



ลักษณะของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และปลาติดเชื้อ  
และการแยกแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus*  
Characterization of *Vibrio vulnificus* Isolates from Human, Environments,  
and Diseased Fish and Its Specific Bacteriophages

อัมพาพันธ์ นกแก่น

Ampapan Naknaen

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

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ลักษณะของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย ลิงแวดล้อม และปลาติดเชื้อ  
และการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus*  
Characterization of *Vibrio vulnificus* Isolates from Human, Environments,  
and Diseased Fish and Its Specific Bacteriophages

อัมพาพันธ์ นักแน่น

Ampapan Naknaen

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

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	ลักษณะของเชื้อ <i>Vibrio vulnificus</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และปลา ติดเชื้อ และการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>Vibrio vulnificus</i>
ผู้เขียน	นางสาวอัมพาพันธ์ หนักแน่น
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
.....	.....ประธานกรรมการ
(ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)	(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)
	.....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)
.....	.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)	(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ัย สุขุมังกูร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

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

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นางสาวอัมพาพันธ์ หนักแน่น)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวอัมพาพันธ์ หนักแน่น)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ลักษณะของเชื้อ <i>Vibrio vulnificus</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และปลาติดเชื้อ และการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>Vibrio vulnificus</i>
ผู้เขียน	นางสาวอัมพาพันธ์ หนักแน่น
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559

### บทคัดย่อ

*V. vulnificus* จัดเป็นเชื้อที่มีความสำคัญเนื่องจากก่อโรคในคนโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำจะมีอัตราการตายสูง และก่อโรควิบริโอซิสในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทำให้เกิดการสูญเสียเงินในระบบเศรษฐกิจ การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์ ฟิโนไทป์ ร่วมกับรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ความสามารถในการก่อโรคโดยใช้หนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*) เป็นแบบจำลอง และการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *V. vulnificus* ในเชื้อทั้งหมด 62 สายพันธุ์ แบ่งเป็น เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมร้อยละ 66 ผู้ป่วยร้อยละ 16 และเชื้อก่อโรคในปลาร้อยละ 16 ผลการตรวจสอบ *vcg*-type, ยีน *manIIA*, ยีน *nanA*, ยีน *nab*, PRXII, การสลายเม็ดเลือดแดง, ความทนต่อเซรุ่ม และการใช้น้ำตาลแมนนิทอล แสดงให้เห็นว่า ยีน *nanA* และ PRXII อาจใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อบอกความรุนแรงของเชื้อได้ดีกว่าการทดสอบอย่างอื่น การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี ERIC-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 4 กลุ่ม คือ A, B, C, และ D โดยกลุ่ม C และ D สมาชิกส่วนใหญ่ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม และเชื้อในแต่ละกลุ่มมีการแสดงออกทาง จีโนมไทป์ และฟิโนไทป์ ที่หลากหลาย ความหลากหลายของเชื้อที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจาก *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์มีการแทรกตัวของโปรเฟจ ผลของการใช้หนอนผีเสื้อเป็นแบบจำลองในการศึกษาความรุนแรงของ *V. vulnificus* แสดงให้เห็นว่าการตายและพยาธิสภาพของหนอนผีเสื้อขึ้นอยู่กับปริมาณและสายพันธุ์ของ *V. vulnificus* ที่ได้รับ การศึกษาครั้งนี้ทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจ จำนวน 333 ไอโซเลท โดยใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 และ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ แบคทีเรียโอเฟจส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย, *V. vulnificus* ไบโอบี 2, *V. cholera* สายพันธุ์ PSU 966 O1, *V. alginolyticus* สายพันธุ์ PSU 6, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ ATCC 17808 และ *V. vulnificus* ก่อโรคในปลา ตามลำดับ คัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจได้จำนวน 5 ไอโซเลทโดยอาศัยความสามารถในการฆ่า *Vibrio* spp. ปริมาณแบคทีเรียโอเฟจภายหลังการเพิ่มจำนวน และขนาดของพลาซมิด เพื่อศึกษาความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะต่าง ๆ พบว่าสามารถอยู่รอดในช่วงอุณหภูมิ 20°C-40°C, pH 5-11 และความเค็มที่ 0-3 % NaCl แบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ มีขนาดมากกว่า 23 kb และผลการทดลองโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะยืนยันว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลทไม่ใช่ชนิดเดียวกัน จากการคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจจำนวน 2 ไอโซเลท (MC20915 และ

BD41025) มาศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ ประกอบด้วยส่วนหัวหกเหลี่ยม ขนาดประมาณ 60 และ 63 nm และไม่มีหาง การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อใช้ระบุความรุนแรงของเชื้อ เพื่อใช้ในการเฝ้าระวัง และป้องกันการติดเชื้อ รวมถึงการป้องกันและกำจัดเชื้อโดยใช้แบคทีเรียโอเฟจ

<b>Thesis Title</b>	Characterization of <i>Vibrio vulnificus</i> isolates from human, environments, and diseased fish and its specific bacteriophages
<b>Author</b>	Miss Ampapan Naknaen
<b>Major</b>	Microbiology
<b>Academic Year</b>	2016

### Abstract

*Vibrio vulnificus* is an important pathogen which can cause serious infections with high mortality rate in humans with underlying diseases and vibriosis in marine animals, resulting in economic loss. Our study is aimed to genotypically and phenotypically characterize, to investigate DNA fingerprints of *V. vulnificus*, to preliminary evaluate possibility of *Galleria mellonella* as animal model for *V. vulnificus* infection, and to isolate bacteriophage specific to *V. vulnificus*. Sixty two *V. vulnificus* strains were used including environmental isolates (66%), clinical isolates (17%), and fish pathogens (17%). The analysis of genotypic and phenotypic characteristics including the presence of *vcg*-type, *manIIA* gene, *nanA* gene, *nab* gene and PRXII, hemolytic activity, serum resistance, and mannitol fermentation, revealed that mannitol fermentation by *nanA* and PRXII were better biomarker candidates to assess virulence strains than the other characteristics. Analysis of DNA fingerprints by ERIC-PCR led to the separation of *V. vulnificus* into 4 groups including A, B, C, and D. Group C and D are composed of most environmental isolates. The genotypic and phenotypic characteristics among groups were insignificantly different. Our study suggested that the high diversity of *V. vulnificus* may be due to the prophage insertion in its genome. The ability to use *Galleria mellonella* larvae as an animal model of virulence *V. vulnificus* strains was explored in this study. The result showed that fatality and pathogenesis of the larvae depended on dose and strain of *V. vulnificus*. Three hundred and thirty-three bacteriophages specific to *V. vulnificus* VVA6 and ATCC 27562 were isolated. Host range analysis showed that most *V. vulnificus* caused lysis in clinical isolates and *V. vulnificus* biotype 2, *V. cholerae* PSU 966 O1, *V. alginolyticus* PSU 6, *V. parahaemolyticus* ATCC 17808, and *V. vulnificus* isolated from diseased fish. To investigate survival ability of bacteriophages in different environmental stresses, 5



bacteriophages were selected based on host range, concentration of bacteriophages after amplification, and plaque size. These bacteriophages survived during 20°C-40°C, pH 5-11 and 0-5% salinity. Their genomes were double-stranded DNA with the size of more than 23 kb and showed different DNA fingerprint patterns after restriction enzyme digestion. Two bacteriophages, MC20915 and BD41025, were chosen to be observed under a transmission electron microscope. The result displayed that both were icosahedrons. Our study demonstrates the possibility of biomarker candidates to indicate virulent *V. vulnificus* strains for disease surveillance and prevention. In addition, this research provides further alternative ways as biological agents to inhibit and control *V. vulnificus* in the aquaculture industry.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือให้คำปรึกษาทั้งในด้านการค้นคว้าข้อมูลในการทำวิจัยรวมถึงชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา อีกทั้งยังกรุณาตรวจสอบแก้ไขงานวิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำปรึกษาและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริงสุลกะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ัย สุขุมังกูร ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังกรุณาตรวจสอบแก้ไขงานวิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิหยวงศ์ อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และคุณจำเริญศรี ถาวรสุวรรณ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง ที่อนุเคราะห์เชื้อเพื่อใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่านที่แนะนำและให้ความรู้ตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษา

ขอขอบคุณ ดร.กมนนันท์ คิงฆมานันท์ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์และแนะนำวิธีการใช้โปรแกรม bionumerics เวอร์ชัน 7 สำหรับวิเคราะห์ ERIC-PCR ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เขมิกา อูระวงค์ และดร.กรกช วิจิตรสงวน ภาควิชาคณิตศาสตร์และสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำการเลือกใช้สถิติเพื่อวิเคราะห์ผลการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.สากล สุวลักษณ์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา และถ่ายภาพแบคทีเรียโอเฟจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ ครอบครัวที่รัก ดร.พงษ์โสภี อดิศาสตร์ สมาชิกห้อง PR516 และวท. 510 เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ เป็นแรงบันดาลใจ และให้ความช่วยเหลือเสมอมา

อัมพาพันธ์ หนักแน่น

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	27
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	28
วิธีดำเนินงาน	33
3. ผลการทดลอง	47
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	67
5. สรุปผลการทดลอง	72
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก ก	98
ภาคผนวก ข	105
ภาคผนวก ค	108
ประวัติผู้เขียน	130

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดแยก <i>V. vulnificus</i>	7
2. แสดง DNA probes และ PCR primer เพื่อยืนยัน <i>V. vulnificus</i>	8
3. การจัดกลุ่มแบคทีเรียโอเฟจตามวิธีของ Bradley	19
4. การจัดจำแนก Family ของแบคทีเรียโอเฟจ ตามวิธีของคณะกรรมการสภาว่าด้วยการจัด อนุกรมวิธานของไวรัส	20
5. แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ โดยวิธี PCR	34
6. แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ของ ยีน <i>manIIA</i> , ยีน <i>nanA</i> , ยีน <i>nab</i> , <i>vcg</i> type และ PRXII	35
7. แสดงการจัดโปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในแต่ละขั้นตอนของ ยีน <i>manIIA</i> , ยีน <i>nanA</i> , ยีน <i>nab</i> , <i>vcg</i> type และ PRXII ภายในเครื่อง Thermal cycle	35
8. แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยาของ ERIC-PCR	36
9. แสดงการจัดโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนของ ERIC-PCR	36
10. แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยาสำหรับการใช้ <i>Not I</i> FastDigest	38
11. ลักษณะการแสดงออกทางจีโนมไทป์และพีโนมไทป์ของ <i>V. vulnificus</i> ที่แยกได้จาก สิ่งแวดล้อม สิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และก่อโรคในปลา	50
12. แสดงการจัดกลุ่มด้วยวิธี ERIC-PCR ลักษณะทางจีโนมไทป์ และพีโนมไทป์	54
13. ผลการทดสอบความรุนแรงของ <i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA1 และสายพันธุ์ VVA6 เบื้องต้นในหนอนผีเสื้อ	56
14. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	105
15. ลักษณะการแสดงออกทางจีโนมไทป์และพีโนมไทป์ของ <i>V. vulnificus</i>	108
16. ผลการทดสอบความรุนแรงของ <i>V. vulnificus</i> จำนวน 10 สายพันธุ์ ในหนอนผีเสื้อ	113
17. ความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อ <i>Vibrio</i> spp. โดยใช้ <i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์	114
18. ความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อ <i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้ <i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA6 เป็นโฮสต์	129

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. ตัวอย่างกลุ่มยีนของ <i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ CMCP6	10
2. การสลาย sialic acid และ transport operons	12
3. NAB pathways เพื่อสังเคราะห์ NuOs (Neu, Kdn, Leg และ Pse acid)	14
4. แสดง ORF (VVA1613 ถึง VVA1636) ของ PRXII	15
5. การศึกษา one step growth	17
6. วงจรชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจ	18
7. กลยุทธ์สำหรับการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจ	22
8. กลไกที่แบคทีเรียใช้สำหรับการป้องกันการเกาะติดของแบคทีเรียโอเฟจ	24
9. การป้องกันการนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจเข้าสู่เซลล์	25
10. การทำงานของระบบ Rex	26
11. แผนผังแสดงการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคเบื้องต้นของ <i>V. vulnificus</i> ในหนอนผีเสื้อ ( <i>Galleria mellonella</i> )	41
12. ลักษณะทางจีโนมและฟีโนไทป์ของ <i>V. vulnificus</i> แต่ละกลุ่ม	51
13. รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเดนโดรแกรมของ <i>V. vulnificus</i> ทั้งหมด 62 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค ERIC-PCR (A, B, C, และ D แสดงกลุ่มที่จัดได้)	53
14. Kaplan-Meier กราฟ แสดงการรอดชีวิตใน 120 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ <i>V. vulnificus</i> จำแนกตามชนิดของเชื้อ	57
15. รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเดนโดรแกรมของ <i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA6, VVA7 และ VVA8 ด้วยเทคนิค PFGE	59
16. การตรวจสอบโปรเฟจใน <i>V. vulnificus</i> โดยใช้ mitomycin C (1 µg/ml)	59
17. แสดงจำนวนแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ <i>Vibrio</i> spp.	60
18. แสดงความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจในอุณหภูมิต่างๆ	61
19. ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจใน pH ต่างๆ	62
20. ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจในความเข้มข้น NaCl ต่างๆ	62
21. การทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ ด้วยวิธี CsCl gradient ultracentrifugation	63
22. รูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	64
23. แสดงขนาดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส	65
24. แสดงชนิดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจ ด้วย <i>DNaseI</i> และ <i>RNaseA</i> โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส	65
25. รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเดนโดรแกรมของแบคทีเรียโอเฟจ 5 ไอโซเลท ภายจากหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	66

**สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ**

ml	=	Milliliter
μl	=	Microliter
°C	=	Degree Celsius
%	=	Percentage
mM	=	Millimolar
M	=	Molar
dNTP	=	Deoxynucleoside triphosphates
kb	=	Kilobase
bp	=	Base pair
ERIC-PCR	=	Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR
PFGE	=	Pulsed field gel electrophoresis
rpm	=	Revolutions per minute
nm	=	Nanometer
CFU	=	Colony forming unit
PFU	=	Plaque forming unit
v/v	=	Volume/Volume
w/v	=	Weight/Volume
g/cm <sup>2</sup>	=	Gram per square centimeter
mg	=	Milligram
mm	=	Millimeter

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

*Vibrio vulnificus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งโค้ง สามารถพบได้ในน้ำทะเล ปากแม่น้ำ หรือสัตว์น้ำทางทะเล โดยเฉพาะหอย คนจะได้รับเชื้อผ่านการรับประทานอาหารทะเลที่ไม่ผ่านความร้อนและมีเชื้อปนเปื้อน โดยเฉพาะหอยนางรมดิบ (Lowry *et al.*, 1989) อาจทำให้เกิดกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ หรืออาจได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผลโดยตรงจากสัมผัสเชื้อที่อยู่ในน้ำทะเล ทำให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผล ก่อให้เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) (Jones and Oliver, 2009) นอกจากนี้ *V. vulnificus* ยังจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรือเป็นโรคตับอักเสบ หลังจากเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดภาวะโลหิตเป็นพิษอย่างรุนแรง ซึ่งมีอัตราการตายอาจสูงถึง 67-80% (Jung *et al.*, 2005) แม้ว่ารายงานการตรวจพบการติดเชื้อ *V. vulnificus* จะมีไม่มากนักทั้งในประเทศและต่างประเทศ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อจะมีอัตราการเสียชีวิตสูง (Mead *et al.*, 1999, Jones and Oliver, 2009, Kiratisin, 2012) และการระบาดของเชื้อมักพบบ่อยในช่วงหน้าร้อน (Blake *et al.*, 1979) ปัจจุบันมีการจำแนก *V. vulnificus* โดยอาศัยการทดสอบทางชีวเคมีและลำดับเบส รวมถึงความสามารถในการก่อโรค สามารถแบ่งออกเป็น 3 ไบโอไทป์ ได้แก่ ไบโอไทป์ 1 มักก่อโรคในคน ไบโอไทป์ 2 ส่วนใหญ่สามารถก่อโรคในสัตว์น้ำแต่มีรายงานว่าสามารถก่อโรคในคนได้ และไบโอไทป์ 3 ก่อโรคในสัตว์น้ำและคน สายพันธุ์นี้พบเฉพาะในประเทศอิสราเอล โดยไบโอไทป์ 3 ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีและลำดับเบสเป็นลูกผสมระหว่างไบโอไทป์ 1 และ 2 (Radu *et al.*, 1998, Strom and Paranjpye, 2000, Oliver, 2005, Jones and Oliver, 2009) การจัดกลุ่มโดยอาศัยไบโอไทป์เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอสำหรับการระบุความรุนแรงของเชื้อในคนหรือสัตว์น้ำได้

ในอดีตการจำแนก *V. vulnificus* โดยใช้ *vcg*-type เพื่อบ่งบอกความสามารถของเชื้อในการก่อโรคและแหล่งที่มา เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและน่าจะมีความรุนแรงจัดเป็น *vcg*-C type ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและไม่น่าจะมีความสามารถในการก่อโรคจัดเป็น *vcg*-E type (Nilsson *et al.*, 2003, Rosche *et al.*, 2005, Vickery *et al.*, 2007) ต่อมา มีรายงานพบ *V. vulnificus* ที่เป็น *vcg*-C type ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม (Guerrero *et al.*, 2015, Kim and Cho, 2015, Cruz *et al.*, 2016) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไม่สามารถใช้ *vcg*-type เพื่อบ่งบอกความสามารถของเชื้อในการก่อโรคได้อย่างแม่นยำ ดังนั้นต่อมาจึงมีการศึกษายีนอื่น ๆ ที่

เกี่ยวข้องกับการก่อโรคหรือเพิ่มความรุนแรงของเชื้อเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัด *V. vulnificus* ที่มีความรุนแรงและก่อโรค เช่นความสามารถของเชื้อในใช้น้ำตาลแมนนิทอล (Drake *et al.*, 2010) การแสดงออกของ pathogenicity region XII (PRXII) (Cohen *et al.*, 2007) และยีน *nanA* ที่ควบคุมการสลาย sialic acid (Jeong *et al.*, 2009, Lubin *et al.*, 2012) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาชิ้นเหล่านี้ใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และปลาที่เป็นโรค จากภาคใต้ของประเทศไทย ร่วมกับการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี ERIC-PCR เพื่อดูความสัมพันธ์ของเชื้อแต่ละกลุ่ม ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการจัดจำแนก *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคและสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคได้

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักประสบปัญหาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น vibriosis, photobacteriosis, furunculosis, streptococcosis และ lactococcosis เป็นต้น vibriosis นับเป็นโรคที่ทำให้ฟาร์มเพาะเลี้ยงสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก (Thompson *et al.*, 2004) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. salmonicida* (Toranzo *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2014) ซึ่งนับเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจของชาติ เนื่องจากประเทศไทยจัดเป็นผู้ผลิตสัตว์น้ำส่งออกลำดับที่ 7 ของโลก (FAO, 2012) เกษตรกรนิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมการระบาดของโรคทั้งแบบใช้ชนิดเดียวและแบบผสม เพื่อเสริมฤทธิ์ของยา ส่งผลให้เชื้อมีอัตราการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นพบว่าแบคทีเรียในทะเลประมาณ 90% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและแบคทีเรียประมาณ 20% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 5 ชนิด (Cabello, 2006, Karunasagar *et al.*, 2007, Almeida *et al.*, 2009, Pasqualina *et al.*, 2011, Cabello *et al.*, 2013) นอกจากนี้พบการดื้อยาหลายชนิดใน *Vibrio* spp. หลายสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคติดเชื้อ (Rowan, 2010, Martinez, 2013) ดังนั้นการใช้กลยุทธ์ใหม่ ๆ เพื่อควบคุมหรือรักษาการติดเชื้อจาก *Vibrios* จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ แบคทีริโอเฟจ (Bacteriophage) เป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากแบคทีริโอเฟจจัดเป็นไวรัสของแบคทีเรีย (obligate intracellular parasite) ซึ่งจำเป็นต้องใช้แบคทีเรียเป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวนและทำลายแบคทีเรียเพื่อปลดปล่อยลูกหลาน (lytic-bacteriophage) (Salmond and Fineran, 2015) โดยการบุกรุกแบคทีเรียมีความจำเพาะสูง จึงไม่ทำลายแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้แบคทีริโอเฟจจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจสำหรับควบคุมโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์ม

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และปลาที่เป็นโรค เพื่อเปรียบเทียบเชื้อจากแหล่งต่างกันมีลักษณะการแสดงออกทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์แตกต่างกันอย่างไร และมีความเกี่ยวข้องกันหรือไม่ (clonal-relation) นอกจากนั้นทำการแยกและศึกษาแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *V. vulnificus* ความรู้จากการศึกษารุ่นนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการหาลักษณะที่จำเพาะของเชื้อ *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลา และ ในคน และการควบคุมเชื้อ เพื่อที่จะเป็นแนวทางในการป้องกันและควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* spp. ในอาหารทะเล และรักษาการติดเชื้อ *V. vulnificus* ในอนาคต



## 1.2 การตรวจเอกสาร

### 1.2.1 *Vibrio* spp.

*Vibrio* spp. จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งมีมากกว่า 72 สปีชีส์ โดยสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสามารถก่อโรคในคนมี 3 สปีชีส์ ได้แก่ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

*Vibrio* มีลักษณะแท่งตรงหรือโค้งหัวท้ายมนแบบ comma-shaped มีขนาดกว้างประมาณ 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  ยาวประมาณ 1.4-2.6  $\mu\text{m}$  ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยการใช้ polar flagella สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ดำรงชีวิตแบบ chemoheterotroph สามารถสร้างเอนไซม์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (exoenzyme) ได้หลายชนิด เช่น gelatinase, amylase, chitinase และ DNase (Joseph *et al.*, 1982) ให้ผลบวกกับการทดสอบ oxidase ยกเว้น *V. metschnikovii* (Bottone and Robin, 1978) สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนให้ผลบวกกับการทดสอบ lysine decarboxylase และ ornithine decarboxylase แต่ให้ผลลบกับการทดสอบ arginine dihydrolase คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของ *Vibrio* คือจะไวต่อการทดสอบ O/129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine) (Alsina and Blanch, 1994) แต่ไม่ให้ออกแก๊ส โดยทั่วไปสามารถสร้าง indole ได้

### 1.2.2 *Vibrio vulnificus*

#### 1.2.2.1 ลักษณะทั่วไป

*V. vulnificus* สามารถพบได้ในแหล่งน้ำเค็มและบริเวณปากน้ำ (น้ำกร่อย) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในสัตว์ทะเล โดยเฉพาะหอยแครงและหอยนางรม ในประเทศแถบตะวันตกมักพบผู้ป่วยติดเชื้อในน้ำร้อน แต่ในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ สามารถพบการติดเชื้อ *V. vulnificus* ได้ตลอดทั้งปี *V. vulnificus* ถูกแยกได้ครั้งแรกโดย U.S. Centers for Disease Control (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1964 (Strom and Paranjpye, 2000) ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* แต่ในการทดสอบทางเคมี *V. vulnificus* สามารถหมักน้ำตาล lactose ได้ แต่ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ไม่สามารถหมักได้ ในปี ค.ศ.1980 *V. vulnificus* ได้ถูกแยกออกจาก *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* โดยอาศัยความแตกต่างของ 16SrRNA gene (Radu *et al.*, 1998, Harwood *et al.*, 2004)

การปนเปื้อน *V. vulnificus* ในอาหารทะเลยังคงมีรายงานอย่างต่อเนื่อง ประเทศได้พบการปนเปื้อน *V. vulnificus* ในกุ้งและปลา (Hsueh *et al.*, 2004) ประเทศสหรัฐอเมริกาตรวจพบ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยนางรมในบริเวณรัฐที่

ติดกับอ่าวเม็กซิโก (Kaysner *et al.*, 1987) นอกจากนี้มีการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อในหอย ปลา และน้ำทะเล แถบทวีปยุโรป ได้แก่ประเทศเดนมาร์ค (Hoi *et al.*, 1998) เยอร์มัน (Lhafi and Kühne, 2007) เนเธอร์แลนด์ (Veenstra *et al.*, 1994) และยังมีรายงานการพบเชื้อในบ่อเลี้ยงปลา ในประเทศอิสราเอล (Bisharat and Raz, 1996, Bisharat *et al.*, 1999, Paz *et al.*, 2007) ส่วน แถบทวีปเอเชีย พบการปนเปื้อนทั้งในน้ำทะเล ปลา และหอย ในประเทศญี่ปุ่น (Venkateswaran *et al.*, 1989, Miyasaka *et al.*, 2006, Mahmud *et al.*, 2008) ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (Yano *et al.*, 2004) และบริเวณเกาะฮ่องกง (Chan *et al.*, 1986) เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ดี ในเขตอากาศอบอุ่นถึงร้อน ดังนั้นจึงพบผู้ติดเชื้อในช่วงฤดูอบอุ่นและฤดูร้อน เช่น ช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงกันยายน ในประเทศสหรัฐอเมริกาหรือช่วงเมษายนถึงกันยายน ในประเทศญี่ปุ่น จีน และไต้หวัน

สำหรับข้อมูลในประเทศไทยจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขระหว่างปี 2544-2549 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *V. vulnificus* แบบ septicemia 56 ราย ในช่วงอายุประมาณ 46-55 ปี นอกจากนี้เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) จากการรับประทาน แต่พบอัตราการตายต่ำและสามารถหายเองได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงว่า จำนวนผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อ *V. vulnificus* มีมากกว่าที่มีการรายงาน โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีประวัติเคยดื่มสุรา ดื่มสุรา และเป็นโรคตับแข็งมาก่อน มีอัตราป่วยตายเป็นร้อยละ 83 กลุ่มคนดังกล่าวเมื่อเกิดการติดเชื้อจะทำให้เชื้อแพร่กระจายไปทำลายอวัยวะต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค (ศรีวรรณ และคณะ, 2549) จากการสำรวจ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมสด จากอ่างศิลา จ.ชลบุรี ระหว่าง เดือนกุมภาพันธ์ 2553 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2554 โดยใช้ยีนการสลายเม็ดเลือดแดง (*vvh*) ในการยืนยันว่าเป็น *V. vulnificus* ผลสำรวจพบว่ามีจำนวน *V. vulnificus* อยู่ระหว่าง 10 และ  $10^2$  MPN/กรัม จากตัวอย่างหอยนางรมสดจำนวน 53 ตัวอย่าง และส่วนใหญ่จะตรวจพบในฤดูฝน (มิถุนายน - พฤศจิกายน) ดังนั้นจากผล การศึกษาแสดงให้เห็นว่าการบริโภคหอยนางรมที่ไม่ผ่านความร้อนอาจมีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ *V. vulnificus* (Changchai and Saunjit, 2014)

#### 1.2.2.2 ไบโอดีของ *V. vulnificus*

*V. vulnificus* สามารถแบ่งออกเป็น 3 ไบโอดี โดยใช้ลักษณะทางฟิโนไทป์ และโฮสต์ที่ก่อโรค โดยไบโอดี 1 ส่วนใหญ่ก่อโรคในคน ไบโอดี 2 ส่วนใหญ่ก่อโรคในสัตว์น้ำ (Biosca *et al.*, 1996, Bisharat *et al.*, 1999)

1. *V. vulnificus* ไบโอดี 1 ส่วนใหญ่ก่อโรคในคน การติดเชื้อมักเป็นแบบ primary septicemia และมีอัตราการตายสูงถึง 50% (Zaidenstein *et al.*, 2008) *V. vulnificus* ไบโอดี 1 เป็นสาเหตุการเสียชีวิตเนื่องจากการรับประทานหอยที่ปนเปื้อนเชื้อในสหรัฐอเมริกามากถึง 95% (Oliver *et al.*, 1991) จากรายงานของ Hseueh และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 พบ *V. vulnificus* ไบโอดี 1 จากตัวอย่างตะกอนดิน น้ำทะเล และสัตว์น้ำ (Hseueh *et al.*, 2004) จาก

การเก็บตัวอย่างบริเวณปากน้ำกร่อยและสัตว์ทะเลในประเทศไต้หวัน สามารถแยกเชื้อในวงศ์ Vibrionaceae ได้ จำนวน 1,167 สายพันธุ์ จากจำนวนดังกล่าวพบว่าเป็น *V. vulnificus* 67 สายพันธุ์ (5.7%) และผลทดสอบทางชีวเคมีพบว่า *V. vulnificus* ทั้งหมดเป็น ไบโอดีป 1 เนื่องจากให้ผลบวกในการทดสอบ indole และ ornithine decarboxylase

2. *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 ก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาไหล *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 ถูกแยกครั้งแรกจากการระบาดของ *V. vulnificus* ในฟาร์มเลี้ยงปลาไหล ในขณะที่การติดเชื้อดังกล่าวส่งผลให้ปลาไหลตายเป็นจำนวนมาก (Biosca *et al.*, 1991, Biosca *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่า *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อบาดแผล (wound infections) ในคนอีกด้วย (Strom and Paranjpye, 2000, Oliver, 2005, Jones and Oliver, 2009) แต่อย่างไรก็ตาม *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 สามารถตรวจพบในสิ่งแวดล้อมน้ำทะเลหรือสัตว์น้ำได้บ่อย ยกเว้นบริเวณที่มีการเลี้ยงปลาไหลและมีการระบาดของเชื้อในฟาร์ม จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Hoi และคณะ ปี ค.ศ. 1998 จากตัวอย่างดินตะกอน น้ำ และหอยกาบ พบ *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 น้อยกว่าไบโอดีป 1 (Hoi *et al.*, 1998) นอกจากนี้มีรายงานการแยก *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีการสัมผัสปลาไหลที่ปนเปื้อน *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 นอกจากการระบาดของเชื้อชนิดนี้ในฟาร์มประเทศไต้หวันและญี่ปุ่น ยังพบการระบาดของ *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 ในประเทศสเปนในช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี 1989 ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีการศึกษาการก่อโรคของไบโอดีป 2 อย่างกว้างขวางเป็นต้นมาโดยพบว่า *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 สามารถก่อโรคในหนูทดลองและมีปัจจัยการก่อโรคที่คล้ายกันกับไบโอดีป 1 ได้แก่ การสร้างแคปซูล การผลิต siderophore การใช้ hemin และ hemoglobin เป็นแหล่งของเหล็ก (iron source) และการผลิตสารพิษที่ขับออกนอกเซลล์ (exotoxin) (Amaro and Biosca, 1996)

3. *V. vulnificus* ไบโอดีป 3 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีและลำดับเบสเหมือนกับ *V. vulnificus* ไบโอดีป 1 และไบโอดีป 2 โดยพบ *V. vulnificus* ไบโอดีป 3 ครั้งแรกในประเทศอิสราเอลจากชาวประมงที่จับปลา โดยขณะนั้นมีการระบาดของเชื้อสูงในบ่อเลี้ยงปลา *V. vulnificus* ไบโอดีป 3 ก่อให้เกิดอาการรุนแรงกับเนื้อเยื่อ (Bisharat *et al.*, 1999, Paz *et al.*, 2007) และก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยมีอัตราการตายที่ค่อนข้างต่ำประมาณ 8% (Zaidenstein *et al.*, 2008) ซึ่งพบการก่อโรคในมนุษย์เพียงในประเทศอิสราเอลเท่านั้น (Jones and Oliver, 2009)

### 1.2.2.3 การก่อเกิดโรคและการระบาด

#### 1. ลักษณะการก่อโรคในคน

การติดเชื้อที่บาดแผล (wound infection): การติดเชื้อที่บาดแผลเกิดจากบาดแผลเปิดสัมผัสกับน้ำทะเลที่มีเชื้อ เมื่อมีการติดเชื้อที่ผิวหนังจะมีอาการบวม ร้อนแดง ปวดรอบ

บาดแผล กลายเป็นตุ่ม จนเกิดอาการเนื้อเน่าตายของเนื้อเยื่ออ่อนใต้ผิวหนังและพบภาวะเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นมีระยะพักตัว 4 ชั่วโมง ถึง 4 วัน (เฉลี่ย 12 ชั่วโมง)

อาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia): เชื้อสามารถเข้าสู่กระแสโลหิตโดยผ่านทางเยื่อบุทางเดินอาหารจากการรับประทานอาหารทะเลดิบหรือผ่านทางบาดแผลในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ โดยเฉพาะผู้ที่ป่วยโรคตับมักจะมีการติดเชื้อในกระแสเลือด ทำให้มีอาการรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ โดยผู้ป่วยมักเริ่มจากมีอาการครั่นเนื้อครั่นตัว ไข้เฉียบพลัน หนาวสั่น ความดันเลือดต่ำ (septic-shock) บริเวณผิวหนังมีผื่นแดงสามารถพัฒนากลายเป็นจำเลือดหรือตุ่มน้ำ (bleb หรือ blisters) และมีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับ ในรายที่ติดเชื้อรุนแรงมักพบตุ่มน้ำที่มีเลือดปน (hemorrhagic bleb) และพบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำมีระยะพักตัว 12-72 ชั่วโมง (เฉลี่ย 6 ชั่วโมง )

กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis): เมื่อรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้ออาจจะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเหลว และปวดท้อง โดยเริ่มมีอาการหลังจากรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อประมาณ 16 ชั่วโมง

## 2. ลักษณะการก่อโรคในปลา

ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่าไวรัสโรซีส โดยจะเกิดจุดแดงตามบริเวณลำตัวและหลังของตัวปลาโดยเฉพาะบริเวณหางและครีบ (Miyazaki *et al.*, 1977) นอกจากนี้อาจมีอาการกระเจตตาขุ่น ปลาจะตายในที่สุดเนื่องจากภาวะโลหิตจาง (anaemia) ดูได้จากเหงือกของปลาที่ซีดจาง (Toranzo *et al.*, 2005)

*V. vulnificus* ไบโอดีป 2 เป็นสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรควิโรซีสที่รุนแรงและเมื่อเกิดการระบาดในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อัตราการตายของจะปลาสูงทำให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การระบาดของ *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 ในฟาร์มปลาไหลในยุโรป (Biosca *et al.*, 1991, Biosca, 1994, Hoi, 1998, Arias *et al.*, 1999, Dalsgaard *et al.*, 1999) นอกจากนี้พบว่า *V. vulnificus* ไบโอดีป 1 สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในปลานิลและกุ้ง (Sakata and Hattori, 1988, Song *et al.*, 1990) จากการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรควิโรซีสในปลาของ *V. vulnificus* ไบโอดีป 1 และไบโอดีป 2 โดยให้ *V. vulnificus* ผ่านทางสามช่องทาง คือ การฉีดเข้าช่องท้อง การแช่ และผสมกับอาหาร พบว่าปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการตายของปลา 50% (LD<sub>50</sub>) ของ *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 คือ  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/ml ตามลำดับ ส่วน LD<sub>50</sub> ของ *V. vulnificus* ไบโอดีป 1 คือ  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$  และ  $1 \times 10^9$  CFU/ml ตามลำดับ ลักษณะของปลาเมื่อติดเชื้อ *V. vulnificus* ไบโอดีป 2 คือเกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ สังเกตได้จาก ลักษณะภายนอกลำตัวของปลา เกิดภาวะเลือดออกบริเวณส่วนหัว หน้าท้อง และครีบ ส่วนลักษณะการก่อโรคของ *V. vulnificus* ไบโอดีป 1 คือเกิดการอักเสบและเกิดภาวะเลือดออกในลำไส้ (Fouz *et al.*, 2002)

#### 1.2.2.4 การคัดแยกและจำแนก *V. vulnificus*

##### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยก *V. vulnificus*

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective media หลายชนิดถูกพัฒนาขึ้นมาและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้แยกเชื้อ *V. vulnificus* ออกจากเชื้ออื่นในวงศ์ Vibrionaceae โดยอาศัยความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน รายละเอียดของอาหารแต่ละชนิด pH อุณหภูมิ และแหล่งคาร์บอน รวมถึงลักษณะสีของโคโลนี *V. vulnificus* ได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดแยก *V. vulnificus*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	pH	อุณหภูมิสำหรับการบ่ม (°C)	แหล่งคาร์บอน	ลักษณะสีของโคโลนี	อ้างอิง
Thiosulphate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)	8.6	37	Sucrose	เขียว	(Kobayashi <i>et al.</i> , 1963)
<i>V. vulnificus</i> agar (VV)	8.6	37	Salicin	เทา	(Brayton <i>et al.</i> , 1983)
SDS polymyxin sucrose agar (SPS)	7.6	37	Sucrose	ฟ้า	(Kitaura <i>et al.</i> , 1983)
Cellobiose polymyxin B colistin agar (CPC)	7.6	40	Cellobiose	เหลือง	(Massad and Oliver, 1987)
Modified cellobiose polymyxin B colistin agar (mCPC)	7.6	40	Cellobiose	เหลือง	(Tamplin <i>et al.</i> , 1991)
<i>V. vulnificus</i> enumeration agar (VVE)	8.5	37	Cellobiose, lactose, X-Gal	ฟ้าอมเขียว	(Miceli <i>et al.</i> , 1993)
Cellobiose colistin agar (CC)	8.5	40	Cellobiose	เหลือง	(Høi <i>et al.</i> , 1998)
<i>V. vulnificus</i> medium (VVM)	8.5	37	Cellobiose	เหลือง	(Cerde-Cuellar <i>et al.</i> , 2000)
<i>V. vulnificus</i> medium+ colistin (VVMc)	8.5	37	Cellobiose	เหลือง	(Cerde-Cuellar <i>et al.</i> , 2001)
CHROMagar™ Vibrio	9.0	37	Chromogenic mix	ฟ้าน้ำทะเล	-

##### 2. การใช้ DNA probes และเทคนิค PCR เพื่อยืนยัน *V. vulnificus*

เนื่องจากวิธีการตรวจทางชีวเคมีมีความใกล้เคียงกันระหว่างเชื้อ *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ดังนั้น จึงมีการยืนยันโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา อัน

ได้แก่ PCR, DNA hybridization เป็นต้น โดยใช้ส่วนของยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. vulnificus* เป็นยีนเป้าหมาย (marker) ได้แก่ cytolysin gene (*vhA*), 16 SrRNA และ 23S rRNA (ตารางที่ 2) โดยที่ cytolysin gene (*vhA*) เป็นยีนอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่พบใน *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ โดยมีความไวของการทดสอบ 10 พิโคกรัม โดยไม่พบผลบวกปลอม จัดเป็นยีนที่นิยมใช้เพื่อทดสอบ ยืนยันมากที่สุด

ตารางที่ 2 แสดง DNA probes และPCR primer เพื่อยืนยัน *V. vulnificus*

Probe/primer	Method	Target gene (size/tpye)	Reference
<i>V. vulnificus</i> probe	Colony hybridization	<i>vhA</i> (3.2 kb DNAprobe)	(Morris <i>et al.</i> , 1987)
WVAP	Colony hybridization	<i>vhA</i> (24 base probe)	(Wright <i>et al.</i> , 1993)
V3V	Colony hybridization	16 SrRNA (24 base probe)	(Cerde-Cuellar <i>et al.</i> , 2000)
Wp1 and Wp2	PCR	<i>vhA</i> (519 bp amplicon)	(Hill <i>et al.</i> , 1991)
Vv-1 and Vv-3	PCR	<i>vhA</i> (340 bp amplicon)	(Brauns <i>et al.</i> , 1991)
118V and 1037R Dvu9V and Dvu45R	Nested PCR	Bacterial 23S rRNA (1828 bp amplicon) <i>V. vulnificus</i> 23S rRNA (978 bp amplicon)	(Arias <i>et al.</i> , 1995)
Vv-1 and Vv-3	Multiplex PCR	<i>vhA</i> (340 bp amplicon)	(Wang <i>et al.</i> , 1997)
L-CTH and R-CTH	Multiplex PCR	<i>vhA</i> (205 bp amplicon)	(Brasher <i>et al.</i> , 1998)
PP-vvh	Phosphorylated probe	<i>vhA</i> (35 base amplicon)	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
BP-vvh	Biotinylated probe	<i>vhA</i> (30 base probe)	
WV1 and WV2R	Reverse transcriptase PCR	<i>vhA</i> (704 bp amplicon)	(Lee <i>et al.</i> , 1997)
WV3 and WV2R	Seminested reverse transcriptase PCR (RT-PCR)(WV1 is outside primerfor 1st round)	<i>vhA</i> (604 bp amplicon)	
<i>V. vulnificus</i> R-PCR	TaqMan real-time PCR	<i>vhA</i> (100 base amplicon)	(Campbell and Wright, 2003)
L-vvh and R-vvh (originally L-CTH and R-CTH)	SYBR green real-time PCR	<i>vhA</i> (205 bp amplicon)	(Panicker <i>et al.</i> , 2004)

### 1.2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรง

- แคปซูล (capsule) องค์ประกอบเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อ โดยบดบังไม่ให้เม็ดเลือดขาวจับกิน (antiphagocytosis) เชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมักจะมีความสามารถในการสร้างแคปซูล

- Fimbriae เป็น N-methylphenylalanine pili type IV ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญในการเกาะติดกับ epithelial cell

- Endotoxin (LPS: Lipopolysaccharide) เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการอักเสบ (inflammation) LPS จะกระตุ้นให้เกิด tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) และ nitric oxide synthase พบว่า หากฉีด LPS ในหนูทดลอง จะเกิด hypertension ในหนูและหนูตายภายใน 1 ชั่วโมง (Linkous and Oliver, 1999, Strom and Paranjpye, 2000, Kirov, 2003)

- Exoenzyme ประกอบด้วย เอนไซม์ hemolysin, elastase, collagenase, DNase, lipase, phospholipase, mucinase, chondroitin sulfatase, hyaluronidase, fibrinolysin และ protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายส่วนต่างๆของโฮสต์ (Linkous and Oliver, 1999, Strom and Paranjpye, 2000, Kirov, 2003)

- ความสามารถในการใช้เหล็ก (Iron utilization) ธาตุเหล็ก เป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการก่อโรคของเชื้อ เชื้อสามารถผลิต phenolate และ hydroxamate siderophores ซึ่งทำให้เชื้อสามารถนำเหล็กในกระแสเลือดมาใช้ได้ จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำลาย siderophores จะทำให้ความรุนแรงของเชื้อลดลง (Biosca *et al.*, 1996, Grau *et al.*, 2005)

1.2.2.6 การศึกษายีนหรือลักษณะพิเศษอื่น ๆ ที่ใช้เป็น virulence marker เพื่อบ่งชี้ความสามารถในการก่อโรค

การศึกษาต่าง ๆ ชี้ให้เห็นว่า *V. vulnificus* สามารถก่อโรคในคน และสัตว์น้ำ และมีอัตราการตายสูงในผู้ป่วยที่มีปริมาณธาตุเหล็กต่ำในกระแสโลหิต และในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ อย่างไรก็ตาม ลักษณะจำเพาะหรือ virulence marker ที่ใช้แยกแยะเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรคนั้นยังไม่แน่ชัด มีการศึกษายีนต่าง ๆ และคุณสมบัติต่าง ๆ เพื่อมาใช้เป็น virulence marker

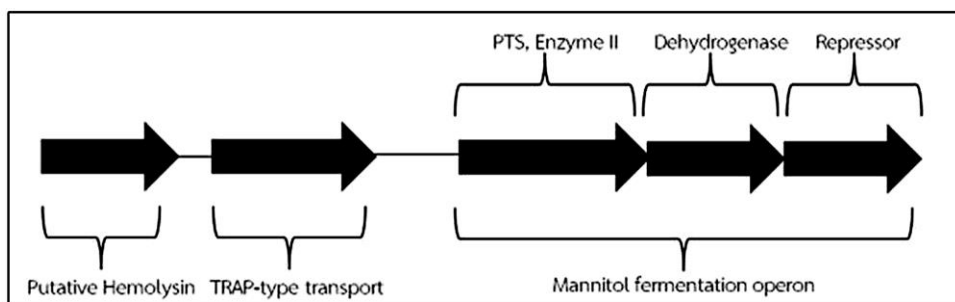
#### 1. Virulence correlated gene (vcg)

การจำแนก *V. vulnificus* เบื้องต้นจะใช้ไบโอไทป์ โดยไบโอไทป์ 1 ให้ผลบวกในการทดสอบ indole, ornithine decarboxylase และพบ O antigen ที่มีหลายรูปแบบ ไบโอไทป์ 2 จะให้ผลลบกับการทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว และพบ O antigen ที่เหมือนกัน (Amaro and Biosca, 1996, Jones and Oliver, 2009) ต่อมา Warner และ Oliver พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 200 bp จากวิธี randomly amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) (Warner and Oliver, 1999) สามารถใช้บอกความแตกต่างของแหล่งที่แยก *V. vulnificus* ได้ จากการศึกษาพบชิ้น

สวนดังกล่าวใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 100% (31/31) แต่ใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมพบเพียง 8% (3/39) จากนั้น Rosche และคณะ ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิธี PCR เพื่อใช้แยกความแตกต่าง *V. vulnificus* ตามแหล่งที่แยก โดยกำหนดให้เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสัมพันธ์กับการแสดงออกของ *vcg-E* (virulence correlated gene environmental allele) และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยสัมพันธ์กับการแสดงออกของ *vcg-C* (virulence correlated gene clinical allele) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยจัดเป็น *vcg-C* type ร้อยละ 90 และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจัดเป็น *vcg-E* type ร้อยละ 93 (Rosche *et al.*, 2005) นอกจากนี้พบว่า *V. vulnificus* ที่จัดเป็น *vcg-C* จะสามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอล ดังนั้นการใช้ความสามารถในการหมักน้ำตาลแมนนิทอลอาจเป็นอีกทางเลือกสำหรับใช้ประเมินเชื้อสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงเบื้องต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและราคาถูก (Drake *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามมีรายงานการตรวจพบ *vcg-C* ใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม (Guerrero *et al.*, 2015, Kim and Cho, 2015, Cruz *et al.*, 2016) ดังนั้น *vcg*-type อาจไม่ใช่ตัวชี้วัดที่ดีที่สุดสำหรับการบ่งบอกแหล่งหรือความรุนแรงของ *V. vulnificus*

## 2. การใช้น้ำตาลแมนนิทอล

จากการศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ CMCP6 (GenBank AE016795) พบโอเปอเรชั่น (รูปที่ 1) ที่ควบคุมการเปลี่ยนน้ำตาลแมนนิทอลเป็นน้ำตาลฟรุกโตส (Kim *et al.*, 2003) ประกอบด้วย mannitol phosphotransferase system (PTS), mannitol dehydrogenase (*mtlD*) และ mannitol operon repressor (*mtlR*) นอกจากนี้บริเวณตำแหน่ง upstream ของแมนนิทอลโอเปอเรชั่น ประกอบด้วยบริเวณ putative hemolysin และ TRAP type mannitol transport system (รูปที่ 1) (Chen *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2003) โดย *V. vulnificus* ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้ (Nilsson *et al.*, 2003, Rosche *et al.*, 2005, Vickery *et al.*, 2007, Froelich and Oliver, 2011)

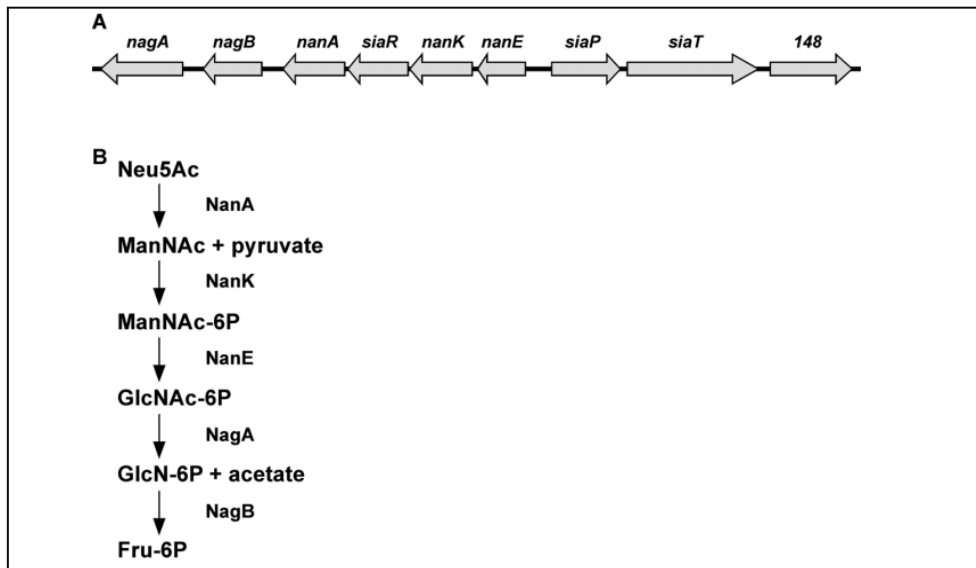


รูปที่ 1 ตัวอย่างกลุ่มยีนของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ CMCP6 (GenBank AE016795)



### 3. การแสดงออกของยีน *nanA*

Sialic acid หรือ N-acetylneuraminic acid คืออนุพันธ์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (9-carbon alpha keto sugars) พบในเยื่อเมือกของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Varki, 1992) เป็นสารเคมีที่ใช้สำหรับการสื่อสารภายในเซลล์ หรือการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และเป็นองค์ประกอบเซลล์เมมเบรน เป็นต้น (Varki, 2008) ในแบคทีเรียก่อโรคมักมีการเปลี่ยนแปลง sialic acid บนผิวเซลล์ ทำให้สามารถหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันได้และยังเกี่ยวข้องกับการสร้างอาณาจักรของแบคทีเรียบริเวณลำไส้ของสัตว์ (Vimr and Troy, 1985, Vimr and Lichtensteiger, 2002, Vimr *et al.*, 2004, Steenbergen *et al.*, 2005) กระบวนการเริ่มจากการสลาย N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) (รูปที่ 2) โดย Neu5Ac จะถูกสลายด้วยเอนไซม์ lyase/aldolase (ยีน *nanA*) ทำให้ได้ N-acetylmannosamine (ManNAc) จากนั้น ManNAc ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตด้วย ManNAc kinase (ยีน *NanK*) ทำให้ได้ N-acetylmannosamine-6-phosphate (ManNAc-6-P) ต่อมา ManNAc-6-P ถูกเปลี่ยนเป็น N-acetylglucosamine-6-P (GlcNAc-6-P) ด้วยเอนไซม์ epimerase (ยีน *NanE*) โดยกลุ่มยีนที่สำคัญสำหรับการควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสลาย sialic acid ในแบคทีเรียประกอบด้วยยีน *nanA*, ยีน *nanK* และยีน *nanE* (Almagro Moreno and Boyd, 2009) ในกระบวนการสลายขั้นสุดท้ายเอนไซม์ GlcNAc-6-P deacetylase (ยีน *nagA*) และ glucosamine-6-P deaminase (*nagB*) จะเปลี่ยน GlcNAc-6-P เป็น fructose-6-P (Fru-6-P) เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการ glycolysis ต่อไป *V. cholerae* พบ SAC genes บน chromosome I บริเวณ 57-kb Vibrio pathogenicity island-2 (VPI-2) ซึ่งถูกจัดเป็นสายพันธุ์ก่อโรค (Jermyn and Boyd, 2002, 2005) จากรายงานของ Lubin และคณะ พบว่าการแสดงออกของยีน *nanA* ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (Lubin *et al.*, 2012) *V. vulnificus* ที่มียีน *nanA* และกระบวนการสลาย N-acetylneuraminic acid จะนำไปสู่ความรุนแรงในการก่อโรคที่เพิ่มขึ้น โดยกระบวนการดังกล่าวเป็นประโยชน์สำหรับการเจริญ การเกาะติด และการอยู่รอดระหว่างการติดเชื้อ Jeong และคณะ ได้ทำการยับยั้งการทำงานของยีน *nanA* ใน *V. vulnificus* พบว่าความเป็นพิษของเชื้อลดลง รวมถึงการเจริญ และการเกาะติดกับเซลล์ เมื่อทดสอบกับ INT-407 epithelial cell นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบในหนู พบว่าความรุนแรงในการก่อโรคลดลง เนื่องจากเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ส่วนกลางและลำไส้ใหญ่ถูกทำลายน้อยลง (Jeong *et al.*, 2009)



**รูปที่ 2** การสลาย sialic acid และ transport operons (A) แผนผังของยีน *nanA* และ *siaPT* โอเปอเรอร์โดยยีน *nanA* โอเปอเรอร์ควบคุมการแสดงออกของกระบวนการสลาย sialic acid และ transcriptional regulator *SiaR* และ *siaPT* โอเปอเรอร์ควบคุมการแสดงออกของ sialic acid transporter, *YjhT* และ sialic acid mutarotase (B) แผนผังแสดงกระบวนการสลาย sialic acid (Johnston *et al.*, 2010)

#### 4. การแสดงออกของยีน *nab*

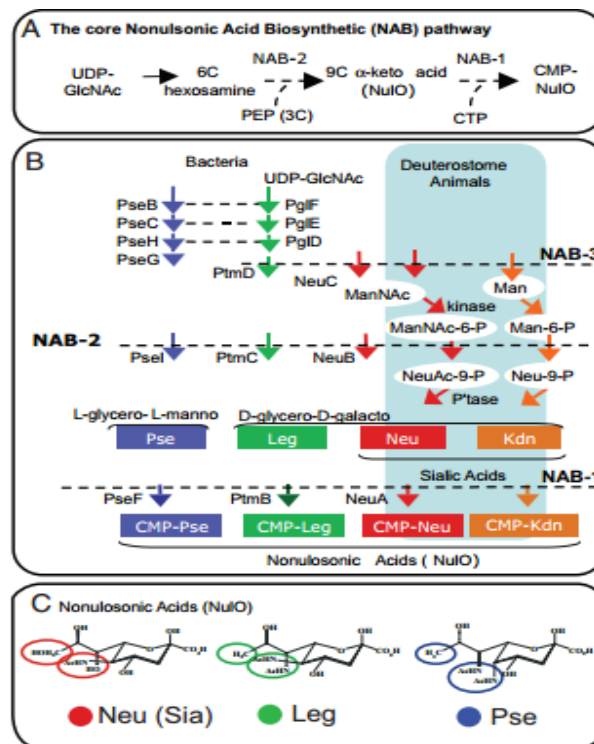
Nonulosonic acid (NulOs) เป็นกลุ่มของอนุพันธ์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (9-carbon alpha keto sugars) เช่นเดียวกับ neuraminic (sialic), legionamic และ pseudaminic acid สามารถพบได้ในโครงสร้างแบคทีเรีย เช่น capsular polysaccharides, LPS หรือ flagella เป็นต้น (Angata and Varki, 2002, Lewis *et al.*, 2009) NulOs ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ 4 isomeric 5,7-diamino-3,5,7,9-tetraoxynon-2-ulosonic acid (Knirel *et al.*, 2003) โดยโครงสร้างหลักของ legionaminic acid (Leg) ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของน้ำตาล *D-glycero-d-galacto* (McNally *et al.*, 2007, Glaze *et al.*, 2008) และ pseudaminic acid (Pse) ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของน้ำตาล *L-glycero-l-manno* (McNally *et al.*, 2006, Schoenhofen *et al.*, 2006) โครงสร้างดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ sialic acid (รูปที่ 3C) โดยขั้นตอนการสร้าง NulOs แต่ละชนิดจะอาศัยเอนไซม์ที่เหมือนกัน เช่น การรวมตัวของน้ำตาล 6-carbon sugar กับ 3-carbon phosphoenolpyruvate (3C) เพื่อสร้างน้ำตาล 9-carbon backbone NulO จากนั้นบริเวณ NulO residues จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารตัวกลาง cytidine monophosphate (CMP)-NulO โดยใช้ cytidine triphosphate ทำให้ได้ NulO ชนิดต่างๆ (รูปที่ 3) (Lewis *et al.*, 2009) นอกจากนี้ NulOs เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม, autoagglutination และการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Swords *et al.*, 2004, Guerry *et al.*, 2006, Ewing *et al.*, 2009, Anderson *et al.*, 2010, Naito *et al.*, 2010) เกี่ยวข้องกับการจับกันโดยตรงของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตระหว่าง

โฮสต์กับแบคทีเรียก่อโรค (Jones *et al.*, 2003, Swords *et al.*, 2004, Carlin *et al.*, 2007, Carlin *et al.*, 2009, Khatua *et al.*, 2010) กลุ่ม NulOs biosynthetic (ยีน *nab*) ยีน พบได้ในแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrionaceae* (Lewis *et al.*, 2009) ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Aliivibrio salmonicida* และ *Photobacterium profundum* (Edebrink *et al.*, 1996, Bogwald and Hoffman, 2006, Lewis *et al.*, 2009, Vinogradov *et al.*, 2009) จากการศึกษาความถี่ของยีน *nab* ใน *Vibrionaceae* พบว่า NAB pathway ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *nab* ประกอบด้วยยีน *nab1* (homolog ของ CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase) ยีน *nab2* (homolog ของ *N*-acetylneuraminic acid synthase) และยีน *nab3* (homolog ของ UDP-*N*-acetylglucosamine 2 epimerase) Lewis และคณะ ทำการศึกษาในกลุ่มยีน *nab* ใน *V. vulnificus* ไบโอดีปป์ 1 สายพันธุ์ YJ016 (ก่อโรคในสัตว์น้ำ) (Chen *et al.*, 2003) และ CMCP6 (ก่อโรคในคน) (Kim *et al.*, 2003) พบว่ายีน *nab* ใน *V. vulnificus* สายพันธุ์ YJ016 ประกอบด้วย open reading frames (ORFs) WV0311 (Nab2) ถึง WV0316 (Nab1) ใน *V. vulnificus* สายพันธุ์ CMCP6 ประกอบด้วย ORFs WV10803 (Nab1) ถึง WV10808 (Nab2) บนโครโมโซม 1 จากการศึกษาพบว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมีการแสดงออกของยีน *nab* ได้มากกว่า 40 เท่าของ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (Lewis *et al.*, 2011)

#### 5. บริเวณ pathogenicity region XII (PRXII)

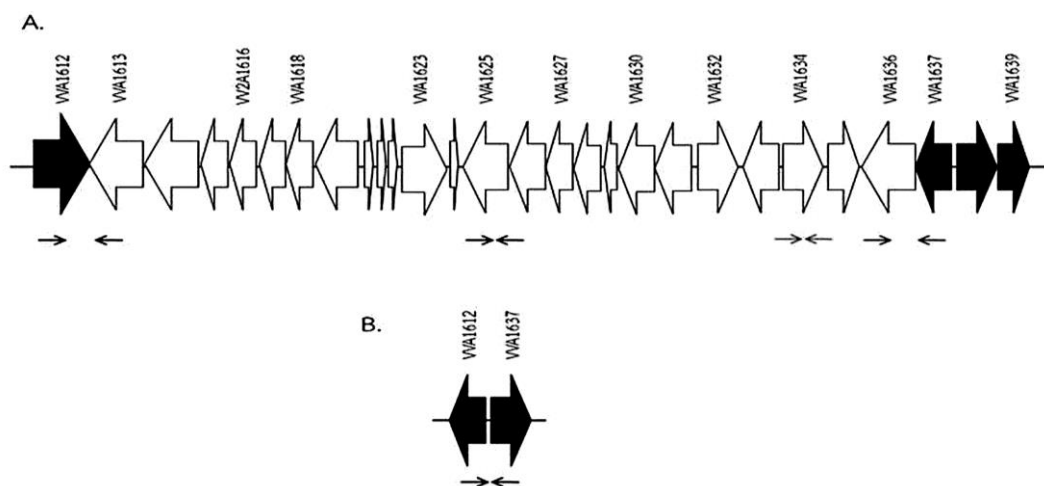
จากการศึกษาบริเวณ PRXII ของ *V. vulnificus* ประกอบด้วย 3 ORFs ได้แก่ บริเวณ VVA0080–VVA0186 (124-kb) ซึ่งมีการแสดงออกของ transport system, amino acid metabolism gene, maltoporin, thermostable hemolysin, ferredoxin, flavodoxin, และ oxidoreductase บริเวณ VVA0301–VVA0336 (53-kb region) ซึ่งมีการแสดงออกของ phospholipase/hemolysin, RTX toxin gene cluster, และ hydrolase และบริเวณ WV1613–VVA1636 (33-kb) ซึ่งควบคุมการแสดงออกของ chondroitinase, sulfate reduction system, oligopeptide ABC transport system, arylsulfatase A gene, methyl-accepting chemotaxis protein ซึ่งบริเวณดังกล่าวเกี่ยวข้องกับอาการก่อโรคของ *V. vulnificus* ต่อมา Cohen และคณะ เลือกบริเวณ 33-kb เนื่องจากมีปริมาณ GC สูงประมาณ 50% จากนั้นผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์สี่คู่สำหรับตรวจสอบการกระจายของยีนเป้าหมายในบริเวณ PRXII (VVA1612F/VVA1613R, VVA1625F/ VVA1625R, VVA1634F/ VVA1634R, และ VVA1636F/ VVA1637R) และตรวจสอบบริเวณ core chromosome flanking ยีน (VVA1612F/VVA1637R) เพื่อยืนยันการแทรกของ PRXII บนโครโมโซม II (รูปที่ 4) จากการศึกษา MLST ของ *V. vulnificus* โดยใช้ 6 housekeeping ยีน (Bisharat *et al.*, 2005) สามารถแบ่ง *V. vulnificus* ออกเป็น 2 lineages คือ lineage I ซึ่งประกอบด้วย *V. vulnificus* ไบโอดีปป์ 1 ในขณะที่ lineage II ประกอบด้วย *V. vulnificus* ไบโอดีปป์ 1 และ 2 โดยบริเวณ PRXII สามารถตรวจพบได้ใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (lineage I) แต่ไม่พบ PRXII ใน *V. vulnificus* กลุ่ม

lineage II PRXII ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ 2 putative chondroitinase AC lyases (VWA1613 และ VWA1636) sulfate permease และกลุ่ม arylsulfatase A (VWA1632-VWA1635) (arylsulfatase hydrolase, putative regulator, sulfatase และ arylsulfatase A precursor) มีรายงานพบว่าการสร้างเอนไซม์ chondroitinase ของแบคทีเรียเพื่อทำลาย chondroitin sulfate proteoglycans และมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในช่องปาก (Takeuchi *et al.*, 1982, Tam *et al.*, 1982) นอกจากนี้กลุ่ม arylsulfatase และระบบการลด sulfate อาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อโรคของแบคทีเรีย (Murooka *et al.*, 1996, Hoffman *et al.*, 2000, Mougous *et al.*, 2002) หาก *V. vulnificus* มีการแสดงออกของ PRXII อาจบ่งบอกถึงศักยภาพสูงในการก่อโรค ดังนั้น PRXII อาจมีประโยชน์ในการแยกกลุ่มของ *V. vulnificus* ที่ก่อโรครุนแรงในมนุษย์ ออกจากกลุ่มที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมและไม่มีการก่อโรค (Cohen *et al.*, 2007)



รูปที่ 3 NAB pathways เพื่อสังเคราะห์ NuOs (Neu, Kdn, Leg และ Pse acid) (A). องค์ประกอบหลักของกระบวนการสร้าง NuOs ซึ่งเกี่ยวข้องกับ UDP-N-acetylglucosamine โดยเริ่มจากรวมตัวของสารตัวกลางที่เป็น 6-carbon กับ phosphoenolpyruvate ทำให้ได้ 9-carbon α-keto acid (NAB-2) จากนั้นโครงสร้างเป็น CMP-activated NuO intermediate (NAB-1) ซึ่งเปลี่ยนโครงสร้างเป็น NuO ชนิดต่างๆ (B). การตั้งชื่อของ NuO pathways ตามความแตกต่างของ

แต่ละบรรพบุรุษ ที่มีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน (C). โครงสร้างทางเคมีของ *N*-acetyl (Neu, Leg และPse) (Lewis *et al.*, 2009)



**รูปที่ 4** แสดง ORF (WVA1613 ถึง WVA1636) ของ PRXII (A). แสดงยีนเป้าหมาย 5 ตำแหน่งบริเวณ PRXII (WVA1612F/WVA1613R, WVA1625F/WVA1625R, WVA1634F/WVA1634R และ WVA1636 F/WVA1637R) (B). แสดงยีนเป้าหมายบริเวณ core chromosome flanking ยีน (WVA1612F/WVA1637R)

#### 1.2.2.7 การรักษาและการป้องกัน

หลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารทะเลดิบ ๆ สุก ๆ โดยเฉพาะหอยนางรมดิบ ในผู้ที่ป่วยโรคตับหรือภูมิคุ้มกันต่ำ ควรปรุงอาหารทะเลให้สุก ไม่ควรสัมผัสน้ำทะเล หรือน้ำกร่อย หากมีบาดแผลที่เกิดขึ้นจากการเล่นน้ำทะเลควรทำความสะอาดทันทีด้วยสบู่ น้ำ และใส่ยาฆ่าเชื้อที่บาดแผล หากมีการติดเชื้อที่รุนแรงการรักษาจะใช้ยาในกลุ่ม tetracyclines ร่วมกับยาในกลุ่ม third-generation cephalosporin (doxycycline+ceftazidime) และ fluoroquinolones (levofloxacin, ciprofloxacin และ gatifloxacin) รวมทั้งตัดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เน่าตายทิ้งร่วมด้วย

#### 1.2.2.8 แนวทางการควบคุม *V. vulnificus* ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

##### 1. ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้แก่ ampicillin, cefotaxime, streptomycin, kanamycin, gentamicin, chloramphenicol, florfenicol, oxytetracycline, nalidixic acid, oxolinic acid, flumequine, furazolidone และ

trimethoprim-sulfamethoxazole แต่พบปัจจุบันพบอัตราการติดเชื้อต่อยาเหล่านี้เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ยามากกว่าสองชนิดในการควบคุมแบคทีเรีย (Romero *et al.*, 2012, Cabello *et al.*, 2013)

## 2. โพรไบโอติก

WHO และ FAO ให้คำนิยามของโพรไบโอติกว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่เมื่อให้ในปริมาณที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตนั้น มีการใช้โพรไบโอติกอย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อใช้ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Enterococcus faecium*, *Bacillus megaterium*, *Aeromonas hydrophila* และ *Arthrobacter* เป็นต้น (Bogut, 2000, Li *et al.*, 2009, Pai *et al.*, 2010, Newaj-Fyzul *et al.*, 2014)

### 1.2.3. แบคทีริโอเฟจ (Bacteriophage)

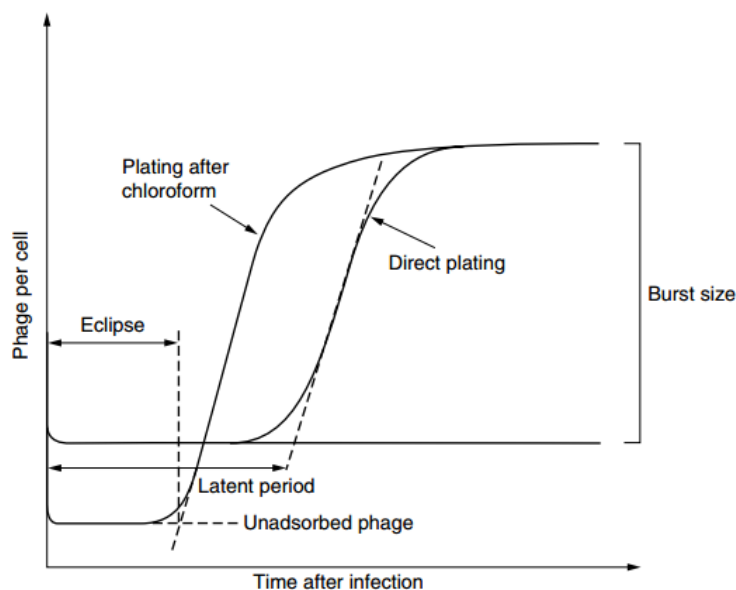
#### 1.2.3.1. ลักษณะทั่วไป

แบคทีริโอเฟจถูกค้นพบในปี 1915 โดย Frederick Twort นักพยาธิวิทยาชาวอังกฤษ และในปี 1917 โดย Felix d'Herelle นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศส (d'Herelle, 2007) แบคทีริโอเฟจจัดเป็นไวรัสของแบคทีเรีย สามารถบุกรุก เพิ่มจำนวน และทำลายเซลล์แบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ องค์ประกอบที่สำคัญของแบคทีริโอเฟจ ได้แก่ สารพันธุกรรม (DNA หรือ RNA) และโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรมเรียกว่า แคปซิด (capsid) บางชนิดอาจมีส่วนหาง และบริเวณส่วนหางนี้อาจพบโครงสร้างอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น base plate และ tail fiber เป็นต้น แบคทีริโอเฟจมากกว่า 95% ชนิดถูกจัดอยู่ในอันดับ Caudovirales (tail phage) แบ่งออกเป็น 3 วงศ์ ตามความยาวของหางได้แก่ *Siphoviridae* ประมาณ 60% *Myoviridae* ประมาณ 25% และ *Podoviridae* ประมาณ 15% (Guttman *et al.*, 2004)

แบคทีริโอเฟจสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตามการดำรงชีวิตได้แก่ แบคทีริโอเฟจที่ทำลายแบคทีเรีย (lytic) และไม่ทำลายแบคทีเรีย (temperate) อย่างไรก็ตาม temperate แบคทีริโอเฟจสามารถกลายเป็น lytic แบคทีริโอเฟจได้ เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีหรือ UV โดยทั่วไปการบุกรุกของแบคทีริโอเฟจเข้าสู่โฮสต์จะมีความจำเพาะสูงมาก ความจำเพาะระหว่างแบคทีริโอเฟจกับแบคทีเรียอาศัยการจับกันระหว่างตำแหน่งจำเพาะที่อยู่บนอนุภาคของแบคทีริโอเฟจ เรียกว่า attachment site กับตำแหน่งที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเรียกว่า receptor site จากนั้นสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจก็จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย และเริ่มต้นเข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวน (replication) ของแบคทีริโอเฟจต่อไป

### 1.2.3.2 การเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจหนึ่งอนุภาคสามารถเข้าสู่โฮสต์เพื่อเพิ่มจำนวนและปลดปล่อยลูกหลาน การศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยอาศัย one step-growth (Ellis and Delbruck, 1939) (รูปที่ 5) วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจสามารถแบ่งเป็น 2 แบบ คือ lytic cycle และ lysogenic cycle (รูปที่ 6)



รูป 5 การศึกษา one step growth (Guttman *et al.*, 2004)

วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจแบบ lytic cycle ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

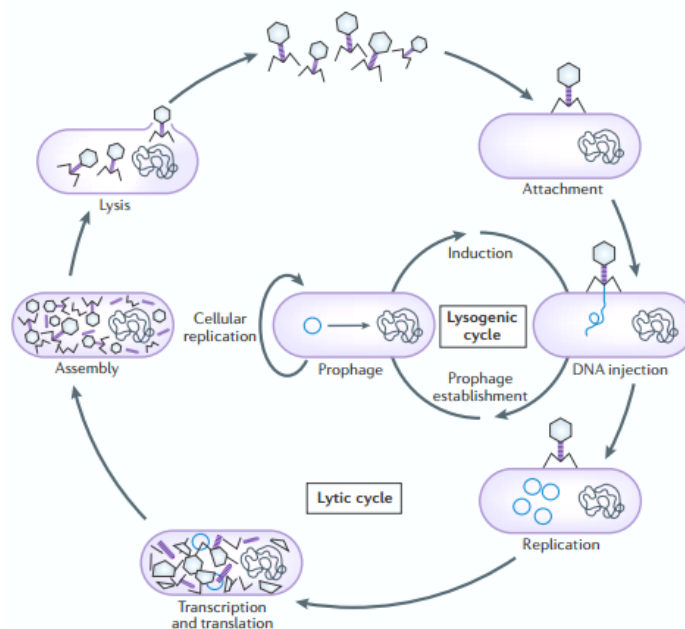
1. การเกาะติด (adsorption) แบคทีริโอเฟจจะเกาะติดบนตัวรับบนผิวเซลล์ ในกรณีที่แบคทีริโอเฟจมีหางจะเกาะติดด้วยโครงสร้างพิเศษ เช่น fiber หรือ spike เพื่อจับกับตัวรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์แบคทีเรีย หรือแคปซูลของแบคทีเรียเป้าหมาย นอกจากนี้การเกาะติดอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยภายนอก เช่น lambda receptor จะแสดงออกในสถานะที่มีน้ำตาลแมนโทส หรือแบคทีริโอเฟจบางชนิดจำเป็นต้องอาศัยไอออนแคลเซียม  $Ca^{2+}$  และ แมกนีเซียม  $Mg^{2+}$  เป็นต้น เพื่อช่วยในการเกาะติด (Wollman and Stent, 1952, Brown and Anderson, 1969)
2. การนำกรดนิวคลีอิกของแบคทีริโอเฟจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (penetration) โดยปกติแบคทีริโอเฟจที่มีหางจะใช้ tail tip เจาะบริเวณชั้น peptidoglycan และ inner membrane เพื่อปล่อยกรดนิวคลีอิกเข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง
3. การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ (transition from host to phage-directed metabolism) แบคทีริโอเฟจจะใช้ RNA

polymerase ของแบคทีเรียในการถอดรหัส (transcription) ของ immediate early genes โดย การแสดงออกของยีนดังกล่าวอาจป้องกันการทำลายกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโอเฟจจาก protease และเอนไซม์ตัดจำเพาะของแบคทีเรีย หลังจากนั้นแบคทีเรียโอเฟจจะเริ่มสร้างเอนไซม์ที่ จำเป็นสำหรับการจำลองสารพันธุกรรม โปรตีนโครงสร้าง เช่น แคปซิดโปรตีน (capsid) ส่วนทาง เป็นต้น และโปรตีนสำหรับการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกตามลำดับ

4. การประกอบอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจ (assembly) กรดนิวคลีอิกของ แบคทีเรียโอเฟจถูกบรรจุในโปรตีนโครงสร้าง หรือแคปซิด จากนั้นแบคทีเรียโอเฟจจะประกอบเป็น อนุภาคที่สมบูรณ์ภายในเซลล์

5. การปลดปล่อยอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจ (lysis) โดยทำให้แบคทีเรียแตก ชั้นแรกแบคทีเรียโอเฟจจะหลั่งเอนไซม์ออกมาทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียส่งผลให้ผนังเซลล์แตก และปลด ปล่อยลูกหลานแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถบุกรุกแบคทีเรียข้างเคียง

การเพิ่มจำนวนแบบ lysogeny cycle จะตรงข้ามกับ lytic cycle เนื่องจาก แบคทีเรียโอเฟจจะแทรกกรดนิวคลีอิกในสารพันธุกรรมของแบคทีเรียและเรียกกระษะนี้ว่า prophage เมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม แบคทีเรียโอเฟจมีการจำลองตัวเองไปพร้อมกันและ ยังคงแทรกอยู่ในสารพันธุกรรมเช่นเดิม โดยไม่ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตก ดังนั้นการเพิ่มจำนวน ของแบคทีเรียโอเฟจดังกล่าว จึงไม่ทำให้เกิดการแตกสลายหรือการตายของแบคทีเรีย แต่อาจทำให้ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียได้ ขณะที่แบคทีเรียอยู่ในสภาวะ เครียด เช่น เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตหรือสารเคมีบางชนิด prophage สามารถ เปลี่ยนวงจรชีวิตเข้าสู่การเพิ่มจำนวนแบบ lytic ได้



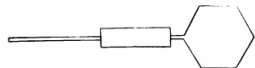

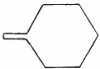



รูปที่ 6 วงจรชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจ (Salmond and Fineran, 2015)



## 1.2.3.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาจ

Bradley ได้จัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาจตามลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและชนิดของกรดนิวคลีอิก สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม แสดงในตารางที่ 3 (Bradley, 1967)

ตารางที่ 3 การจัดกลุ่มแบคทีเรียโอฟาจตามวิธีของ Bradley

กลุ่ม	ลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจ	ชนิดของกรดนิวคลีอิก	รูปร่างของแบคทีเรียโอฟาจ
A	-ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) -ส่วนหาง (tail) มีชีทที่ยึดหดได้อหุ้ม (contractile sheath) และเป็นแท่งตรง	ds-DNA	
B	-ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) -ส่วนหาง (tail) ไม่มีชีทที่ยึดหดได้อหุ้ม (contractile sheath) และยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัว	ds-DNA	
C	-ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) -ส่วนหาง (tail) ไม่มีชีทที่ยึดหดได้อหุ้ม (contractile sheath) และสั้นกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัว	ds-DNA	
D	-ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีแคปไซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคปซิด	ss-DNA	
E	-ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคปไซเมอร์ขนาดเล็กหรือไม่มี	ss-DNA	
F	-ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวที่มีความยืดหยุ่น	ss-DNA	

นอกจากนี้พบแบคทีเรียโอเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอนมี envelope ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ ไม่มีแคปซิดและกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ต่อมาคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV) ได้จัดหมวดหมู่ของไวรัส ประกอบด้วย 3 orders, 61 families, 214 genera และมากกว่า 3600 species (Van Regenmortel *et al.*, 2000) สำหรับการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียโอเฟจให้เป็น 1 order, 13 families, และ 31 genera การจัดจำแนก Family ของแบคทีเรียโอเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส แสดงในตารางที่ 4 การตั้งชื่อในระดับ family ให้ลงท้ายด้วย *-viridae* เช่น *Myoviridae* และในระดับ genus ให้ลงท้ายด้วย *-virus* เช่น *Microvirus* เป็นต้น (Ackermann, 2004)

#### 1.2.3.4 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแบคทีเรียโอเฟจ

แบคทีเรียโอเฟจมีความไวต่อสารเคมีหรือปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ได้แก่ pH, ascorbic acid, urea, urethane, detergent, chelating agent, mustard gas, alcohol และความร้อน เป็นต้น โดยปกติแล้วแบคทีเรียโอเฟจสามารถอยู่รอดได้ในช่วงความเป็นกรดต่างที่ 5-8 และอยู่รอดลดลงในช่วงความเป็นกรดต่างที่ 3-4 ถูกยับยั้งเมื่อสัมผัสกับรังสียูวีในช่วงความยาวคลื่น 260 nm นอกจากนี้แบคทีเรียโอเฟจยังไวต่อสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ได้แก่ urea และ urethane ระดับความรุนแรงในการทำลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้น อุณหภูมิ และชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ แบคทีเรียโอเฟจที่มีซองไขมันหุ้ม หรือ envelope จะไวต่อสารเคมีสูง เช่น chloroform (Guttman *et al.*, 2004) ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจ จึงจำเป็นต้องตรวจสอบความสามารถของการอยู่รอดในสภาวะเครียดต่างๆ

**ตารางที่ 4** การจัดจำแนก Family ของแบคทีเรียโอเฟจ ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

Shape	Nucleic acid	Virus group	Particulars	Example
Tailed	DNA, 2, L	<i>Myoviridae</i>	tail contractile	T4
		<i>Siphoviridae</i>	tail long, noncontractile	$\lambda$
		<i>Podoviridae</i>	tail short	T7
Polyhedral	DNA, 1, C	<i>Microviridae</i>	conspicuous capsomers	$\phi$ X174
		<i>Corticoviridae</i>	complex capsid, lipids	PM2
		<i>Tectiviridae</i>	inner lipid vesicle, pseudotail	PRD1
		<i>SHI, group*</i>	inner lipid vesicle	SH1
	RNA, 1, L	<i>STV1 group*</i>	turret-shaped protrusions	STIV
		<i>Leviviridae</i>	poliovirus-like	MS2
		<i>Cystoviridae</i>	envelope, lipids	$\phi$ 6
Filamentous	DNA, 1, C	<i>Inoviridae</i>	a. long filaments b. short rods	fd MVL1
		<i>Lipothrixviridae</i>	envelope, lipids	TTV1
		<i>Rudoviridae</i>	TMV-like	SIRV-1
Pleomorphic	DNA, 2, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	envelope, lipids, no capsid	L2
		<i>Fuselloviridae</i>	same, lemon-shaped	SSV1
		<i>Salterprovirus</i>	same, lemon-shaped	His1
		<i>Guttaviridae</i>	droplet-shaped	SNDV
		<i>Ampullaviridae*</i>	bottle-shaped	ABV
		<i>Bicaudaviridae*</i>	two-tailed, growth cycle	ATV
		<i>Globuloviridae*</i>	paramyxovirus-like	PSV

C Circular; L linear; S superhelical; seg segmented; 1 single-stranded; 2 double-stranded \*รอกการจัดหมวดหมู่

#### 1.2.3.5 การนำแบคทีเรียโอเฟจไปใช้ประโยชน์

ปัจจุบันอุบัติการณ์ของแบคทีเรียที่เรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่การคิดค้นตัวยาใหม่ ๆ ได้น้อยลง ดังนั้นการใช้แบคทีเรียโอเฟจ และผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียโอเฟจ จึงเป็นอีกทางเลือกสำหรับใช้ควบคุมแบคทีเรียก่อโรค ในด้านอุตสาหกรรมการเกษตร ด้านการแพทย์ หรือด้านอุตสาหกรรม (รูปที่ 7)

##### 1. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจในทางการแพทย์

การใช้แบคทีเรียโอเฟจในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (phage typing) ตามความไวต่อการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจ วิธีการนี้อาศัยความจำเพาะระหว่างการเกาะติดของแบคทีเรียโอเฟจกับ receptor บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรียจะสังเกตเห็น plaque หรือวงใสบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียโอเฟจในการตรวจติดตามยีนเป้าหมาย การจับโปรตีนบริเวณผิวเซลล์ และใช้เป็นตัวติดตามทางชีวภาพ (Schmelcher and Loessner, 2014) มีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจเพื่อรักษาโรคติดเชื้อ (Chan *et al.*, 2013, Nobrega *et al.*, 2015) เช่น การศึกษาแบคทีเรียโอเฟจสายพันธุ์ผสมเพื่อกำจัด *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในหู พบว่าแบคทีเรียโอเฟจสามารถทำลายเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัย (Wright *et al.*, 2009)

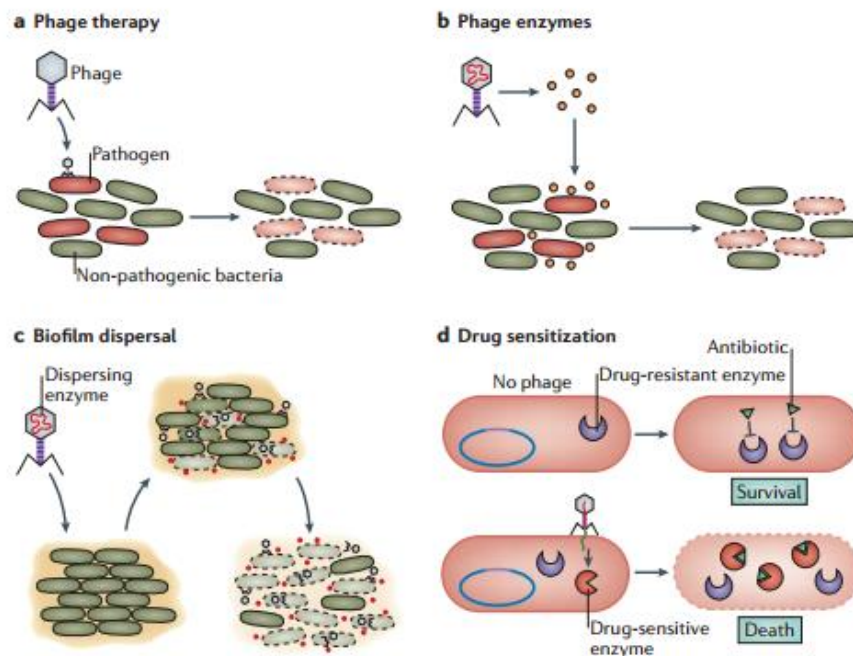
##### 2. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจในทางด้านอุตสาหกรรม

ด้านความปลอดภัยทางอาหารและอุตสาหกรรมการเกษตร มีการใช้แบคทีเรียโอเฟจทางการค้า เช่น การใช้ LISTEX P100 (Microcos; the Netherland) และ ListShield (Intralix; Baltimore, Maryland, USA) สำหรับควบคุม *Listeria monocytogenes* ในกระบวนการผลิตอาหาร

##### 3. ผลผลิตของแบคทีเรียโอเฟจที่ใช้ทางการแพทย์ และอุตสาหกรรม

นอกจากนี้ยังมีการใช้ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียโอเฟจ (รูปที่ 7) ได้แก่ endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้แบคทีเรียแตกขณะเพิ่มจำนวน โดย endolysin จะทำลายบริเวณ peptidoglycan ของแบคทีเรีย (Roach and Donovan, 2015) ปัจจุบันมีการพัฒนา endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์จากแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ โดยทำให้เกิดกระบวนการ hydrolysis บริเวณพันธะ beta-1, 4-glycosidic bond ในชั้นของ peptidoglycan ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นรู และแตก (Young, 2014) ชื่อ endolysin ที่ใช้ทางการค้าได้แก่ Staphekt (Microcos) ใช้สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* ด้านการแพทย์ได้นำ endolysin บริสุทธิ์มาใช้เป็น therapeutic agent อาจใช้สารชนิดนี้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อทำลายแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์ม (รูปที่ 7)

(Knoll and Mylonakis, 2014) นอกจากนี้มีการใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ (รูปที่ 7) เช่น การใช้แบคทีริโอเฟจที่มียาปฏิชีวนะเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการทำลายแบคทีเรียเป้าหมายและช่วยเพิ่มความเข้มข้นของยาบริเวณที่ติดเชื้อ (Yacoby and Benhar, 2008)



**รูปที่ 7** กลยุทธ์สำหรับการประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจ (a) การใช้แบคทีริโอเฟจควบคุมแบคทีเรียก่อโรค (b) การใช้เอนไซม์ของแบคทีริโอเฟจเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรค (c) การใช้แบคทีริโอเฟจ และเอนไซม์ที่แบคทีริโอเฟจสร้างขึ้นเพื่อทำลายไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย (d) การใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อสังเคราะห์ antibiotic-resistant enzyme (Salmond and Fineran, 2015)

#### 4. การใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อควบคุม *Vibrio* spp.

*Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสนใจ เนื่องจากเป็นเชื้อที่ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ สาเหตุส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับการรับประทานอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อหรือไม่ผ่านการปรุงสุก ดังนั้นการใช้แบคทีริโอเฟจในการควบคุม *Vibrio* spp. จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อดังกล่าวที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคอาหารทะเล ตัวอย่างการใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อควบคุมโรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. ดังนี้

4.1 การใช้แบคทีริโอเฟจ ในการควบคุม *V. anguillarum* เพื่อป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวในปลา سالمอน จากการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและในฟาร์ม พบว่าแบคทีริโอเฟจ สามารถลดการตายของปลา سالمอนได้ถึง 100% (Higuera *et al.*, 2013)

4.2 การแยกและศึกษาลักษณะแบคทีเรียโอเฟจต่อ *V. owensii* (Yu et al., 2013) เพื่อประโยชน์สำหรับการป้องกันโรคติดเชื้อดังกล่าวในอนาคต

4.3 การแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจต่อ *V. harveyi* เพื่อควบคุมการติดเชื้อ *V. harveyi* ในตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำสูงถึง 80% (Vinod et al., 2006)

4.4 การใช้แบคทีเรียโอเฟจควบคุมการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอ่อนของกุ้งขาว พบว่าแบคทีเรียโอเฟจมีประสิทธิภาพในการลดอัตราการตายของตัวอ่อนของกุ้งได้ (Lomeli-Ortega and Martínez-Díaz, 2014)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางทะเลเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงปลาทะเล แต่เกษตรกรยังคงประสบปัญหาเนื่องจากการตายของปลาที่เกิดจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ vibriosis, photobacteriosis, furunculosis, flexibacteriosis, streptococcosis, lactococcosis, BKD, mycobacteriosis และ piscirickettsiosis เป็นต้น vibriosis เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* spp. สาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อใน *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. salmonicida* และ *V. vulnificus* (Toranzo et al., 2005, Silva et al., 2014) *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากสามารถก่อโรคในคนและมีรายงานการติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง จากรายงานของ CDC พบว่า *V. vulnificus* สามารถพบได้มากในสัตว์จำพวกหอยทะเล ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาแบคทีเรียโอเฟจเพื่อใช้ควบคุมเชื้อดังกล่าว

1.2.3.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้แบคทีเรียโอเฟจในการควบคุมทางชีวภาพมีดังนี้

1. ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์
2. ความสามารถของการอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ใช้งานจริง เช่น ในฟาร์มเพาะเลี้ยง
3. ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจภายในแบคทีเรียที่สั้นและให้ลูกหลานของแบคทีเรียโอเฟจจำนวนมาก
4. การเหนี่ยวนำให้เกิด lysogenic phage
5. แบคทีเรียทนต่อแบคทีเรียโอเฟจ
6. ความสามารถในการถ่ายทอดยีนที่ทำให้เพิ่มความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรีย

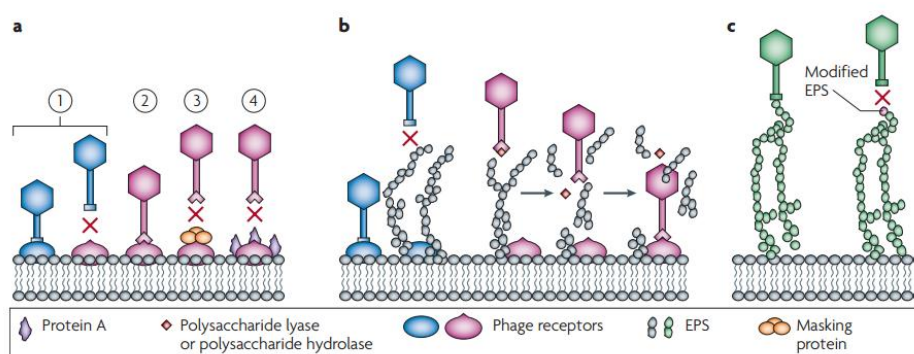
### 1.2.3.7 กลไกการต่อสู้ของแบคทีเรียต่อแบคทีเรียโอเฟจ

การเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติส่งผลให้แบคทีเรียมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด ทำให้แบคทีเรียโอเฟจมีการวิวัฒนาการสูงเช่นกัน เนื่องจากการดำรงชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจต้องอาศัยแบคทีเรีย (Sturino and Klaenhammer, 2006, Mc Grath and Van Sinderen, 2007) (รูปที่ 6) กลไกการต่อสู้ของแบคทีเรียต่อแบคทีเรียโอเฟจประกอบด้วย 4 กลไกดังนี้

1. การป้องกันการเกาะติดของแบคทีเรียโอเฟจ (preventing phage adsorption)

ขั้นแรกแบคทีเรียโอเฟจจะเกาะติดบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียอาจป้องกันการเกาะติด ได้แก่ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียโอเฟจเข้าจับบริเวณ receptor บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น *S. aureus* สามารถสร้าง protein A ซึ่งใช้ในการหลบหนีระบบภูมิคุ้มกัน โดย protein A จะจับกับบริเวณ Fc ของ IgG (Foster, 2005) พบว่าหาก *S. aureus* มีการสร้าง protein A ได้ปริมาณน้อย การเกาะติดของแบคทีเรียโอเฟจจะเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจาก protein A บดบังบริเวณ receptor ที่แบคทีเรียโอเฟจจะเข้าจับ (รูป 8a) (Nordstrom and Forsgren, 1974)

เพื่อความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อม แบคทีเรียสร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) พบว่าแบคทีเรียโอเฟจบางชนิดสามารถจดจำโพลีเมอร์ภายนอกเซลล์ (extracellular polymers) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นได้ เช่น แบคทีเรียโอเฟจของ *E. coli* จดจำบริเวณ O antigen และ K antigen หรือ *Salmonella* phage P22 จดจำบริเวณ K antigen ได้ (รูป 8c) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียโอเฟจสามารถย่อยสลายสารกลุ่มนี้ได้ (รูป 8b) (Stirm, 1968, Sutherland, 1995, Steinbacher *et al.*, 1997, Sutherland, 1999, Sutherland *et al.*, 2004) เพื่อที่จะป้องกันการบุกรุกของแบคทีเรียโอเฟจ แบคทีเรียสร้างสารหรือโมเลกุลเพื่อแย่งจับบริเวณ receptor บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียกับแบคทีเรียโอเฟจ

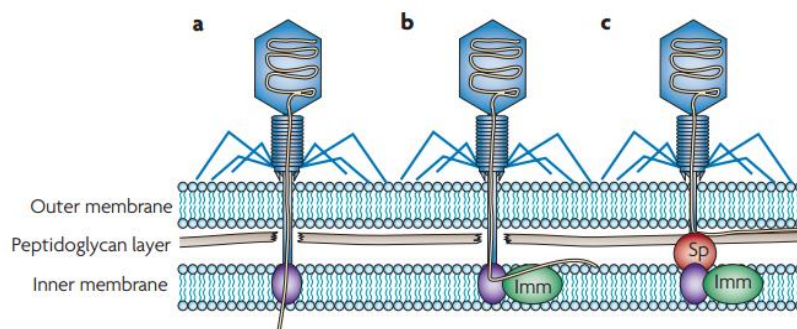


**รูปที่ 8** กลไกที่แบคทีเรียใช้สำหรับการป้องกันการเกาะติดของแบคทีเรียโอเฟจ (a) แบคทีเรียหลีกเลี่ยงการติดเชื้อจากแบคทีเรียโอเฟจ โดยเปลี่ยนแปลง receptor บนผิวเซลล์ทำให้แบคทีเรียโอเฟจเกาะติดไม่ได้ (step 1) ต่อมาแบคทีเรียโอเฟจสามารถจดจำ receptor ใหม่ได้ (step 2) แต่

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียจะสร้างโปรตีนชนิดใหม่บดบังบริเวณ receptor ทำให้แบคทีเรียโอเฟจเกาะติดไม่ได้ (step 3) *S. aureus* สามารถสร้าง protein A ซึ่งจะช่วยให้การเกาะติดของแบคทีเรียโอเฟจ (step 4) (b) แบคทีเรียสร้างสารจำพวก exopolysaccharide (EPS) เพื่อป้องกันการเกาะติด แต่แบคทีเรียโอเฟจสามารถผลิตเอนไซม์ polysaccharide lyase หรือ polysaccharide hydrolase เพื่อสลาย EPS (c) แบคทีเรียโอเฟจสามารถจดจำสารจำพวก polysaccharides เช่น O antigens และ K antigens แต่แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างทำให้แบคทีเรียโอเฟจไม่สามารถเกาะติดได้ (Labrie *et al.*, 2010)

## 2. การป้องกันการนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจเข้าสู่เซลล์ (preventing phage DNA entry)

แบคทีเรียมีระบบที่เรียกว่า superinfection exclusion (Sie) ซึ่งหมายถึงระบบที่สร้างโปรตีนเพื่อป้องกันการนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจเข้าสู่เซลล์ เช่น ยีน *imm* และ ยีน *sp* ในระบบ Sie ถูกสร้างขึ้นเพื่อป้องกัน Coliphage T4 เป็นต้น ระบบนี้จะยับยั้งการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว (รูปที่ 9) (Lu *et al.*, 1993)



รูปที่ 9 การป้องกันการนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจเข้าสู่เซลล์ (a) สภาวะปกติที่ *E. coli* ถูกบุกรุกโดย phage T4 โดยปกติชั้น peptidoglycan จะถูกสลาย ต่อมาดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจ ถูกนำเข้าสู่ cytoplasm ผ่าน inner-membrane protein (b) แบคทีเรียสร้างโปรตีน Imm ซึ่งจะยับยั้งการนำดีเอ็นเอเข้าสู่ cytoplasm ดังนั้นจึงป้องกันการติดเชื้อจาก T-even-like phages (c) และแบคทีเรียสร้างโปรตีน Sp ซึ่งจะป้องกันการสลายชั้น peptidoglycan ดังนั้นดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจจะถูกกักไว้บริเวณชั้น peptidoglycan และ outer membrane (Lu *et al.*, 1993)

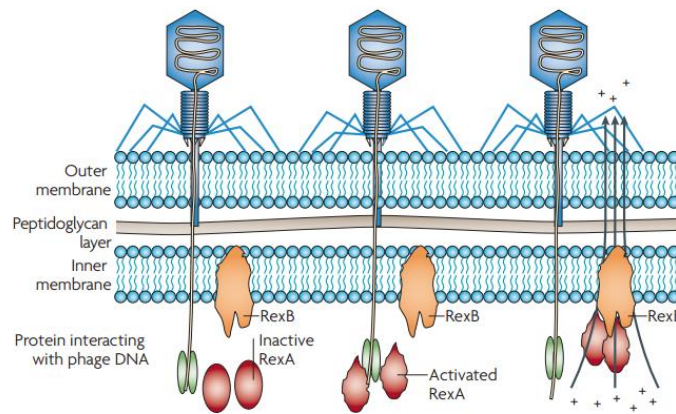
## 3. การทำลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจ

3.1 ระบบ restriction-modification (R-M) สามารถพบได้ในแบคทีเรียทั่วไป โดยระบบ R-M จะอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอม เช่น ดีเอ็นเอของไวรัส

3.2 ระบบ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISP-Cas) CRISP-cas เป็นระบบที่พบได้ในแบคทีเรียและอหิวาต์เปรียบเหมือนระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของแบคทีเรีย โดยระบบจะป้องกันและจดจำดีเอ็นเอแปลกปลอม เช่น แบคทีริโอเฟจ และพลาสมิด (Barrangou *et al.*, 2007, Sorek *et al.*, 2008)

#### 4. ระบบ Abortive infection (Abi)

แบคทีเรียหรือเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีการฆ่าตัวตาย โดยผ่านระบบ Abi เช่น ระบบ Rex พบระบบดังกล่าวใน phage  $\lambda$ -lysogenic *E. coli* (Molineux, 1991, Snyder, 1995) RexA และRexB โปรตีนจะถูกสร้างสำหรับป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีริโอเฟจ โดย RexA จะถูกกระตุ้นด้วย phage protein-DNA complex จากนั้น RexA ที่พร้อมทำงานจะไปกระตุ้น RexB ก่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของไอออนบริเวณ inner membrane ของแบคทีเรีย ทำให้ membrane ถูกทำลายและแบคทีเรียตาย (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 การทำงานของระบบ Rex (Labrie *et al.*, 2010)



### 1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะการแสดงออกทางจีโนมไทป์ และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และปลาที่เป็นโรค
2. เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. vulnificus*
3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้หนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*) เป็นโมเดลสัตว์ทดลอง สำหรับเชื้อ *V. vulnificus*
4. เพื่อแยกและลักษณะแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะกับ *V. vulnificus*

## บทที่ 2

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

#### 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

##### 2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
1. Agar	Difco (France)
2. Tryptic soy agar	Difco (France)
3. Tryptic soy broth	Difco (France)
4. Luria-Bertani agar	Difco (France)
5. Luria-Bertani broth	Difco (France)
6. Peptone	Merck (USA)
7. Brain Heart Infusion agar	Merck (USA)
8. Mannitol	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
9. Glucose	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
10. Sucrose	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)

##### 2.1.2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
1. Magnesium Sulfate Heptahydrate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	Ajax Finechem Pty (New Zealand)
2. Tris base	Bio Basic Canana INC
3. Sodium Chloride (NaCl)	AjaxFinechem PtyLtd

	(New Zealand)
4. Bromphenol blue	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
5. Ethidium bromide	Sigma (USA)
6. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Bio Basic Canana INC
7. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio Basic Canana INC
8. Boric acid	Bio Basic Canana INC
9. Potassium chloride (KCl)	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
10. Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
11. Monopotassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
12. Sodium hydroxide (NaOH)	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
13. Hydrochloric acid (HCl)	LobaChemie (USA)
14. Polyethylene glycol 8000 (PEG 8000)	AMRESCO (USA)
15. Sodium acetate (NaOAc)	Ajax Finechem PtyLtd (New Zealand)
16. Cesium Chloride (CsCl)	Sigma (USA)

### 2.1.3 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

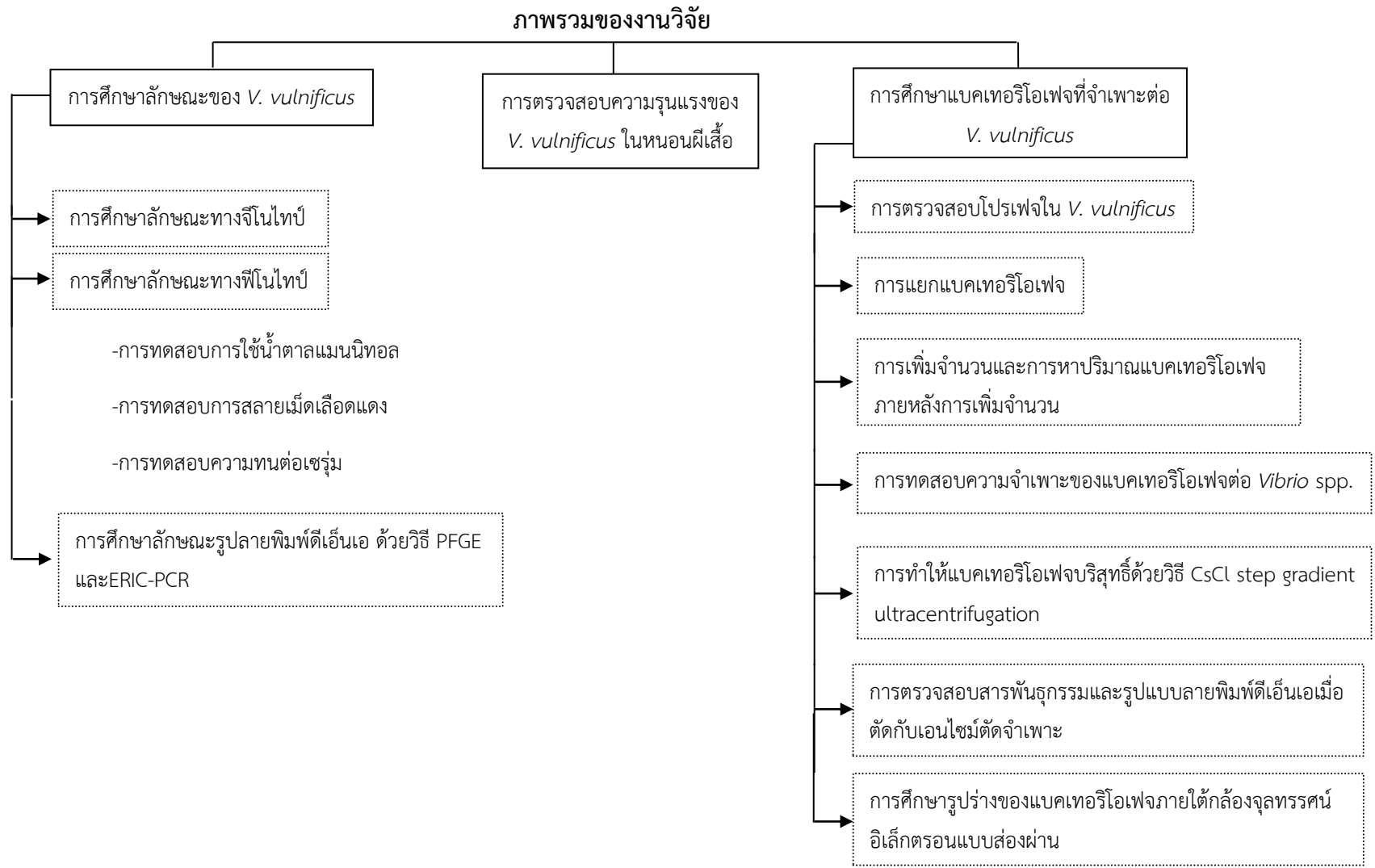
ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
1. Agarose	Bio-Rad (USA)
2. dNTP	Bioline (UK)
3. MyTaq DNA polymerase	Bioline (UK)
4. 1 kb DNA ladder	Solis BioDyne (Sweden)
5. 100 bp ladder	Bioline (UK)
6. Lambda DNA	Thermo Scientific (USA)
7. Proteinase K	Invitrogen (USA)
8. DNase I	Thermo Scientific (USA)
9. RNase A	AMRESCO (USA)

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| 10. Restriction enzyme                    | Thermo Scientific (USA) |
| 11. Low melting agarose                   | Bio-Rad (USA)           |
| 12. CHEF DNA size standard, Lambda ladder | Bio-Rad (USA)           |

#### 2.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้ว และอุปกรณ์สำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml
- หลอด PCR
- เครื่อง PCR (Bio-Rad, T100 Thermal Cycle, USA)
- Automatic pipette ขนาด 20, 200 และ 1000  $\mu$ l (Gilson, France)
- ชุด Electrophoresis และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น 200/2.0 (Bio-Rad, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (MIKRO 22R, Germany)
- เครื่อง vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- ตู้เย็นแช่แข็ง  $-20^{\circ}\text{C}$  (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็นแช่แข็ง  $4^{\circ}\text{C}$  (Sanyo, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaker incubator) (Labline Instrument Int., USA)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow carbinet) รุ่น ABS 1200A (ASTEC microflow, UK)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Metrohm, Switzerland)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Bio-Rad, USA)
- เครื่อง Hot plate และSteirrer (Fisher Scientific, USA)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)
- เข็มสำหรับฉีด insulin (Terumo Myjector, USA)
- เครื่อง ultracentrifuge (Backman, USA)
- Snake skin® dialysis tubing (Thermo scientific, USA)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (JEM 2010, JEOL, Germany)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (LPerkin Elmer, UK)
- เครื่องสำหรับทำ Pulse field gel electrophoresis (PFGE) (contour-clamped homogeneous electric field apparatus, CHEF DR III, Bio-rad, USA)
- Plug mold
- Microcentrifuge (Miko 22R Hettich, Germany)

- BioNumerics version 7.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)



## 2.2 วิธีการดำเนินการ

### 2.2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

*V. vulnificus* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 62 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลาเก๋าเสียจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันความสามารถในการก่อโรคในปลาเก๋าเสียจากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 10 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 41 สายพันธุ์ และ *V. vulnificus* ATCC 27562 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

*V. alginolyticus* PSU 6 , *V. cholerae* O1 PSU 966 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17808 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### 2.2.2 การตรวจหาลักษณะทางจีโนมไทป์

2.2.2.1 ตรวจสอบลักษณะจีโนมไทป์ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *manIIA*, ยีน *nanA*, ยีน *nab*, *vcg*-type และ PRXII โดยวิธี PCR

สกัดดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ โดยวิธีต้มเดือดที่ 100°C นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีและเก็บดีเอ็นเอที่ -20°C เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR จากนั้นตรวจสอบยีน *manIIA*, ยีน *nanA*, ยีน *nab*, *vcg*-type และ PRXII โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 6 การจัดโปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในแต่ละขั้นตอนแสดงตารางที่ 7

2.2.2.2 การวิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ผสม PCR product กับ loading dye จากนั้นดูดใส่หลอดอะกาโรสเจล (0.8-1.5%) ใส่ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb DNA และ 100 bp ladder) ลงไปใน 1 หลอดของอะกาโรสเจล จากนั้นเปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรับความต่างศักย์ (80-100 โวลต์) และใช้เวลาระหว่าง 30-50 นาที โดยขึ้นอยู่กับ PCR product เมื่อครบเวลานำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจสอบแถบของยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง benchtop UV transilluminater

ตารางที่ 5 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ โดยวิธี PCR

Primer	Gene target	Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)	Reference	
Man IIA F	Mannitol fermentation operon	GATGTTGGTGAACAACCTTCTCTGC	60.8	243	(Froelich and Oliver, 2011)	
Man IIA R		TCTGAAGCCTGTTGGATGCC				
<i>nanA</i> -F	Sialic acid catabolism cluster	TKATCGCCGCTCCYCATAACA	55	745	(Lubin <i>et al.</i> , 2012)	
<i>nanA</i> -R		GCAACGCCACCGTATTCAAC				
VV0316F	YJ-like nab1 allele	GGCCACCCCTTCAATTGAG	60	435	(Lewis <i>et al.</i> , 2011)	
VV0316R		GTCGCATACACAACCGTGG				
VV0312F	YJ-like nab2 allele	CGACGAAGCACTGGCGTTTAA A	61	986		
VV0312R		GCTCGAGCATCTCCCAACTACT				
VV10803F	CM-like nab1 allele	TTATCGGCGACAAGGTGA	57	346		
VV10803R		ATCCATTACATAGGCAAATATG				
VV10808F	CM-like nab2 allele	TATTCGTTTAGCCAAACAGTTGA	57	902		
VV10808R		CCACTTCATCCCAACGCGTT				
<i>vcg</i> C-F	Virulence-correlated gene clinical allele	AGCTGCCGATAGCGATCT	50	99		(Mala <i>et al.</i> , 2014)
<i>vcg</i> C-R		TGAGCTAACGCGAGTAGTGAG				
<i>vcg</i> E-F	Virulence-correlated gene environmental allele	CTCAATTGACAATGATCT	55	278		
<i>vcg</i> E-R		CGCTTAGGATGATCGGTG				
VVA1612F	Region XII, flanking region	ACCCTGATCGTTGGCTACTC	57	2,257	(Cohen <i>et al.</i> , 2007)	
VVA1613R	Region XII	GGAGCGGTGTGATGGTGTTG				
VVA1625F	Region XII	CGGTCTGTGGTTTATCG	47	1,822		
VVA1625R	Region XII	TCGTTTCCAGTCGTAC				
VVA1634F	Region XII	TGACACCCAACCTAGACCAC	55	1,364		
VVA1634R	Region XII	ATTGATGCCAACCTGAG				
VVA1636F	Region XII	TGTCCACGACTTGAACACG	56	1,547		
VVA1637R	Region XII, flanking region	AACATCAACCAGCGAGTCGAAC				
VVA1612bF	Region XII, flanking region	TGTGGAGAGCGGCAAGATCAAG	61	1,200		
VVA1637R	Region XII, flanking region	AACATCAACCAGCGAGTCGAAC				



ตารางที่ 6 แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ของยีน *manIIA*, ยีน *nanA*, ยีน *nab*, *vcg*-type และ PRXII

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
10x buffer (20 mM Mg <sup>2+</sup> )	8.50
2.5 mM dNTP	1.25
1 μM primer-F	3.75
1 μM primer-R	3.75
1 U <i>Taq</i> polymerase	0.25
DNA template	5.00
Deionized water	8.50
ปริมาตรรวม	25

ตารางที่ 7 แสดงการจัดโปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในแต่ละขั้นตอนของยีน *manIIA*, ยีน *nanA*, ยีน *nab*, *vcg*-type และ PRXII ภายในเครื่อง Thermal cycle

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรวม
1. Hot start	94	60	1
2. Denature	94	30	} 30
3. Annealing	(ขึ้นอยู่กับยีน แสดงในตารางที่ 5)		
4. Extension	72	60	
5. Final Extention	72	600	1

### 2.2.2.3 การแปลผล *nab* และ PRXII

การตรวจยีน *nab1* และยีน *nab2* จะแปลผลเป็น YJ-like allele หรือ CM-like allele โดยจะจัดเป็น YJ-like allele เมื่อตรวจพบบริเวณ VV0312 (YJ-like *nab1* allele) และ VV0316 (YJ-like *nab2* allele) แต่ถ้าตรวจพบบริเวณ VV10803 (CM-like *nab1* allele) และ VV10808 (CM-like *nab2* allele) จัดเป็น CM-like allele (Lewis *et al.*, 2011)

การตรวจหา PRXII จะเพิ่มจำนวน 4 ยีนได้แก่ putative chondroitinase AC lyases สองตำแหน่ง (ยีน VVA1613 และยีน VVA1636), putative arylsulfatase A (ยีน VVA1634) และ putative methyl-accepting chemotaxis protein (ยีน VVA1625) โดยจะแปลผลว่าเป็นผลบวก เมื่อมีการเพิ่มจำนวนยีนอย่างน้อย 3 ยีน และตรวจไม่พบบริเวณขนานข้าง (flanking region) ของ PRXII (Cohen *et al.*, 2007)

#### 2.2.2.4 การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* โดยวิธี ERIC-PCR

สกัดดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ ด้วยชุดสกัด Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA โดยอาศัย 0.5% อะกาโรสเจล ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 35 นาที ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในข้อ 2.2.2.2

การศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* โดยอาศัยโปรแกรม ERIC1R (5'-ATGTAAGCTC CTGGGGATTCA-3') และ ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGG GGTG AGCG-3') (Rivera *et al.*, 1995) ใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 8 การจัดโปรแกรม อุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนแสดงดังตารางที่ 9 แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในข้อ 2.2.2.2 โดยใช้ 1% อะกาโรสเจล ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 5 นาที จากนั้นปรับความต่างศักย์เป็น 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง และสร้างเดนโดรแกรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม bionumerics เวอร์ชัน 7.0

#### ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยาของ ERIC-PCR

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
5x buffer (20 mM Mg <sup>2+</sup> , 2.5 mM dNTP)	20
10 µM ERIC1R	5
10 µM ERIC2	5
2.5 U Expolymerase	0.5
DNA template	-
Deionized water	69.5
ปริมาตรรวม	100 (5 reaction)

\*\*ดูส่วนผสมจำนวน 19 µl ผสมกับ ดีเอ็นเอจำนวน 1 µl\*\*

#### ตารางที่ 9 แสดงการจัดโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนของ ERIC-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรวม
1. Hot start	95	7	1
2. Denature	90	1	30
3. Annealing	52	1	
4. Extension	70	5	
5. Final Extention	70	10	1

### 2.2.2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6, VVA7 และ VVA8 โดยใช้วิธี Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

จากผลการศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์ ฟิโนไทป์ และรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี ERIC-PCR เมื่อไม่พบความแตกต่างของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6, VVA7 และ VVA8 จะทำการจำแนกโดยใช้เทคนิค PFGE อาจสามารถบอกความแตกต่าง หรือความสัมพันธ์ของเชื้อดังกล่าวได้ (Cameron *et al.*, 1994, Buchrieser *et al.*, 1995, Tamplin *et al.*, 1996) วิธี PFGE ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย, การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลโดยอาศัยการสลับสนามไฟฟ้าสองทิศทาง และการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยย่อ้มกับเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ขั้นตอนการทำ PFGE โดยละเอียดมีดังนี้

1. เลี้ยง *V. vulnificus* บนอาหาร TSA + 1% NaCl นำเชื้อมาละลายใน cell suspension buffer ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาณเชื้อให้ได้ OD เท่ากับ 0.2 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm จากนั้นนำ *V. vulnificus* ขว่นลอยปริมาตร 500  $\mu$ l บ่มที่ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที
2. เติม protenase K (20 mg/ml) ปริมาตร 20  $\mu$ l แล้วเติม 1.2% อะกาโรสเจลที่หลอมละลาย ปริมาตร 500  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันและใส่ลงใน plug mold จนเต็มหลุมโดยไม่ให้มีฟองอากาศ
3. วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มต่อที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
4. ใส่ plug ลงใน lysis buffer ปริมาตร 5 ml แล้วเติม proteinase K ปริมาตร 25  $\mu$ l บ่มที่ 55°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. เท lysis buffer ออก แล้วล้าง plug mold ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มีอุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง และล้างด้วย TE buffer2, pH 8.0 เป็นเวลา 15 นาที 3 ครั้ง
6. นำ plug ใส่ลงในหลอด eppendorf แล้วเก็บไว้ที่ 4°C ข้ามคืน
7. ตัด plug ให้ได้ขนาด 3x5 mm ใส่ใน 1X FastDigest buffer ของเอนไซม์ Not I ปริมาตร 100  $\mu$ l แล้วบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
8. ดูด 1X buffer ออกให้หมด แล้วเติมส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยาสำหรับการใช้ Not I FastDigest

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
10x FastDigest buffer	10
Not I FastDigest	1
Deionized water	89
ปริมาตรรวม	100

9. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดของเหลวออกทั้งหมด แล้วนำ plug ออกมาวางบนหวี ใช้ CHEF DNA size standard, Lambda ladder เป็น marker และตรึงด้วย 1% อะกาโรสเจล จำนวน 1-2 หยด รอให้แข็ง

10. วางหวีลงถาดเจลที่เตรียมไว้ แล้วเติม 1% อะกาโรสเจล

11. รอให้อะกาโรสเจลแข็งประมาณ 15 นาที จากนั้นดึงหวีออก แล้วนำไปวางในเครื่อง PFGE ชนิด CHEF (Bio-Red, Heraeus, USA) ใช้ระยะเวลาในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 19 ชั่วโมง, กระแสไฟ 6 V/cm, มุมการใช้กระแสไฟฟ้า 120°, Initial time 2.2 วินาที และ final switch time 54.2 ที่อุณหภูมิ 14°C ใน 0.5X TBE buffer

12. ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยนำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจสอบแถบของยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง benchtop UV transilluminater และสร้างเดนโดแกรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม bionumerics เวอร์ชัน 7.0

## 2.2.3 การตรวจหาลักษณะทางฟีโนไทป์

### 2.2.3.1 ความสามารถในการสร้าง indole

เลี้ยง *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ ใน 1% peptone เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วหยด Kovac's reagent ถ้าเชื้อสามารถสร้าง indole จะสังเกตเห็นวงแหวนสีแดงบนผิวหน้า และถ้าเชื้อไม่สามารถสร้าง indole จะสังเกตเห็นวงแหวนสีเขียว

### 2.2.3.2 การทดสอบการใช้น้ำตาลแมนนิทอล

ทำการถ่าย *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ บนอาหาร LB agar + 1% NaCl ลงใน mannitol fermentation broth (1% mannitol, 0.0075% bromothymol blue, 1% peptone, 0.5% NaCl, pH 7.4) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน ถ้า *V. vulnificus* สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้สีอาหารจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลือง (Froelich and Oliver, 2011)

### 2.2.3.3 การทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดง (Bier *et al.*, 2013)

การเตรียม 4% เม็ดเลือดแดงของคน ซึ่งได้รับจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง โดยปั่นเหวี่ยงโลหิตด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม PBS ให้เท่ากับปริมาตรของส่วนใสที่ดูดทิ้ง เพื่อล้างเม็ดเลือดแดง ทำซ้ำสองครั้ง หลังจากนั้นเจือจางเม็ดเลือดแดงให้ได้ 4% ด้วย PBS

การเตรียมกล้าเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงใน Brain-heart infusion medium (BHIB) + 1% NaCl พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบที่ 150 รอบ/นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm เท่ากับ 1.6 (late log phase) นำกล้าเชื้อมาปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์และตะกอนเซลล์ โดยน้ำเลี้ยงเซลล์นำมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.22  $\mu\text{m}$  ตะกอนเซลล์ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนใน PBS สำหรับการทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงของเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์จะใช้อัตราส่วน 1:1 (เซลล์/น้ำเลี้ยงเซลล์: 4% เม็ดเลือดแดงของคน) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยใช้ชุดควบคุมจำนวน 3 ชุด และทำการทดลอง 3 ซ้ำ ได้แก่

1. Positive control ประกอบด้วย 2% Triton X-100 และ 4% เม็ดเลือดแดง แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที
2. Spontaneous control ประกอบด้วย PBS และ 4% เม็ดเลือดแดง แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่ อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที
3. Spontaneous control ของเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย เซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยการบ่มที่ 56°C นาน 30 นาที และ 4% เม็ดเลือดแดง แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่ อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที

การคำนวณ % การสลายเม็ดเลือดแดง

$$= 100 \times \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} - \text{ค่าดูดกลืนแสงของ spontaneous control})}{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ positive} - \text{ค่าดูดกลืนแสงของ spontaneous control})}$$

การแปลผล : ให้ผลบวก เมื่อ % การสลายเม็ดเลือดแดงมากกว่า 20 %

### 2.2.3.4 การทดสอบความทนต่อเซรัม (Bier *et al.*, 2013)

การตรวจสอบความทนต่อเซรัม ซึ่งได้รับจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง ด้วยวิธี colorimetric serum sensitivity assay (Moll *et al.*, 1979) การแปลผลดูจากการเจริญของเชื้อ หากมีการเจริญเชื้อจะใช้น้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดทำให้สีฟ้าของอาหาร peptone glucose

broth เปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเลี้ยง *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ใน 96-well plate ที่มีอาหาร LB+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน 96-well plate ที่มีอาหาร LB+1% NaCl บ่มต่อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาถ่ายเชื้อลงใน peptone glucose broth (1% glucose, 0.0075% bromthymol blue, 1% peptone, 0.5% NaCl, pH 7.4) ที่มีปริมาณเซรุ่มแตกต่างกันได้แก่ 0, 10, 20, 40, 60 และ 80% แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การแปลผล

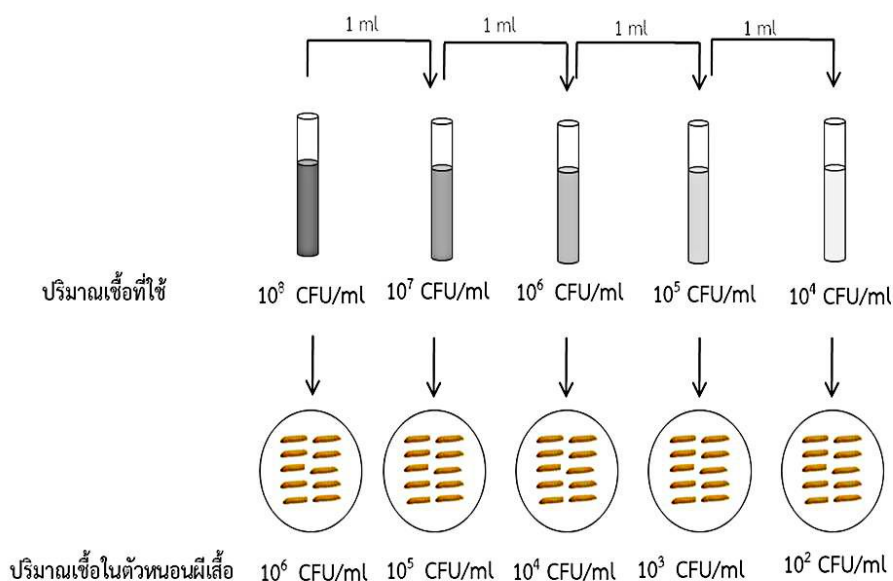
ให้ผลบวก ที่เซรุ่ม 60 – 80 % = resistance

ให้ผลบวก ที่เซรุ่ม 20 – 40 % = intermediate resistance

ให้ผลบวก ที่เซรุ่ม 0 – 10 % = sensitive

## 2.2.4 การตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* ในหนอนผีเสื้อ *Galleria mellonella*

ตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคโดยคัดเลือก *V. vulnificus* 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ VWA1, VWA2, VWA3, VWA4, VWA5, VWA6, VWA7, VWA8, VWA9 และ FVW11 เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าว สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมงได้ยืนยันความสามารถในการก่อโรคในปลาเก๋าเสือ โดยเชื้อสายพันธุ์ VWA6 ทำให้ปลาตายเมื่อให้เชื้อปริมาณ  $10^6$  CFU/ml แต่การศึกษาครั้งนี้ใช้โมเดลหนอนผีเสื้อแทนปลาเก๋าเสือ การศึกษาแบบหยาบในเบื่องตันจะใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VWA1 และ VWA6 ให้ปริมาณเชื้อสุดท้ายระหว่าง  $10^2$ ,  $10^3$ , ...,  $10^6$  CFU/ml โดยเตรียมกล้าเชื้อ *V. vulnificus* ให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml มีรายละเอียดการเตรียมดังต่อไปนี้ เชื้อโคลนเดี่ยวของ *V. vulnificus* จากอาหารแข็ง LB + 1% NaCl เลี้ยงในอาหารเหลว LB + 1% NaCl ปริมาณ 5 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้เลี้ยงต่อใน ฟลาสก์ที่มี LB + 1% NaCl ปริมาตร 45 ml และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นล้างกล้าเชื้อด้วย PBS buffer 3 ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าประมาณ 0.5-0.6 หลังจากนั้นทำการเจือจางเชื้อสิบเท่าด้วย PBS buffer ดังแสดงในรูปที่ 11 เชื้อแต่ละความเข้มข้น ( $10^2$ ,  $10^3$ , ...,  $10^6$  CFU/ml) ฉีดเข้าขาซ้ายคู่ที่ 1 ของหนอนผีเสื้อปริมาณ 10  $\mu$ l จำนวน 10 ตัว ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ และทำการนับปริมาณเชื้อทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ โดยวิธี spread plate ชุดควบคุมฉีดเพียง PBS จากนั้นสังเกตการตายของหนอนผีเสื้อที่เวลา 24, 48, 72, 96, และ 120 ชั่วโมง ในกรณีที่หนอนผีเสื้อรอดชีวิตจะติดตามผลจนหนอนผีเสื้อกลายเป็นผีเสื้อ



รูปที่ 11 แผนผังแสดงการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* ในหนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*)

จากผลการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคได้คัดเลือกปริมาณเชื้อที่  $10^8$ ,  $10^2$  และ  $10^3$  CFU/ml เพื่อใช้สำหรับทดสอบ *V. vulnificus* สายพันธุ์อื่น ๆ ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อให้ได้ปริมาณที่ต้องการและตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคในหนอนจะใช้วิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (รูปที่ 11) (Norville *et al.*, 2014, McMillan *et al.*, 2015)

### 2.2.5 การตรวจสอบโปรเฟจใน *V. vulnificus*

การตรวจสอบแบคทีเรียที่มีการแทรกตัวของโปรเฟจอยู่อาจใช้รังสี UV, ยาปฏิชีวนะ (mitomycin C) หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) เพื่อชักนำให้โปรเฟจเปลี่ยนเป็นไลติกแบคทีเรียโอเฟจ ซึ่งจะสามารถเพิ่มจำนวนอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจ และปลดปล่อยลูกหลานโดยทำให้เซลล์โฮสต์แตก การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ mitomycin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) เนื่องจากสารดังกล่าวเหนี่ยวนำให้โปรเฟจกลายเป็นไลติกแบคทีเรียโอเฟจได้สูงสุด (Los *et al.*, 2009, Bloch *et al.*, 2014)

ตรวจสอบการแทรกของโปรเฟจใน *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ โดยเลี้ยง *V. vulnificus* ใน TSB + 1% NaCl ให้อยู่ในช่วง log phase ( $10^8$  CFU/ml) จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสออก แล้วเติม TSB + 1% NaCl เพื่อละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นเติม mitomycin C ให้ความเข้มข้นสุดท้าย  $1 \mu\text{g/ml}$  นำไปบ่มที่  $37^\circ\text{C}$  นาน 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลองควบคู่กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม mitomycin C โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บ

ส่วนในสมมาตรตรวจสอบ แบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี drop plate หากสังเกตเห็นวงใสให้แปลผลว่ามีการแทรกของโปรเฟจในแบคทีเรียดังกล่าว

## 2.2.6 การศึกษาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *V. vulnificus*

### 2.2.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *V. vulnificus*

แบคทีเรียที่ใช้เป็นโฮสต์สำหรับการแยกแบคทีเรียโอเฟจ ได้แก่ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 และ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 โดยเตรียมกล้าเชื้อ *V. vulnificus* ให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml ซึ่งรายละเอียดการเตรียมเชื้อมีดังต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อโดยเลือกโคลนเดี่ยว ของ *V. vulnificus* จากอาหาร TSA + 1% NaCl เลี้ยงในอาหาร TSB + 1% NaCl ปริมาณ 5 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงต่อในฟลาस्कที่มี TSB + 1% NaCl ปริมาตร 45 ml และบ่มต่อที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบที่ 150 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าประมาณ 0.5-1.0 และทำการนับจำนวนเชื้อเริ่มต้น ( $10^8$  CFU/ml) โดยวิธี spread plate ซึ่งเชื้อที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการเป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

### 2.2.6.2 การแยกแบคทีเรียโอเฟจ

ทำการแยกแบคทีเรียโอเฟจจากตัวอย่างอาหารทะเลซึ่งประกอบด้วยตัวอย่าง หอยแครง หอยแมลงภู่ หอยตลับ และกุ้ง ด้วยวิธี double-layer agar plaque assay ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ ขั้นแรกทำการเตรียมตัวอย่าง 25 กรัม โดยหอยแครง และหอยตลับ ทำการเก็บน้ำหอย และเนื้อหอยจะหั่นบาง กุ้งเก็บส่วนตับจากนั้นบดหยาบแล้วเติม 1% NaCl ปริมาตร 10 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด  $0.45\ \mu\text{m}$  เก็บส่วนใสที่ผ่านการกรอง ดูดส่วนใส 200  $\mu\text{l}$  ผสมกับกล้าเชื้อ *V. vulnificus* ( $10^8$  CFU/ml) ดูดใส่ soft agar (TSB, 0.75% agar และ 1% NaCl) ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบน TSA + 1%NaCl บ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ทำ single plaque เพื่อให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเขี่ยบริเวณที่เกิดวงใส ใสใน TSB + 1 % NaCl ปริมาตร 300  $\mu\text{l}$  แล้วเติมกล้าเชื้อ *V. vulnificus* 50  $\mu\text{l}$  บ่มข้ามคืนที่  $37^{\circ}\text{C}$  ตรวจสอบแบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี double-layer agar plaque assay โดยจะทำ single plaque สองครั้งแล้วจึงเก็บ plaque ใน SM buffer ที่มี chloroform 2% (V/V) และเก็บไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  (Adams, 1959, Schmidt and Stanier, 1965)



### 2.2.6.3 การเพิ่มจำนวนและเก็บแบคทีเรียโอฟาจ

เลี้ยง *V. vulnificus* ให้ได้ปริมาณ  $1 \times 10^8$  CFU/ml คูดเชื้อ 200  $\mu$ l ผสมกับแบคทีเรียโอฟาจ 50  $\mu$ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นผสมกับ soft agar + 1% NaCl แล้วเททับลงบนอาหาร TSA + 1% NaCl บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บแบคทีเรียโอฟาจ โดยคูด SM buffer ปริมาตร 3 ml ใส่ในเพลตที่เพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้คูดส่วนใสและเก็บ soft agar แล้วเติม chloroform 2% (V/V) นำไปเขย่าอย่างแรง 30 วินาที และแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 35 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่ 4°C (Adams, 1959, Schmidt and Stanier, 1965, DePaola *et al.*, 1998)

### 2.2.6.4 การหาปริมาณแบคทีเรียโอฟาจภายหลังการเพิ่มจำนวน

นำแบคทีเรียโอฟาจที่เพิ่มจำนวนแล้วมาเจือจางแบบสิบเท่าด้วย SM buffer จากนั้นคูดแบคทีเรียโอฟาจปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมกับ *V. vulnificus* ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) ปริมาตร 200  $\mu$ l ใส่ soft agar ผสมให้เข้ากันและเทลงบน TSA + 1% NaCl รอให้แห้งแล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียโอฟาจแล้วนำมาคำนวณในหน่วย PFU/ml

### 2.2.6.5 การทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอฟาจต่อ *Vibrio* spp.

เชื้อที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย *Vibrio* spp. 24 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562, *V. vulnificus* สายพันธุ์ PSU 025, *V. vulnificus* สายพันธุ์ PSU 039, *V. alginolyticus* สายพันธุ์ PSU 6, *V. cholerae* O1 สายพันธุ์ PSU 966, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ ATCC 17808, *V. vulnificus* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยจำนวน 10 สายพันธุ์ และ *V. vulnificus* ที่แยกได้ปลาที่ติดเชื้อจำนวน 10 สายพันธุ์ เลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1 \times 10^8$  CFU/ml ปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมกับ soft agar แล้วเททับลงบน TSA + 1% NaCl รอให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยดแบคทีเรียโอฟาจปริมาตร 2  $\mu$ l ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียโอฟาจที่สามารถทำลายแบคทีเรียที่เรียได้และให้ผลบวกจะเห็นวงใส (DePaola *et al.*, 1998)

### 2.2.6.6 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อความอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจ

จากการทดสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอฟาจต่อ *Vibrio* spp. และขนาดของพลาสต์สามารถคัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ MC20915, BD11015, BD41015, BD51015, และ BD61015 จากนั้นนำมาตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดภายใต้อุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรดต่าง

สำหรับการทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C และ 70°C ชั้นแรกเจือจางแบคทีเรียโอฟาจให้ได้ปริมาณ  $10^6$  PFU/ml ใน SM buffer แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C และ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียโอฟาจ ด้วยวิธี double-layer agar plaque assay ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) เป็นโฮสต์

สำหรับการทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียโอฟาจภายใต้ความเป็นกรดต่างที่ pH ต่าง ๆ ชั้นแรกทำการปรับกรดต่างใน SM buffer ให้มีค่าเท่ากับ 2, 5, 7, 9, 11, และ 13 ตามลำดับ โดยใช้สารละลาย 3M sodium hydroxide (NaOH) และ 1M hydrochloric acid (HCl) นอกจากนี้ทดสอบความอยู่รอดภายใต้ความเค็มต่าง ๆ โดยใช้ SM buffer ที่มีการเติม sodium chloride (NaCl) โดยปรับให้มีค่าความเค็ม (salinity) เท่ากับ 0%, 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียโอฟาจ ( $10^7$  PFU/ml) ปริมาณ 100  $\mu$ l ผสมกับ SM buffer 900  $\mu$ l ที่มีความเป็นกรดและความเค็มต่าง ๆ จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียโอฟาจ ด้วยวิธี double-layer agar plaque assay ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) เป็นโฮสต์

#### 2.2.6.7 การทำให้แบคทีเรียโอฟาจบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl gradient ultracentrifugation

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ 5 ไอโซเลท โดยนำ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  CFU/ml ผสมกับแบคทีเรียโอฟาจความเข้มข้น  $1 \times 10^7$  PFU/ml ในอาหาร TSB + 1% NaCl ปริมาตร 50 ml บ่มที่ 37°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm นาน 15 นาที เก็บส่วนใส จากนั้นนำผสมกับ PEG 8,000 (10% w/w) และ NaCl (1M) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่ 4°C นาน 12 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนแบคทีเรียโอฟาจ จากนั้นทำการเก็บตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนแบคทีเรียโอฟาจที่ได้มาละลายใน SM buffer จากนั้นทำให้แบคทีเรียโอฟาจบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl step gradient ultracentrifugation ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (Sambrook *et al.*, 1989) โดยใช้ CsCl ที่ความหนาแน่น 0.66 g/cm<sup>3</sup>, 0.82 g/cm<sup>3</sup> และ 1.0 g/cm<sup>3</sup> แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (swinging out rotor) ที่ความเร็วรอบ 35,000 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บแบนขาวชุ่นที่ความหนาแน่น 0.66 g/cm<sup>3</sup> แล้วเอา CsCl ออกด้วยวิธี dialysis โดยใช้ SM buffer จากนั้นเก็บที่ 4°C แล้วนำไปยืนยันความเป็นแบคทีเรียโอฟาจและหาปริมาณแบคทีเรียโอฟาจด้วยวิธี double-layer agar plaque assay โดยใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 เป็นโฮสต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

### 2.2.6.8 การสกัดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ

สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอฟาจที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยการเติม *DNase I* และ *RNase A* แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้อง จากนั้นทำให้แบคทีเรียโอฟาจแตกโดยเติม lysis buffer และ proteinase K (10 mg/ml) บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ phenol-chloroform (อัตราส่วน 1:1) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ตูดส่วนใสด้านบนที่ได้มาเติม chloroform เพื่อกำจัด phenol แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสเพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3 M sodium acetate และ Isopropanol เก็บไว้ที่ -20°C ซ้ำมคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 70% แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นระเหย ethanol ออก ทำการละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอฟาจด้วย DI และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20°C (Sambrook *et al.*, 1989)

#### 2.2.6.8.1 การตรวจสอบคุณสมบัติของสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ

ทำการตรวจสอบขนาดและชนิดของสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ โดยตรวจสอบชนิดของสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ *DNase I* และ *RNase A* (Silva *et al.*, 2014) จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2.2 โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder

ตรวจสอบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Hind III*, *Not I* และ *EcoR I* แล้วเติมบัฟเฟอร์ที่จำเพาะกับเอนไซม์ จากนั้นบ่มนาน 12-16 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2.2 โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder

#### 2.2.6.9 การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำแบคทีเรียโอฟาจที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 2.2.6.6 ส่องดูรูปร่าง โดยใช้ copper grid แล้วย้อมด้วย uranyl acetate 1% นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Hall, 1955, Hitchborn and Hills, 1965)

### 2.2.7 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

เปรียบเทียบลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* ตามแหล่งที่ได้รับเชื้อ และจากการจัดกลุ่มด้วยวิธี ERIC-PCR โดยวิธี chi-square เลือกใช้ Fisher's exact test

และสร้าง Kaplan-Meier กราฟ เพื่อแสดงการรอดชีวิตของหนอนด้วยโปรแกรม SPSS version 14 (SPSS Inc. Chicago, Ill., U.S.A)

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

##### 3.1 การจัดกลุ่ม *V. vulnificus* โดยใช้ไบโอบี

*V. vulnificus* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ก่อโรคในปลา ร้อยละ 17 (10/62) กลุ่มที่แยกได้จากผู้ป่วย ร้อยละ 17 (10/62) และกลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ร้อยละ 66 (41/62) โดยใช้ *V. vulnificus* ATCC 27562 เป็นเชื้อมาตรฐาน การจัดกลุ่ม *V. vulnificus* เบื้องต้นโดยใช้ไบโอบี อาศัยความสามารถในการสร้าง indole โดยไบโอบี 1 จัดเป็นกลุ่มที่สร้าง indole และไบโอบี 2 จัดเป็นกลุ่มที่ไม่สร้าง indole จากการศึกษาพบว่า *V. vulnificus* ส่วนใหญ่จัดเป็นไบโอบี 1 โดยเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและเชื้อก่อโรคในปลาทุกสายพันธุ์จัดเป็นไบโอบี 1 นอกจากนี้พบว่าเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมจัดเป็นไบโอบี 1 ร้อยละ 95 (39/41) อย่างไรก็ตามพบ *V. vulnificus* ที่จัดเป็นไบโอบี 2 ในกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (สายพันธุ์ G16 และสายพันธุ์ K1) ร้อยละ 5 (2/41) (ตารางที่ 11)

##### 3.2 การตรวจสอบ *vcg* type, ยีน *manIIA*, ยีน *nanA*, ยีน *nab* และ PRXII โดยวิธี PCR

จากการตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ในแต่ละกลุ่มของ *V. vulnificus* ร่วมกับการวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าการตรวจพบยีน *nanA* และ PRXII ในเชื้อแต่ละกลุ่มมีอย่างน้อยหนึ่งคู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การตรวจพบ *vcg*-type และยีน *manIIA* ในเชื้อแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11) จากการตรวจสอบ *vcg*-type พบว่า *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์จัดเป็น *vcg*-C type และมียีน *manIIA* ยกเว้น *V. vulnificus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมตรวจพบยีน *manIIA* ร้อยละ 86 (ตารางที่ 11) ดังนั้น *vcg* type และยีน *manIIA* อาจไม่ใช่ตัวชี้วัดที่ดีสำหรับการจัดกลุ่มของ *V. vulnificus*

เมื่อพิจารณาการตรวจพบยีน *nanA* ในแต่ละกลุ่มของ *V. vulnificus* โดยอาศัยการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบยีน *nanA* ในเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมน้อยกว่ากลุ่มเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ( $p$ -value = 0.047) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 12) โดยตรวจพบยีน *nanA* ใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ร้อยละ 63 (26/41) และใน *V. vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วยทุกสายพันธุ์ (10/10) (ตารางที่ 11)

บริเวณ PRXII พบในกลุ่ม *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่ำกว่าเชื้อที่ก่อโรคในปลา ( $p$ -value = 0.035) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 12) โดยตรวจพบบริเวณ PRXII ร้อยละ 36 (15/41) และร้อยละ 80 (8/10) (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตามการตรวจพบยีน *nanA* และ

PRXII ใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและเชื้อที่ก่อโรคในปลาแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

### 3.3 ความสามารถในการหมักน้ำตาลแมนนิทอล

จากการศึกษาพบว่า *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ที่จัดเป็น *vcg-C* type สามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอลได้ร้อยละ 90 (56/62) อย่างไรก็ตามพบว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 5 สายพันธุ์ ไม่สามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอลได้ โดยผลการหมักน้ำตาลแมนนิทอลให้ผลสอดคล้องกับการปรากฏยีน *manIIA* (ตารางที่ 11)

### 3.4 ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง

จากการทดสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของคน โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ของ *V. vulnificus* ในแต่ละกลุ่ม เมื่ออาศัยการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ *V. vulnificus* ในแต่ละกลุ่มแสดงความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value = 0.003) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของคนโดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ *V. vulnificus* ในแต่ละกลุ่มพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value = 0.048) (รูปที่ 12) โดยพบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์จากเชื้อกลุ่มที่แยกจากสิ่งแวดล้อมมีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงร้อยละ 68 (28/41) ขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์จากเชื้อกลุ่มที่แยกได้จากผู้ป่วยทุกสายพันธุ์สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเซลล์จากเชื้อในกลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและเชื้อก่อโรคในปลามีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

จากการทดสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของคน โดยใช้ตัวเซลล์ *V. vulnificus* พบว่า เซลล์แต่ละกลุ่มมีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value = 0.000) (ตารางที่ 11) โดยเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงโดยตัวเซลล์แต่ละกลุ่มพบว่า เชื้อในกลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ต่ำกว่าเชื้อที่ก่อโรคในปลา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value = 0.001) (รูปที่ 12) โดยเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมสามารถสลายเม็ดเลือดแดงร้อยละ 44 ขณะที่เชื้อที่ก่อโรคในปลาทุกสายพันธุ์สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ นอกจากนี้พบการสลายเม็ดเลือดแดงในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยต่ำกว่าเชื้อที่ก่อโรคในปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value = 0.010) (รูปที่ 12) ซึ่งเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้เพียงร้อยละ 20 นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อในกลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

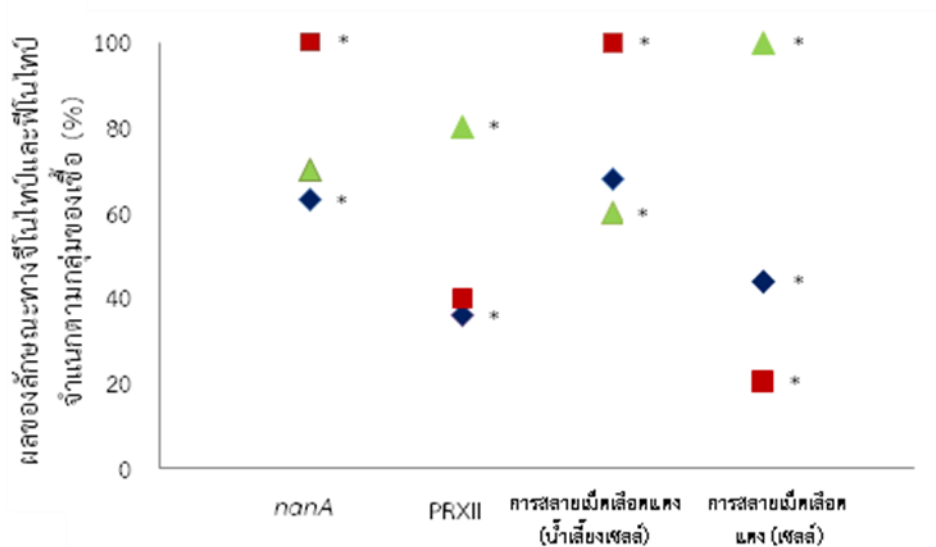
### 3.5 ความทนต่อเซรุ่ม

จากการศึกษาพบว่า *V. vulnificus* *vcg-C* type ร้อยละ 92 (57/62) ทนต่อเซรุ่ม (เจริญได้ในเซรุ่ม 60-80 %) ร้อยละ 2 (1/62) ทนต่อเซรุ่มปานกลาง (เจริญได้ในเซรุ่ม 20-40 %) และร้อยละ 5 (3/62) ไวต่อเซรุ่ม (เจริญได้ในเซรุ่ม 0-10 %) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ลักษณะการแสดงออกทางจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และเชื้อก่อโรคในปลา

แหล่งที่แยก	ไบโอไทป์		จีโนมไทป์							ฟีโนไทป์						
	vcg type		<i>manIIA</i>	<i>nanA</i>	<i>nab</i>		PRXII	ความสามารถในการหมักน้ำตาลแมนนิทอล	การสลายเม็ดเลือดแดง		ความทนต่อเซรุ่ม					
	1	2			C	E			CM-like	YJ-like	น้ำเลี้ยงเซลล์	เซลล์	Sen	Int	Res	
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
สิ่งแวดล้อม (n = 41 สายพันธุ์)	39 (95)	2 (5)	41 (100)	0	36 (88)	26 (63)	1 (2)	27 (66)	15 (36)	36 (88)	28 (68)	18 (44)	3 (7)	1 (2)	37 (90)	
ผู้ป่วย (n = 10 สายพันธุ์)	10 (100)	0	10 (100)	0	10 (100)	10 (100)	1 (10)	5 (50)	4 (40)	10 (100)	10 (100)	2 (20)	0	0	10 (100)	
ก่อโรคในปลา (n = 10 สายพันธุ์)	10 (100)	0	10 (100)	0	10 (100)	7 (70)	0	6 (60)	8 (80)	10 (100)	6 (60)	10 (100)	0	0	10 (100)	





รูปที่ 12 ลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* แต่ละกลุ่ม ให้ (◆) แทน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (■) แทน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (▲) แทน *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลา

\*การตรวจพบลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในแต่ละกลุ่มของ *V. vulnificus* ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

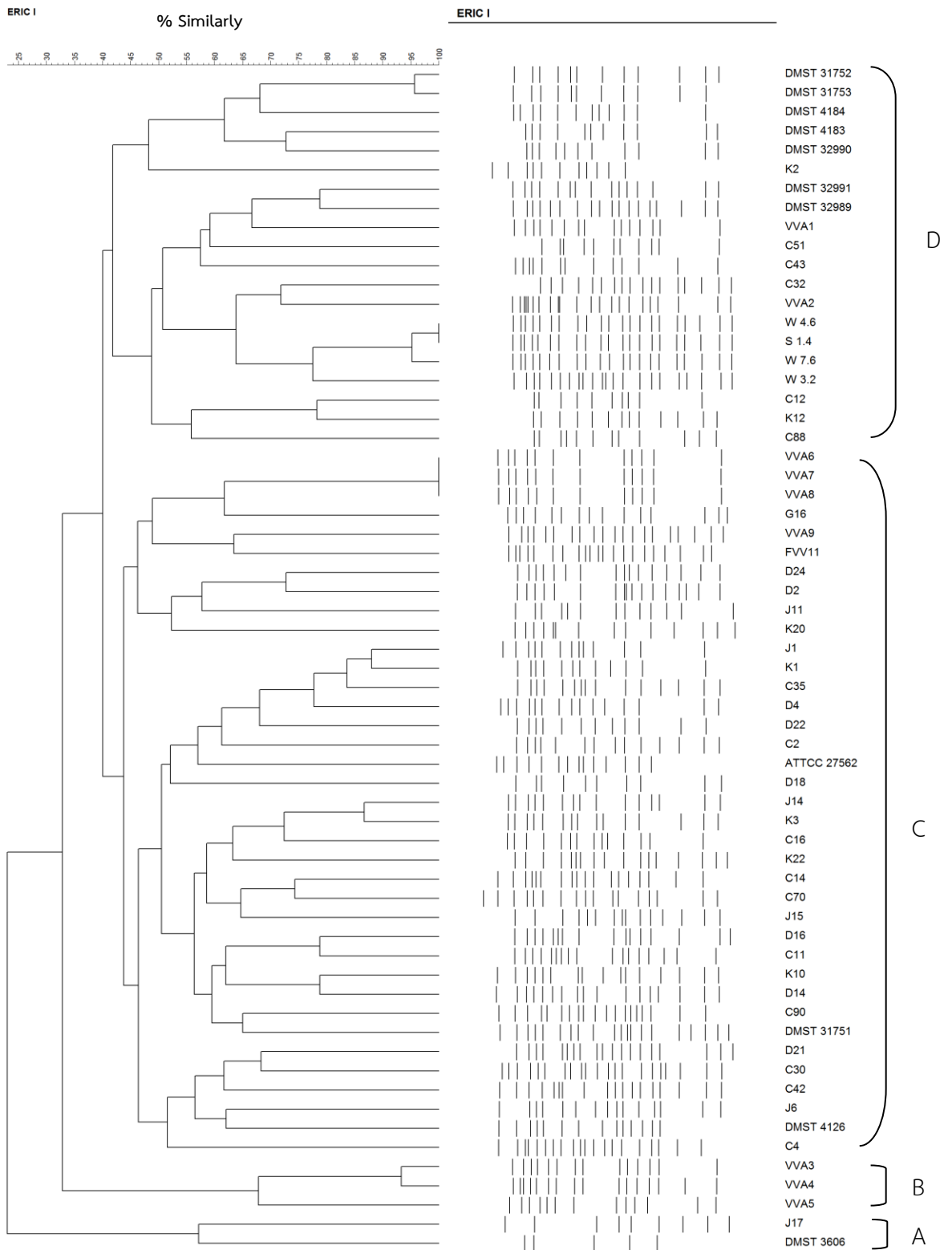
### 3.6 การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* โดยใช้เทคนิค ERIC-PCR

จากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* ทั้งหมด 62 สายพันธุ์ สามารถจัดกลุ่มเชื้อจากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวน 4 กลุ่ม ได้แก่ A, B, C, และ D (รูปที่-13) โดยกลุ่ม A ประกอบด้วย *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (1/2) และสิ่งแวดล้อม (1/2) ร้อยละ 50 ตามลำดับ กลุ่ม B ประกอบด้วย *V. vulnificus* ก่อโรคในปลาจำนวน 3 ไอโซเลท กลุ่ม C ประกอบด้วย *V. vulnificus* ATCC 27562 *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมร้อยละ 78 (29/37) เชื้อที่ก่อโรคในปลาร้อยละ 13 (5/37) และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยร้อยละ 5 (2/37) และกลุ่ม D ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมร้อยละ 55 (11/20) ผู้ป่วยร้อยละ 35 (7/20) และเชื้อที่ก่อโรคในปลาร้อยละ 10 (2/20) (รูปที่ 13)

เมื่อพิจารณาแต่ละกลุ่มที่ได้จากวิธี ERIC-PCR ร่วมกับลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ โดยอาศัยการวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าเชื้อแต่ละกลุ่มมีลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ที่หลากหลาย และไม่สามารถนำไปเชื่อมโยงกับแต่ละกลุ่มของ ERIC-PCR อย่างไรก็ตามกลุ่ม C พบว่าประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ( $p$ -value = 0.000) และเชื้อก่อโรคในปลา ( $p$ -value = 0.000) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่ม D ประกอบด้วยเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมสูงกว่าเชื้อที่ก่อโรคในปลา ( $p$ -value=0.006) อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ โดยพบการแสดงออกของ PRXII ของทั้งสองกลุ่มเพียงร้อยละ 38 (14/37) และร้อยละ 55 (11/20) ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* สายพันธุ์ S 1.4 และ W 4.6 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน และเชื้อ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6, VVA7 และ VVA8 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเดนโดรแกรมของ *V. vulnificus* ทั้งหมด 62 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค ERIC-PCR (A-D แสดงกลุ่มที่จัดได้)

ตารางที่ 12 แสดงการจัดกลุ่มด้วยวิธี ERIC-PCR ลักษณะทางจีโนมไทป์ และฟีโนไทป์

กลุ่ม	<i>V. vulnificus</i> แยกตามแหล่งที่ได้รับ	ลักษณะทางจีโนมไทป์				ลักษณะทางฟีโนไทป์				
		PRXII	<i>nanA</i>	nab		การสลายเม็ดเลือดแดง		ความทนต่อเซรุ่ม		
				YJ-like	CM-like	น้ำเลี้ยงเซลล์	เซลล์	sen	Int	res
A (n = 2)	สิ่งแวดล้อม (n = 1)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	ผู้ป่วย (n = 1)									
B (n = 3)	ก่อโรคในปลา (n = 3)	2 (67)	3 (100)	1 (33)	0 (0)	1 (33)	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562										
C (n = 37)	สิ่งแวดล้อม (n = 29)	14 (38)	25 (67)	23 (62)	0 (0)	27 (73)	18 (49)	37 (100)	0 (0)	0 (0)
	ผู้ป่วย (n = 2)									
	ก่อโรคในปลา (n = 5)									
D (n = 20)	สิ่งแวดล้อม (n = 11)	11 (55)	15 (75)	11 (55)	2 (10)	15 (75)	9 (45)	16 (80)	1 (5)	3 (15)
	ผู้ป่วย (n = 7)									
	ก่อโรคในปลา (n = 2)									

### 3.7 ความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* ในหนอนผีเสื้อ *Galleria mellonella*

การศึกษาค้นคว้าคัดเลือก *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในปลาเก๋าเสือ ซึ่งได้รับการยืนยันความสามารถในการก่อโรคจากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง จังหวัดสงขลา อย่างไรก็ตามการใช้ปลาเก๋าเสืออาจมีข้อจำกัดสูงในการศึกษาเนื่องจากมีราคาแพงและหาได้ยาก ปัจจุบันมีความพยายามในการใช้หนอนผีเสื้อเพื่อตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียหลายกลุ่ม (Desbois and Coote, 2012) ดังนั้นการครั้งนี้จึงเลือกใช้โมเดลหนอนผีเสื้อเพื่อตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่ได้รับการยืนยันความสามารถในการก่อโรคในปลาเก๋าเสือ จากการรายงานพบว่า *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงสุด เนื่องจากทำให้ปลาเก๋าเสือตายภายใน 5 วัน เมื่อได้รับเชื้อปริมาณ  $10^6$  CFU/ml ผ่านทางช่องท้อง (Thawonsuwan *et al.*, 2016) จากรายงานดังกล่าวจึงเลือกปริมาณ *V. vulnificus* ที่ใช้ทดสอบอยู่ในช่วง  $10^2, 10^3, \dots, 10^7$  CFU/ml โดยการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคเบื้องต้นจะเลือก *V. vulnificus* ที่ทำให้ปลาเก๋าเสือป่วยแต่ไม่ตาย และสายพันธุ์ที่ทำให้ปลาเก๋าเสือตาย ได้แก่ สายพันธุ์ VVA1 และ VVA6 จากการศึกษาพบว่า *V. vulnificus* ทั้งสองสายพันธุ์ ทำให้หนอนผีเสื้อเกิดการติดเชื้อและสังเกตเห็นการสร้างเม็ดสี (melanization) โดยเชื้อสายพันธุ์ VVA6 ไม่พบการรอดชีวิตของหนอนตั้งแต่ 24 ชั่วโมง เมื่อได้รับเชื้อปริมาณ  $1.8 \times 10^2, 2.6 \times 10^3, \dots, 2.5 \times 10^7$  CFU/ml แต่เมื่อหนอนผีเสื้อได้รับเชื้อสายพันธุ์ VVA1 ปริมาณ  $2.3 \times 10^2$  และ  $6.9 \times 10^3$  CFU/ml ไม่พบการตายของหนอนผีเสื้อ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเป็น  $4.5 \times 10^4, 2.1 \times 10^5, 2.2 \times 10^6$  และ  $2.3 \times 10^7$  CFU/ml พบการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อลดลงเหลือร้อยละ 87, 13, 3, และ 3 ที่ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 13) จากผลดังกล่าวพบว่าการตายของหนอนผีเสื้อขึ้นอยู่กับปริมาณและสายพันธุ์ของ *V. vulnificus* ที่ได้รับ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณเชื้อที่  $10^1, 10^2$ , และ  $10^3$  CFU/ml สำหรับตรวจสอบความรุนแรงของ *V. vulnificus* สายพันธุ์อื่น ๆ ในหนอนผีเสื้อ

จากการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคในหนอนผีเสื้อของ *V. vulnificus* จำนวน 10 สายพันธุ์ โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง การรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อ (ร้อยละ) และเวลา (ชั่วโมง) โดยพิจารณาที่ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิต (median survival time) ซึ่งหมายถึงเวลาที่ทำให้การอยู่รอดของหนอนผีเสื้อเท่ากับร้อยละ 50

พบว่าเมื่อหนอนผีเสื้อได้รับเชื้อสายพันธุ์ VVA9, VVA8, VVA6, และ VVA5 ปริมาณ 10 CFU/ml ที่ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิต 24 ชั่วโมง (รูปที่ 14A) พบอัตราการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อร้อยละ 26.7, 30, 33.3, และ 36.7 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA3 มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อ 48 ชั่วโมง โดยมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 46.7

เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อของแต่ละสายพันธุ์เป็น 100 CFU/ml พบเชื้อจำนวน 5 สายพันธุ์ ให้ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อ 24 ชั่วโมง ได้แก่สายพันธุ์ VVA6, VVA8, VVA5, VVA9 และ VVA3 (รูปที่ 14B) มีอัตราการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ VVA5,

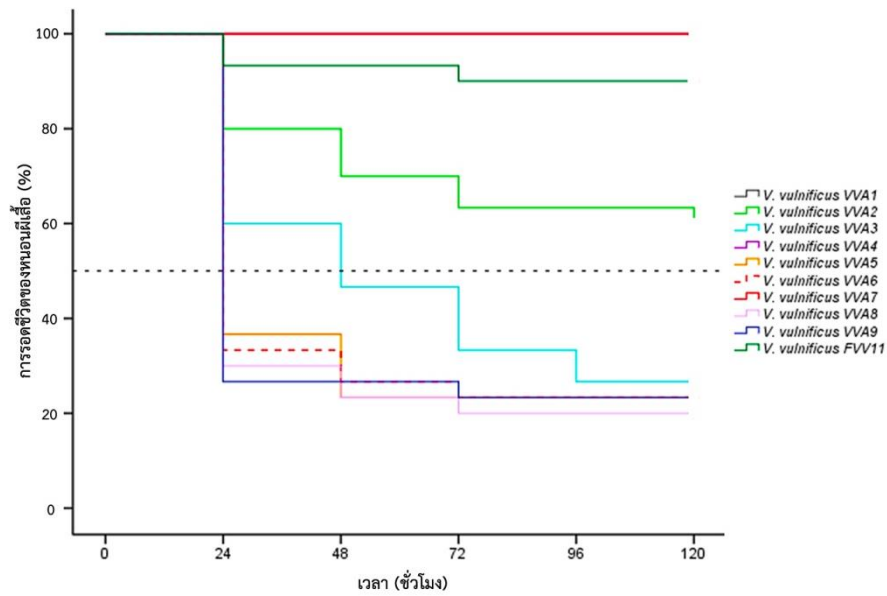
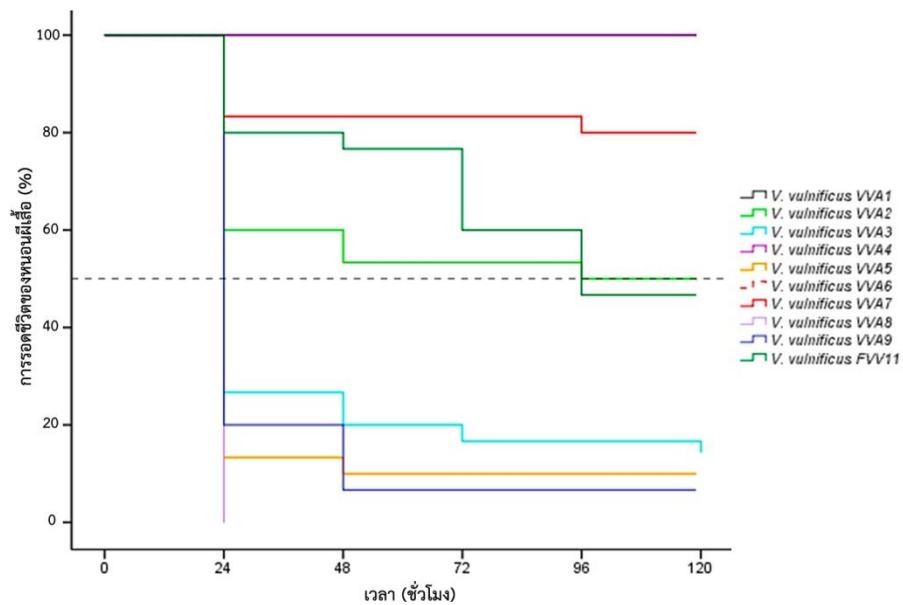
VVA9 และ VVA3 เป็นร้อยละ 13.3, 20, และ 26.7 ตามลำดับ โดยเชื้อสายพันธุ์ VVA6 และ VVA8 ไม่พบการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อ

เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแต่ละสายพันธุ์เป็น 1000 CFU/ml พบว่าเชื้อจำนวน 8 สายพันธุ์ ให้ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อ 24 ชั่วโมง โดยเชื้อสายพันธุ์ VVA2 และ VVA7 มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 3.3 และ 36.7 ตามลำดับ แต่ไม่พบอัตราการรอดชีวิตของหนอนผีเสื้อในเชื้อสายพันธุ์ VVA3, VVA5, VVA6, VVA8, VVA9, และ FWV11 (รูปที่ 14C)

จากการประเมินผลของปริมาณ *V. vulnificus* ที่ทำให้เกิดการตายของหนอนผีเสื้อร้อยละ 50 (LD<sub>50</sub>) พบว่าเมื่อหนอนผีเสื้อได้รับ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6, VVA8, VVA5, VVA9 VVA3, และ VVA2 ปริมาณ 100 CFU/ml ทำให้เกิดการตายของหนอนต่ำกว่าร้อยละ 50 (รูปที่ 14B)

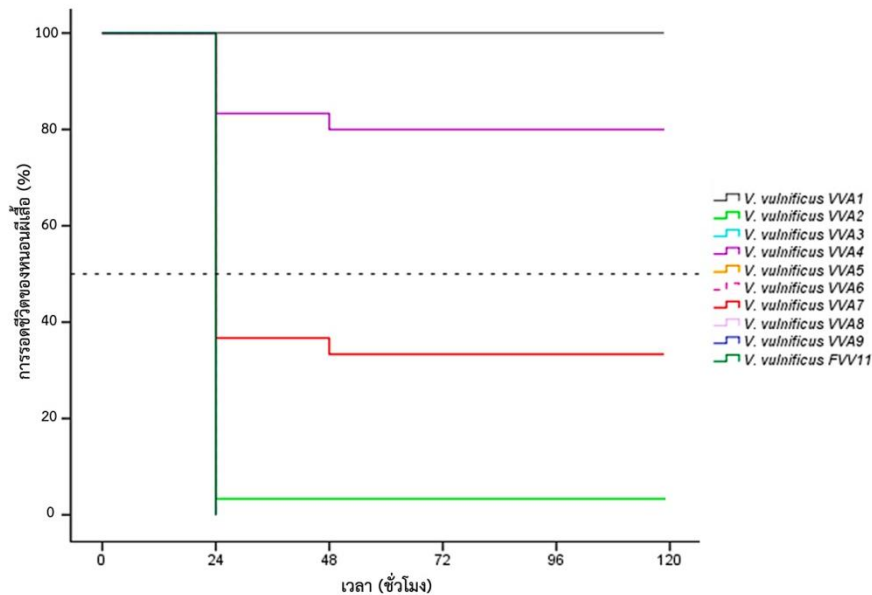
**ตารางที่ 13** ผลการทดสอบความรุนแรงของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA1 และสายพันธุ์ VVA6 เบื้องต้นในหนอนผีเสื้อ

แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียที่ใช้ (CFU/mL)	จำนวนหนอนผีเสื้อที่รอดชีวิต (%)				
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	120 ชั่วโมง
<i>V. vulnificus</i> VVA1	$2.3 \times 10^7$	3	3	3	3	3
	$2.2 \times 10^6$	13	10	10	7	3
	$2.1 \times 10^5$	30	30	13	13	13
	$4.5 \times 10^4$	90	87	87	87	87
	$6.9 \times 10^3$	100	100	100	100	100
	$2.3 \times 10^2$	100	100	100	100	100
<i>V. vulnificus</i> VVA6	$2.5 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	$4.5 \times 10^6$	0	0	0	0	0
	$3.1 \times 10^5$	0	0	0	0	0
	$6.0 \times 10^4$	0	0	0	0	0
	$2.6 \times 10^3$	0	0	0	0	0
	$1.8 \times 10^2$	0	0	0	0	0

A. *V. vulnificus* ( $10^1$  CFU/ml)B. *V. vulnificus* ( $10^2$  CFU/ml)

รูปที่ 14 Kaplan-Meier กราฟ แสดงการรอดชีวิตใน 120 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ *V. vulnificus* จำแนกตามชนิดของเชื้อ

*C. V. vulnificus* ( $10^3$  CFU/ml)

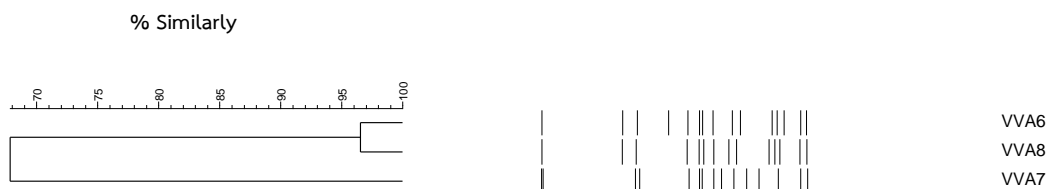


รูปที่ 14 Kaplan-Meier กราฟ แสดงการรอดชีวิตใน 120 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ *V. vulnificus* จำแนกตามชนิดของเชื้อ (ต่อ)

### 3.8 การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

เนื่องจาก *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6, VVA7 และ VVA8 มีผลการตรวจสอบลักษณะทางจีโนมไทป์และพีโนมไทป์ที่เหมือนกัน นอกจากนั้นยังให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกันเมื่อใช้เทคนิค ERIC-PCR (รูปที่ 13) จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อกลุ่มนี้ได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยด้วยเทคนิค PFGE พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ได้ โดยสายพันธุ์ VVA6 และ VVA8 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันร้อยละ 96.5 และเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกับ VVA7 ร้อยละ 68 (รูปที่ 15 )

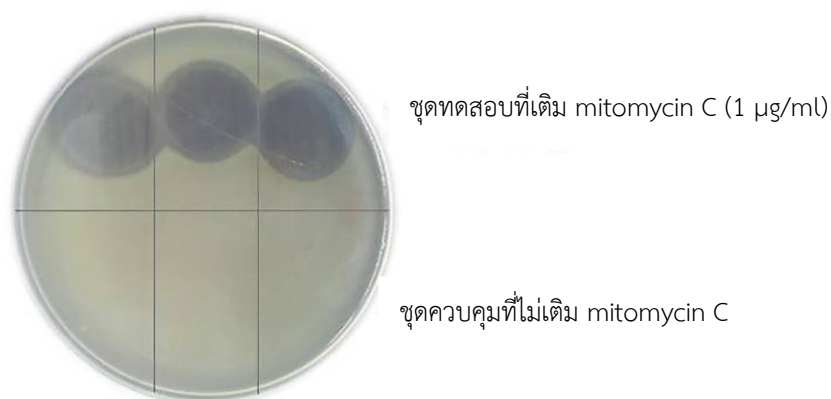




รูปที่ 15 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเดนโตรแกรมของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6, VVA7 และ VVA8 ด้วยเทคนิค PFGE

### 3.9 การแยกแบคทีเรียโอฟาจและหาปริมาณแบคทีเรียโอฟาจ

จากการตรวจสอบโอฟาจใน *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์มีการแทรกของสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ (รูปที่ 16) จากนั้นทำการแยกแบคทีเรียโอฟาจโดยใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 และสายพันธุ์ VVA6 เป็นโฮสต์ จากตัวอย่างหอยแครง หอยแมลงภู่ และกุ้ง สามารถแยกแบคทีเรียโอฟาจได้จำนวน 333 ไอโซเลท ให้ขนาดของพลาคล์อยู่ระหว่าง 0.01-0.23 mm และมีปริมาณแบคทีเรียโอฟาจอยู่ระหว่าง  $10^7$ - $10^{12}$  PFU/ml

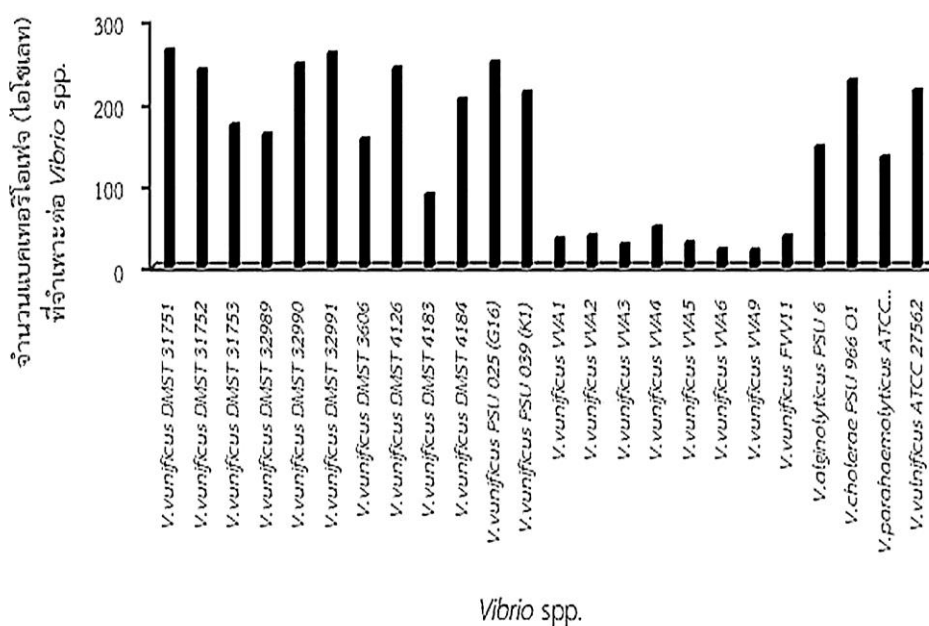


รูปที่ 16 การตรวจสอบโอฟาจใน *V. vulnificus* โดยการเหนี่ยวนำด้วย mitomycin C (1 µg/ml)

### 3.10 การตรวจสอบความจำเพาะของแบคทีเรียโอฟาจต่อ *Vibrio* spp.

นำแบคทีเรียโอฟาจจำนวน 333 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio* spp. พบว่าแบคทีเรียโอฟาจส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย,

*V. vulnificus* ไบโอดีป 2, *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU 966 O1, *V. alginolyticus* สายพันธุ์ PSU 6, *V. parahaemolyticus* ATCC 17808 และ *V. vulnificus* ก่อโรคในปลา ตามลำดับ (รูปที่ 17) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียโอเฟจจำนวน 4 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย แบคทีเรียโอเฟจจำนวน 174 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ของไบโอดีป 2 แบคทีเรียโอเฟจจำนวน 25 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *V. alginolyticus* สายพันธุ์ PSU 6, *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU 966 O1 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17808 แต่อย่างไรก็ตามไม่พบแบคทีเรียโอเฟจที่ยับยั้ง *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ที่ก่อโรคในปลา จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจ โดยพิจารณาจากความสามารถในการยับยั้ง *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลาเก้าสายได้หลายสายพันธุ์ ปริมาณแบคทีเรียโอเฟจภายหลังการเพิ่มจำนวน และขนาดของพลาทส์มากกว่า 0.15 mm สามารถคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจได้จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ MC20915, BD11015, BD41015, BD51015 และ BD61015



รูปที่ 17 แสดงจำนวนแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp.

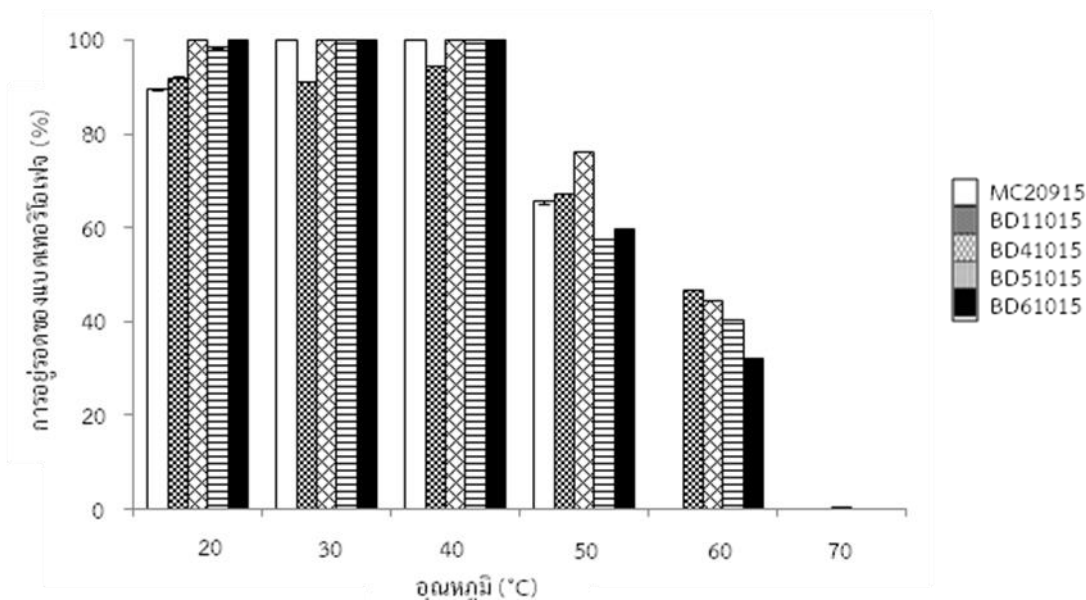
### 3.11 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแบคทีเรียโอเฟจ

นำแบคทีเรียโอเฟจ 5 ไอโซเลท มาบ่มที่อุณหภูมิ 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C และ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความอยู่รอดในอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิ 20°C-40°C โดย BD41015 และ BD61015 สามารถอยู่รอดได้ร้อยละ 100, MC20915 อยู่รอดที่อุณหภูมิ 20°C ได้ร้อยละ 90 ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ได้ร้อยละ 100 แต่ไม่สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 60°C, BD11015 อยู่รอดได้ประมาณ

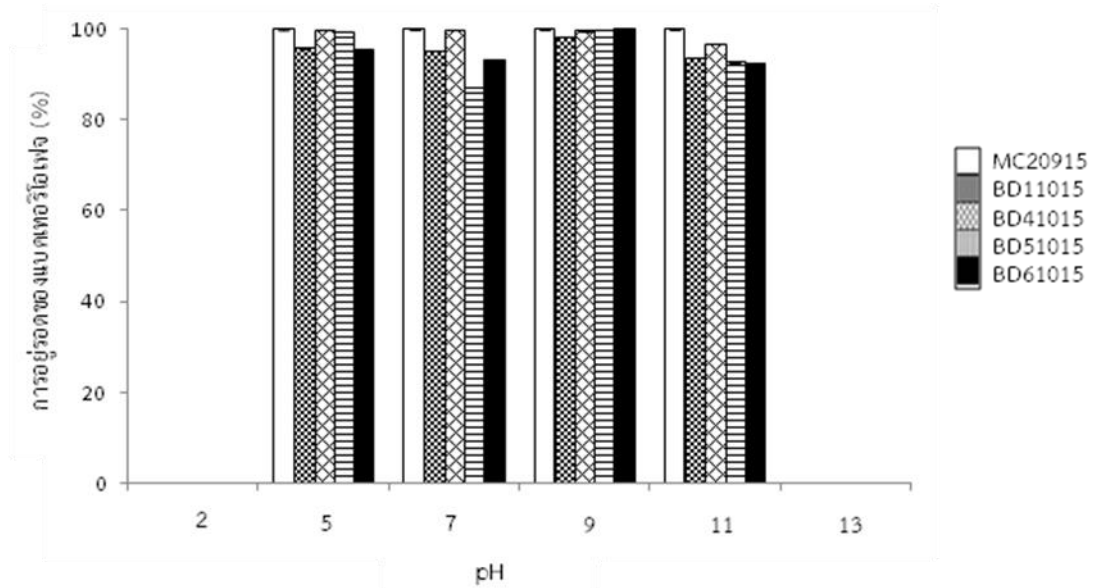
ร้อยละ 91-97 ในช่วงอุณหภูมิ 20°C-40°C, BD51015 อยู่รอดที่อุณหภูมิ 20°C ได้ประมาณร้อยละ 98 ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ได้ร้อยละ 100 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50°C-60°C พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท อยู่รอดได้น้อยกว่าร้อยละ 75 และไม่สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 70°C (รูปที่ 18)

เมื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลทใน SM บัฟเฟอร์ที่ปรับกรดต่างเท่ากับ 2, 5, 7, 9, 11 และ 13 พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทุกไอโซเลทสามารถอยู่รอดมากกว่าร้อยละ 80 ในช่วงกรดต่าง 5-11 แต่อย่างไรก็ตามที่กรดต่าง 2 และ 13 พบว่าไม่มีแบคทีเรียโอเฟจสามารถอยู่รอด (รูปที่ 19)

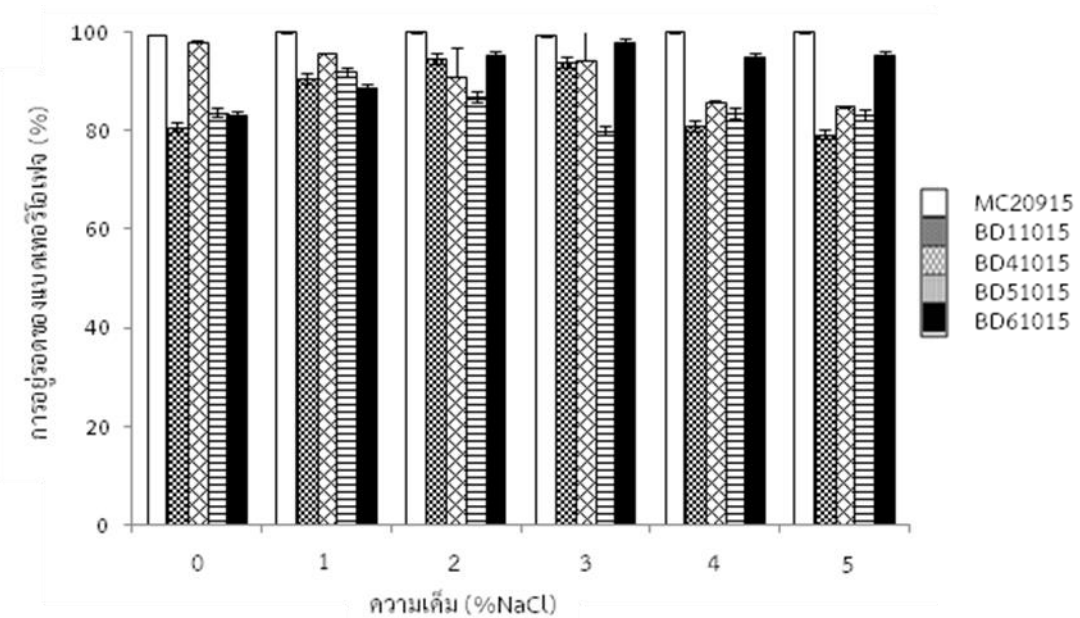
เมื่อทดสอบความอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจในสถานะที่มีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน SM บัฟเฟอร์ พบว่า MC20915 สามารถอยู่รอดได้ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0-5, BD61015 อยู่รอดได้ประมาณร้อยละ 90-97 ในช่วงความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1-5, BD41015 อยู่รอดได้ประมาณร้อยละ 91-99 ในช่วงความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0-3 BD11015 อยู่รอดได้ประมาณร้อยละ 90-95 ในช่วงความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1-3 และ BD51015 อยู่รอดได้ประมาณร้อยละ 80-90 ในช่วงความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0-5 (รูปที่ 20) จากผลศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท ในช่วงอุณหภูมิ pH และความเค็มที่กว้าง



รูปที่ 18 ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจในอุณหภูมิต่าง ๆ



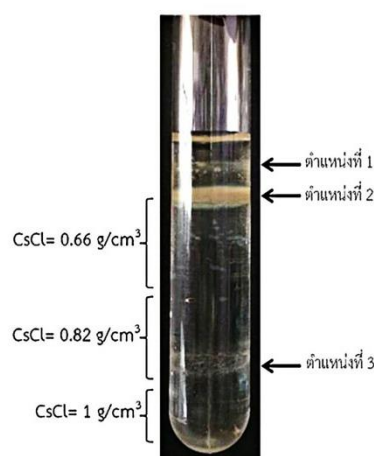
รูปที่ 19 ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียไอเฟจใน pH ต่างๆ



รูปที่ 20 ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียไอเฟจในความเข้มข้น NaCl ต่างๆ

### 3.11 การทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl gradient ultracentrifugation

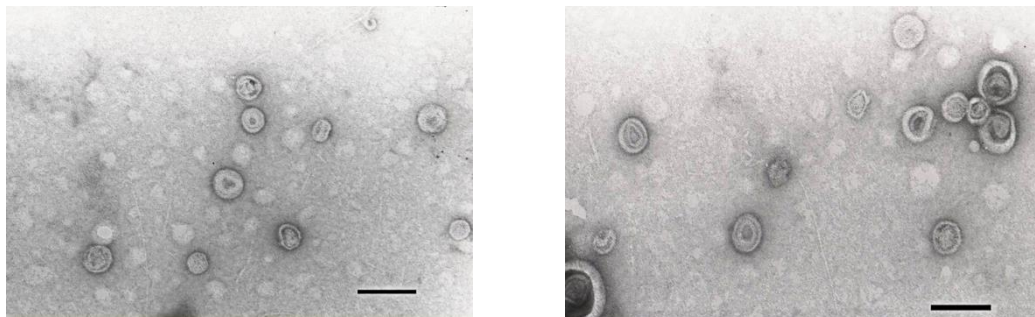
จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลทให้แบนอย่างน้อย 2 แถบ หลังจากปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูง (รูปที่ 21) แบคทีเรียโอเฟจถูกเก็บจากแถบตำแหน่งที่ 2 โดย 2 นำไปทดสอบการติดเชื้อกับโฮสต์ด้วยวิธี drop plate หลังจากนั้นกำจัด CsCl ออกด้วยวิธีไดอะไลซิส และเก็บแบคทีเรียโอเฟจที่ 4°C สำหรับการทดลองต่อไป



รูปที่ 21 การทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ ด้วยวิธี CsCl gradient ultracentrifugation

### 3.12 การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจ

คัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจจากการศึกษาความจำเพาะและความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะเครียดต่าง ๆ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจ 2 ไอโซเลท ได้แก่ MC20915 และ BD41015 จากนั้นนำแบคทีเรียโอเฟจที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl gradient ultracentrifugation แล้วนำมาศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 2 ไอโซเลทประกอบด้วย ส่วนหัวและไม่มีหาง โดยส่วนหัวของ MC20915 มีขนาด 60 nm และ BD41015 มีขนาด 63 nm (รูปที่ 22)

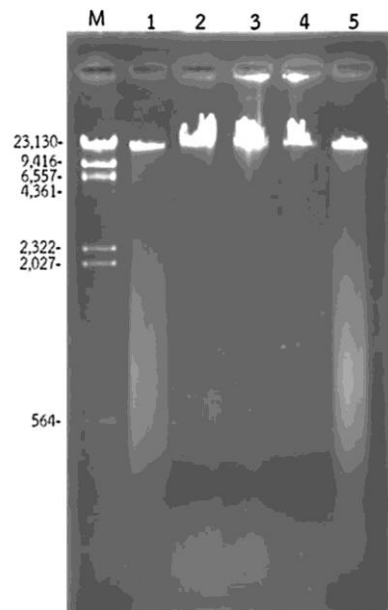


**รูปที่ 22** รูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

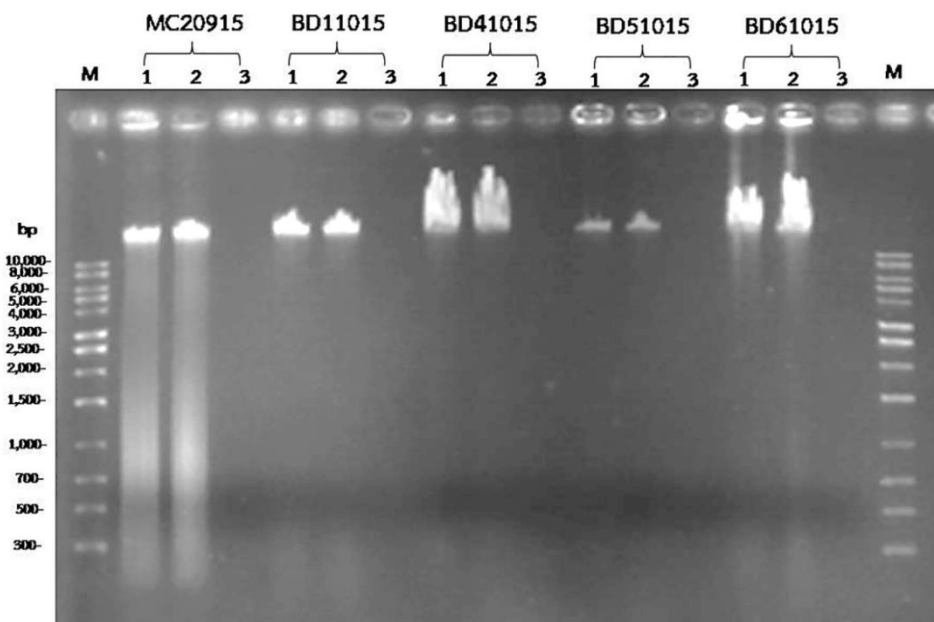
(A: MC 20915, B: BD 41015) (bar = 100 nm)

### 3.13 การตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจ

นำแบคทีเรียโอเฟจ 5 ไอโซเลท ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl gradient ultracentrifugation มาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าทุกไอโซเลทให้ขนาดมากกว่า 23 kb (รูปที่ 23) และมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ (รูปที่ 24) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *not* I แต่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A ประกอบด้วย MC20915 และ BD51015 กลุ่ม B ประกอบด้วย BD11015, BD41015 และ BD61015 (รูปที่ 25A) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I พบว่า MC20915 ไม่ถูกตัด แต่ BD11015, BD41015, BD51015 และ BD61015 ถูกตัดด้วย *EcoR* I และให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน (รูปที่ 25B)



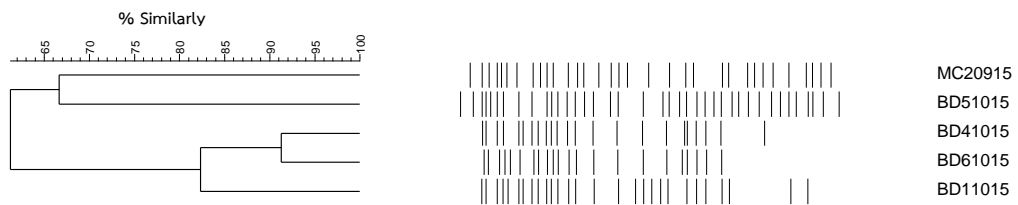
รูปที่ 23 แสดงขนาดดีเอ็นเอของแบคทีริโอเฟจ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แถว M = lambda *Hind* III ladder, แถว 1 = MC20915, แถว 2 = BD11015, แถว 3 = BD41015, แถว 4 = BD51015 และแถว 5 = BD61015



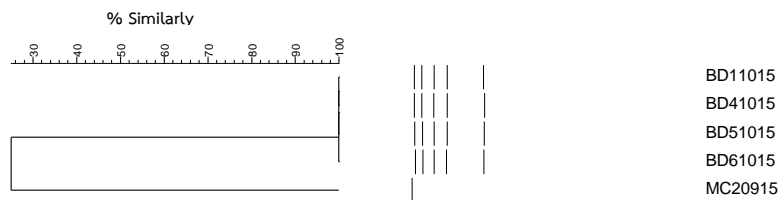
รูปที่ 24 แสดงชนิดสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ ด้วย DNase I และ RNaseA โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แถว M 1 kb ladder แถว 1 ดีเอ็นเอของแบคทีริโอเฟจที่ไม่ตัดด้วย DNase I และ

RNaseA แถว 2 ดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอฟาจที่ตัดด้วย RNaseA และแถว 3 ดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอฟาจที่ตัดด้วย DNase I

A



B



รูปที่ 25 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเดนโดรแกรมของแบคทีเรียโอฟาจ 5 ไอโซเลท ภายจากหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (A ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ B ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI)



## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *V. vulnificus* ก่อให้เกิดอัตราการตายสูง แม้ว่ามีรายงานการติดเชื้อน้อยก็ตาม รายงานการระบาดของเชื้อส่วนใหญ่พบบริเวณ Gulf Coast ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Penman *et al.*, 1995, Motes *et al.*, 1998, Shapiro *et al.*, 1998, Baizabal-Ramirez *et al.*, 2010) และในแถบเอเชีย (Hsueh *et al.*, 2004, Oishi *et al.*, 2006, Inoue *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2013) ปัญหาของเชื้อ *V. vulnificus* คือไม่มีตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ที่ชัดเจน สำหรับการระบุความรุนแรงของเชื้อ ปัจจุบันมีการศึกษาปัจจัยในการก่อโรคโดยใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่มีการยืนยันความรุนแรง (CMCP6, MO6-24/O และ YJ016) ซึ่งแยกได้ในประเทศเกาหลี สหรัฐอเมริกา และไต้หวัน ตามลำดับ (Wright *et al.*, 1990, Chen *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะและยีนต่างๆสำหรับใช้เพื่อระบุความรุนแรงของประชากรเชื้อที่พบในประเทศแถบเอเชียยังไม่ชัดเจน (Kim and Cho, 2015) จากการศึกษาของ Hoi และคณะพบว่า *V. vulnificus* ไปโอโทป์ 1 ส่วนใหญ่สามารถแยกได้จากสิ่งแวดล้อม ในขณะที่ไปโอโทป์ 2 แยกได้ในปริมาณที่น้อยกว่าหรือไม่พบ อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่ *V. vulnificus* ไปโอโทป์ 1 และ 2 ใช้ในการเจริญแตกต่างกัน (Hoi *et al.*, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เนื่องจาก *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมร้อยละ 95 (39/41) จัดเป็นไปโอโทป์ 1 และจัดเป็นไปโอโทป์ 2 เพียงร้อยละ 5 (2/41) ได้แก่ *V. vulnificus* สายพันธุ์ G16 และสายพันธุ์ K1

ในปี 2005 Rosche และคณะ ใช้ *vcg*-type สำหรับบอกลักษณะที่แยก *V. vulnificus* โดยพบว่าร้อยละ 90 ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจัดเป็น *vcg*-C type ขณะที่ร้อยละ 93 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจัดเป็น *vcg*-E type (Rosche *et al.*, 2005) การค้นพบนี้ชี้ไปในแนวทางที่เชื้อซึ่งเป็น *vcg*-C type ที่พบมากในผู้ป่วยติดเชื้อ น่าจะมีความรุนแรงมากกว่า *vcg*-E type ซึ่งพบได้บ่อยในเชื้อที่แยกจากธรรมชาติ ต่อมา มีรายงานการใช้ *vcg*-type เพื่อจัดกลุ่ม *V. vulnificus* ตามแหล่งที่แยก พบว่าไม่เป็นไปตามการรายงานของ Rosche และคณะ เช่น Warner และ Oliver ได้รายงานการจัดกลุ่ม *V. vulnificus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลใน eastern coast ของ North Carolina พบว่า *V. vulnificus* ร้อยละ 46.9 จัดเป็น *vcg*-E type และร้อยละ 53.1 จัดเป็น *vcg*-C type (Warner and Oliver, 2008) ในปี 2013 Yokochi และคณะ ศึกษาการกระจายของ *V. vulnificus* บริเวณทะเล Ariake ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าร้อยละ 91.4 จัดเป็น *vcg*-C type (Yokochi *et al.*, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เนื่องจาก *V. vulnificus* ที่แยกได้จาก

สิ่งแวดลอมทุกสายพันธุ์จัดเป็น *vcg-C type* นอกจากนี้พบว่า *V. vulnificus* *vcg-C type* ร้อยละ 90 สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Drake และคณะ (Drake *et al.*, 2010) การศึกษาโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสไฟโร (pyrosequencing) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งจีโนมของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง พบการแสดงออกของยีนที่จำเพาะกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย (clinical strains) ได้แก่ sialic acid catabolism, mannitol fermentation และส่วนประกอบของ type IV secretory pathway VirB4 (Morrison *et al.*, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lubin และคณะ ที่ทำการศึกษาลำดับเบสของ *V. vulnificus* สามสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (CMCP6, MO6-24/O และ YJ016) พบว่าทั้งสามสายพันธุ์มียีนควบคุมการสลาย sialic acid (ยีน *nanA*) นอกจากนี้ตรวจพบ *nanA* ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดลอม ร้อยละ 77.7 และ 42.5 ตามลำดับ (Lubin *et al.*, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากตรวจพบยีน *nanA* ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยทุกสายพันธุ์ ขณะที่เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดลอมตรวจพบได้น้อยกว่าคือ ร้อยละ 63

Nonulosonic acid (NulOs) เป็นโครงสร้างน้ำตาลที่พบได้ในโครงสร้างต่างๆ ของแบคทีเรีย เช่น capsule โดยการสร้าง NulOs เกิดจากยีน *nab* ซึ่งพบในแบคทีเรียวงศ์ *Vibrionaceae* หลายสายพันธุ์ (Lewis *et al.*, 2009) Lewis และคณะมีการตรวจสอบบริเวณยีน *nab* โดยใช้ลำดับเบสของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ CMCP6 (ไปโอโทป์ 1, ก่อโรคนคน) และ YJ016 (ไปโอโทป์ 1, ก่อโรคนสัตว์น้ำ) เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบ *nab1* และ *nab2* ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดยกำหนดให้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ CMCP6 และ YJ016 จัดเป็น CM-like allele และ YJ-like allele ตามลำดับ เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการแสดงออกของ CM-like และ YJ-like และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดลอมส่วนใหญ่มีการแสดงออกของ YJ-like (Lewis *et al.*, 2011) การศึกษาครั้งนี้ตรวจพบเชื้อที่มีการแสดงออกของ CM-like เพียง 2 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดลอม โดยเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดลอม เชื้อที่ก่อโรคนปลา และผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการแสดงออกของ YJ-like

จากการศึกษาของ Bier และคณะ เพื่อตรวจสอบ ยีน VVA1634 ของ pathogenicity region XII (PRXII) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดลอมมีการแสดงออกของ PRXII น้อยกว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย (Bier *et al.*, 2013) จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าเชื้อที่ก่อโรคนปลาส่วนใหญ่มีการแสดงออกของ PRXII และพบการแสดงออกดังกล่าวในเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดลอม

ดังนั้นจากการตรวจสอบลักษณะทางจีโนม *nanA* และ PRXII อาจใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพร่วมกันสำหรับบอกความรุนแรงของ *V. vulnificus* ได้

การระบาดวิทยามีการจำแนกชนิดของเชื้อโดยอาศัยรูปแบบทางสารพันธุกรรม เช่น การใช้เทคนิค Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) และ Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) เป็นต้น เทคนิค ERIC-PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงลำดับเบสที่ปรากฏซ้ำบริเวณ non-coding region (ERIC-sequences) (Versalovic

et al., 1991) มีการใช้เทคนิคดังกล่าวในการจัดกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก เช่น *Xanthomonas campestris*, *V. parahaemolyticus* และ *Streptococcus pneumoniae* เป็นต้น (Louws et al., 1994, Hermans et al., 1995, Marshall et al., 1999, Khan et al., 2002) จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เทคนิค ERIC-PCR จัดกลุ่ม *V. vulnificus* ได้ 4 กลุ่ม (A, B, C, และ D) โดยกลุ่ม A และ B มีจำนวนสมาชิกในกลุ่มน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 ขณะที่กลุ่ม C และ D สมาชิกส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม โดยพบจำนวนเชื้อกลุ่มดังกล่าวสูงกว่าเชื้อที่ก่อโรคในปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มจากเทคนิค ERIC-PCR ร่วมกับลักษณะทางจีโนมไทป์และ ฟิโนไทป์ พบว่าสมาชิกในแต่ละกลุ่มมีการแสดงออกลักษณะดังกล่าวหลากหลาย และแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเทคนิค ERIC-PCR ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6, VVA7, และ VVA8 เนื่องจากให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน เมื่อตรวจสอบลักษณะทางจีโนมไทป์และฟิโนไทป์ พบว่ามีการแสดงของยีน *manIIA* และ *PRXII* ทนต่อซีรัม สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้เมื่อทดสอบกับน้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ โดยเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ได้รับการยืนยันความสามารถในการก่อโรคในปลาเก๋าเสือ (Thawonsuwan et al., 2016) ต่อมาจึงเลือกใช้เทคนิค PFGE เพื่อศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ได้ โดยเชื้อสายพันธุ์ VVA6 และ VVA8 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอความเหมือนกันร้อยละ 96.5 นอกจากนี้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถถูกทำให้ติดเชื้อมากขึ้นของแบคทีเรียโอเฟจเดียวกัน และมีระดับความรุนแรงในการก่อโรคในหนอนผีเสื้อเท่ากัน ซึ่งแตกต่างอย่างสิ้นเชิงเมื่อเทียบกับ VVA7

ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงอย่างหนึ่งในการก่อโรคของ *V. vulnificus* คือความสามารถในการผลิตสาร hemolysin ที่ทำให้เมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (Johnson and Calia, 1981, Yamanaka et al., 1987, Chae et al., 1996) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและปลาติดเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ที่น่าประหลาดใจคือตัวเซลล์ของ *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลาทุกสายพันธุ์สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก แต่เมื่อทดสอบกับน้ำเลี้ยงเซลล์พบการสลายเม็ดเลือดแดงเพียงร้อยละ 60 นอกจากนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้าง capsular polysaccharide (CPS) และความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* (Yoshida et al., 1985, Gulig et al., 2005, Jones and Oliver, 2009) จากรายงานของ Simpson และคณะ พบว่า *V. vulnificus* ที่สร้างขึ้น CPS หนาให้ค่า LD<sub>50</sub> ในหนูน้อยกว่า *V. vulnificus* ที่สร้างขึ้น CPS บาง และ *V. vulnificus* ที่ไม่สร้างขึ้น CPS จะมีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่าหรือไม่มี (Simpson et al., 1987, Wright et al., 1990) นอกจากนี้มีรายงานการตรวจสอบ *V. vulnificus* *vcg*-C และ *vcg*-E type ที่สร้าง CPS ทำให้เชื้อทนต่อเซรัมเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม *V. vulnificus* *vcg*-E type ทนต่อเซรัมน้อยกว่า *V. vulnificus* *vcg*-C type (Bogard and Oliver, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เนื่องจาก *V. vulnificus* *vcg*-C ร้อยละ 92 ทนต่อเซรัม

การใช้หนอนผีเสื้อ *Galleria mellonella* ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียเพื่อเป็นทางเลือกใหม่แทนการใช้สัตว์ทดลองอื่น ๆ ตามหลักการของ 3Rs

(Schaeck *et al.*, 2013) เป็นการลดค่าใช้จ่ายและความต้องการโครงสร้างพื้นฐาน หรือความไม่สะดวกในการศึกษาการติดเชื้อในสัตว์น้ำ (Chamilos *et al.*, 2007, Desbois and Coote, 2012) เนื่องจากหอนอนผีเสื้อเป็นโมเดลที่ง่ายและทำให้เกิดการติดเชื้อภายในหอนอนผีเสื้อได้ (Norville *et al.*, 2014, McMillan *et al.*, 2015) นอกจากนี้มีรายงานการใช้หอนอนผีเสื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรีย ได้แก่ *V. anguillarum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Francisella tularensis* และ *Legionella pneumophila* เป็นต้น (Champion *et al.*, 2010, Wand *et al.*, 2011, Harding *et al.*, 2012, McMillan *et al.*, 2015) เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้โมเดลสัตว์ทดลองสำหรับเชื้อ *V. vulnificus* ในระยะเริ่มต้น จึงตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* จำนวน 10 สายพันธุ์ในหอนอนผีเสื้อ ซึ่งเชื้อดังกล่าวได้รับการยืนยันความสามารถในการก่อโรคในปลาเก๋าเสือ (Thawonsuwan *et al.*, 2016) พบว่า *V. vulnificus* ทำให้หอนอนผีเสื้อเกิดการติดเชื้อและสังเกตเห็นการสร้างเม็ดสี (melanization) โดย *V. vulnificus* มีความรุนแรงในการก่อโรคในหอนอนผีเสื้อสูงเมื่อเทียบกับปลาเก๋าเสือ เนื่องจากเมื่อหอนอนผีเสื้อได้รับเชื้อปริมาณ  $10^2$  CFU/ml (VVA6 และ VVA8) ไม่พบการรอดชีวิตของหอนอนผีเสื้อตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมง แต่จากการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 ในปลาเก๋าเสือ พบว่าต้องให้เชื้อปริมาณสูงถึง  $10^6$  CFU/ml ถึงจะทำให้ปลาเก๋าเสือตายภายในเวลา 120 ชั่วโมง (Thawonsuwan *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 ในปลาเก๋าเสือและหอนอนผีเสื้อให้ผลสอดคล้องกัน เช่นเดียวกับการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Streptococcus* Group A ในหอนอนผีเสื้อเปรียบเทียบกับหนูทดลอง (Jander *et al.*, 2000, Olsen *et al.*, 2011) จากการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ *V. vulnificus* ในหอนอนผีเสื้อ พบว่าสายพันธุ์ VVA6, VVA8, VVA5 และ VVA9 มีความรุนแรงในการก่อโรคตามลำดับ โดยทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการแสดงออกของ PRXII สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้เมื่อทดสอบกับตัวเซลล์และทนต่อเซรุ่ม

ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมการติดเชื้อ *V. vulnificus* (Chiang and Chuang, 2003, Chen *et al.*, 2012) ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ก่อให้เชื้อดังกล่าวเริ่มดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Baker-Austin *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2011, Elmahdi *et al.*, 2016) ดังนั้นการพัฒนากลยุทธ์ใหม่เพื่อควบคุม *V. vulnificus* จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น แบคทีเรียโอเฟจชนิด lytic เป็นอีกกลยุทธ์ที่น่าสนใจ เนื่องจากแบคทีเรียโอเฟจสามารถใช้แบคทีเรียเป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวนลูกหลาน และปลดปล่อยลูกหลานโดยการทำให้แบคทีเรียแตก คุณสมบัตินี้เป็นลักษณะที่มีประโยชน์สำหรับกำจัดแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรียโอเฟจยังมีความจำเพาะในการบุกรุกแบคทีเรียสูง ไม่ทำลายแบคทีเรียประจำถิ่น (Sulakvelidze *et al.*, 2001, Calendar, 2006) ด้านอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์มีการพิจารณาและนำแบคทีเรียโอเฟจมาใช้ควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ (Nakai and Park, 2002, Park and Nakai, 2003, Karunasagar *et al.*, 2007, Verner-Jeffreys *et al.*, 2007, Higuera *et al.*, 2013, Martinez Diaz and Hipolito Morales, 2013)

การคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจโดยอาศัย *V. vulnificus* สองสายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกได้จาก *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 ให้ขนาด plaque เล็ก ( $< 0.08$  mm) ขณะที่แบคทีเรียโอเฟจที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 เป็นโฮสต์ ให้ขนาด plaque ขนาดใหญ่ ( $\leq 0.23$  mm) และทุกชนิดสามารถเกิดการติดเชื้อมีกับ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและเชื้อที่ก่อโรคในปลา ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจเบื้องต้นจะอาศัยขนาดของ plaque จำนวนและชนิดของ *V. vulnificus* ที่เกิดการติดเชื้อ จากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจจำนวน 5 ไอโซเลท

เมื่อพิจารณาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโอเฟจ ได้แก่ อุณหภูมิ pH และความเค็ม แบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท อยู่รอดในช่วงอุณหภูมิ  $20^{\circ}\text{C}$ - $40^{\circ}\text{C}$  และ pH 5-11 นอกจากนี้พบว่า MC20915 และ BD41025 สามารถอยู่รอดได้สูงสุดในช่วงความเค็มที่ 0-5% NaCl และ 0-3% NaCl ตามลำดับ

จากการนำแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียโอเฟจว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่าสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจเป็นดีเอ็นเอสายคู่ มีขนาดมากกว่า 23 kb และไม่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของ *not I* แต่ถูกตัดด้วย *Hind III* และ *EcoR I* โดยหลังจากตัดด้วย *Hind III* พบว่าให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน จากรูปแบบดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท ต่างชนิดกัน นอกจากนี้มีศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจ MC20915 และ BD41025 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าประกอบด้วยส่วนหัวหกเหลี่ยม มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 60-63 nm ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอเฟจที่พบในธรรมชาติซึ่งมีจีโนมเป็นดีเอ็นเอนั้น ร้อยละ 96 เป็นแบคทีเรียโอเฟจที่มีหาง (*Caudovirales*) ส่วนแบคทีเรียโอเฟจที่มีส่วนหัวหกเหลี่ยมและแบบเส้นใยพบเพียงร้อยละ 3-4 จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 2 ไอโซเลทซึ่งมีจีโนมเป็นดีเอ็นเอมีส่วนหัวเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเป็นไปได้นี่คือลักษณะแบคทีเรียโอเฟจแท้จริงที่ได้ หรืออาจเนื่องจากความรุนแรงของกระบวนการทำให้แบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CsCl gradient ultracentrifugation ทำให้ส่วนหางของแบคทีเรียโอเฟจหลุด ในกรณีแบคทีเรียโอเฟจประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหางจะจัดอยู่ในวงศ์ *Myoviridae*, *Siphoviridae*, และ *Podoviridae* โดยการจัดกลุ่มดังกล่าวขึ้นอยู่กับความยาวของหาง และในกรณีที่แบคทีเรียโอเฟจประกอบด้วยส่วนหัวอย่างเดียวจะจัดอยู่ในวงศ์ *Microviridae*, *Corticoviridae*, และ *Tectiviridae* ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

1. *V. vulnificus* จำนวน 60 จาก 62 สายพันธุ์ (97%) จัดเป็นไบโอไทป์ 1 แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 2 สายพันธุ์ จัดเป็นไบโอไทป์ 2
2. *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์จัดเป็น *vcg-C* type และสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้จำนวน 56 จาก 62 สายพันธุ์ (90%) ซึ่งผลความสามารถในการใช้น้ำตาลสอดคล้องกับการตรวจพบยีน *manIIA*
3. การแสดงออกของยีน *nanA* สามารถตรวจพบใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (100%) สูงกว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (63%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
4. *V. vulnificus* ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ส่วนใหญ่จัดเป็น YJ-like allele โดยพบการแสดงออกดังกล่าวใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (66%) *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลา (60%) และ *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลา (60%) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่า *V. vulnificus* สายพันธุ์ DMST 32990 และสายพันธุ์ W 4.6 จัดเป็น CM-like allele ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม
5. การตรวจสอบการแสดงออกของ PRXII พบใน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (36%) ต่ำกว่า *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลา (80%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
6. การตรวจสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงเมื่อทดสอบกับน้ำเลี้ยงเซลล์พบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ นอกจากนี้พบการสลายเม็ดเลือดแดงของน้ำเลี้ยงเซลล์จากเชื้อกลุ่มดังกล่าวสูงกว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จาก *V. vulnificus* กลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (68%) และ *V. vulnificus* กลุ่มที่ก่อโรคในปลา (60%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงเมื่อทดสอบกับตัวเซลล์พบว่า *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลา (100%) สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้สูงกว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (44%) และ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (20%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
7. เมื่อพิจารณา *vcg*-type ร่วมกับความทนต่อเซรุ่ม พบว่า *V. vulnificus* *vcg-C* type ร้อยละ 92 (57/62) ทนต่อเซรุ่ม แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *V. vulnificus* *vcg-C* type ที่แยกได้จากปลาติดเชื้อร้อยละ 2 (1/62) ทนต่อเซรุ่มปานกลาง และร้อยละ 5 (3/62) ไวต่อเซรุ่ม

8. จากการตรวจสอบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* จำนวน 62 สายพันธุ์ ด้วยวิธี ERIC-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อจากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวน 4 กลุ่ม ได้แก่ A, B, C, และ D โดยกลุ่ม C และ D ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 37 และ 20 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยทั้งสองกลุ่มสมาชิกส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม

9. เมื่อพิจารณาลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในแต่ละกลุ่มที่จัดโดยวิธี ERIC-PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ พบว่าเชื้อทั้ง 4 กลุ่ม มีความแตกต่างกันของลักษณะดังกล่าวอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

10. จากการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์มีความหลากหลายมาก อาจเนื่องมาจาก *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์มีการแทรกตัวของโปรเฟจ ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงตัวชี้วัดทางชีวภาพที่เป็นไปได้ที่สุดอาจใช้ *nanA* และ PRXII เพื่อบอกความรุนแรงของ *V. vulnificus* ได้ในเบื้องต้น

11. มีความเป็นไปได้เบื้องต้นในการใช้หนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*) เพื่อใช้เป็นโมเดลสัตว์ทดลองสำหรับการศึกษาความรุนแรงของ *V. vulnificus* เนื่องจากหนอนผีเสื้อแสดงพยาธิสภาพเมื่อเกิดการติดเชื้อ *V. vulnificus* โดยสังเกตได้จากการสร้างเม็ดสี (melanization) และการตายของหนอนผีเสื้อภายหลังจากการได้รับเชื้อ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการตายของหนอนผีเสื้อขึ้นอยู่กับปริมาณและสายพันธุ์ของเชื้อที่ได้รับซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเมื่อใช้ปลาเก๋าเป็นโมเดลสัตว์ทดลอง

12. สามารถแยกแบคทีเรียโอเฟจจำนวน 333 ไอโซเลท จากตัวอย่างหอยแครง หอยแมลงภู่ และกุ้ง โดยใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 และสายพันธุ์ VVA6 เป็นโฮสต์ โดยให้ขนาดของพลาทส์อยู่ระหว่าง 0.01-0.23 mm แบคทีเรียโอเฟจส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย, *V. vulnificus* ไบโอดี 2, *V. cholerae* PSU 966 O1, *V. alginolyticus* PSU 6, *V. parahaemolyticus* ATCC 17808 และ *V. vulnificus* ก่อโรคในปลา ตามลำดับ

13. สามารถคัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจได้จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ MC20915, BD11015, BD41015, BD51015 และ BD61015 โดยอาศัยความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio* spp. ปริมาณแบคทีเรียโอเฟจภายหลังการเพิ่มจำนวน และขนาดของพลาทส์

14. แบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท อยู่รอดในช่วงอุณหภูมิ 20°C-40°C และ pH 5-11 นอกจากนี้พบว่า MC20915 และ BD41025 สามารถอยู่รอดได้สูงสุดในช่วงความเค็มที่ 0-5% NaCl และ 0-3 %NaCl ตามลำดับ

15. แบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่มีขนาดมากกว่า 23 kb นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลทไม่ใช้ชนิดเดียวกัน เนื่องจากหลังจากนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 5 ไอโซเลท มาตัดด้วย *Hind* III พบว่าให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน จากการศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า MC20915 และ BD41025 ประกอบด้วยส่วนหัวหกเหลี่ยมมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 60 และ 63 nm ตามลำดับ

## เอกสารอ้างอิง

- ศรีวรรณ หัตถยานานนท์, กฤษณา ภูริกิตติชัย, กรองแก้ว ศุภวัฒน์, และปฐม สวรรคปญญาเลิศ. 2549. มหันตภัยจากเชื้อ *Vibrio vulnificus*. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- Ackermann, H. W. 2004. 4 Bacteriophage Classification. Bacteriophages: Biology and applications. 67.
- Adams, M. H. 1959. Bacteriophages. New York ( London): Inter-science Publishers.
- Almagro Moreno, S. and Boyd, E. F. 2009. Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria. Biomedicine evolutionary biology. 9(1): 118.
- Almeida, A., Cunha, A., Gomes, N., Alves, E., Costa, L. and Faustino, M. A. 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. Marine drugs. 7(3): 268-313.
- Alsina, M. and Blanch, A. R. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. Journal of applied bacteriology. 76(1): 79-85.
- Amaro, C. and Biosca, E. G. 1996. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. Applied and Environmental Microbiology. 62(4): 1454-1457.
- Anderson, G. G., Goller, C. C., Justice, S., Hultgren, S. J. and Seed, P. C. 2010. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. Infection and immunity. 78(3): 963-975.
- Angata, T. and Varki, A. 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. Chemical reviews. 102(2): 439-470.
- Arias, C., Macián, M., Aznar, R., Garay, E. and Pujalte, M. 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. Journal of applied microbiology. 86(1): 125-134.
- Arias, C. R., Garay, E. and Aznar, R. 1995. Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. Applied and Environmental Microbiology. 61(9): 3476-3478.



- Baizabal-Ramirez, O., Negrete-Perez, M., Guerrero-Daza, D., Martinez-Herrera, N., Aburto-Desachy, Y. and Mata-Miranda, P. 2010. Septic shock by *Vibrio vulnificus* at the coast Gulf of Mexico. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 49(4): 433-436.
- Baker-Austin, C., McArthur, J., Lindell, A. H., Wright, M. S., Tuckfield, R. C., Gooch, J., Warner, L., Oliver, J. and Stepanauskas, R. 2009. Multi-site analysis reveals widespread antibiotic resistance in the marine pathogen *Vibrio vulnificus*. *Microbial ecology*. 57(1): 151-159.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315(5819): 1709-1712.
- Bier, N., Bechlars, S., Diescher, S., Klein, F., Hauk, G., Duty, O., Strauch, E. and Dieckmann, R. 2013. Genotypic diversity and virulence characteristics of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates from the Baltic Sea region. *Applied and environmental microbiology*. 79(12): 3570-3581.
- Biosca, E., Amaro, C., Esteve, C., Alcaide, E. and Garay, E. 1991. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*. 14(1): 103-109.
- Biosca, E. G. 1994. Serología y virulencia de *Vibrio vulnificus* biotipo 2. Universitat de València, Departament de Microbiologia, City.
- Biosca, E. G., Oliver, J. D. and Amaro, C. 1996. Phenotypic characterization of *Vibrio vulnificus* biotype 2, a lipopolysaccharide-based homogeneous O serogroup within *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology*. 62(3): 918-927.
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D. N. and Wykstra, D. L. 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *The Lancet*. 354(9188): 1421-1424.
- Bisharat, N., Cohen, D. I., Harding, R. M., Falush, D., Crook, D. W., Peto, T. and Maiden, M. C. 2005. Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerg Infect Dis*. 11(1): 30-35.

- Bisharat, N. and Raz, R. 1996. *Vibrio* infection in Israel due to changes in fish marketing. *The Lancet*. 348(9041): 1585-1586.
- Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G. and Heublein, P. C. 1979. Disease caused by a marine *vibrio*: clinical characteristics and epidemiology. *New England Journal of Medicine*. 300(1): 1-5.
- Bloch, S., Nejman-Falenczyk, B., Dydecka, A., Los, J. M., Felczykowska, A., Wegrzyn, A. and Wegrzyn, G. 2014. Different Expression Patterns of Genes from the Exo-Xis Region of Bacteriophage lamda and Shiga Toxin-Converting Bacteriophage 24 B following Infection or Prophage Induction in *Escherichia coli*. *PloS one*. 9(10).
- Bogard, R. W. and Oliver, J. D. 2007. Role of iron in human serum resistance of the clinical and environmental *Vibrio vulnificus* genotypes. *Applied and environmental microbiology*. 73(23): 7501-7505.
- Bogut, I. 2000. Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and content of intestinal microflora in sheat fish (*Silurus glanis*). *Veterinari Medicina*. 45(4): 107-109.
- Bogwald, J. and Hoffman, J. 2006. Structural studies of the O-antigenic oligosaccharide from *Vibrio salmonicida* strain C2 isolated from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Carbohydrate research*. 341(11): 1965-1968.
- Bottone, E. and Robin, T. 1978. *Vibrio parahaemolyticus*: suspicion of presence based on aberrant biochemical and morphological features. *Journal of clinical microbiology*. 8(6): 760-763.
- Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*. 31(4): 230.
- Brasher, C. W., DePaola, A., Jones, D. D. and Bej, A. K. 1998. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. *Current microbiology*. 37(2): 101-107.
- Brauns, L. A., Hudson, M. C. and Oliver, J. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(9): 2651-2655.

- Brayton, P., West, P., Russek, E. and Colwell, R. 1983. New selective plating medium for isolation of *Vibrio vulnificus* biogroup 1. *Journal of clinical microbiology*. 17(6): 1039-1044.
- Brown, D. T. and Anderson, T. F. 1969. Effect of host cell wall material on the adsorbability of cofactor-requiring T4. *Journal of virology*. 4(1): 94-108.
- Buchrieser, C., Gangar, V., Murphree, R., Tamplin, M. and Kaspar, C. 1995. Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oysters as demonstrated by clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(3): 1163-1168.
- Cabello, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*. 8(7): 1137-1144.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A. and Buschmann, A. H. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental microbiology*. 15(7): 1917-1942.
- Calendar, R. 2006. *The bacteriophages*. Oxford University Press on Demand, City.
- Cameron, D. N., Khambaty, F. M., Wachsmuth, I. K., Tauxe, R. V. and Barrett, T. J. 1994. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*. 32(7): 1685-1690.
- Campbell, M. S. and Wright, A. C. 2003. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Applied and environmental microbiology*. 69(12): 7137-7144.
- Carlin, A. F., Lewis, A. L., Varki, A. and Nizet, V. 2007. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *Journal of bacteriology*. 189(4): 1231-1237.
- Carlin, A. F., Uchiyama, S., Chang, Y.-C., Lewis, A. L., Nizet, V. and Varki, A. 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood*. 113(14): 3333-3336.

- Cerda-Cuellar, M., Jofre, J. and Blanch, A. R. 2000. A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. Applied and environmental microbiology. 66(2): 855-859.
- Cerda-Cuellar, M., Permin, L., Larsen, J. and Blanch, A. 2001. Comparison of selective media for the detection of *Vibrio vulnificus* in environmental samples. Journal of applied microbiology. 91(2): 322-327.
- Chae, M.-R., Kim, H.-N., Park, K.-H., Ro, I.-W., Kim, M.-A., Kim, D.-Y., Par, J.-W. and Kim, H.-R. 1996. Species-specific hemolysis by *Vibrio vulnificus* cytolysin. Experimental & Molecular Medicine. 28(2): 95-99.
- Chamilos, G., Lionakis, M. S., Lewis, R. E. and Kontoyiannis, D. P. 2007. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. The Lancet infectious diseases. 7(1): 42-55.
- Champion, O. L., Karlyshev, A. V., Senior, N. J., Woodward, M., La Ragione, R., Howard, S. L., Wren, B. W. and Titball, R. W. 2010. Insect infection model for *Campylobacter jejuni* reveals that O-methyl phosphoramidate has insecticidal activity. Journal of Infectious Diseases. 201(5): 776-782.
- Chan, B. K., Abedon, S. T. and Loc-Carrillo, C. 2013. Phage cocktails and the future of phage therapy. Future microbiology. 8(6): 769-783.
- Chan, K., Woo, M., Lo, K. and French, G. 1986. Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of Hong Kong. Applied and environmental microbiology. 52(6): 1407-1411.
- Changchai, N. and Saunjit, S. 2014. OCCURRENCE OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *VIBRIO VULNIFICUS* IN RETAIL RAW OYSTERS FROM THE EASTERN COAST OF THAILAND. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 45(3): 662-669.
- Chen, C.-Y., Wu, K.-M., Chang, Y.-C., Chang, C.-H., Tsai, H.-C., Liao, T.-L., Liu, Y.-M., Chen, H.-J., Shen, A. B.-T. and Li, J.-C. 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. Genome research. 13(12): 2577-2587.
- Chen, S.-C., Lee, Y.-T., Tsai, S.-J., Chan, K.-S., Chao, W.-N., Wang, P.-H., Lin, D.-B., Chen, C.-C. and Lee, M.-C. 2012. Antibiotic therapy for necrotizing fasciitis caused by

*Vibrio vulnificus*: retrospective analysis of an 8 year period. Journal of antimicrobial chemotherapy. 67(2): 488-493.

Chiang, S. R. and Chuang, Y. C. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. Journal of microbiology, immunology, and infection 36(2): 81-88.

Cohen, A. L. V., Oliver, J. D., DePaola, A., Feil, E. J. and Boyd, E. F. 2007. Emergence of a virulent clade of *Vibrio vulnificus* and correlation with the presence of a 33-kilobase genomic island. Applied and environmental microbiology. 73(17): 5553-5565.

Cruz, C. D., Chycka, M., Hedderley, D. and Fletcher, G. C. 2016. Prevalence, characteristics and ecology of *Vibrio vulnificus* found in New Zealand shellfish. Journal of applied microbiology.

d'Herelle, F. 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. Research in microbiology. 158(7): 553.

Dalsgaard, I., Høi, L., Siebeling, R. and Dalsgaard, A. 1999. Indole-positive *Vibrio vulnificus* isolated from disease outbreaks on a Danish eel farm. Diseases of aquatic organisms. 35(3): 187-194.

DePaola, A., Motes, M. L., Chan, A. M. and Suttle, C. A. 1998. Phages infecting *Vibrio vulnificus* are abundant and diverse in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the Gulf of Mexico. Applied and environmental microbiology. 64(1): 346-351.

Desbois, A. P. and Coote, P. J. 2012. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. Advances in applied microbiology. 78: 25.

Drake, S. L., Whitney, B., Levine, J. F., DePaola, A. and Jaykus, L.-A. 2010. Correlation of mannitol fermentation with virulence-associated genotypic characteristics in *Vibrio vulnificus* isolates from oysters and water samples in the Gulf of Mexico. Foodborne pathogens and disease. 7(1): 97-101.

- Edebrink, P., Jansson, P. E., Bogwald, J. and Hoffman, J. 1996. Structural studies of the *Vibrio salmonicida* lipopolysaccharide. Carbohydrate research. 287(2): 225-245.
- Ellis, E. L. and Delbruck, M. 1939. The growth of bacteriophage. The Journal of general physiology. 22(3): 365-384.
- Elmahdi, S., Dasilva, L. V. and Parveen, S. 2016. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries : A review. Food microbiology. 57: 128-134.
- Ewing, C. P., Andreishcheva, E. and Guerry, P. 2009. Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81-176. Journal of bacteriology. 191(22): 7086-7093.
- Foster, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. Nature Reviews Microbiology. 3(12): 948-958.
- Fouz, B., Alcaide, E., Barrera, R. and Amaro, C. 2002. Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). Aquaculture. 212(1): 21-30.
- Froelich, B. and Oliver, J. 2011. Orientation of mannitol related genes can further differentiate strains of *Vibrio vulnificus* possessing the *vcgC* allele. Adv Stud Biol. 3: 151-160.
- Glaze, P. A., Watson, D. C., Young, N. M. and Tanner, M. E. 2008. Biosynthesis of CMP-N, N'-Diacetyllegionaminic Acid from UDP-N, N'-Diacetylbacillosamine in *Legionella pneumophila*. Biochemistry. 47(10): 3272-3282.
- Grau, B. L., Henk, M. C. and Pettis, G. S. 2005. High-frequency phase variation of *Vibrio vulnificus* 1003: isolation and characterization of a rugose phenotypic variant. Journal of bacteriology. 187(7): 2519-2525.
- Guerrero, A., Rodriguez, B. G. G., Wong-Chang, I. and Lizarraga-Partida, M. L. 2015. Genetic characterization of *Vibrio vulnificus* strains isolated from oyster samples in Mexico. International journal of environmental health research.
- Guerry, P., Ewing, C., Schirm, M., Lorenzo, M., Kelly, J., Pattarini, D., Majam, G., Thibault, P. and Logan, S. 2006. Changes in flagellin glycosylation affect

- Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Molecular microbiology*. 60(2): 299-311.
- Gulig, P. A., Bourdage, K. L. and Starks, A. M. 2005. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J. Microbiol.* 43(Suppl 1): 118-131.
- Guttman, B., Raya, R. and Kutter, E. 2004. 3 Basic Phage Biology. *Bacteriophages: Biology and applications*. 29.
- Hall, C. E. 1955. Electron densitometry of stained virus particles. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1(1): 1-12.
- Harding, C. R., Schroeder, G. N., Reynolds, S., Kosta, A., Collins, J. W., Mousnier, A. and Frankel, G. 2012. *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infection and immunity*. 80(8): 2780-2790.
- Harwood, V. J., Gandhi, J. P. and Wright, A. C. 2004. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *Journal of microbiological methods*. 59(3): 301-316.
- Hermans, P., Sluifjter, M., Hoogenboezem, T., Heersma, H., Van Belkum, A. and De Groot, R. 1995. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(6): 1606-1612.
- Higuera, G., Bastias, R., Tsertsvadze, G., Romero, J. and Espejo, R. T. 2013. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 392: 128-133.
- Hill, W. E., Keasler, S., Trucksess, M., Feng, P., Kaysner, C. and Lampel, K. 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Applied and environmental microbiology*. 57(3): 707-711.
- Hitchborn, J. and Hills, G. 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. *Virology*. 27(4): 528-540.
- Hoei, L. 1998. *Vibrio vulnificus* in Denmark: occurrence, isolation and characterization

- Hoffman, J. A., Badger, J. L., Zhang, Y., Huang, S.-H. and Kim, K. S. 2000. *Escherichia coli* K1 *aslA* Contributes to Invasion of Brain Microvascular Endothelial Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Infection and immunity*. 68(9): 5062-5067.
- Høi, L., Dalsgaard, I. and Dalsgaard, A. 1998. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. *Applied and environmental microbiology*. 64(5): 1721-1724.
- Hoi, L., Larsen, J., Dalsgaard, I. and Dalsgaard, A. 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(1): 7-13.
- Hsueh, P.-R., Lin, C.-Y., Tang, H.-J., Lee, H.-C., Liu, J.-W., Liu, Y.-C. and Chuang, Y.-C. 2004. *Vibrio vulnificus* in Taiwan. *Emerging infectious diseases*. 10: 1363-1368.
- Inoue, Y., Ono, T., Matsui, T., Miyasaka, J., Kinoshita, Y. and Ihn, H. 2008. Epidemiological survey of *Vibrio vulnificus* infection in Japan between 1999 and 2003. *The Journal of dermatology*. 35(3): 129-139.
- Jander, G., Rahme, L. G. and Ausubel, F. M. 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of bacteriology*. 182(13): 3843-3845.
- Jeong, H. G., Oh, M. H., Kim, B. S., Lee, M. Y., Han, H. J. and Choi, S. H. 2009. The capability of catabolic utilization of N-acetylneuraminic acid, a sialic acid, is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis. *Infection and immunity*. 77(8): 3209-3217.
- Jermyn, W. S. and Boyd, E. F. 2002. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 148(11): 3681-3693.
- Jermyn, W. S. and Boyd, E. F. 2005. Molecular evolution of *Vibrio* pathogenicity island-2 (VPI-2): mosaic structure among *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* natural isolates. *Microbiology*. 151(1): 311-322.
- Johnson, D. E. and Calia, F. M. 1981. Hemolytic reaction of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Journal of clinical microbiology*. 14(4): 457-459.



- Johnston, J. W., Shamsulddin, H., Miller, A.-F. and Apicella, M. A. 2010. Sialic acid transport and catabolism are cooperatively regulated by SiaR and CRP in nontypeable *Haemophilus influenzae*. BMC microbiology. 10(1): 1.
- Jones, C., Virji, M. and Crocker, P. R. 2003. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. Molecular microbiology. 49(5): 1213-1225.
- Jones, M. K. and Oliver, J. D. 2009. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. Infection and immunity. 77(5): 1723-1733.
- Joseph, S. W., Colwell, R. R. and Kaper, J. B. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. Critical reviews in microbiology. 10(1): 77-124.
- Jung, C., Park, M. and Heo, M. 2005. Immunization with major outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* elicits protective antibodies in a murine model. JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-. 43(5): 437.
- Karunasagar, I., Shivu, M., Girisha, S., Krohne, G. and Karunasagar, I. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. Aquaculture. 268(1): 288-292.
- Kaysner, C., Abeyta, C., Wekell, M., DePaola, A., Stott, R. and Leitch, J. 1987. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. Applied and environmental microbiology. 53(6): 1349-1351.
- Khan, A. A., McCarthy, S., Wang, R.-F. and Cerniglia, C. E. 2002. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3: K6 isolates. FEMS microbiology letters. 206(2): 209-214.
- Khatua, B., Ghoshal, A., Bhattacharya, K., Mandal, C., Saha, B., Crocker, P. R. and Mandal, C. 2010. Sialic acids acquired by *Pseudomonas aeruginosa* are involved in reduced complement deposition and siglec mediated host-cell recognition. FEBS letters. 584(3): 555-561.

- Kim, H.-J. and Cho, J.-C. 2015. Genotypic Diversity and Population Structure of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated in Taiwan and Korea as Determined by Multilocus Sequence Typing. PLoS one. 10(11): e0142657.
- Kim, J. H., SHIN, S. P., HAN, J. E., JUN, J. W. and PARK, S. C. 2011. Occurrence and antibiotic resistance of *Vibrio vulnificus* in seafood and environmental waters in Korea. Journal of Food Safety. 31(4): 518-524.
- Kim, Y. R., Lee, S. E., Kim, C. M., Kim, S. Y., Shin, E. K., Shin, D. H., Chung, S. S., Choy, H. E., Progulske-Fox, A. and Hillman, J. D. 2003. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. Infection and immunity. 71(10): 5461-5471.
- Kiratisin, P. 2012. *Vibrio vulnificus* septicemia in Thailand: A 12-year case series and report of two fatal massive rhabdomyolysis cases. Asian Biomed. 6(3).
- Kirov, S. M. 2003. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. FEMS microbiology letters. 224(2): 151-159.
- Kitaura, T., Doke, S., Azuma, I., Imaida, M., Miyano, K., Harada, K. and Yabuuchi, E. 1983. Halo production by sulfatase activity of *V. vulnificus* and *V. cholerae* O agar medium. FEMS Microbiology Letters. 17: 205-209.
- Knirel, Y. A., Shashkov, A. S., Tsvetkov, Y. E., Jansson, P.-E. and Zaehring, U. 2003. 5, 7-Diamino-3, 5, 7, 9-tetradeoxy-non-2-ulosonic acids in bacterial glycopolymers: chemistry and biochemistry. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. 58: 371-417.
- Knoll, B. M. and Mylonakis, E. 2014. Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: an overview. Clinical infectious diseases. 58(4): 528-534.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. and Kuwahara, S. 1963. A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology. 18: 387.
- Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. Nature Reviews Microbiology. 8(5): 317-327.

- Lee, C.-Y., Panicker, G. and Bej, A. K. 2003. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. *Journal of microbiological methods*. 53(2): 199-209.
- Lee, J. Y., Eun, J. B. and Choi, S. H. 1997. Improving detection of *Vibrio vulnificus* in *Octopus variabilis* by PCR. *Journal of food science*. 62(1): 179-182.
- Lee, S.-H., Chung, B.-H. and Lee, W.-C. 2013. Retrospective analysis of epidemiological aspects of *Vibrio vulnificus* infections in Korea in 2001–2010. *Japanese journal of infectious diseases*. 66(4): 331-333.
- Lewis, A. L., Desa, N., Hansen, E. E., Knirel, Y. A., Gordon, J. I., Gagneux, P., Nizet, V. and Varki, A. 2009. Innovations in host and microbial sialic acid biosynthesis revealed by phylogenomic prediction of nonulosonic acid structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(32): 13552-13557.
- Lewis, A. L., Lubin, J.-B., Argade, S., Naidu, N., Choudhury, B. and Boyd, E. F. 2011. Genomic and metabolic profiling of nonulosonic acids in *Vibrionaceae* reveal biochemical phenotypes of allelic divergence in *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology*. 77(16): 5782-5793.
- Lhafi, S. K. and Kühne, M. 2007. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *International journal of food microbiology*. 116(2): 297-300.
- Li, J., Tan, B. and Mai, K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 291(1): 35-40.
- Linkous, D. A. and Oliver, J. D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*. 174(2): 207-214.
- Lomeli-Ortega, C. O. and Martínez-Díaz, S. F. 2014. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*. 434: 208-211.
- Los, J. M., Los, M., Wegrzyn, G. and Wegrzyn, A. 2009. Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of Shiga

- toxins in response to different induction agents. *Microbial pathogenesis*. 47(6): 289-298.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. and De Bruijn, F. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*. 60(7): 2286-2295.
- Lowry, P. W., McFarland, L. M., Peltier, B. H., Roberts, N. C., Bradford, H. B., Herndon, J. L., Stroup, D. F., Mathison, J. B., Blake, P. A. and Gunn, R. A. 1989. *Vibrio* gastroenteritis in Louisiana: a prospective study among attendees of a scientific congress in New Orleans. *Journal of Infectious Diseases*. 160(6): 978-984.
- Lu, M., Stierhof, Y. and Henning, U. 1993. Location and unusual membrane topology of the immunity protein of the Escherichia coli phage T4. *Journal of virology*. 67(8): 4905-4913.
- Lubin, J.-B., Kingston, J. J., Chowdhury, N. and Boyd, E. F. 2012. Sialic acid catabolism and transport gene clusters are lineage specific in *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology*. 78(9): 3407-3415.
- Mahmud, Z. H., Neogi, S. B., Kassu, A., Huong, B. T. M., Jahid, I. K., Islam, M. S. and Ota, F. 2008. Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS microbiology ecology*. 64(2): 209-218.
- Mala, W., Chomvarin, C., Alam, M., Rashed, S. M., Faksri, K. and Angkititrakul, S. 2014. MOLECULAR ANALYSIS OF *VIBRIO VULNIFICUS* ISOLATED FROM COCKLES AND PATIENTS IN THAILAND. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 45(1): 103-112.
- Marshall, S., Clark, C., Wang, G., Mulvey, M., Kelly, M. and Johnson, W. 1999. Comparison of Molecular Methods for Typing *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of clinical microbiology*. 37(8): 2473-2478.
- Martinez Diaz, S. F. and Hipolito Morales, A. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*. 400: 120-124.

- Martínez, J. L. 2013. Bacterial pathogens: from natural ecosystems to human hosts. *Environmental microbiology*. 15(2): 325-333.
- Massad, G. and Oliver, J. D. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology*. 53(9): 2262-2264.
- Mc Grath, S. and Van Sinderen, D. 2007. *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. Horizon Scientific Press, City.
- McMillan, S., Verner Jeffreys, D., Weeks, J., Austin, B. and Desbois, A. P. 2015. Larva of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, is a suitable alternative host for studying virulence of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*. *Biomedicine microbiology*. 15(1): 1.
- McNally, D. J., Aubry, A. J., Hui, J. P., Khieu, N. H., Whitfield, D., Ewing, C. P., Guerry, P., Brisson, J.-R., Logan, S. M. and Soo, E. C. 2007. Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives as novel flagellar glycans. *Journal of Biological Chemistry*. 282(19): 14463-14475.
- McNally, D. J., Hui, J. P., Aubry, A. J., Mui, K. K., Guerry, P., Brisson, J.-R., Logan, S. M. and Soo, E. C. 2006. Functional characterization of the flagellar glycosylation locus in *Campylobacter jejuni* 81-176 using a focused metabolomics approach. *Journal of Biological Chemistry*. 281(27): 18489-18498.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg. *Emerging infectious diseases*. 5(6): 841.
- Miceli, G., Watkins, W. and Rippey, S. 1993. Direct plating procedure for enumerating *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and environmental microbiology*. 59(11): 3519-3524.
- Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K. and Hara-Kudo, Y. 2006. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic birds in Japan. *Epidemiology and infection*. 134(04): 780-785.
- Miyazaki, T., Kugota, S., Jo, Y. and Kubota, S. 1977. Histopathological studies on vibriosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*), 1: Natural infection. *Fish Pathology (Japan)*.

- Molineux, I. 1991. Host-parasite interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *The New biologist*. 3(3): 230-236.
- Moll, A., Cabello, F. and Timmis, K. N. 1979. Rapid assay for the determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum. *FEMS Microbiol Lett*. 6(5): 273-276.
- Morris, J., Wright, A. C., Roberts, D., Wood, P., Simpson, L. and Oliver, J. 1987. Identification of environmental *Vibrio vulnificus* isolates with a DNA probe for the cytotoxin-hemolysin gene. *Applied and environmental microbiology*. 53(1): 193-195.
- Morrison, S. S., Williams, T., Cain, A., Froelich, B., Taylor, C., Baker-Austin, C., Verner-Jeffreys, D., Hartnell, R., Oliver, J. D. and Gibas, C. J. 2012. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus* environmental isolates. *PLoS One*. 7(5): e37553.
- Motes, M., DePaola, A., Cook, D., Veazey, J., Hunsucker, J., Garthright, W., Blodgett, R. and Chirtel, S. 1998. Influence of Water Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and environmental microbiology*. 64(4): 1459-1465.
- Mougous, J. D., Green, R. E., Williams, S. J., Brenner, S. E. and Bertozzi, C. R. 2002. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chemistry & biology*. 9(7): 767-776.
- Murooka, Y., Azakami, H. and Yamashita, M. 1996. The monoamine regulon including syntheses of arylsulfatase and monoamine oxidase in bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 60(6): 935-941.
- Naito, M., Fridrich, E., Fields, J. A., Pryjma, M., Li, J., Cameron, A., Gilbert, M., Thompson, S. A. and Gaynor, E. C. 2010. Effects of sequential *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide core truncations on biofilm formation, stress survival, and pathogenesis. *Journal of bacteriology*. 192(8): 2182-2192.
- Nakai, T. and Park, S. C. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in microbiology*. 153(1): 13-18.
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. and Austin, B. 2014. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*. 431: 1-11.

- Nilsson, W. B., Paranjypte, R. N., DePaola, A. and Strom, M. S. 2003. Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. *Journal of clinical microbiology*. 41(1): 442-446.
- Nobrega, F. L., Costa, A. R., Kluskens, L. D. and Azeredo, J. 2015. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in microbiology*. 23(4): 185-191.
- Nordstrom, K. and Forsgren, A. 1974. Effect of protein A on adsorption of bacteriophages to *Staphylococcus aureus*. *Journal of virology*. 14(2): 198-202.
- Norville, I., Hartley, M., Martinez, E., Cantet, F., Bonazzi, M. and Atkins, T. 2014. *Galleria mellonella* as an alternative model of *Coxiella burnetii* infection. *Microbiology*. 160(6): 1175-1181.
- Oishi, H., Ura, Y., Mitsumizo, S. and Nakashima, M. 2006. A collective review of *Vibrio vulnificus* infection in Japan. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 80(6): 680-689.
- Oliver, J. 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiology and infection*. 133(03): 383-391.
- Oliver, J. D., Nilsson, L. and Kjelleberg, S. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(9): 2640-2644.
- Olsen, R. J., Watkins, M. E., Cantu, C. C., Beres, S. B. and Musser, J. M. 2011. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence*. 2(2): 111-119.
- Pai, S. S., Anas, A., Jayaprakash, N. S., Priyaja, P., Sreelakshmi, B., Preetha, R., Philip, R., Mohandas, A. and Singh, I. S. B. 2010. *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by pre-emptive treatment of a rearing system with antagonistic or non-antagonistic bacterial probiotics. *Aquaculture Research*. 41(6): 847-860.
- Panicker, G., Myers, M. L. and Bej, A. K. 2004. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*. 70(1): 498-507.

- Park, S. C. and Nakai, T. 2003. Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. Diseases of aquatic organisms. 53(1): 33-39.
- Pasqualina, L., Gabriella, C., Eleonora, M., Renata, Z. and Santi, D. 2011. Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. piscicida strains isolated from Italian aquaculture farms. New Microbiol. 34: 53-63.
- Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O. and Cohen, D. 2007. Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. Environmental Research. 103(3): 390-396.
- Penman, A. D., Lanier Jr, D. C., Avara 3rd, W., Canant, K. E., DeGroot, J. W., Brackin, B. T., Currier, M. M. and Hotchkiss, R. L. 1995. *Vibrio vulnificus* wound infections from the Mississippi Gulf coastal waters: June to August 1993. Southern medical journal. 88(5): 531-533.
- Radu, S., Elhadi, N., Hassan, Z., Rusul, G., Lihan, S., Fifadara, N. and Purwati, E. 1998. Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles (*Anadara granosa*): antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. FEMS microbiology letters. 165(1): 139-143.
- Rivera, I., Chowdhury, M., Huq, A., Jacobs, D., Martins, M. and Colwell, R. R. 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. Applied and environmental microbiology. 61(8): 2898-2904.
- Roach, D. R. and Donovan, D. M. 2015. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. Bacteriophage. 5(3): e1062590.
- Romero, J., Feijóo, C. G. and Navarrete, P. 2012. Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives. INTECH Open Access Publisher, City.
- Rosche, T. M., Yano, Y. and Oliver, J. D. 2005. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. Microbiology and immunology. 49(4): 381-389.



- Rowan, N. J. 2010. Defining established and emerging microbial risks in the aquatic environment: current knowledge, implications, and outlooks. *International journal of microbiology*. 2011.
- Sakata, T. and Hattori, M. 1988. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased tilapia [*Sarotherodon niloticus*; Japan]. *Fish Pathology (Japan)*.
- Salmond, G. P. and Fineran, P. C. 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*. 13(12): 777-786.
- Sambrook, Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning* 2nd edn. Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaeck, M., Van den Broeck, W., Hermans, K. and Decostere, A. 2013. Fish as research tools: alternatives to in vivo experiments. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*. 41(3): 219-229.
- Schmelcher, M. and Loessner, M. J. 2014. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*. 4(2): e28137.
- Schmidt, J. M. and Stanier, R. 1965. Isolation and characterization of bacteriophages active against stalked bacteria. *Microbiology*. 39(1): 95-107.
- Schoenhofen, I. C., McNally, D. J., Brisson, J.-R. and Logan, S. M. 2006. Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction. *Glycobiology*. 16(9): 8C-14C.
- Shapiro, R., Altekruze, S., Hutwagner, L., Bishop, R., Hammond, R., Wilson, S., Ray, B., Thompson, S., Tauxe, R. and Griffin, P. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988–1996. *Journal of Infectious Diseases*. 178(3): 752-759.
- Silva, Y. J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, A., Calado, R., Gomes, N. C., Pardo, M. A., Hernandez, I. and Almeida, A. 2014. Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PloS one*. 9(12): e114197.

- Simpson, L., White, V., Zane, S. and Oliver, J. 1987. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity*. 55(1): 269-272.
- Snyder, L. 1995. Phage exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents. *Molecular microbiology*. 15(3): 415-420.
- Song, Y., Cheng, W., Shen, C., Ou, Y. and Song, H. 1990. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in cultured shrimp and eel in Taiwan. Paper read at NSC Symp. Ser, at.
- Sorek, R., Kunin, V. and Hugenholtz, P. 2008. CRISPR a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*. 6(3): 181-186.
- Steenbergen, S. M., Lichtensteiger, C. A., Caughlan, R., Garfinkle, J., Fuller, T. E. and Vimr, E. R. 2005. Sialic acid metabolism and systemic pasteurellosis. *Infection and immunity*. 73(3): 1284-1294.
- Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Weintraub, A. and Seckler, R. 1997. Interaction of *Salmonella* phage P22 with its O-antigen receptor studied by X-ray crystallography. *Biological chemistry*. 378(3-4): 337-344.
- Stirm, S. 1968. *Escherichia coli* K bacteriophages I. Isolation and introductory characterization of five *Escherichia coli* K bacteriophages. *Journal of virology*. 2(10): 1107-1114.
- Strom, M. S. and Paranjpye, R. N. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and infection*. 2(2): 177-188.
- Sturino, J. M. and Klaenhammer, T. R. 2006. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nature Reviews Microbiology*. 4(5): 395-404.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J. G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45(3): 649-659.
- Sutherland, I. W. 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 38(4): 319-328.

- Sutherland, I. W. 1995. Polysaccharide lyases. FEMS microbiology reviews. 16(4): 323-347.
- Sutherland, I. W., Hughes, K. A., Skillman, L. C. and Tait, K. 2004. The interaction of phage and biofilms. FEMS microbiology letters. 232(1): 1-6.
- Swords, W. E., Moore, M. L., Godzicki, L., Bukofzer, G., Mitten, M. J. and VonCannon, J. 2004. Sialylation of lipooligosaccharides promotes biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infection and immunity. 72(1): 106-113.
- Takeuchi, H., Hori, Y., Kanehisa, J., Tani, A., Takai, R. and Sagawa, H. 1982. Bacterial chondroitinase ABC and hyaluronidase in human dental plaque and inflamed gingiva. Journal of Osaka Dental University. 16(2): 183.
- Tam, Y., Harvey, R. and Chan, E. 1982. Chondroitin sulfatase--producing and hyaluronidase--producing oral bacteria associated with periodontal disease. Journal (Canadian Dental Association). 48(2): 115-120.
- Tamplin, M., Martin, A., Ruple, A., Cook, D. and Kaspar, C. 1991. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. Applied and environmental microbiology. 57(4): 1235-1240.
- Tamplin, M. L., Jackson, J. K., Buchrieser, C., Murphree, R. L., Portier, K. M., Gangar, V., Miller, L. G. and Kaspar, C. W. 1996. Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates. Applied and environmental microbiology. 62(10): 3572-3580.
- Thawonsuwan, J., Kasornchandra, J., Soonsan, P. and Keawtapee, C. 2016. Isolation of *Vibrio vulnificus* Biotype I from Disease Outbreaks on Cultured Tiger Grouper *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775. Fish Pathology. 51(Special-issue): S39-S45.
- Thompson, F. L., Iida, T. and Swings, J. 2004. Biodiversity of vibrios. Microbiology and molecular biology reviews. 68(3): 403-431.
- Toranzo, A. E., Magarinos, B. and Romalde, J. L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture. 246(1): 37-61.
- Van Regenmortel, M. H., Fauquet, C., Bishop, D., Carstens, E., Estes, M., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M., McGeoch, D. and Pringle, C. 2000. Virus taxonomy:

classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, City.

- Varki, A. 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*. 2(1): 25-40.
- Varki, A. 2008. Sialic acids in human health and disease. *Trends in molecular medicine*. 14(8): 351-360.
- Veenstra, J., Rietra, P., Coster, J., Slaats, E. and Dirks-Go, S. 1994. Seasonal variations in the occurrence of *Vibrio vulnificus* along the Dutch coast. *Epidemiology and infection*. 112(02): 285-290.
- Venkateswaran, K., Nakano, H., Okabe, T., Takayama, K., Matsuda, O. and Hashimoto, H. 1989. Occurrence and distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp., and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland Sea of Japan. *Applied and environmental microbiology*. 55(3): 559-567.
- Verner-Jeffreys, D. W., Algoet, M., Pond, M. J., Virdee, H. K., Bagwell, N. J. and Roberts, E. G. 2007. Furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is not readily controllable by bacteriophage therapy. *Aquaculture*. 270(1): 475-484.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*. 19(24): 6823-6831.
- Vickery, M. C., Nilsson, W. B., Strom, M. S., Nordstrom, J. L. and DePaola, A. 2007. A real-time PCR assay for the rapid determination of 16S rRNA genotype in *Vibrio vulnificus*. *Journal of microbiological methods*. 68(2): 376-384.
- Vimr, E. and Lichtensteiger, C. 2002. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends in microbiology*. 10(6): 254-257.
- Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L. and Steenbergen, S. M. 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(1): 132-153.
- Vimr, E. R. and Troy, F. A. 1985. Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (nan) in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 164(2): 845-853.

- Vinod, M., Shivu, M., Umesha, K., Rajeeva, B., Krohne, G., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*. 255(1): 117-124.
- Vinogradov, E., Wilde, C., Anderson, E. M., Nakhamchik, A., Lam, J. S. and Rowe-Magnus, D. A. 2009. Structure of the lipopolysaccharide core of *Vibrio vulnificus* type strain 27562. *Carbohydrate research*. 344(4): 484-490.
- Wand, M. E., Müller, C. M., Titball, R. W. and Michell, S. L. 2011. Macrophage and *Galleria mellonella* infection models reflect the virulence of naturally occurring isolates of *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. oklahomensis*. *Biomedicine microbiology*. 11(1): 1.
- Wang, R. F., Cao, W. W. and Cerniglia, C. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of applied microbiology*. 83(6): 727-736.
- Warner, E. and Oliver, J. D. 2008. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. *Applied and environmental microbiology*. 74(1): 80-85.
- Warner, J. M. and Oliver, J. D. 1999. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* species. *Applied and environmental microbiology*. 65(3): 1141-1144.
- Wollman, E. L. and Stent, G. S. 1952. Studies on activation of T4 bacteriophage by cofactor: IV. Nascent activity. *Biochimica et biophysica acta*. 9: 538-550.
- Wright, A., Hawkins, C., Anggard, E. and Harper, D. 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical otolaryngology*. 34(4): 349-357.
- Wright, A., Simpson, L., Oliver, J. and Morris, J. 1990. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity*. 58(6): 1769-1773.

- Wright, A. C., Miceli, G. A., Landry, W. L., Christy, J., Watkins, W. and Morris, J. 1993. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(2): 541-546.
- Yacoby, I. and Benhar, I. 2008. Targeted filamentous bacteriophages as therapeutic agents. *Expert opinion on drug delivery*. 5(3): 321-329.
- Yamanaka, H., Satoh, T., Katsu, T. and Shinoda, S. 1987. Mechanism of haemolysis by *Vibrio vulnificus* haemolysin. *Microbiology*. 133(10): 2859-2864.
- Yano, Y., Yokoyama, M., Satomi, M., Oikawa, H. and Chen, S.-S. 2004. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. *Journal of Food Protection*. 67(8): 1617-1623.
- Yokochi, N., Tanaka, S., Matsumoto, K., Oishi, H., Tashiro, Y., Yoshikane, Y., Nakashima, M., Kanda, K. and Kobayashi, G. 2013. Distribution of virulence markers among *Vibrio vulnificus* isolates of clinical and environmental origin and regional characteristics in Japan. *PLoS one*. 8(1): e55219.
- Yoshida, S., Ogawa, M. and Mizuguchi, Y. 1985. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity*. 47(2): 446-451.
- Young, R. 2014. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology*. 52(3): 243-258.
- Yu, Y.-P., Gong, T., Jost, G., Liu, W.-H., Ye, D.-Z. and Luo, Z.-H. 2013. Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS microbiology letters*. 348(2): 112-119.
- Zaidenstein, R., Sadik, C., Lerner, L., Valinsky, L., Kopelowitz, J., Yishai, R., Agmon, V., Parsons, M., Bopp, C. and Weinberger, M. 2008. Clinical characteristics and molecular subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel. *Emerging infectious diseases*. 14(12): 1875.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

#### 1. สูตรอาหาร

##### 1.1 Tryptic soy agar (TSA) + 1% NaCl

ส่วนประกอบต่อลิตร

Pancreatic digest of casein	15	g
Papaic digest of soybean	5	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
NaCl	10	g
น้ำกลั่น	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง TSA และ NaCl ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำส่วนผสมไปต้มโดยใช้ magnetic stirrer จนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

##### 1.2 Tryptic soy broth (TSB) + 1% NaCl

ส่วนประกอบต่อลิตร

Pancreatic digest of casein	15	g
Papaic digest of soybean	5	g
Sodium chloride	5	g
NaCl	10	g
น้ำกลั่น	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง TSB และ NaCl ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำส่วนผสมไปต้มโดยใช้ magnetic stirrer จนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C



### 1.3 Soft agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptic soy broth	30	g
Sodium chloride	10	g
Agar	7	g
น้ำกลั่น	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง TSB, NaCl และ agar ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำส่วนผสมไปต้มโดยใช้ magnetic stirrer จนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน ใช้ปิเปตดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 1.4 Luria-Bertani agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptone	10	g
Yeast Extract	5	g
Sodium chloride	10	g
Agar	7	g
น้ำกลั่น	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง TSB, Yeast Extract, NaCl และ agar ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำส่วนผสมไปต้มโดยใช้ magnetic stirrer จนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 1.5 Luria-Bertani broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

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

การเตรียม

ชั่ง TSB, Yeast Extract และ NaCl ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำส่วนผสมไปต้มโดยใช้ magnetic stirrer จนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 1.6 Mannitol fermentation broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

1% Mannitol	10	g
0.0075% Bromothymol blue	0.075	g
1% Peptone	10	g
0.5% NaCl	5	g
pH 7.4		
น้ำกลั่น	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง Mannitol, Bromothymol blue, peptone และ NaCl ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml ใช้ปิเปตดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 1.7 Brain Heart Infusion agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Calf Brains, Infusion	7.7	g
Beef Heart, Infusion	9.8	g
Proteose peptone	10.0	g
Dextrose	2.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Disodium phosphate	2.5	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง Calf Brains, Beef Heart, Proteose peptone, Dextrose, Sodium chloride, Disodium phosphate และ agar ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 1.8 Brain Heart Infusion broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

Calf Brains, Infusion	7.7	g
Beef Heart, Infusion	9.8	g

Proteose peptone	10.0	g
Dextrose	2.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Disodium phosphate	2.5	g
น้ำกลั่น	1000	ml

#### การเตรียม

ชั่ง Calf Brains, Beef Heart, Proteose peptone, Dextrose, Sodium chloride และ Disodium phosphate ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 1.9 Peptone glucose broth

#### ส่วนประกอบต่อลิตร

1% Glucose	10	g
0.0075% Bromthymol blue	0.075	g
1% Peptone	10	g
0.5 NaCl	5	g
pH 7.4		
น้ำกลั่น	1000	ml

#### การเตรียม

ชั่ง Glucose, Bromothymol blue, Peptone และ NaCl ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

## 2 สูตรการเตรียมสารเคมี

### 2.1 SM buffer

#### ส่วนประกอบต่อลิตร

MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (8 mM)	2	g
Sodium chloride (100 mM)	5.8	g
1M Tris-Cl pH 7.5 (50 mM)	50	ml
น้ำกลั่น	1000	ml

#### การเตรียม

ชั่ง Sodium chloride และ MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml เติม Tris-Cl pH 7.5 แล้วปรับปริมาตรน้ำเป็น 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.2 Loading dye

ซึ่ง Bromphenol blue 25 mg และ Sucrose 4 g ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

## 2.3 Ethidium bromide (10mg/ml)

ซึ่ง Ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

## 2.4 Cell suspension buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

1M Tris, pH 8.0	100	ml
0.5M EDTA, pH 8.0	200	ml
1M NaCl	20	ml
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ดูด 1M Tris, pH 8.0, 0.5M EDTA, pH 8.0 และ 1M NaCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.5 Cell lysis buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

1M Tris, pH 8.0	50	ml
0.5M EDTA, pH 8.0	100	ml
10% SDS	100	ml
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ดูด 1M Tris, pH 8.0, 0.5M EDTA, pH 8.0 และ 10% SDS แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.6 TE buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

1M Tris, pH 8.0	10	ml
0.5M EDTA, pH 8.0	2	ml
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ดูด 1M Tris, pH 8.0 และ 0.5M EDTA, pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.7 10× TBE buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tris base	108	g
Boric acid	55	g
0.5M EDTA, pH 8.0	40	ml
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง Tris base, Boric acid และดูด 0.5M EDTA, pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.8 Phosphate-buffered saline (PBS)

ส่วนประกอบต่อลิตร

NaCl	8	g
KCl	2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4	g
pH 7.4		
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> และ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.9 Lysis buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

0.5M EDTA	18.61	g
1M Tris	12.11	g
10% SDS	10	g
pH 8.0		
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง EDTA, Tris และ SDS ละลายในน้ำ 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**2.10 3M NaCl**

ส่วนประกอบต่อลิตร

NaCl	175.32	g
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง NaCl ละลายในน้ำ 1000 ml แล้วนำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**2.11 30% PEG 8,000**

ส่วนประกอบต่อลิตร

PEG 8,000	30	g
น้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

การเตรียม

ชั่ง PEG 8,000 ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**2.12 3M NaOAc (Sodium acetate)**

ส่วนประกอบต่อ 100 ml

NaOAc	40.8	g
pH 5.2		
น้ำกลั่นให้ครบ	100	ml

การเตรียม

ชั่ง NaOAc ละลายในน้ำ 80 ml ปรับ pH ให้ได้ 5.2 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## ภาคผนวก ข

## แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 14 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	แบคทีเรีย	แหล่งที่แยก	แหล่งที่ได้รับ
1	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D22	แยกจากหอยนางรม	ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D24	แยกจากหอยนางรม	
3	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J6	แยกจากหอยนางรม	
4	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J11	แยกจากหอยนางรม	
5	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J14	แยกจากหอยนางรม	
6	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J15	แยกจากหอยนางรม	
7	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J17	แยกจากหอยนางรม	
8	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K2	แยกจากหอยนางรม	
9	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K3	แยกจากหอยนางรม	
10	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K10	แยกจากหอยนางรม	
11	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D14	แยกจากหอยนางรม	
12	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D16	แยกจากหอยนางรม	
13	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D21	แยกจากหอยนางรม	
14	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C42	แยกจากหอยนางรม	
15	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D18	แยกจากหอยนางรม	
16	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C30	แยกจากหอยนางรม	
17	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C35	แยกจากหอยนางรม	
18	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D2	แยกจากหอยนางรม	
19	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C90	แยกจากหอยนางรม	
20	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C32	แยกจากหอยนางรม	
21	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K20	แยกจากหอยนางรม	
22	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C16	แยกจากหอยนางรม	
23	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K22	แยกจากหอยนางรม	
24	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C14	แยกจากหอยนางรม	
25	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C88	แยกจากหอยนางรม	

ตารางที่ 14 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

ลำดับ	แบคทีเรีย	แหล่งที่แยก	แหล่งที่ได้รับ	
26	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C12	แยกจากหอยนางรม	ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	
27	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C70	แยกจากหอยนางรม		
28	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C11	แยกจากหอยนางรม		
29	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K12	แยกจากหอยนางรม		
30	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C43	แยกจากหอยนางรม		
31	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C51	แยกจากหอยนางรม		
32	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C4	แยกจากหอยนางรม		
33	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D4	แยกจากหอยนางรม		
34	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C2	แยกจากหอยนางรม		
35	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J1	แยกจากหอยนางรม		
36	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ PSU 039	แยกจาก สิ่งแวดล้อม		
37	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ PSU 025	แยกจาก สิ่งแวดล้อม		
38	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 31751	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
39	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 31752	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
40	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 4184	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
41	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 31753	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
42	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 4183	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
43	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 32991	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
44	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 32989	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
45	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 32990	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
46	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562	สายพันธุ์ มาตรฐาน	American type culture collection	
47	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 3606	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	
48	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 4126	แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย		
49	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA1	แยกจากปลากะพงขาว	สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ชายฝั่ง กรมประมง	
50	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA2	แยกจากปลากะพงขาว		



ตารางที่ 14 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

ลำดับ	แบคทีเรีย	แหล่งที่แยก	แหล่งที่ได้รับ
51	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA3	แยกจากปลากะพงขาว	สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ชายฝั่ง กรมประมง
52	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA4	แยกจากปลากะพงขาว	
53	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA5	แยกจากปลากะพงขาว	
54	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA6	แยกจากปลาเก๋าเสือ	
55	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA7	แยกจากปลาเก๋าเสือ	
56	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA8	แยกจากปลาเก๋าเสือ	
57	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA9	แยกจากปลาเก๋าเสือ	
58	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ FWV11	แยกจากปลาเก๋าเสือ	
59	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ W 3.2	น้ำกระชังปลาบังแดด จ.กระบี่	ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
60	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ W 4.6	น้ำกระชังปลาบังแดด จ.กระบี่	
61	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ W 7.6	น้ำกลางคลองจืดหาด จ. กระบี่	
62	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ S 1.4	ตะกอนดินกระชังปลาบังแดด จ.กระบี่	
63	<i>V. cholerae</i> O1 สายพันธุ์ PSU 966	แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วย	
64	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	สายพันธุ์ มาตรฐาน	American type culture collection
65	<i>V. alginolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	สายพันธุ์ มาตรฐาน	ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ภาคผนวก ค  
ผลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ 15 ลักษณะการแสดงออกทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus*

ลำดับ	แบคทีเรีย	ไบโอไทป์	การหมักน้ำตาล แมนนิทอล	จีโนไทป์				การสลายเม็ดเลือดแดง		ความทนต่อเซรุ่ม
				<i>ManIIA</i>	<i>nanA</i>	<i>nab</i>	PRXII	น้ำเลี้ยงเซลล์	เซลล์	
1	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D22	1	+	+	+	YJ-like	-	-	+	Res
2	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D24	1	+	+	-	YJ-like	+	+	+	Res
3	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J6	1	+	+	+	YJ-like	+	-	-	Res
4	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J11	1	-	-	+	-	-	+	+	Res
5	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J14	1	+	+	+	YJ-like	-	+	-	Res
6	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J15	1	+	+	+	YJ-like	-	-	-	Res
7	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J17	1	+	+	-	-	-	+	-	Res
8	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K2	1	-	-	+	YJ-like	-	+	+	Res
9	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K3	1	+	+	+	YJ-like	-	+	-	Res
10	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K10	1	+	+	+	YJ-like	-	+	-	Res
11	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D14	1	+	+	+	-	-	+	+	Res
12	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D16	1	+	+	-	YJ-like	+	+	+	Res

ตารางที่ 15 ลักษณะการแสดงออกทางจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* (ต่อ)

ลำดับ	แบคทีเรีย	ไบโอไทป์	การหมักน้ำตาล แมนนิทอล	จีโนมไทป์				การสลายเม็ดเลือดแดง		ความทนต่อเซรุ่ม
				<i>ManIIA</i>	<i>nanA</i>	<i>nab</i>	PRXII	น้ำเลี้ยงเซลล์	เซลล์	
13	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D21	1	+	+	+	YJ-like	-	+	+	Res
14	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C42	1	+	+	-	YJ-like	-	+	-	Res
15	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D18	1	+	+	+	YJ-like	-	+	+	Res
16	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C30	1	+	+	+	YJ-like	-	-	-	Res
17	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C35	1	+	+	+	-	-	+	-	Res
18	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D2	1	+	+	-	YJ-like	+	-	+	Res
19	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C90	1	+	+	+	-	+	-	+	Res
20	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C32	1	+	+	-	YJ-like	-	-	+	Res
21	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K20	1	+	+	-	YJ-like	-	+	-	Res
22	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C16	1	+	+	+	YJ-like	-	+	+	Res
23	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K22	1	+	+	+	-	+	-	-	Res
24	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C14	1	+	+	+	-	+	+	-	Res

ตารางที่ 15 ลักษณะการแสดงออกทางจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* (ต่อ)

ลำดับ	แบคทีเรีย	ไบโอไทป์	การหมักน้ำตาล แมนนิทอล	จีโนมไทป์				การสลายเม็ดเลือดแดง		ความทนต่อเซรุ่ม
				<i>ManIIA</i>	<i>nanA</i>	<i>nab</i>	PRXII	น้ำเลี้ยงเซลล์	เซลล์	
25	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C88	1	+	+	-	YJ-like	-	+	-	Res
26	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C12	1	-	-	-	-	+	-	-	Res
27	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C70	1	+	+	-	YJ-like	-	-	-	Res
28	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C11	1	+	+	-	YJ-like	+	+	+	Res
29	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K12	1	+	+	+	-	+	+	-	Res
30	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C43	1	+	+	-	YJ-like	-	-	-	Res
31	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C51	1	-	-	-	-	-	-	-	Res
32	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C4	1	-	-	-	-	-	+	+	Res
33	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ D4	1	+	+	-	YJ-like	+	+	-	Res
34	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ C2	1	+	+	+	YJ-like	+	+	+	Res
35	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ J1	2	+	+	+	-	-	+	-	Res
36	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ PSU 039	1	+	+	+	YJ-like	-	-	-	Res

ตารางที่ 15 ลักษณะการแสดงออกทางจีโนมและฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* (ต่อ)

ลำดับ	แบคทีเรีย	ไบโอไทป์	การหมักน้ำตาล แมนนิทอล	จีโนม				การสลายเม็ดเลือดแดง		ความทนต่อเซรุ่ม
				<i>ManIIA</i>	<i>nanA</i>	<i>nab</i>	PRXII	น้ำเลี้ยงเซลล์	เซลล์	
37	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ PSU 025	1	+	+	+	YJ-like	-	+	-	Res
38	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 31751	1	+	+	+	YJ-like	+	+	+	Res
39	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 31752	1	+	+	+	YJ-like	-	+	-	Res
40	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 4184	1	+	+	+	YJ-like	-	+	+	Res
41	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 31753	1	+	+	+	-	+	+	-	Res
42	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 4183	1	+	+	+	YJ-like	+	+	-	Res
43	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 32991	1	+	+	+	-	+	+	-	Res
44	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 32989	1	+	+	+	CM-like	-	+	-	Res
45	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 32990	1	+	+	+	-	-	+	-	Res
46	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562	1	+	+	+	-	-	+	-	Res
47	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 3606	1	+	+	+	-	-	+	-	Res
48	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ DMST 4126	2	+	+	+	YJ-like	-	+	-	Res

ตารางที่ 15 ลักษณะการแสดงออกทางจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ของ *V. vulnificus* (ต่อ)

ลำดับ	แบคทีเรีย	ไบโอไทป์	การหมักน้ำตาล แมนนิทอล	จีโนมไทป์				การสลายเม็ดเลือดแดง		ความทนต่อเซรุ่ม
				<i>ManIIA</i>	<i>nanA</i>	<i>nab</i>	PRXII	น้ำเลี้ยงเซลล์	เซลล์	
49	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA1	1	+	+	+	YJ-like	+	+	+	Res
50	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA2	1	+	+	+	-	+	-	+	Res
51	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA3	1	+	+	+	-	-	-	+	Res
52	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA4	1	+	+	+	-	+	+	+	Res
53	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA5	1	+	+	+	YJ-like	+	-	+	Res
54	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA6	1	+	+	-	-	+	+	+	Res
55	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA7	1	+	+	-	-	+	+	+	Res
56	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA8	1	+	+	-	-	+	+	+	Res
57	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA9	1	+	+	+	-	+	-	+	Res
58	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ FVV11	1	+	+	+	YJ-like	-	+	+	Res
59	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ W 3.2	1	+	+	+	-	+	+	+	Sen
60	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ W 4.6	1	+	+	+	CM-like	+	+	-	Sen
61	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ W 7.6	1	+	+	+	YJ-like	-	+	+	Sen
62	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ S 1.4	1	+	+	+	YJ-like	+	+	+	Int

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบความรุนแรงของ *V. vulnificus* จำนวน 10 สายพันธุ์ ในหอนอนผีเสื้อ

<i>V. vulnificus</i>		เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหอนอนผีเสื้อ จำแนกตามเวลาต่าง (ชั่วโมง)				
สายพันธุ์	ปริมาณที่ใช้ (CFU/ml)	24	48	72	96	120
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA1	10	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1000	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA2	10	80.0	70.0	63.3	63.3	60.0
	100	60.0	53.3	53.3	50.0	50.0
	1000	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA3	10	60.0	46.7	33.3	26.7	26.7
	100	26.7	20.0	16.7	16.7	13.3
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA4	10	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1000	83.3	80.0	80.0	80.0	80.0
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA5	10	36.7	23.3	23.3	23.3	23.3
	100	13.3	10.0	10.0	10.0	10.0
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA6	10	33.3	26.7	23.3	23.3	23.3
	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA7	10	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	100	83.3	83.3	80.0	80.0	80.0
	1000	36.7	33.3	33.3	33.3	33.3
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA8	10	30.0	23.3	20.0	20.0	20.0
	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ VVA9	10	26.7	23.3	23.3	23.3	23.3
	100	20.0	6.7	6.7	6.7	6.7
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ FWV11	10	93.3	93.3	90.0	90.0	90.0
	100	80.0	76.7	60.0	46.7	46.7
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
1				+												+
2				+												+
3				+												+
4				+												+
5				+												+
6																+
7																+
8																+
9																+
10																+
11			+	+										+		+
12														+		+
13		+							+					+		+
14				+												+
15	+															+
16														+		+
17					+											+
18	+				+				+				+			+
19	+	+		+	+			+		+			+			+
20				+	+								+			+
21		+	+		+			+	+	+	+		+			+
22		+	+		+			+	+				+			+
23		+	+					+	+	+	+		+			+
24		+	+		+			+	+	+	+		+			+
25		+	+					+	+	+	+		+	+		+



ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. olinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
26	+	+			+			+	+	+	+		+			+
27	+	+	+			+	+	+		+	+		+			+
28	+	+	+			+	+	+			+		+			+
29	+	+	+			+	+	+	+	+	+		+			+
30	+	+	+			+	+	+		+	+		+			+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
40			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+
41			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+
42	+		+	+	+		+	+	+	+	+		+			+
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+			+
44	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+			+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+
46		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+
48	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+			+
49		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+
50							+		+				+			+

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
51					+		+		+				+			+
52					+		+		+				+			+
53					+		+	+	+		+		+			+
54					+		+		+				+			+
55					+		+		+		+	+	+			+
56					+	+	+		+		+		+			+
57					+	+	+	+	+		+	+	+			+
58					+	+	+	+	+		+	+	+			+
59					+		+		+				+			+

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
81			+	+		+		+		+		+	+		+	+
82			+	+		+		+		+		+			+	+
83	+	+	+	+		+		+		+		+			+	+
84		+	+	+	+	+	+		+	+		+				+
85		+	+	+	+	+	+	+		+		+			+	+
86		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
87		+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+	+
88		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
89		+	+	+	+	+	+		+		+				+	+
90		+	+	+	+	+	+		+		+				+	+
91			+	+		+			+			+				
92			+	+		+			+			+				
93			+	+					+			+				+
94								+	+	+	+	+				+
95			+	+		+		+	+	+	+	+				+
96		+	+	+	+	+		+	+	+		+				+
97	+		+	+	+			+	+	+	+	+		+	+	+
98			+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
99			+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
100			+	+	+	+		+	+	+	+	+			+	+
101			+	+	+		+	+	+	+	+	+			+	
102			+	+	+	+	+		+	+	+	+			+	
103			+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
104			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
105			+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
106			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
107	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
108		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
109			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
110			+	+	+	+	+			+		+		+	+	+
111	+	+	+	+			+		+	+		+				
112	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+				
113	+	+	+	+			+	+	+			+		+		
114	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+		
115	+	+	+	+	+	+	+			+		+		+		
116			+	+		+	+	+	+			+		+		
117	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		
118	+	+	+	+	+	+	+			+		+				
119			+	+			+		+	+		+		+		
120	+	+	+	+			+	+	+	+		+		+		
121	+	+	+	+		+	+	+	+	+						+
122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						+
123	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+			+	+
124	+	+	+	+	+	+	+	+	+						+	+
125		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
126	+		+		+		+	+	+	+		+			+	+
127	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+			+	+
128		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
129		+	+	+		+	+	+	+	+		+			+	+
130		+	+	+		+	+	+		+		+			+	+

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	Vibrio spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
131			+	+	+	+									+	
132			+	+	+	+			+	+		+			+	
133		+	+	+	+	+		+	+	+		+		+	+	+
134		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
135			+	+	+	+			+	+	+	+			+	+
136			+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
137			+	+		+		+	+	+		+		+	+	
138			+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
139			+	+	+	+			+	+				+	+	
140		+	+	+	+	+			+	+	+	+		+	+	
141			+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
142										+						
143			+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
144			+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
145			+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
146			+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
147			+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
148			+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
149			+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
150			+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
151		+	+	+	+	+		+	+		+	+			+	
152		+	+	+	+	+		+	+			+			+	
153		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	
154		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	
155		+	+	+	+	+	+	+	+			+			+	

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	Vibrio spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
156		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	
157		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	
158		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	
159		+	+	+	+	+	+	+	+			+			+	
160		+	+	+	+	+	+	+	+			+			+	
161				+	+	+	+	+			+	+			+	
162				+	+	+	+	+	+			+		+	+	
163				+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
164	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	
165		+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
166			+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
167	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	
168		+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
169		+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
170		+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
171		+		+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	
172		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
173		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
174		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
175		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
176		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
177			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
178		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
179		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
180		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
181				+	+	+	+	+							+	+
182		+		+	+	+	+	+	+			+			+	+
183		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
184	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+	+
185	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+
186		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
187	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+	+
188	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
189		+		+	+	+	+	+		+	+	+				+
190	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
192			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
193	+		+	+	+	+	+								+	
194				+	+		+	+								
195			+	+	+	+		+	+			+			+	
196				+	+	+	+	+				+			+	
197	+		+	+	+	+	+	+	+			+			+	
198			+	+	+	+						+			+	
199					+		+									
200															+	
201				+	+	+	+	+				+		+	+	
202	+			+	+	+	+	+				+		+	+	
203	+			+	+	+		+				+		+		
204	+			+	+	+		+				+		+	+	
205				+	+	+	+	+				+		+	+	

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
206	+			+	+	+	+	+				+		+	+	
207	+			+	+			+				+				+
208	+			+	+		+	+						+	+	
209				+	+	+	+	+						+	+	
210	+			+	+	+										+
211					+	+			+					+	+	
212			+	+	+	+		+	+			+		+	+	
213			+			+		+	+			+		+	+	
214	+		+		+	+		+	+			+	+	+	+	
215			+		+	+			+	+		+		+	+	
216					+	+		+	+					+	+	
217	+		+		+	+		+	+			+	+	+	+	
218	+		+	+	+	+		+	+	+		+		+	+	
219	+		+	+	+	+		+	+	+		+		+	+	
220	+		+		+			+	+	+		+		+	+	
221			+		+	+	+	+	+	+		+			+	
222			+		+	+	+	+	+	+		+	+		+	
223			+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	
224			+		+	+	+	+	+	+		+			+	
225			+		+	+	+	+	+	+		+			+	
226			+		+	+		+	+	+		+	+		+	
227			+			+	+	+	+	+		+			+	
228			+		+	+			+			+				
229			+		+	+	+	+	+	+		+			+	
230			+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	



ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
231			+		+			+	+	+	+				+	
232			+	+		+			+		+				+	
233		+	+	+	+			+	+						+	
234		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
235		+	+	+	+			+	+							
236		+	+	+	+			+	+	+	+				+	
237		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+	
238			+	+	+			+	+	+					+	
239			+	+	+			+	+		+	+			+	

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
240		+											+		+	+
241					+		+	+		+	+				+	+
242					+		+	+		+					+	+
243		+		+							+		+	+	+	+
244	+	+	+	+	+		+		+	+	+				+	+
245	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+
246	+	+	+	+		+		+		+			+		+	+
247		+	+				+						+		+	+
248		+	+	+											+	+
249		+						+							+	+
250		+		+	+	+	+	+		+			+	+		+
251		+		+	+	+		+	+	+	+					+
252		+			+	+	+	+	+	+						+
253			+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
254	+	+		+	+	+		+	+		+					+
255			+	+	+		+	+	+		+		+	+	+	+
256	+	+			+			+	+		+			+		+
257		+			+	+	+	+		+						+
258		+			+		+	+		+						+
259		+			+	+	+	+		+					+	+
260		+	+	+	+	+		+	+			+	+			+
261		+	+	+		+		+	+			+			+	+
262	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+		+	+
263	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+
264		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	Vibrio spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
265		+	+	+	+	+		+	+		+	+	+		+	+
266	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+
267		+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+	+
268		+	+	+	+	+		+	+		+	+			+	+
269		+	+	+	+	+		+	+		+	+	+		+	+
270				+		+	+	+	+	+	+			+		
271						+	+	+	+	+	+		+	+		+
272		+	+		+	+	+	+	+		+	+		+		+
273		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
274				+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+
275		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
276	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
277				+			+	+	+	+			+	+		
278		+	+			+	+	+	+	+			+	+		+
279		+		+		+	+	+	+	+			+			+
280		+		+		+	+	+	+		+	+		+	+	+
281		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	
282	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
283	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
284	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
285	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
286	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+
287	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
288	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
289	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
290				+					+		+			+	+	+
291				+		+			+		+	+		+	+	+
292			+	+					+		+	+		+	+	+
293		+	+	+		+	+	+	+		+	+	+		+	+
294		+	+	+				+	+		+	+		+	+	+
295			+	+					+		+			+	+	+
296			+	+			+	+	+		+	+	+		+	+
297			+	+			+	+	+		+				+	+
298			+	+				+	+		+			+	+	+
299		+	+	+					+		+			+	+	+
300			+	+	+			+	+		+	+		+	+	+
301			+	+	+	+		+	+		+	+		+	+	+
302			+	+	+		+	+	+		+	+		+	+	+
303			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
304			+	+	+	+	+	+			+	+		+	+	+
305		+	+	+	+		+	+	+		+	+		+	+	+
306			+	+	+		+			+		+	+	+	+	+
307			+	+	+	+		+	+			+	+	+	+	+
308			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
309		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
310								+								+
311		+														
312						+		+					+			
313					+	+	+	+					+		+	+
314		+			+	+		+							+	

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
315						+		+					+		+	
316			+		+	+		+					+		+	+
317					+	+		+								
318						+		+								
319					+	+		+								
320	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
321	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
322			+	+	+	+	+		+		+	+	+	+		+
323	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
324	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
325			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+
326	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
327	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
328			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+
329	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
330			+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
331			+		+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
332			+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+
333	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
334			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
335			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
336	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
337			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
338			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
339			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+

ตารางที่ 17 ความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ ATCC 27562 เป็นโฮสต์ (ต่อ)

phage code	<i>Vibrio</i> spp. ที่ใช้															
	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4183	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 3606	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4126	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32990	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32991	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ G16(PSU025)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ K1(PSU039)	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31751	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31752	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 31753	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 32989	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ 4184	<i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ ATCC 17808	<i>V. alinolyticus</i> สายพันธุ์ PSU 6	<i>V. cholerae</i> สายพันธุ์ PSU 01 368	<i>V. vulnificus</i> สายพันธุ์ ATCC 27562
340			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
341			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+
342			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
343	+		+	+	+	+	+	+			+		+	+	+	+
344			+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+
345			+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
346	+		+	+	+	+	+	+			+		+	+	+	+
347			+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+

ตารางที่ 18 ความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA6 เป็นโฮสต์

<i>Vibrio</i> spp.	แบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ <i>V. vulnificus</i>								
	MC10915	MC20915	BD11015	BD21015	BD31015	BD41015	BD51015	BD61015	BD71015
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	+	+							
<i>V. vulnificus</i> DMST 3606	+	+		+	+				
<i>V. vulnificus</i> DMST 4126									
<i>V. vulnificus</i> DMST 4183	+	+	+			+	+		
<i>V. vulnificus</i> DMST 4184						+			
<i>V. vulnificus</i> DMST 31751	+	+	+	+		+	+	+	
<i>V. vulnificus</i> DMST 31752	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> DMST 31753	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> DMST 32990	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> DMST 32991	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> DMST 32989									
<i>V. vulnificus</i> PSU 039									
<i>V. vulnificus</i> PSU 025									
<i>V. vulnificus</i> VVA1			+	+	+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> VVA2	+	+		+		+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> VVA3	+	+			+	+	+		
<i>V. vulnificus</i> VVA4	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> VVA5									
<i>V. vulnificus</i> VVA6	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> VVA7	+	+				+		+	
<i>V. vulnificus</i> VVA8	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i> VVA9	+	+	+			+	+	+	
<i>V. vulnificus</i> FW11	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>V. alginolyticus</i> PSU 6									
<i>V. cholerae</i> PSU 966 O1									
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17808									

