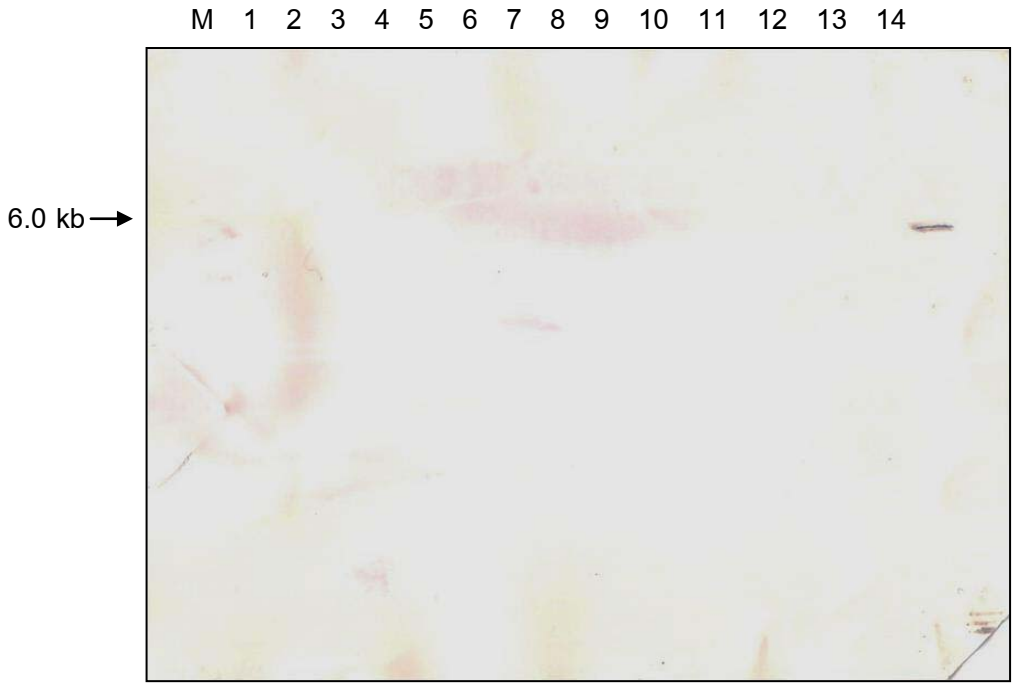
รูปที่ 3.4 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค เมื่อใช้ยีน *tdh* เป็นตัวตรวจจับ

Lane M	:	MW marker (1kb DNA ladder)
Lane 1-6	:	*V. alginolyticus* จากผู้ป่วย
Lane 7-12	:	*V. alginolyticus* จากสัตว์ทะเลที่เป็นโรค
Lane 13	:	*V. parahaemolyticus* strain 42 (*tdh*$^+$, *trh*1$^+$) control
Lane 14	:	*V. parahaemolyticus* strain 43 (*tdh*$^+$, *trh2*$^+$) control



รูปที่ 3.5 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค เมื่อใช้ยีน *trh*1 เป็นตัวตรวจจับ

Lane M	:	MW marker (1kb DNA ladder)
Lane 1-6	:	*V. alginolyticus* จากผู้ป่วย
Lane 7-12	:	*V. alginolyticus* จากสัตว์ทะเลที่เป็นโรค
Lane 13	:	*V. parahaemolyticus* strain 43 (*tdh*$^+$, *trh*2$^+$) control
Lane 14	:	*V. parahaemolyticus* strain 42 (*tdh*$^+$, *trh*1$^+$) control



รูปที่ 3.6 Southern blot hybridization ของ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค เมื่อใช้ยีน *trh*2 เป็นตัวตรวจจับ

Lane M	:	MW marker (1kb DNA ladder)
Lane 1-6	:	*V. alginolyticus* จากผู้ป่วย
Lane 7-12	:	*V. alginolyticus* จากสัตว์ทะเลที่เป็นโรค
Lane 13	:	*V. parahaemolyticus* strain 42 (*tdh*$^+$, *trh*1$^+$) control
Lane 14	:	*V. parahaemolyticus* strain 43 (*tdh*$^+$, *trh2*$^+$) control

4. การบ่งชี้เชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสัตว์ทะเลที่เป็นโรคโดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *tox*R, collagenase และ *omp*K เป็นยีนเป้าหมาย

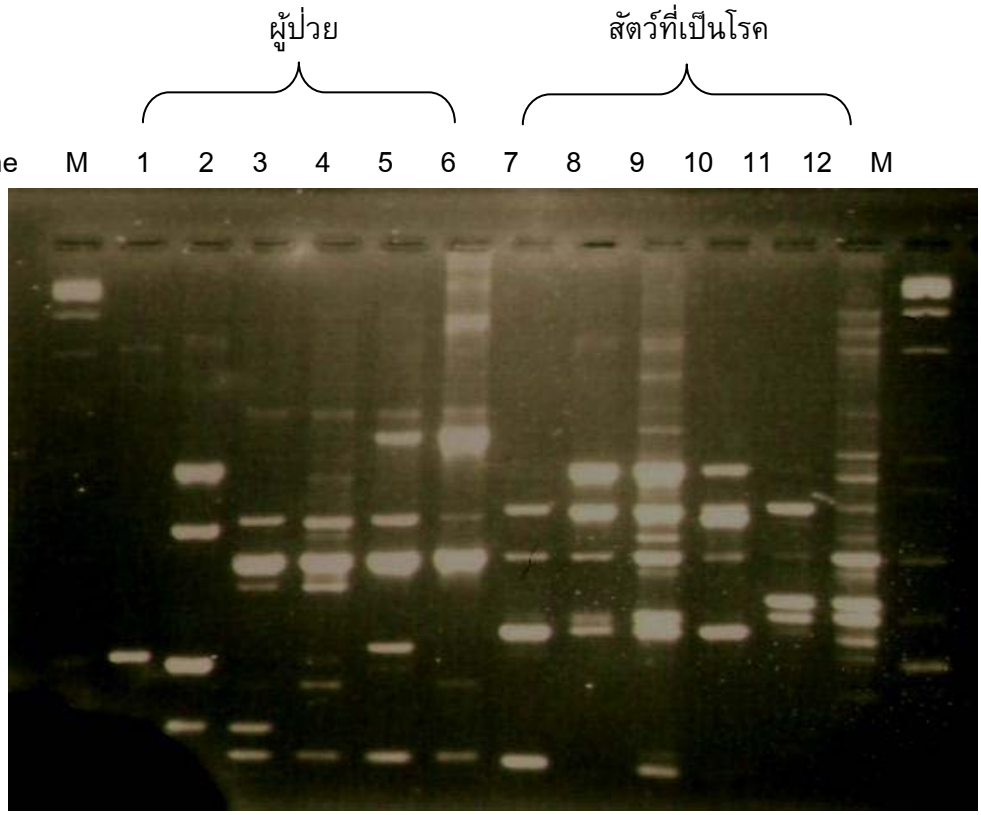
เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 6 ไอโซเลต และจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรค 6 ไอโซเลต ซึ่งตรวจสอบโดยวิธีทางชีวเคมี และคาดว่าเป็น *V. alginolyticus* ถูกนำมายืนยันโดยการตรวจหายีน *tox*R, collagenase และ *omp*K โดยวิธี PCR ผลการทดลองพบยีน collagenase ในเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยทุกไอโซเลต ยกเว้นไอโซเลตหมายเลข 3978 พบยีน *tox*R1, *tox*R2 และ *tox*R3 จำนวน 4, 1 และ 4 ไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วยตามลำดับ แต่ไม่พบในไอโซเลตหมายเลข 3978 และพบยีน *omp*K ใน 3 ไอโซเลตจากผู้ป่วย (หมายเลข 4537, 4543 และ 4794) ส่วน *V. alginolyticus* ทุกไอโซเลตที่แยกจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรคไม่พบยีนทั้งสามชนิด เมื่อเทียบกับ *V. alginolyticus* สายพันธุ์มาตรฐาน (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ผลการบ่งชี้ลักษณะของ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคโดยวิธี PCR

Sample	PSU no.	Targeted genes				
		collagenase	*tox*R1	*tox*R2	*tox*R3	*omp*K
ผู้ป่วย	3978	-	-	-	-	-
	4537	+	+	-	+	+
	4543	+	+	-	+	+
	4718	+	-	+	-	-
	4794	+	+	-	+	+
	4912	+	+	-	+	-
สัตว์ทะเลที่เป็นโรค	4109	-	-	-	-	-
	4110	-	-	-	-	-
	4111	-	-	-	-	-
	4112	-	-	-	-	-
	4130	-	-	-	-	-
	4246	-	-	-	-	-
VA reference strain	6	+	-	+	-	-

5. ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสัตว์ทะเลที่เป็นโรคโดยใช้วิธี AP-PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ William *et al*., 1990)

ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยจำนวน 6 ไอโซเลต และจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรคจำนวน 6 ไอโซเลต โดยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ primer 2 (รูปที่ 3.7) พบว่าแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในกลุ่มเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยพบว่า 4 ไอโซเลต มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันในบางตำแหน่ง (lane 3, PSU 4543; lane 4, PSU 4718; lane 5, PSU 4794 และ lane 6, PSU 4912) แต่อีก 2 ไอโซเลตมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกับไอโซเลตอื่นในกลุ่มเดียวกัน (lane 1, PSU 3978 และ lane 2, PSU 4537) ส่วนในกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ทะเลที่เป็นโรคพบว่า เชื้อที่แยกจากกุ้งที่ป่วย 3 ไอโซเลตมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกันในบางตำแหน่ง (lane 8, PSU 4110; lane 9, PSU 4111 และ lane 10, PSU 4112) และเชื้อที่แยกจากปลาที่ป่วย 1 ไอโซเลต มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกับกุ้งที่ป่วยอย่างชัดเจน (lane 12, PSU 4246)



รูปที่ 3.7 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรค โดยใช้ primer 2

Lane M	:	MW marker (λ *Hind* III+ 100 bp DNA ladder)	
Lane 1	:	PSU 3978	ผู้ป่วย
Lane 2	:	PSU 4537	
Lane 3	:	PSU 4543	
Lane 4	:	PSU 4718	
Lane 5	:	PSU 4794	
Lane 6	:	PSU 4912	
Lane 7	:	PSU 4109	สัตว์ทะเลเป็นโรค
Lane 8	:	PSU 4110	
Lane 9	:	PSU 4111	
Lane 10	:	PSU 4112	
Lane 11	:	PSU 4130	
Lane 12	:	PSU 4246	

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *V. alginolyticus* เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผล และในปัจจุบันพบว่าทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารอักเสบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (Daniels, 2000) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. alginolyticus* จากดินตะกอน น้ำทะเล และสัตว์ทะเล บริเวณหมู่เกาะตะรุเตา เกาะยอ และตัวอย่างหอยแครงจากตลาดคลองเรียน จำนวน 436 ไอโซเลต เพื่อนำมาตรวจหายีนก่อโรค *tdh* และ *trh* เนื่องจากมีรายงานการค้นพบยีน *trh* ใน *V. alginolyticus* ที่แยกจากหอยนางรมที่ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบว่ายีนนี้มีลำดับเบสเหมือนกับยีน *trh*2 ที่พบใน *V. parahaemolyticus* ถึง 98% (Escalona *et al*., 2006) ผลการตรวจหายีน *tdh* และ *trh* โดยวิธี Colony hybridization พบว่าจากจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ตรวจ มี 12 ไอโซเลต และ 8 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกอ่อนๆ บนแผ่นไนลอน เมื่อทดสอบด้วย *tdh* และ *trh* probe ตามลำดับ และเมื่อนำไอโซเลตที่ให้ผลบวกอ่อนๆ มาทดสอบยืนยันอีกครั้งโดยใช้วิธี Southern blot hybridization โดยใช้ *tdh*, *trh*1 และ *trh*2 probe ไม่พบว่าไอโซเลตที่ทดสอบมียีนเหล่านี้ แสดงว่าเชื้อ *V. alginolyticus* ทั้ง 436 ไอโซเลตที่แยกจากสิ่งแวดล้อมบริเวณหมู่เกาะตะรุเตา เกาะยอ และตลาดคลองเรียน ไม่มียีน *tdh* และ *trh* ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส พบว่าจาก 436 ไอโซเลต มี 65 ไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งค่อนข้างใกล้เคียงกับการทดลองของ Molitoris และคณะที่พบว่า *V. alginolyticus* ที่แยกจากสัตว์ทะเล สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ประมาณ 2.4% (Molitoris *et al*., 1985) มีรายงานว่าใน *V. parahaemolyticus* ตำแหน่งของยีน *ure* และยีน *trh* อยู่ใกล้กันบนโครโมโซม การพบยีน *ure* ใน *V. parahaemolyticus* แสดงว่าเชื้อนั้นมียีน *trh* (Suthienkul *et al*., 1995; Okuda *et al.,* 1997; Ghosh and Sehgal, 1998) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบยีน *trh* ใน *V. alginolyticus* ที่แยกได้ อาจเนื่องมาจากยีน *trh* ที่ Escalona และคณะพบใน *V. alginolyticus* อาจได้รับการถ่ายทอดมาจาก *V. parahaemolyticus* หรือ vibriophage อื่นๆ และยีนนี้อาจขนาบข้างด้วย insertion sequence จึงเป็นไปได้ว่ายีนนี้จะได้รับการถ่ายทอดมาสู่ *V. alginolyticus* ในช่วงระยะเวลาหนึ่งและถูกส่งออกไปสู่สิ่งมีชีวิตอื่นในทะเล หรืออาจเป็นไปได้ว่ายีน *ure* และยีน *trh* ของ *V. alginolyticus* ไม่ได้อยู่ใกล้กันบนโครโมโซม จึงไม่มีการถ่ายทอดไปด้วยกัน และไม่มีการแสดงออกของลักษณะดังกล่าวร่วมกัน แตกต่างจาก *V. parahaemolyticus* การไม่พบยีนก่อโรค *tdh* และ *trh* ใน *V. alginolyticus* บริเวณหมู่เกาะตะรุเตา เกาะยอ และตลาดคลองเรียนนั้น ถือว่าเป็นสถานการณ์ที่ดีเพราะยีนเหล่านี้อาจจะทำให้คนและสัตว์ทะเลที่ได้รับเชื้อมีอาการท้องเสียรุนแรงมากกว่าการได้รับเชื้อนี้ที่ไม่มียีนก่อโรค

นอกจากการตรวจหายีนก่อโรค *tdh* และ *trh* ใน *V. alginolyticus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมแล้ว การทดลองครั้งนี้ยังได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *tox*R (*tox*R1, *tox*R2 และ *tox*R3) และเปรียบเทียบไพรเมอร์นี้กับไพรเมอร์ที่ออกแบบมาก่อน ได้แก่ ยีน collagenase และ ยีน *omp*K (Di Pinto *et al*., 2004; Cai *et al*., 2009) เพื่อใช้ทดสอบยืนยันเชื้อที่คาดว่าเป็น *V. alginolyticus* (โดยใช้วิธีทางชีวเคมี) ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสัตว์ทะเลที่เป็นโรค โดยใช้วิธี PCR สาเหตุที่ต้องใช้หลายไพรเมอร์มาทดสอบเปรียบเทียบเนื่องจาก *V. alginolyticus* มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ vibrios สปีชีส์อื่น ทำให้แยกจากกันได้ค่อนข้างยาก ยีน *tox*R ใน *V. alginolyticus* มีลำดับเบสใกล้เคียงกับใน *V. parahaemolyticus* 61.7% (Osorio and Klose, 2000) ยีน collagenase ของ *V. alginolyticus* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ collagenase สูงกว่าในแบคทีเรียชนิดอื่น และมี amplicon size แตกต่างกับ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* (Di Pinto *et al*., 2005) และยีน *omp*K เป็นยีนที่พบได้มากบริเวณผิวเซลล์ ทำหน้าที่เป็น receptor ต่อ KVP40 ซึ่งเป็น vibriophage ของ *V. parahaemolyticus* (Qian *et al.,* 2008) ผลการทดลองพบยีน collagenase ในเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยทุกไอโซเลต ยกเว้นไอโซเลต PSU 3978 ขณะที่ยีน *tox*R1, *tox*R2 และ *tox*R3 พบได้ในบางไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วย และไม่พบยีนนี้ในไอโซเลต PSU 3978 ส่วนยีน *omp*K พบในผู้ป่วยไอโซเลต PSU 4537, 4543 และ 4794 จากข้อมูลนี้สามารถสรุปได้ว่าความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการยืนยัน *V. alginolyticus* ไม่เท่ากัน โดยไพรเมอร์ต่อยีน collagenase มีความไวมากที่สุด รองลงมาคือไพรเมอร์ต่อยีน *tox*R1, *tox*R3 และ *omp*K นอกจากนี้ยังสรุปได้ว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่ต่างกัน ส่วนสาเหตุที่ไม่พบยีนทั้งสามชนิดในผู้ป่วยไอโซเลต PSU 3978 และทุกไอโซเลตที่แยกจากสัตว์ทะเล อาจเกิดจากผลปฏิกิริยาทางชีวเคมีมีความคลาดเคลื่อนทำให้แปลผลผิดพลาด หรืออาจเป็นเชื้อ *V. hollisae* เนื่องจากลักษณะโคโลนีบน CV มีสีขาวขนาดใหญ่ ใกล้เคียงกับโคโลนีของ *V. alginolyticus* (Janda *et al*., 1988; Hara-Kudo *et al*., 2001) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า Cai และคณะพบยีนทั้งสามชนิดใน *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ แต่ไม่พบยีนทั้งสามชนิดในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (Cai *et al*., 2009)

การก่อโรคของ *V. alginolyticus* ที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องแยกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยดูลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบแหล่งที่มา จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยจำนวน 6 ไอโซเลต และจากสัตว์ทะเลที่เป็น

โรคจำนวน 6 ไอโซเลต โดยเทคนิค AP-PCR พบว่าแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในกลุ่มเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยพบว่า 4 ไอโซเลต มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันในบางตำแหน่ง แต่อีก 2 ไอโซเลตมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกับไอโซเลตอื่นในกลุ่มเดียวกัน แสดงว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่ต่างกัน ส่วนในกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ทะเลที่เป็นโรคพบว่า เชื้อที่แยกจากกุ้งที่ป่วย 3 ไอโซเลตมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกันในบางตำแหน่ง และเชื้อที่แยกจากปลาที่ป่วย 1 ไอโซเลต มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกับกุ้งที่ป่วยอย่างชัดเจน AP-PCR เป็นวิธีศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ผลรวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย รวมทั้งไม่ต้องการเครื่องมือพิเศษใดๆ แต่มีข้อจำกัดว่าในแต่ละขั้นตอนของการทดลองควรทำโดยบุคคลเดียวกัน และสภาวะในการทดลองแต่ละครั้งต้องใกล้เคียงกันที่สุด แต่เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น amplified fragment length polymorphism (AFLP) หรือ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) แม้ทั้งสองวิธีจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า แต่มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เครื่องมือราคาแพง ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงอีกทั้งต้องอาศัยความชำนาญในการทำ

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปว่าไม่พบ *V. alginolyticus* ที่มียีน *tdh* และ *trh* การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมหลายๆ แห่งมาทดสอบเพิ่ม จะทำให้เพิ่มโอกาสการตรวจพบได้มากขึ้น การติดเชื้อจาก *V. alginolyticus* มีแนวโน้มที่จะเกิดเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปเพื่อเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังเชื้อนี้ในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. เชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกมาจากดินตะกอน น้ำทะเล และสัตว์ทะเลบริเวณหมู่เกาะตะรุเตา เกาะยอ และตลาดคลองเรียน จำนวน 436 ไอโซเลต เมื่อนำมาตรวจหายีนก่อโรค *tdh* และ *trh* โดยวิธี Colony hybridization พบ 12 และ 8 ไอโซเลตที่ให้ผลบวก เมื่อทดสอบด้วยตัวติดตามยีน *tdh* และ *trh* ตามลำดับ และเมื่อนำมาตรวจยืนยันโดยวิธี Southern blot hybridization ปรากฏว่าไม่พบยีนทั้งสองชนิด

2. การตรวจหายีนสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* โดยวิธี PCR และวิธี Southern blot hybridization จากผู้ป่วย 6 ไอโซเลต และจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรค 6 ไอโซเลต ไม่พบเชื้อที่มียีน *tdh* และ *trh*

3. ผลการบ่งชี้ *V. alginolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคโดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *tox*R, collagenase และ *omp*K เป็นยีนเป้าหมาย ผู้ป่วยทุกไอโซเลต ยกเว้นไอโซเลต PSU 3978 มียีน collagenase และยีน *tox*R และ/หรือ *omp*K พบได้ในบางไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วยแตกต่างกัน ส่วน *V. alginolyticus* ที่แยกจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรคไม่พบยีนทั้งสามชนิด ดังนั้น เชื้อที่แยกจากผู้ป่วย PSU 3978 และเชื้อที่แยกจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรคอาจไม่ใช่เชื้อ *V. alginolyticus*

4. จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. alginolyticus* จากผู้ป่วยจำนวน 6 ไอโซเลต และจากสัตว์ทะเลที่เป็นโรคจำนวน 6 ไอโซเลต โดยเทคนิค AP-PCR พบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยและสัตว์ทะเลที่เป็นโรคมีความแตกต่างกัน บ่งชี้ว่าเชื้อก่อโรคดังกล่าวเป็นคนละสายพันธุ์ และมาจาก original clone ที่ต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

พงษ์ศักดิ์ เสือมาก และคณะ. 2551. รายงานสรุปการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีสุราษฎร์ธานี ม.2 ต. มะขามเตี้ย อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 14-16 สิงหาคม 2550. ใน รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ. กรมควบคุมโรค. กรุงเทพฯ.

สมพร ศรีเฟื่องฟุ้ง. 2547. ความชุกของเชื้อ *Vibrio* species ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศิริราชตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537-2544. ในจดหมายข่าว กันยายน ถึง ธันวาคม 2547. สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. หน้า 2.

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2536. พันธุศาสตร์เบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

ศรีวรรณา หัทยานานนท์ และคณะ. 2549. มหันตภัยจากเชื้อ *Vibrio vulnificus*. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2549. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 38: 797-800.

Alsina, M. and Blanch, A.R. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appl. Microbiol. 76: 79-85.

Arnheim, N. and Erlich, H. 1992. Polymerase Chain Reaction strategy. Annu. Rev. Biochem. 61: 131-156.

Austin, B. and Austin, D.A. 1999. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. 3rd ed. Springer-Praxis: Godalming.

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.

Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano. L. and Donelli, G. 2003. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. Int. J. Food microbiol. 89: 31-39.

Barker, J.W.H. and Gangarosa, E.J. 1974. Food poisoning due to *V. parahaemolyticus*. Annu. Rev. Med. 25: 75-81.

Baumann, P. and Schubert, R.H.W. 1984. Facultatively anaerobic Gram negative rods. Family II in *Vibrionaceae*. In: Bergey' s manual of systemic bacteriology. Holt, S.G. and Krieg, N.R. Baltimore: Williams & Wilkins.

Caccamese, S.M. and Rastegar, D.A. 1999. Chronic diarrhea associated with *Vibrio alginolyticus* in an immunocompromised patient. Clin. Infect. Dis. 29: 946-947.

Cai, S.H., Lu, Y.S., Wu, Z.H., Jian, J.C. and Huang, Y.C. 2009. A novel multiplex PCR method for detecting virulent strains of *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture Reseach. 41: 27-34.

Claudia, C.R. and Agraharkar, M. 2003. Unusual marine pathogens causing cellulitis and bacteremia in hemodialysis patients. Hemodial. Int. 7: 356-359.

Collier, D.N. 2002. Cutaneous infections from coastal and marine bacteria. Dermatol. Ther. 15: 1-9.

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.

Dalsgaard, A. 1998. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aguaculture. Int. J. Food Science and Technology. 33: 127-138.

Daniels, N.A. 2000. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. J. Infect. Med. 17: 665-685.

Di Pinto, A., Ciccarese, G., Tantillo, G., Catalano, D. and Forte, V.T. 2005. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. J. Food Prot. 68: 150-153.

Di Pinto, A., Ciccarese, G., Fontanarosa, M., Terio, V. and Tantillo, G. 2006. Detection of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase-targeted multiplex-PCR, J. Food Safety. 26: 150-159.

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.

Echeverria, P., Pitarangsi, C., Eampokalap, B., Vibulbandhitkit, S., Boonthai, P. and Rowe, B. 1983. A longitudinal study of the prevalence of bacterial enteric pathogens among adults with diarrhea in Bangkok, Thailand. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1: 193-204.

Eckert, K.A. and Kunkel, K.A. 1990. High fidelity DNA synthesis by the thermus aquaticus DNA polymerase. Nucleic Acid Res. 18: 3739-3744.

Escalona, N.G., Blackstone, G.M. and DePaola, A. 2006. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus.* Appl. Environ. Microbiol. 72: 7925-7929.

Food and Drug Administration (FDA). 2004. Bacteriological Analytical Manual online Chapter 9 *Vibrio*. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm (accessed 06/12/10)

Fouz, B., Conchas, R.F., Bolinches, J., Romalde, J.L. and Toranzo, A. 1990. Relationship among pathogenic *V. anguillarum* and *V. tubiashii* with environmental vibrio. 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 *tox*R gene in *V. harveyi*. J. Gen. Appl. Microbiol. 52: 281-287.

French, G.L. 1990. Antibiotics for marine vibrios. The Lancet. 336: 568-569.

Gorbach, S.L., Banwell, J.G., Jacobs, B., Chatterjee, B.D., Mitra, R. Brigham, K.L. and Neogy, K.N. 1970. Intestinal microflora in asiatic cholera. I. "rice-water" stool. J. Infect. Dis. 121: 32-37.

Granstiens, M. and Wallis, J. 1979. Colony hybridization. Method Enzymol. 68: 379-389.

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.

Heelan, J.S. 2001. A fatal case of *Vibrio vulnificus* infection in an alcoholic male. Clin. Microbiol. Newsl. 23: 144-145.

Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M. and Pommepuy, M. 2002. Occurrence of pathogenic *vibrios* in coastal area of France. J. Appl. Microbiol. 92: 1123-1135.

Hlady, W.G. and Klontz, K.C. 1996. The epidemiology of *vibrio* infections in Florida, 1981-1993. J. Infect. Dis. 173: 1176-1183.

Hörmansdorfer, S., Wentges, H., Büchler, K.N. and Bauer, J. 2000. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. Int. J. Hyg. Environ. Health. 203: 169-175.

James, D. 2005. The viable but non culturable state in bacteria. J. Microbiol. 43: 93-100.

Janda, J.M., Powers, C., Bryant, R.G. and Abbott, S.L. 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. Clin. Microbiol. Rev. 1: 245-267.

Johnson, D.E., Weinberg, L., Ciarkowski, J., West, P. and Colwell, R.R. 1984. Wound infection caused by kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. J. Clin. Microbiol. 20: 811-812.

Juan, M., Fajardo, R., Jose, F.P. and Cesar, A.A. 2003. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent. J. Clin. Microbiol. 41: 3427-3429.

Kahla-Nakbi, A.B., Besbes, A., Chaieb, K., Rouabhia, M. and Bakhrouf, A. 2007. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. Marine. Environ. Res. 64: 469-478.

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 *tox*R 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.

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.

Lee, K.K., Yu, S.R. and Liu, P.C. 1997. Alkaline Serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicas*. Curr. Microbiol. 34: 110-117.

Lee, D.Y., Moon, S.Y., Lee, S.O., Yang, H.Y., Lee, H.J. and Lee, M.S. 2008. Septic shock due to *Vibrio alginolyticus* in a cirrhotic patient: the first case in Korea. Yonsei Med. J. 49: 329-332.

Levine, W.C. and Griffin, P.M. 1993. *Vibrio* infections on the gulf coast: results of first year of regional surveillance. J. Infect. Dis. 167:469-483.

Lesmana, M., Subekti, D.S., Tjaniadi, P., Simanjuntak, C.H., Punjabi, N.H., Campbell, J.R. and Oyofo, B.A. 2002. Spectrum of *vibrio* species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 43: 91-97.

Lessner, A.M., Webb, R.M. and Rabin, B. 1985. *Vibrio alginolyticus* conjunctivitis first reported case. Arch. Ophthalmol. 103: 229-230.

Lin, Z., Kumagai,K., Baba, K., Mekalanos, J.J. and Nishibuchi, M. 1993. *V. parahaemolyticus* has a homolog of the *V. cholerae tox*RS operon that mediates environment induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. J. Bacteriol. 175: 3844-3855.

Marshall, K.C., Stout, R. and. Mitchell, R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. J. Gen. Microbiol. 68:337–348.

Maugeri, T.L., Caccamo, D. and Gugliandolo, C. 2000. Potentially pathogenic Vibrio in brackish waters and mussels. J. Appl. Microbiol. 89: 261-266.

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 *tox*R. J. bacteriol. 170: 2575-2583.

Molitoris, E., Joseph, S.W., krichevsky, M.I., Sindhuhardja, W. and Colwell, R.R. 1985. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1388-1394.

Montieri, S., Suffredini, E., Cicozzi, M. and Croci, L. 2010. Phylogenetic and evolutionary analysis of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolates based on *tox*R gene sequence. New Microbiologica. 33: 359-372.

Myatt, D.C. and Davis, G.H. 1989. Isolation of medically significant Vibrio species from riverine sources in south east Queensland. Microbiol. 60: 111-123.

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. and Kaper, J.B. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infect. Immun. 63: 2093-2099.

Olive, D.M. and Bean, P. 1999. Principle and application of methods for DNA-based typing of microbial organism. J. Clin. Microbiol. 37: 1661-1669.

Oliver, J.D. and Kaper, J.B. 1997. *Vibrio* species. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J (eds.) Food Microbiology Fundamentals-Frontiers. ASM Press. Washington D.C. pp 228-264.

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.

Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S.L., Janda, J.M. and Nishibuchi, M. 1997. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the tdh-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *V. parahemolyticus* 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., Grag, S., Bhattacharya, S.K., Nair G.B. and Nishibushi, M. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *V. parahaemolyticus* in Calcatta, India, and isolation of strains from the same clonal group from south east Asian travelers arriving in Japan. J. Clin. Microbiol. 35: 3150-3155.

Osario, 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.

Pan, T.M., Wang, T.K., Lee, C.L., Chien, S.W. and Horng, C.B. 1997. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. J. Clin. Microbiol. 35: 1260-1262.

Caccamese, S.M. and Rastegar, D.A. 1999. Chronic diarrhea associated with *Vibrio alginolyticus* in an immunocompromised patient. Clin. Infect. Dis. 29: 946-947.

Poda, G. 1997. Vibrio 99-117. In Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentary. Dossier del Centro di cocumentazione per la salute della Regione Emilia-Romagna.

Qian, R.H., Xiao, Z.H., Zhang, C.W., Chu, W.Y., Wang, L.S., Zhou, H.H., Wei, Y.W. and Yu, L. 2008. A conserved outer membrane protein as an effective vaccine candidate from *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture. 278: 5-9.

Qian, R.H., Xiao, Z.H., Zhang, C.W., Chu, W.Y., Mao, Z.J. and Yu, L. 2008. Expression and purification of two major outer membrane proteins from *Vibrio alginolyticus.* J. Microbiol. Biotechnol. 24: 245-251.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. 1977. Labelling deoxynucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. Molec. Biol. 113: 237-251.

Rubin, S.J. and Tilton, R.C. 1975. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from wound infections. J. Clin. Microbiol. 2: 556-558.

Sayler, G.S., Shields, M.S., Tedford, E.T., Breen, A., Hooper, S.W., Sirotkin, K.M. and Davis, J.W. 1985. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1295-1303.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning laboratory manual. 3nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Schmidt, U., Chmel, H. and Cobbs, C. 1979. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. J. Clin. Microbiol. 10: 666-668.

Selvin, J. and Lipton, A.P. 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 57: 147-150.

Shinoda, S. 1999. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. J. Nat. Toxins. 8: 259-269.

Strom, M.S. and Paranjpye, R.N. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Microbes Infect. 2:177-188.

Tacket, C.O., Brenner, F. and Blake, P.A. 1984. Clinical features and epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. J. Infect. Dis. 149: 558-561.

Tada, J., Ohashi, T., Nishimaru, 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 hemolysiin-related hemolysin gene (*trh*) of *V. parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 6: 477-487.

Takeuchi,H., Shibano, Y., Morihara, K., Fukushima, J., Inami, S., Keil, B., Gilles, A.M., Kawamoto, S. and Okuda, K. 1992. Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. Biochem. J. 281: 703-708.

Taylor, R., McDonald, M., Russ, G., Carson, M. and Lukaczynski, E. 1981. *Vibrio alginolyticus* peritonitis associated with ambulatory peritoneal dialysis. British Med. J. 280: 275-276.

Terai, A., Shirai, H., Yoshida, O., Takeda, Y. and Nishibuchi, M. 1990. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh* gene) of *Vibrio mimicus* and its evolutionary relationship with the *tdh* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 71: 319–324.

Thompson, C.C., Thomson, F.L., Vandemaulebroecke, K., Hoste, B., Dawyndt, P. and Swings, J. 2004. Use of *rec*A as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 919-924.

Uh, Y., Park, J.S., Hwang, G.Y., Jang, I.H., Yoon, K.J., Park, H.C. and Hwang, S.O. 2001. *Vibrio alginolyticus* acute gastroenteritis: report of two cases. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 7: 103-106.

Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprertthisan, V. Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., matsumoto, C. and Nishibuchi, M. 2000. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* strain from environment and clinical sources in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2685-2689.

Vuddhakul, V. 2008. *V. parahaemolyticus*: an important seafood-borne pathogen. iQue media: Songkhla.

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.

Wong, H.C., Chen, M.C., Liu, S.H. and Liu, D.P. 1999. Incidence of highly genetically diverdified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. Int. J. Food Microbiol. 52: 181-188.

Xie, Z.Y, Hu, C.Q., Chen, C., Zhang, L.P. and Ren, C.H. 2005. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. Appli. Microbiol. 41: 202-207.

Xu, C., Ren. H., Wang, S. and Peng, X. 2004. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. Res. Microbiol. 155: 835-842.

Yan, Q., Chen, Q., Ma, S., Zhuang, Z. and Wang, X. 2007. Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to the intestinal mucus of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Aquaculture. 269: 21-30.

Yoji, H.Z., Le Clair, R.A., Ohta, K. and Montague, T.S. 1973. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* cultures isolated in the United States with those isolated in Japan. J. Infect. Dis. 127: 237-241.

http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=17 (accessed 18/03/11)

http://www2.le.ac.uk/departments/emfpu/genetics/explained/pcr (accessed 26/03/11)

http://oregonstate.edu/instruction/bb331/lecture04/FigF9.html (accessed 28/03/11)

www.rmuti.ac.th/user/thanyaphak/contacts/Heredity/chapter7.1.pdf (accessed 29/03/11)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani (LB) agar

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง LB agar 35 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* spp.

2. Luria Bertani (LB) broth

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง LB broth 20 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* spp.

3. Nutrient agar (NA)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง NA 23 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* spp.

4. Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

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
Bacto agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง TCBS 89 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

5. Tryptic soy agar (TSA)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Pancreatic digest of casein	15	g
Papaic digest of soybean	5	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง TSA 40 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

6. Tryptic soy broth (TSB)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Pancreatic digest of casein	15	g
Papaic digest of soybean	5	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง TSB 30 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

7. CHROMagar vibrio (CV)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Peptone & yeast extract	8	g
Chromogenic mix	0.3	g
Sodium chloride	51.4	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง CV 74.7 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ (ทุกขั้นตอนการเตรียมต้องไม่ให้โดนแสง)

8. Urea agar base

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Pancreatic digest of gelatin	1	g
Yeast extract	3	g
Dextose	1	g
Sodium chloride	5	g
Urea	20	g
Potassium phosphate	2	g
Phenol red	0.012	g

ชั่ง urea agar base 29 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการกรอง จากนั้นละลาย agar 15 g ในน้ำ 900 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิ agar ลดลงเหลือ 45-55°C จึงเติม 100 ml ของ urea agar base แล้วนำไปเทใส่หลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 3 ml

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* spp.

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

1.1 Loadind 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 bromind (10 mg/ml)

ชั่ง Ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนโดยใช้แท่งแม่เหล็กจนกว่าจะละลาย (ใช้เวลาหลายชั่วโมง) เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (ต้องสวมถุงมือทุกครั้งที่เตรียมและระวังอย่าหายใจเอาผง Ethidium bromide เข้าไประหว่างการชั่ง)

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform

2.1 Phosphate buffer solution (PBS) pH 8.0

Na_2HPO_4	1.44	g
KH_2PO_4	0.2	g
KCl	0.2	g
Sodium chloride	8	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 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 µl และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 60 µl จะได้ PBS-EDTA ปริมาตร 300 µl

2.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่น 90 ml อุ่นเล็กน้อยเพื่อให้ละลายดีขึ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

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

ผสม Chloroform และ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ให้เข้ากัน จากนั้นเติม 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 3M 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)

ชั่งเอนไซม์ RNase 100 mg ละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 15 mM Sodium chloride ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 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 Colony hybridization and Southern blot hybridization

3.1 0.5 M NaOH

ชั่ง NaOH 20 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.2 1 M Tris-HCl pH 7.0

ชั่ง Tris base 121.1 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.3 1 M Tris-HCl pH 7.0 + 1.5 M NaCl

Tris base	121.1	g
NaCl	87.68	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.4 Denaturation solution

1.5 M NaCl	87.68	g
0.5 M NaOH	20.0	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งสารแล้วละลายในน้ำกลั่น 800 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.5 Neutralization solution

1.5 M NaCl	87.68	g
0.5 M Tris	60.57	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งสารแล้วละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วยกรด HCl เข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.6 10x Standard saline citrate (SSC)

NaCl	87.68	g
Sodium citrate dehydrate	44.12	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งสารแล้วละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.7 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 โดยเติมน้ำก่อนครึ่งหนึ่ง ใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) คนให้ละลาย 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเริ่มละลายดีให้เติมน้ำส่วนที่เหลือ

3.8 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 ปราศจากเชื้อปริมาตร 64 ml โดยเติมน้ำก่อนครึ่งหนึ่ง ใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) คนให้ละลาย 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อละลายดีให้เติมน้ำส่วนที่เหลือ แล้วดูดสารละลายที่ละลายดีแล้วผสมกับดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย DIG (DIG-labeled DNA probe) ตามความเข้มข้นที่กำหนด ก่อนใช้ดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย DIG ให้นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันทีอีก 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตรวจจับแยกเป็นสายเดี่ยว

3.9 Washing buffer

Maleic acid	11.6	g
NaCl	8.76	g
Tween 20	3	ml
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งสารแล้วละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย NaOH ชนิดเกล็ด แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม Tween 20

3.10 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

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

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

3.12 Detection buffer

NaCl	5.8	g
Tris base	12.1	ml
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งสารแล้วละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 9.5 ด้วยกรด HCl เข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

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

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

3.14 Maleic acid buffer

Maleic acid	5.8	g
NaCl	4.38	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งสารแล้วละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วยกรด NaOH เข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวปานสุรีย์ จริยวิจิตร

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110220044

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน (Teacher Assistant)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ปานสุรีย์ จริยวิจิตร และ วราภรณ์ วุฑฒะกุล. 2554. ลักษณะของ *Vibrio alginolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม. ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 9. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, 30 มิถุนายน- 1 กรกฎาคม 2554.