บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

แบคทีเรียในจีนัส Vibrio พบอยู่ทั่วไปในน้ำทะเล ในปัจจุบันมีรายงานมากกว่า 30 สปีชีส์ที่พบทั่วโลก และในจำนวนนี้มีอยู่ 12 สปีชีส์ที่พบว่าก่อให้เกิดโรคในคน ซึ่งมีทั้งแบบ ติดเชื้อภายในลำไส้ (intestinal tract) และนอกลำไส้ (extraintestinal tract) (Blake *et al*., 1980) *Vibrio hollisae* ถูกรายงานการพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 โดย Hickman และคณะ เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในกลุ่ม Vibrio ที่เพิ่งเป็นที่รู้จักไม่นานมานี้ มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของอาการท้องร่วง เนื่องมาจากการรับประทานอาหารทะเลสุกๆดิบๆ (Hickman *et al*., 1982) อาการของโรคจะคล้ายกับผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ *V. cholerae* non-O1 (Haughes *et al*., 1978; Morris *et al*., 1982) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อ *V. hollisae* ในบาดแผล และในกระแสเลือด (Morris and Blake, 1982; Lowry *et al*., 1986; Rank *et al*., 1988) เชื้อจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 °C ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อดังกล่าว จึงคาดว่าเชื้อนี้น่าจะปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม และเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคท้องร่วงที่เกิดจากอาหารทะเลเป็นพิษ อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการทำได้ยากเนื่องจากเชื้อจะไม่ค่อยเจริญในอาหารที่ใช้แยก enteric pathogen ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป เช่น Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS) และ MacConkey agar ผู้ป่วยบางรายที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรง เมื่อแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ จะพบเชื้อโคโลนีเล็กๆ เพียง 1 โคโลนีบนอาหาร TCBS (Carnahan *et al*., 1994) เชื้อที่ถูกรายงานส่วนใหญ่จะถูกพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose lysine deoxycholate agar ซึ่งใช้แยก Shigella และ Blood agar ซึ่งใช้แยกเชื้อในกระแสโลหิต (Abbott and Janda, 1994; Carnahan *et al*., 1994) นอกจากนี้ยังให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่ไม่ชัดเจนนัก และอาหารที่ใช้ทดสอบ ต้องเติมเกลือที่ความเข้มข้น 1% ด้วยเสมอ อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆนี้ได้มีการพัฒนาการวินิจฉัยเชื้อตัวนี้โดยวิธี PCR (Vuddhakul *et al*., 2000) ซึ่งช่วยให้การวินิจฉัยเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง สำหรับกลไกการก่อโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแน่ชัด แต่พบว่าเชื้อ

V. hollisae ทุกสายพันธุ์สามารถผลิต hemolysin ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ thermostable direct hemolysin (tdh) ที่พบใน *V. parahaemolyticus* และ hemolysin ดังกล่าวเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดโรคในคน เนื่องจากตรวจพบจีน *tdh* ได้ใน *V. parahaemolyticus* เกือบทุกสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วย แต่ตรวจพบได้น้อยมากใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม(Miyamoto *et al*., 1969; Sakazaki *et al*., 1968) นอกจากนี้ยังพบจีน *tdh* ได้บ้างในบางสายพันธุ์ของ *V. mimicus* และพบใน *V. cholerae* non-O1 เพียง 1 สายพันธุ์ ขณะที่พบว่า *V. hollisae* ทุกสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม มีจีน *tdh* ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่มีการถ่ายทอดจีน *tdh* ภายในกลุ่ม *Vibrio* species ด้วยกัน (Nishibuchi and Kaper, 1995) และ *V. hollisae* อาจเป็นแหล่งกำเนิด จีน *tdh* ดังกล่าว และถ่ายทอดไปยัง *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* species อื่นๆในธรรมชาติ การถ่ายทอดจีนดังกล่าวนี้อาจผ่านทาง bacteriophage เนื่องจากเมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการพบ filamentous bacteriophage ของ *V. cholerae* เป็นตัวการสำคัญในการถ่ายทอด cholera toxin (Waldor and Mekalanos, 1996) และในเวลาต่อมามีการตรวจพบจีน bacteriophage อยู่บนโครโมโซมและพลาสมิดของ *V. parahaemolyticus* (Taniguchi *et al*., 1984) ดังนั้นการเคลื่อนที่ของ bacteriophage จากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่งอาจทำให้เกิดการพา จีน *tdh* ไปให้แบคทีเรียตัวนั้นด้วย เพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานว่า *V. hollisae* เป็นแหล่งของ จีน *tdh* และถ่ายทอดไปให้ *V. parahaemolyticus* หรือ *Vibrio* species อื่นๆ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจหา จีนของ bacteriophage ว่าปรากฏอยู่บนโครโมโซม หรือ พลาสมิดของ *V. hollisae* หรือไม่ ในการศึกษานี้จะทำการแยกเชื้อ *V. hollisae* และศึกษาหาจีนของ bacteriophage บนโครโมโซมและพลาสมิดของ *V. hollisae*

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 แฟมิลี่ Vibrionaceae

1.2.1.1 ลักษณะทั่วไป

Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งขนาดกว้าง 0.5-0.8 μm ยาว 1.4-2.6 μm ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วย polar flagellum ไม่สร้างสปอร์ ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน (chemoorganotroph) สามารถเผาผลาญอาหาร (metabolism) เพื่อสร้างพลังงาน ได้ทั้งแบบการหมักและการหายใจ โดยทั่วไปจะให้ผลออกซิเดสบวก เจริญได้ในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) พบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ปัจจัยที่อาจก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในกลุ่มนี้ คือ อุณหภูมิ ความเค็ม ความลึกจากผิวทะเล และสิ่งมีชีวิตที่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อ เชื้อบางสปีชีส์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-25 °C และบางสปีชีส์เจริญที่อุณหภูมิ 35-37 °C และส่วนใหญ่จะเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.5-0.8% ยกเว้นบางสปีชีส์ที่ต้องการเกลือในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ ก่อให้เกิดโรคในปลา และคน ในแฟมิลี่นี้จะประกอบด้วย 4 จีนัส คือ จีนัส Vibrio จีนัส Photobacterium จีนัส Plesiomonas และจีนัส Aeromonas เชื้อในจีนัส Vibrio หลายสปีชีส์มักจะก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในลำไส้ (intestinal tract) และนอกลำไส้ (extraintestinal tract) มีการแพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติ และมีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae ที่ให้ผลออกซิเดสลบ เชื้อในจีนัส Vibrio ที่ก่อให้เกิดโรคในคนมี 12 สปีชีส์ คือ *V. cholerae V. parahaemolyticus V. fluvialis V. vulnificus V. alginolyticus V. mimicus V. hollisae V. furnissii V. cincinnatiensis V. damsela V. metschnikovii* และ *V. carchariae*

1.2.1.2 การก่อโรค

การก่อโรคในคนแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม *V. cholerae* และกลุ่ม non-*V. cholerae* สำหรับกลุ่ม non-*V. cholerae* นั้นจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ตามความต้องการเกลือในการเจริญเติบโต คือ กลุ่มทนเค็ม ได้แก่ *V. parahaemolyticus V. fluvialis V. vulnificus V. alginolyticus V. hollisae V. furnissii V. cincinnatiensis* และ *V. carchariae* และกลุ่มไม่ทนเค็ม ได้แก่ *V. cholerae* และ *V. mimicus* การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของ

อุณหภูมิและความเค็มของน้ำล้วนมีผลต่อการระบาดของเชื้อ Vibrio ส่วนใหญ่จะก่อให้เกิดโรค gastroenteritis ทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ถ่ายอุจจาระเป็นเลือด มีไข้ นอกจากนี้ Vibrio ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผล และติดเชื้อในกระแสโลหิต กลไกการก่อโรคเกิดจาก เชื้อสามารถสร้าง toxin ได้หลายชนิด เช่น cytotoxin hemolysin และเอนไซม์ที่มีบทบาทในการทำลายเนื้อเยื่อ (ดังตารางที่ 1.1)

ตารางที่ 1.1 อาการที่มักเกิดขึ้นกับผู้ติดเชื้อ Vibrio และชนิดของ toxin ที่เชื้อสร้างขึ้น

ชนิดของอาการ	เชื้อกลุ่ม non - *V. cholerae*	Cytotoxin/เอนไซม์
Gastroenteritis: อาการที่มักเกิดขึ้น ● ท้องร่วง ปวดเกร็งช่องท้อง คลื่นไส้อาเจียน มีไข้ ถ่ายเป็นเลือด ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ	*V. parahaemolyticus* *V. cholerae* non-O1 *V. fluvialis* *V. mimicus* *V. furnissii* *V. hollisae* *V. alginolyticus* *V. vulnificus*	Cytotoxin Hemolysin
Wound infection: อาการที่มักเกิดขึ้น ● บวมพอง เจ็บปวด หนังร้อนแดง ตุ่มพอง เนื้อเยื่อตาย เนื้อเน่า	*V. alginolyticus* *V. vulnificus* *V. cholerae* non-O1 *V. damsela* *V. carchariae* *V. fluvialis* *V. parahaemolyticus* *V. mimicus*	Protease Hemolysin
Septicemia: อาการที่มักเกิดขึ้น ● มีไข้ หัวใจเต้นเร็วผิดปกติ ช็อก ตุ่มพอง หายใจขัด อวัยวะทำงานผิดปกติ	*V. vulnificus* *V. fluvialis* *V. damsela* *V. cholerae* Non-O1 *V. cincinnatiensis*	Protease Endotoxin (lipopolysaccharide)

(ที่มา www.emedicine.com/med/topic2375.htm)

ในสหรัฐอเมริกาการติดเชื้อ Vibrio ส่วนใหญ่มักเกิดจากกลุ่ม non-*V. cholerae* โดยในปี ค.ศ.1983 มีรายงานการตรวจพบเชื้อ Vibrio จำนวน 9 สปีชีส์ ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *V. fluvialis V. hollisae V. mimicus* และ *V. parahaemolyticus* ก่อให้เกิดอาการท้องร่วง และมีการติดเชื้อนอกลำไส้ เช่น ติดเชื้อจากบาดแผล หู กระแสเลือด และถุงน้ำดี *V. alginolyticus V. damsela V. metschnikovii* และ *V. vulnificus* ก่อให้เกิดการติดเชื้อเริ่มต้นภายนอกลำไส้ และ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* non-O1 ก่อให้เกิดท้องร่วงและการติดเชื้อนอกลำไส้ (Blake *et al*., 1983) จากการศึกษาผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลแถบอ่าว Chesapeake เป็นเวลา 15 ปีติดต่อกัน พบว่ามีการติดเชื้อ Vibrio 40 สายพันธุ์ โดยแยกจากผู้ป่วย 32 ราย และพบทั้งหมด 8 สปีชีส์ คือ *V. parahaemolyticus* 16 สายพันธุ์ *V. vulnificus* 10 สายพันธุ์ *V. cholerae* non-O1 7 สายพันธุ์ *V. mimicus* 3 สายพันธุ์ *V. hollisae* 1 สายพันธุ์ *V. fluvialis* 1 สายพันธุ์ *V. alginolyticus* 1 สายพันธุ์ ส่วนที่เหลืออีก 1 สายพันธุ์ เป็น Vibrio ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ เชื้อถูกแยกออกจากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ เช่น แผล อุจจาระ เสมหะ หู กระดูก และถุงน้ำดี (Hoge *et al*., 1989) ในปี ค.ศ. 1989 มีความร่วมมือกันในการตรวจหาการก่อโรคเนื่องจากเชื้อ Vibrio ในแถบอ่าวรัฐตามชายฝั่ง 4 แห่ง คือ Alabama Florida Louisiana และ Texas พบผู้ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* 34 ราย *V. cholerae* non-O1 30 ราย *V. vulnificus* 18 ราย *V. hollisae* 9 ราย *V. alginolyticus* 7 ราย และ *V. fluvialis* 7 ราย พบผู้ป่วยมีอาการ ติดเชื้อเริ่มต้นในกระแสโลหิต 14 ราย มีอาการติดเชื้อในทางเดินอาหาร 71 ราย ติดเชื้อในบาดแผล 29 ราย และมีอาการอื่นๆอีก 7 ราย มีผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลถึง 66 ราย และในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิต 9 ราย ผู้ป่วยทุกรายที่ติดเชื้อในกระแสโลหิต และ 17% ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร พบว่ามีโรคประจำตัวเรื้อรัง พบว่า 67% ของผู้ติดเชื้อในกระแสโลหิต และ 74% ของผู้ที่ติดเชื้อในทางเดินอาหาร รับประทานหอยนางรมดิบใน 1 สัปดาห์ ก่อนจะเกิดอาการ (Levine and Griffin, 1993) และระหว่างปี ค.ศ. 1981-1994 มีรายงานการติดเชื้อ non-*V. cholerae* ในรัฐฟลอริดาสูงมาก ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* รองลงมาเป็น *V. vulnificus V. cholerae* non-O1 *V. hollisae V. alginolyticus V. fluvialis* และ *V. mimicus* (Hlady, 1997) นอกจากนี้ยังมีการพบเชื้อ Vibrio ในหอยนางรม ที่ส่งมาจากชายฝั่งของบราซิล โดยพบ *V. alginolyticus* 81%

V. parahaemolyticus 77% *V. cholerae* non-O1 31% *V. fluvialis* 27% *V. furnissii* 19% *V. mimicus* 12% และ *V. vulnificus* 12% (Blake *et al*., 1983) ในการศึกษา Vibrio ที่ประเทศออสเตรเลียมีการตรวจพบเชื้อ Vibrio จากน้ำ ตะกอน พืช และอุจจาระ แถบบริเวณชายฝั่งแม่น้ำ ทั้งหมด 8 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย พบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *V. cholerae V. fluvialis* และ *Aeromonas* species และเชื้อที่เหลือคาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus V. alginolyticus V. vulnificus* และ *V. hollisae* (Myatt and Davis, 1989)

ในประเทศไทย จากการศึกษาผู้ป่วย 660 ราย ที่มีอาการท้องร่วง และเข้ารับรักษาตัวในโรงพยาบาลบำราศนราดูร ระหว่างปี ค.ศ.1980-1981 พบผู้ป่วยติดเชื้อ Shigella 27% *V. parahaemolyticus* 19% *E. coli* 5% *Salmonella* species 3% *Campylobacter jejuni* 1% *V. cholerae* non-O1 3% และพบ Vibrio อื่นๆ อีกน้อยกว่า 1% การระบาดของ *V. parahaemolyticus* พบมากในช่วงเดือนกันยายน และตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูฝน และพบการระบาดของ *V. cholerae* O1 สูงถึง 25% ในปี 1980 แต่ไม่พบในปี 1981 (Echeverria *et al*., 1983) ในปี 1985 มีรายงานการแยกเชื้อ *V. cholerae* non-O1 281 สายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อม และตรวจพบ cholerae toxin (ctx) ถึง 5 สายพันธุ์ (Hanchalay *et al*., 1985) ในระหว่างเดือน มกราคม ค.ศ. 1983 ถึง เดือนมีนาคม ค.ศ. 1988 จากการตรวจเชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วย ที่เข้ารับการรักษาตัว ในโรงพยาบาลศิริราช พบผู้ป่วย 13 ราย ที่ติดเชื้อ *V. cholerae* non-O1 3 ราย ที่ติดเชื้อ *V. vulnificus* และ 10 ราย ที่ติดเชื้อ *Vibrio* species จากการศึกษาผู้ป่วย 20 ราย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชายพบว่า มีประวัติเป็นโรคตับแข็ง ผู้ป่วยมีอาการไข้ ปวดเกร็งช่องท้อง ท้องร่วง เยื่อบุช่องท้องอักเสบ ช็อก และมีบาดแผลที่ผิวหนัง ผู้ป่วยบางรายได้รับประทานอาหารทะเล และสัมผัสน้ำทะเลมาก่อนที่จะเกิดอาการดังกล่าว 50% ของผู้ป่วยเสียชีวิตถึงแม้จะได้รับยาปฏิชีวนะ (Thamlikitkul, 1990) ในปี ค.ศ. 1999 มีการตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงถึง 45.9% ในอาหารทะเลส่งออก 686 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และเวียดนาม โดยตัวอย่างที่มาจากฮ่องกงและไทยจะตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงกว่าตัวอย่างที่มาจากอินโดนีเซียและเวียดนามมาก ซึ่งตัวอย่างที่พบส่วนใหญ่จะเป็น กุ้ง ปู หอย และปลา (Wong *et al*., 1999) และในปีเดียวกันมีการตรวจพบ *V. parahaemolyticus*

ในหอยทะเลสดจากภาคใต้ของประเทศไทย และพบว่าเป็นสายพันธุ์ O3:K6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดมาแล้วในหลายประเทศ (Vuddhakul *et al*., 2000)

แม้จะมีรายงานการตรวจพบเชื้อ Vibrio ที่ก่อโรคในประเทศไทยหลายสปีชีส์ แต่ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบ เชื้อ *V. hollisae* ในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยหรือสิ่งแวดล้อมใดๆเลย ทั้งที่มีรายงานการตรวจพบเชื้อดังกล่าวในหลายประเทศ และเชื้อก็มีศักยภาพในการก่อโรคสูง *V. hollisae* ถูกรายงานครั้งแรกในปี 1982 โดย Hickman และคณะ สามารถแยกเชื้อ *V. hollisae* จากผู้ป่วยได้ทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากอุจจาระ 15 สายพันธุ์ อีก 1 สายพันธุ์แยกได้จากกระแสโลหิต (Hickman *et al*., 1982) และในปีเดียวกันนั้นเอง Morris ได้ทำการตรวจสอบเชื้อที่ส่งมายัง Center for Disease Control (CDC) ระหว่างปี ค.ศ. 1971- ค.ศ. 1981 พบเชื้อ *V. hollisae* ที่แยกจากอุจจาระผู้ป่วย 11 ราย แยกจากกระแสโลหิต 1 ราย จากการศึกษาผู้ป่วย 9 รายที่แยกเชื้อได้จากอุจจาระ พบผู้ป่วยมีอาการท้องร่วง ปวดเกร็งช่องท้อง ระยะฟักตัวของโรคใช้เวลาตั้งแต่ 4 ชั่วโมงถึง 13 วัน ผู้ป่วย 1 ราย ถ่ายอุจจาระมีมูกเลือดปน (bloody diarrhea) ผู้ป่วย 6 ราย รับประทานอาหารทะเลก่อนเกิดอาการ และผู้ป่วย 3 รายนี้ มีโรคประจำตัวเรื้อรัง เช่น ความดันโลหิตสูง ตับพิการ โรคพิษสุราเรื้อรัง และโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะเรื้อรัง พบว่าผู้ป่วย 1 ราย ที่ติดเชื้อ *V. hollisae* ในกระแสโลหิตนั้น เป็นโรคตับแข็ง สมองอักเสบ และปอดบวมร่วมด้วย และหลังจากเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเพียง 2 วันผู้ป่วยก็เสียชีวิตลง (Morris *et al*., 1982) ต่อมามีการตรวจพบเชื้อ *V. hollisae* จากชายอายุ 65 ปี ซึ่งเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยอาการ มีไข้สูง หนาวสั่น คลื่นไส้อาเจียน และปวดเกร็งช่องท้อง พบว่าผู้ป่วยได้รับประทานปลา catfish ที่จับได้ จากแม่น้ำ Mississippi ห่างจากอ่าวเม็กซิโกเพียง 115 ไมล์ ก่อนเกิดอาการ และเมื่อตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดพบว่าเป็นเชื้อ *V. hollisae* (Lowry *et al*., 1986) ในปี 1988 มีรายงานการพบเชื้อ *V. hollisae* จากกระแสโลหิตในชายอายุ 36 ปี ซึ่งมีประวัติเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรัง ชายคนดังกล่าวเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลจากอาการท้องร่วง ปวดเกร็งช่องท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ หนาวสั่น จากการตรวจอุจจาระ ไม่พบเชื้อ *Salmonella* species *Shigella* species *Campylobacter* species และไข่พยาธิใดๆ หลังจากให้น้ำเกลือ อาการปวดท้อง และท้องร่วงหายไป สามารถกลับบ้านได้ หลังจากนั้นอีก 6 วัน ผู้ป่วยได้กลับมารักษาตัวในโรงพยาบาลอีก ด้วยอาการ ปวดท้อง ท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ หนาว

สั่น จากการตรวจอุจจาระไม่พบเชื้อใดๆเช่นเดิม แต่กลับพบเชื้อ *V. hollisae* ในกระแสเลือด เมื่อซักประวัติผู้ป่วยพบว่าได้รับประทานปลาดิบมาก่อน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อครั้งนี้ (Rank *et al*., 1988) ในปี ค.ศ.1994 มีรายงานว่าพบผู้ป่วยหญิง 1 ราย มีอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง จากแต่เดิมที่ผู้ป่วยเคยเป็นผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ดี อาการดังกล่าวเกิดขึ้นภายหลังจากรับประทานหอยนางรมดิบก่อนเกิดอาการ 3 วัน ผู้ป่วยมีอาการถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ มีไข้ การแยกเชื้อใช้เวลาหลายวัน จนรู้ว่าเป็นเชื้อ *V. hollisae* ผู้ป่วยได้รับยา ciprofloxacin และ ampicillin จนอาการดีขึ้น และกลับบ้านได้หลังจากรักษาตัวในโรงพยาบาล 7 วัน (Carnahan *et al*., 1994) นอกจากนี้มีรายงานการติดเชื้อ *V. hollisae* ในผู้ป่วยอีก 2 ราย ซึ่งมีอาการติดเชื้อในทางเดินอาหาร รายแรกพบว่าได้รับประทานหอยนางรม จากร้านอาหารริมหาดแคลิฟอร์เนีย ปลายเดือนพฤศจิกายน จากนั้น 72 ชั่วโมง ผู้ป่วยมีอาการปวดท้องเล็กน้อย และท้องร่วงแบบไม่รุนแรง อาการเริ่มดีขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง แต่เมื่อได้รับประทานปูเป็นอาหารเย็น วันรุ่งขึ้นกลับมีอาการท้องร่วงถ่ายเหลวเป็นน้ำ ปวดเกร็งช่องท้องเป็นระยะๆ และเริ่มปวดเกร็งมากขึ้นจนต้องเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล ผู้ป่วยมีไข้สูง จากการแยกเชื้อพบว่าเป็น *V. hollisae* ผู้ป่วยได้รับยา tetracycline จนอาการดีขึ้นและสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ รายที่สองเป็นหญิงอายุ 25 ปี ได้รับประทานหอยนางรมดิบจากภัตตาคารบนเกาะฮาวาย หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ เธอเริ่มมีอาการปวดเกร็งช่องท้อง ท้องร่วง แต่ไม่รุนแรง และเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลเพราะคิดว่าเป็นไส้ติ่งอักเสบ หลังจากผ่าตัด พบว่าลำไส้ส่วนปลาย (ileum) อักเสบ เมื่อทำการเพาะเชื้อหาสาเหตุพบว่าเป็นเชื้อ *V. hollisae* (Abbot and Janda, 1994) ในช่วงปี ค.ศ. 1981-1994 ที่รัฐฟลอริดา จากการตรวจผู้ป่วย 333 ราย ที่ติดเชื้อ *Vibrio* species พบผู้ป่วยติดเชื้อ *V. hollisae* 38 ราย เป็นการติดเชื้อในลำไส้ 35 ราย และติดเชื้อในกระแสโลหิต 3 ราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการท้องร่วง ปวดเกร็งบริเวณช่องท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และมีไข้เนื่องจากรับประทานหอยนางรมดิบ สามารถพบเชื้อนี้ได้ตลอดทั้งปี ยกเว้นในเดือนสิงหาคมและกันยายน (Hlady, 1997) ในประเทศฝรั่งเศส มีรายงานการติดเชื้อ *V. hollisae* จากหอยกาบโดยพบชายอายุ 76 ปี เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล ด้วยอาการติดเชื้อในทางเดินอาหาร และในกระแสเลือด จากการซักประวัติพบว่าผู้ป่วยได้รับประทานหอยกาบจากอ่าวเล็กๆ ในเมือง Brittany ซึ่งเป็นครั้งแรกของการพบเชื้อตัวนี้ในยุโรป (Rouzet *et al*., 1996)

1.2.1.3 การเพาะแยกเชื้อ

เชื้อในกลุ่ม Vibrionaceae หลายสปีชีส์ ถูกแยกได้ง่ายเนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโดยทั่วไป สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วง นิยมใช้อาหาร Salmonella Shigella agar (SS) MacConkey agar (Mac) และ TCBS เป็นอาหารแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ แต่เชื้อ Vibrio ไม่สามารถแยกได้ด้วย อาหาร SS agar และ Mac agar เนื่องจากอาหารทั้งสองมีเกลือไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้น ผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วงเนื่องจากรับประทานอาหารทะเล ห้องปฏิบัติการจะใช้ TCBS เป็นอาหารแยกเชื้อ ซึ่งเป็น selective medium ที่คัดเลือกเฉพาะเชื้อกลุ่มนี้ซึ่งจะทนน้ำดี และสามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และขณะเดียวกันยังเป็น differential medium โดยสามารถแยกเชื้อนี้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาล sucrose กับกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล sucrose เชื้อที่สามารถหมักน้ำตาล sucrose จะให้โคโลนีสีเหลือง มี 7 สปีชีส์ ได้แก่ *V. choleraeV. metschnikovii V. cincinnatiensis V. fluvialis V. furnissii V. fluvialis V. alginolyticus* และ *V. carchariae* และที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล sucrose จะให้โคโลนีสีเขียว ได้แก่ *V. mimicus V. hollisae V. damsela V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* อย่างไรก็ตามพบว่า *V. hollisae* จะเจริญได้น้อยมาก หรือไม่เจริญเลยบนอาหารดังกล่าว ทำให้เป็นอุปสรรคในการวินิจฉัยโรคท้องร่วง ที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวและอาจทำให้การแปลผลผิดพลาดเนื่องจาก ไม่คิดว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง ดังนั้นการแยกเชื้อ *V. hollisae* จึงมีความจำเป็นจะต้องพัฒนาอาหารชนิดใหม่ มีรายงานการใช้อาหาร Sporosarcina halophila agar ซึ่งใช้แยกเชื้อ Halomonas Listonella Salinicoccus Sporosarcina และ Vibrio บางสปีชีส์ เช่น *V. fluvialis V. furnissii V. hollisae V. vulnificus* และ *V. ordalii* และอาหาร Mannitol maltose agar ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้แยกเชื้อ Vibrio โดยทั่วไป (Atlas, 1997) ถ้าสามารถนำอาหารทั้งสองชนิดมาพัฒนาร่วมกัน อาจจะช่วยให้ได้อาหารที่สามารถแยกเชื้อ *V. hollisae* ได้ดีและมีลักษณะเฉพาะที่แยกจากเชื้ออื่นได้ง่าย

1.2.2 *Vibrio hollisae*

Vibrio hollisae จัดอยู่ในกลุ่ม halophilic bacteria เนื่องจากต้องการเกลือในการเจริญ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ polar flagellum ถูกรายงานเป็นครั้งแรกโดย Hickman ในปี ค.ศ. 1982 เชื้อนี้จะให้ผลบวกต่อการทดสอบ oxidase การสร้าง indole การเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite การหมักน้ำตาล glucose arabinose galactose และ mannose และให้ผลลบต่อการทดสอบ lipase deoxyribonuclease gelatinase Voges-Proskauer ไม่สามารถใช้ citrate acetate malonate และ KCN medium ไม่สร้าง lysine decarboxylase ornithine decarboxylase arginine dihydrolase และไม่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล adonitol arabitol cellobiose dulcitol erytritol glycerol (25% จะให้ผลช้า และจะให้ผลบวกในวันที่ 7 ของการทดสอบ) myo-inositol lactose maltose mannitol melibiose glucoside mucate raffinose rhamnose salicin sorbitol sucrose trehalose และ xylose ไม่เคลื่อนที่ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 36 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แต่เมื่อบ่มไว้ 7 วัน พบว่า 88% สามารถเคลื่อนที่ได้ นอกจากนี้เชื้อยังให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่ไม่ชัดเจนนัก ทำให้อ่านผลการทดสอบผิดพลาดได้ง่าย และอาหารที่ใช้ทดสอบต้องเติมเกลือที่ความเข้มข้น 1% ด้วยเสมอ *V. hollisae* ถูกยับยั้งได้โดย ยา penicillin ampicillin carbenicillin cephalotin colistin polymyxin-B streptomycin kanamycin gentamycin tetracycline chloramphenicol และ sulfadiazine (Hickman *et al*., 1982) การแยกเชื้อ *V. hollisae* ในห้องปฏิบัติการทำได้ยาก ผู้ป่วยบางรายที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรง เมื่อแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ จะพบเชื้อโคโลนีเล็กๆ เพียง 1 โคโลนีบนอาหาร TCBS (Carnahan *et al*., 1994) เชื้อที่ถูกรายงานส่วนใหญ่จะถูกพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose lysine deoxycholate agar ซึ่งใช้แยก Shigella และ Blood agar ซึ่งใช้แยกเชื้อในกระแสโลหิต (Abbott and Janda, 1994; Carnahan *et al*., 1994) แม้จะมีรายงานว่าเชื้อ *V. hollisae* มีแหล่งกำเนิดอยู่ในน้ำเค็ม แต่ก็ยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบเชื้อนี้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเลเช่น กุ้ง หอย ปู ปลา หรือสิ่งมีชีวิตใดๆจากทะเลเลย จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1983 Nishibuchi และคณะได้ทำการแยกเชื้อ *V. hollisae* จากปลา 12 ตัว ที่จับในช่วงเดือนกันยายน แถบทะเล Shirauhi เมือง Kumamoto ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นปลาในจีนัส *Kanosiras punctatus Malio macrocephalus* และ *Therapon oxyrhyncuc* ตรวจพบ

V. hollisae 1 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannital maltose agar ซึ่งเป็นอาหารทั่วไปที่ใช้แยกเชื้อในกลุ่ม Vibrio ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารจะมีลักษณะกลม มีสีม่วงใส ขอบเรียบแบน (Nishibuchi *et al*., 1988) สำหรับ *V. hollisae* จะต่างจาก marine vibrios ทั่วไปตรงที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C (marine vibrios ส่วนใหญ่เจริญที่ 20-25 °C) ดังนั้นประเทศในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศไทยน่าจะเป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อนี้ แต่ไม่เคยมีรายงานเชื้อนี้ในประเทศไทยหรือประเทศใกล้เคียง *V. hollisae* สามารถสร้าง thermostable direct hemolysin (tdh) ซึ่งคาดว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดโรค

1.2.3 Thermostable direct hemolysin

Thermostable direct hemolysin (tdh) ถูกรายงานว่าพบครั้งแรกในเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยคาดว่าเป็น virulence factor ก่อให้เกิดอาการท้องร่วง ปวดเกร็งช่องท้อง คลื่นไส้ และอาเจียน เนื่องจากพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยมากกว่า 90% สามารถสร้าง tdh ขณะที่สายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมพบเพียง 1-2% เท่านั้น tdh มีคุณสมบัติย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (β-hemolysis) ในอาหาร Wagatsuma agar ปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่า Kanagawa phenomenon (KP) tdh ถูกควบคุมการสร้างโดยจีน *tdh* เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่เป็น KP^+ จะมีจีน *tdh* อยู่ 2 ชุด ส่วนสายพันธุ์ที่เป็น KP^- จะไม่พบจีน *tdh* หรืออาจพบจีน *tdh* เพียงชุดเดียว (มีประมาณ 16%) และมีการแสดงออกของจีนต่ำ (low-level expression) ทำให้ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน Wagatsuma agar อย่างไรก็ตามพบว่า *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้บ้าง (weakly hemolysis) เรียกว่า intermediate สายพันธุ์ที่มีจีน *tdh* ทั้ง 2 ชุดพบว่าจะมีความรุนแรงในการก่อโรคสูง (Nishibuchi *et al*., 1985)

tdh เป็นสารประกอบโปรตีนที่ไม่มีฟอสโฟไลปิด และคาร์โบไฮเดรต มีน้ำหนักโมเลกุล 46 กิโลดาลตัน เป็น homodimer protein ประกอบด้วยโปรตีน 2 ซับยูนิตที่เหมือนกัน แต่ละซับยูนิตมีขนาด 21 กิโลดาลตัน เปปไทด์แต่ละสายจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 165 ตัว (Honda and Ida, 1993) tdh จาก *V. parahaemolyticus* สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C นานถึง 10 นาที (Sakurai *et al*., 1976) และจะถูกสร้างขึ้นเมื่อมี

การปนเปื้อนของเชื้อ 10^6 cell/g ของอาหาร ภายใต้สภาวะ pH ที่เหมาะสม คือ 5.5-6.5 (อรษา, 2541)

tdh มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง มีบทบาทเป็น enterotoxin ทำให้เกิดการสะสมน้ำในลำไส้สัตว์ทดลอง เช่นกระต่าย เมื่อทดลองใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่เป็น KP^+ จะทำให้เกิดการสะสมน้ำในลำไส้สูงกว่าสายพันธุ์ที่เป็น KP^- แต่เมื่อใช้ตะกอนเซลล์ จะต้องใช้ที่ความเข้มข้นสูงๆ จึงจะชักนำให้เกิด การสะสมน้ำในลำไส้ได้ (Sakazaki *et al.*, 1974) กลไกการสะสมน้ำในลำไส้เกิดจากการไปเพิ่ม ปริมาณ Ca^{2+} ภายในเซลล์ เป็นผลให้เกิดการหลั่ง Cl^- ออกนอกเซลล์ และทำให้ท้องร่วง (Raimondi *et al.*, 1995) tdh ยังมีบทบาทเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxin) มีผลไปลดจำนวนไมโครวิลไล ที่ผิวเซลล์ FL (human aniotic membrane cell) ทำให้ไซโทพลาซึมเสื่อม และนิวเคลียสแตกสลาย (Sakurai *et al.*, 1976) ทำให้เซลล์ Int407 (human embryonic cell) เกิด Ca^{2+} independent cytotoxicity โดยไปทำลายส่วนของเยื่อหุ้มพลาสมา ไลโซโซม และทำให้เซลล์เสื่อม (Tang *et al.*, 1995) ในเซลล์ IEC-6 (rat crypt small intestinal monolayer) พบว่าไปเพิ่ม Ca^{2+} ภายในเซลล์ ไปลดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์และทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนไป (Fabbri *et al.*, 1999) tdh ออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์ (cytolytic activity) โดย tdh จะจับกับที่รับและแทรกเข้าไปยังชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ Rat-1 (rat embryo) เกิดรู มี membrane permeability เพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง รวมทั้งนิวเคลียสเริ่มหดเล็กลง โครมาตินหดตัวและทำให้เซลล์เกิด apoptosis ในที่สุด (Nishibuchi *et al.*, 1990; Naim *et al.*, 2001) นอกจากนี้ tdh มีผลทำให้เกิด ion influx ในเซลล์ลำไส้ (Raimondi *et al*, 2000) เซลล์หัวใจ (Honda *et al*., 1976) เซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู (Takeda, 1988) และเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (Huntley *et al.*, 1993) ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติหรือแตกสลาย

นอกจากจะพบจีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* แล้วยังตรวจพบจีน *tdh* ใน *V. hollisae* ทุกสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม พบในบางสายพันธุ์ของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* non-O1 (Nishibuchi and Kaper, 1995) จากการศึกษาพบว่า tdh จาก *V. hollisae* มีผลให้เซลล์รังไข่ของหนูแฮมสเตอร์เกิดการยืดตัวและมีการสะสมของเหลวภายในเซลล์ ภายในชั่วโมงแรกแบคทีเรียจะเข้าไปเกาะติดที่ผิวเซลล์ ใน 2 ชั่วโมงต่อมา ไมโครวิลไลของเซลล์เริ่มยืดยาวและโอบล้อมเชื้อ *V. hollisae* เข้าไปภายใน

เซลล์แบคทีเรียจะเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จนไซโทพลาซึมเริ่มลดขนาดลงและทำให้เซลล์ตายลงในที่สุด (Miliotis *et al.*, 1995) เมื่อฉีดเชื้อ *V. hollisae* จำนวน 2 x 10^7 CFU เข้าในหนู จะทำให้เกิดการสะสมน้ำในลำไส้หนูทดลอง ภายหลังรับเชื้อ 6 ชั่วโมง เมื่อนำดีเอนเอของ *V. hollisae* มาทำ DNA-colony hybridization โดยใช้ tdh ของ *V. parahaemolyticus* เป็นตัวตรวจจับ (probe) พบว่าให้ผลบวก แสดงว่า tdh ของ *V. hollisae* มีความคล้ายคลึงกับ tdh ของ *V. parahaemolyticus* เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าจีน *tdh* ของ *V. hollisae* มี open reading frame (ORF) ขนาด 567 bp เหมือนกับ *V. parahaemolyticus V. cholerae* non-O1 และ *V. mimicus* (Yamasaki *et al.*, 1991) แสดงว่าจีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก และ Nishibuchi พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ จีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* คล้ายคลึงกับ จีน *tdh* ของ *V. hollisae V. mimicus* และ *V. chorelae* 93.3% 97.0% และ 98.6% ตามลำดับ (Nishibuchi *et al.*, 1990; Yoh *et al.*, 1986) แสดงให้เห็นว่าจีนดังกล่าวมีกำเนิดมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน และอาจเกิดการถ่ายทอดจีน ระหว่างเชื้อภายในกลุ่ม Vibrio ด้วยกัน อย่างไรก็ตามพบว่า tdh ของ *V. hollisae* ต่างจาก tdh ของ *V. parahaemolyticus* ตรงที่ tdh ของ *V. hollisae* ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C ได้นาน 10 นาที ขณะที่ tdh จาก *V. parahaemolyticus* สามารถทนความร้อนได้ (Yoh *et al.*, 1986; Yoh *et al.*, 1989)

1.2.4 จีน *toxR*

จีน *toxR* ถูกพบครั้งแรกในเชื้อแฟมิลี่ Vibrionaceae สันนิษฐานว่าเป็นจีนที่ควบคุมการทำงานของจีนอื่นๆที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค พบจีนดังกล่าวใน *V. cholerae V. parahaemolyticus V. fluvialis V. vulnificus* (Lee *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1987; Reich and Schoolnik, 1994) *V. alginolyticus V. mimicus V. hollisae* และพบในเชื้อ Photobacterium ที่ก่อโรคในปลา เช่น *Photobacterium damsela* subsp. *damsela Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Osarino and Klose, 2000) จีน *toxR* ถูกพบครั้งแรกว่าเป็นจีนที่ควบคุม cholera toxin operon และภายหลังพบว่าสามารถควบคุมจีนอื่นๆ ของ *V. cholerae* อีกหลายชนิด (DiRita, 1992; Miller *et al.*, 1987) ต่อมามีการพบ *toxS* ตรงตำแหน่ง operon ของ *toxR* จัด toxR และ toxS เป็น integral membrane protein ที่กระตุ้นการถอดรหัสของจีนที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของ

โรค ซึ่งทั้งคู่จะต้องทำงานร่วมกัน (Pfau and Taylor, 1998) พบว่า toxR และ toxS ของ *V. parahaemolyticus* เป็นตัวส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของ จีน *tdh* (Lin *et al.*, 1993) เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่เป็น KP^+ จะมีการแสดงออกของจีน *tdh* สูงกว่าสายพันธุ์ที่เป็น KP^- ซึ่งเกิดจากความแตกต่างในตำแหน่งโปรโมเตอร์ และขึ้นอยู่กับจีน *toxRS* ของ *V. parahaemolyticus* สามารถพบจีน *toxRS* ใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ (ทั้งที่มาจากธรรมชาติและจากผู้ป่วย) (Lin *et al.*, 1993) toxR จะมีโครงสร้างที่สำคัญ 3 ตำแหน่งคือ N-terminal cytoplasmic DNA-binding domain central transmembrane domain และ C-terminal periplasmic domain และพบว่ามีตำแหน่งที่สำคัญอีกตำแหน่งหนึ่งซึ่งอยู่ระหว่างตำแหน่ง ที่ 1 และตำแหน่งที่ 3 เรียกตำแหน่งดังกล่าวว่า tether region ซึ่งจะทำให้สามารถแยกเชื้อ Vibrio ออกจากเชื้อ Photobacterium ได้ (Osarino and Klose, 2000) สำหรับ *toxRS* operon ของ *V. parahaemolyticus* จะมีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกับ *toxRS* operon ของ *V. cholerae* มาก (Reich and Schoolnik, 1994) โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน *tox*R และ *tox*S ของ *V. parahaemolyticus* จะเหมือนกับ จีน *toxR* และ *toxS* ของ *V. cholerae* 52 และ 62% ตามลำดับ (Lin *et al.*, 1993) ส่วนจีน *toxR* และ *toxS* ของ *V. vulnificus* จะเหมือนกับจีน *toxR* และ *toxS* ของ *V. cholerae* 65.7 และ 71.5% ตามลำดับ (Lee *et al.*, 2000) และจีน *toxR* ของ *V. cholerae* จะเหมือนกันกับจีน *toxR* ของ *V. mimicus* 71.2% จีน *toxR* ของ *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* จะเหมือนกันกับจีน *toxR* ของ *V. parahaemolyticus* 63 และ 61.7% ตามลำดับ ส่วนจีน *toxR* ของ *V. parahaemolyticus* เหมือนกันกับ จีน *toxR* ของ *V. hollisae* 59% และยังพบว่าจีน *toxR* ของ *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* จะเหมือนกันกับ *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ถึง 91% ปัจจุบันมีการใช้จีน *toxR* ในการบ่งชี้เชื้อ *V. hollisae* โดยวิธี PCR แทนวิธีการทางชีวเคมีที่ทำได้ยากและเสียเวลาในการตรวจสอบ และวิธีการ PCR ยังให้ผลแม่นยำกว่า (Vuddhakul *et al.*, 2000)

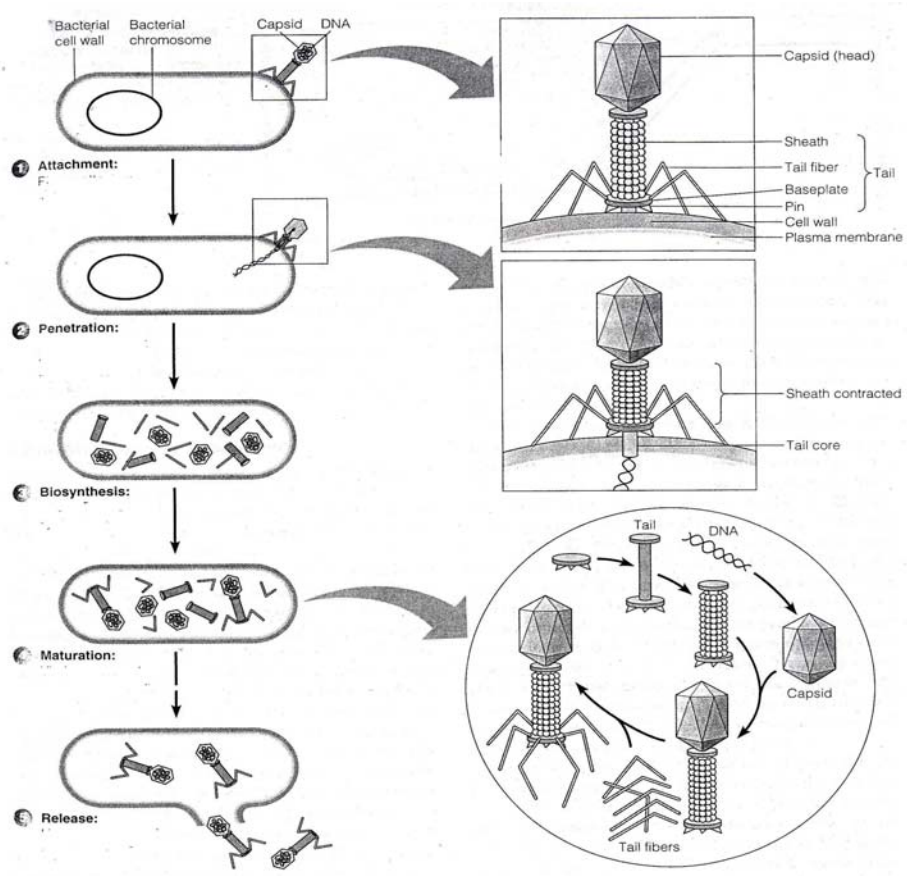
1.2.5 bacteriophage

Bacteriophages เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า phage คือไวรัสที่ใช้แบคทีเรียเป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวน แบคทีเรียทุกสปีชีส์ ติดเชื้อไวรัสได้ และไวรัสที่ติดเชื้อแบคทีเรียก็แตกต่างกัน เช่น ไวรัสที่ติดเชื้อ *Escherichia coli* มีชื่อว่า coliphages ไวรัสที่ติดเชื้อ *Vibrio* species เรียกว่า vibriophages โดยทั่วไป phages จะมีโครงสร้าง 2 ส่วนคือ ส่วนหัวและส่วนหาง ส่วนหัว (head) จะประกอบไปด้วยแคปซิด (capsid) เป็นโปรตีนที่ล้อมรอบ genome ไวรัสไว้ภายใน ซึ่ง genome เป็นกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอนเอ หรือ อาร์เอนเอ เพียงชนิดเดียว phages บางชนิดอาจมีส่วนหัวอย่างเดียว โดยไม่มีส่วนหางและจะใช้ส่วนหัวนี้ทำหน้าที่ในการเกาะติดเซลล์ของโฮสต์ phages ที่มีส่วนหาง (tail) โครงสร้างของหางจะเป็นท่อกลวงยาว (hollow tube) มีเปลือกหุ้ม (sheath) phage บางชนิดมีส่วนนี้ยืดและหดได้ phageใช้หางในการเกาะติดกับเซลล์ของโฮสต์ อย่างไรก็ตามพบว่า มี phages บางชนิดที่ไม่มีโครงสร้างทั้งส่วนหัวและส่วนหาง phages เข้าสู่แบคทีเรียและเพิ่มจำนวนได้ 2 วงจรคือ วงจรแบบ lytic และวงจรแบบ lysogenic

1.2.5.1 วงจรแบบ lytic (lytic cycle) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเกาะติด (attachment) phages จะใช้ส่วนหัวบริเวณแคปซิดหรือหาง (ในกรณีที่มีหาง) เกาะติดกับที่รับ (receptor) ที่จำเพาะบนแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็นผนังเซลล์ pili หรือแฟลกเจลา
2. การเข้าสู่เซลล์ (penetration) ส่วนหางของ phages จะปล่อยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และเปลือกหุ้ม (sheath) จะหดตัว ฉีดเฉพาะ genome ซึ่งเป็นดีเอนเอ หรืออาร์เอนเอเข้าไปภายในไซโทพลาซึมของแบคทีเรีย (ดังรูปที่ 1.1)
3. Biosynthesis phages จะขัดขวางขบวนการถอดรหัสและแปลรหัสสารพันธุกรรม (transcription และ translation) เพื่อนำไปสร้างเซลล์แบคทีเรีย แต่จะเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง mRNA และแปลรหัสเป็นโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆของ phages เพื่อสังเคราะห์ genome และโครงสร้างต่างๆ ของ phage
4. การประกอบเป็นอนุภาค phage (Maturation) มีการรวมตัวของ genome เข้าไปอยู่ในโครงสร้างโปรตีนส่วนที่เป็นแคปซิด และประกอบติดกับส่วนหาง ได้เป็นอนุภาค phage สมบูรณ์

5. การออกจากเซลล์ (release) phages จะใช้เอนไซม์ไปย่อย cytoplasmic membrane และ peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก ปล่อย phages ออกมานอกเซลล์เพื่อเข้าแบคทีเรียหรือเซลล์โฮสต์ตัวใหม่ต่อไป



รูปที่ 1.1 วงจรชีวิตแบบ lytic ของ bacteriophage

(ที่มา: Tortora *et al*., 1997)

1.2.5.2 วงจรแบบ lysogenic (lysogenic cycle)

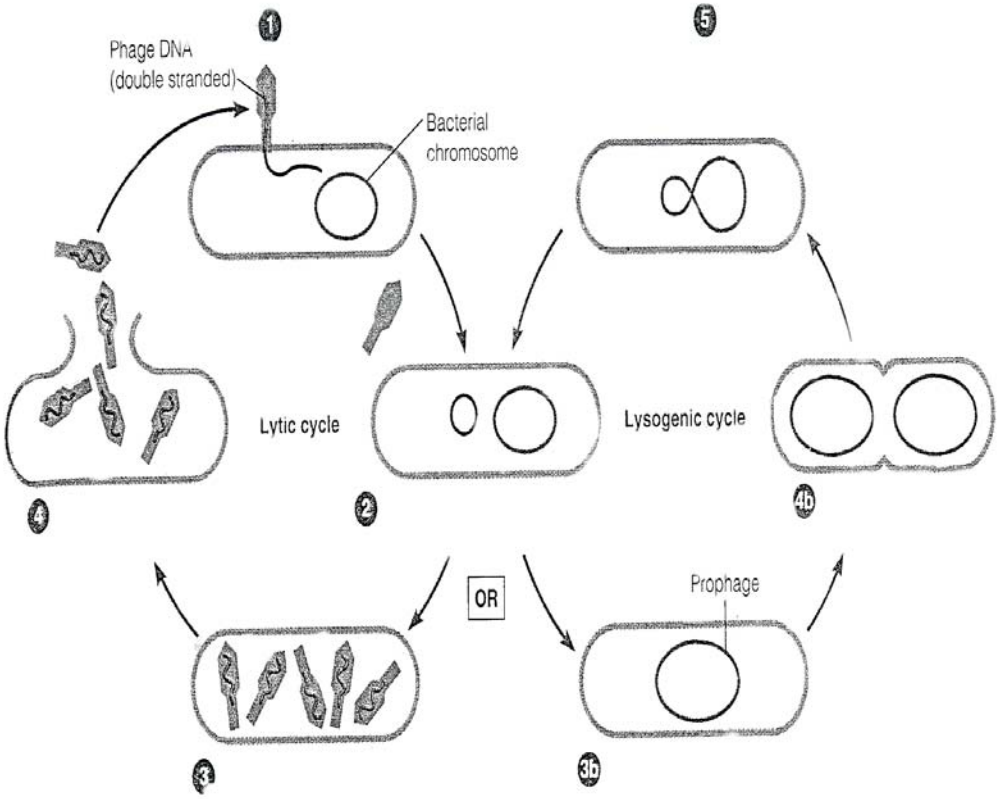
ในวงจรแบบนี้เมื่อดีเอนเอของ phage เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้ว ดีเอนเอของ phage จะเข้าไปรวมกับดีเอนเอของแบคทีเรีย เรียกดีเอนเอของแบคทีเรียและ phages ที่รวมกันอยู่นี้ว่า prophage และทุกครั้งที่แบคทีเรียแบ่งตัว prophage ก็จะเพิ่มจำนวนไปด้วยพร้อมทั้งแฝงอยู่กับดีเอนเอของโฮสต์ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งมีปัจจัยบางอย่างมากระตุ้น เช่น แสงอัลตราไวโอเลต หรือสารเคมีบางชนิด ทำให้ดีเอนเอของ phages หลุดออกมาจากดีเอนเอของแบคทีเรีย และเข้าสู่วงจรแบบ lytic ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกแล้วเข้าสู่เซลล์ใหม่ต่อไป การที่ genome ของ phage มีการรวมตัวกับ genome ของแบคทีเรีย มีผลทำให้แบคทีเรียนั้นไม่มีการติดเชื้อ phages ตัวใหม่ (ดังรูปที่ 1.2) และถ้า phages นั้นมีจีนที่สร้าง toxin อยู่บน genome ก็สามารถทำให้แบคทีเรียนั้นสร้าง toxin ได้ ในกรณีสุดท้ายการแยกตัวของ phages ออกจาก genome ของแบคทีเรีย อาจทำให้จีนส่วนหนึ่งของแบคทีเรียติดออกมากับ genome ของ phages และเมื่อไปรวมกับ genome ของแบคทีเรียตัวใหม่ก็จะทำให้แบคทีเรียใหม่มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป ตามจีนที่ติดมาด้วย

phages แบ่งออกได้ 2 ชนิดตามลักษณะการติดเชื้อในแบคทีเรียคือ

1. Virulent phages หรือ lytic phages เป็น phages ที่มีการติดเชื้อแบบวงจร lytic เพียงแบบเดียว ยกตัวอย่างเช่น T- phages
2. Temperate phages หรือ lysogenic phages เป็น phages ที่มีการติดเชื้อแบบวงจร lytic หรือวงจร lysogenic ก็ได้ ขึ้นอยู่กับสภาวะของแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น phage λ (lambda) และ filamentous phage

1.2.6 Filamentous phage

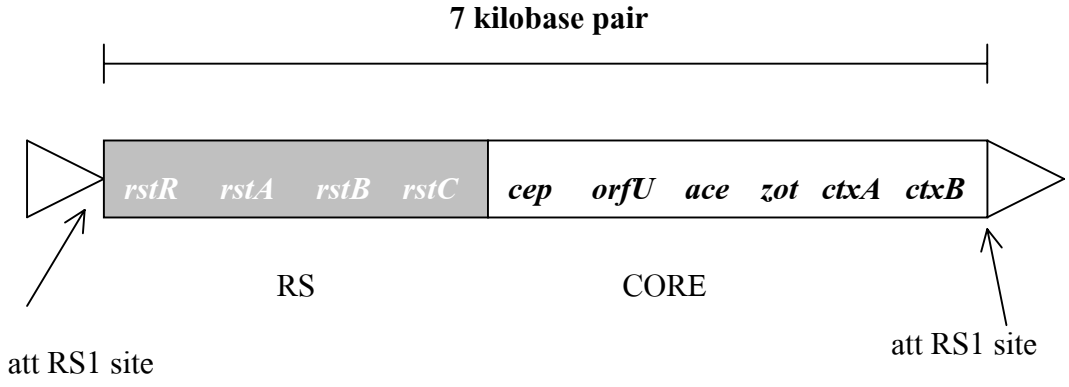
เป็น phages รูปแท่ง มีดีเอนเอเป็นสายเดี่ยวรูปวงกลม แบ่งออกได้ 2 classes (Marvin, 1974; Marvin *et al.*, 1974) คือ class I เป็น phages ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้แก่ M13 fd f1 If1 และ Ike ส่วน class II พบในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้แก่ Pf1 และ Pf3 และพบในแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ได้แก่ Xf เมื่อเข้าสู่แบคทีเรียจะเปลี่ยนเป็นดีเอนเอสายคู่รูปวงกลม (double strand replicative form DNA) โดยอยู่ในรูปพลาสมิดนอกโครโมโซม (extra chromosomal plasmid) หรือรวมตัว



รูปที่ 1.2 วงจรชีวิตแบบ lysogenic ของ bacteriophage

(ที่มา: Tortora *et al*., 1997)

อยู่กับโครโมโซมดีเอนเอ (Kar *et al.*, 1996; Waldor *et al.*, 1997) และจะเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับที่แบคทีเรียแบ่งตัว filamentous phage สามารถออกจากเซลล์ทางผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียที่ยื่นออกไปโดยไม่ทำให้เซลล์แตก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีบทบาทในการถ่ายทอดจีนจากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง มีรายงานสนับสนุนสมมติฐานนี้ โดยการพบ filamentous bacteriophage ของ *V. cholerae* มีชื่อว่า ctx phage ซึ่งคล้ายคลึงกับ coliphage M13 พบว่า ctx phage นี้เป็นตัวถ่ายทอด toxin จาก *V. cholerae* ตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง (Waldor and Mekalanos, 1996) เนื่องจากพบจีนสร้าง cholera toxin (*ctx*) ซึ่งมีขนาด 7-9.7 กิโลเบสอยู่บนจีนของ ctx phage โดยจีนนี้มีโครงสร้างแบบ transposon ประกอบด้วย central core region ขนาด 4.5 กิโลเบส (ดังรูปที่ 1.3)



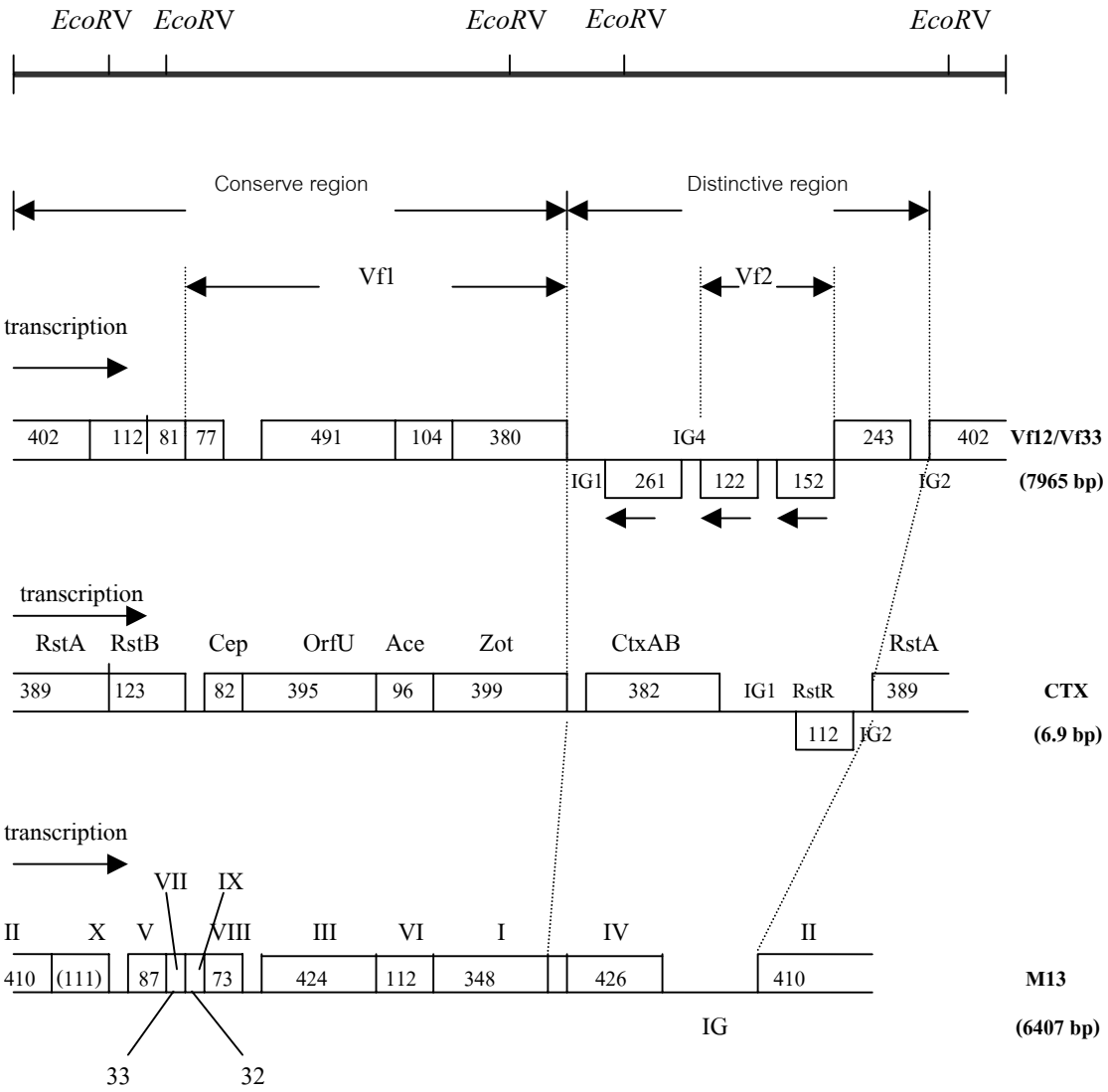
รูปที่ 1.3 โครงสร้างของจีน ctx phage
(ที่มา: Waldor and Mekalanos, 1996)

มี replicative sequence (RS) ขนาด 2.7 กิโลเบส 1 ชุด หรือมากกว่า 1 ชุด อยู่ปลาย (Pearson *et al.*, 1993; Waldor and Mekalanos, 1996) ส่วนของ central core region ประกอบด้วยจีนอย่างน้อย 6 ชนิดคือ c*txAB* (cholera toxin) z*ot* (zonula occludens toxin) (Fasano *et al.*, 1991) *cep* (core-encoded pilin) (Blake *et al.*, 1980) a*ce* (accessory cholera enterotoxin) และ *orfU* (ยังไม่รู้หน้าที่) (Trucksis *et al.*, 1993) บริเวณ RS

ประกอบด้วย open reading frame 4 ตัว (rst A B C R) ซึ่งเป็นตัวกำหนด การรวมตัวของจีน *ctx* ข้าไปในโครโมโซมของ *V. cholerae* ตรงตำแหน่งจำเพาะคือบริเวณ attRS1 (Pearson *et al*., 1993) มีรายงานการพบ filamentous bacteriophage อีกหลายชนิด ที่แยกจาก *V. cholerae* O139 เช่น VSK (Kar *et al.*, 1996) fs1 และ fs2 (Ehara *et al.*, 1997) และพบว่า phage VSK สามารถรวมตัวกับโครโมโซมของโฮสต์ และมีการเพิ่มจำนวนแบบวงจร lytic จึงสรุปได้ว่า การพบจีน *ctxAB* อยู่บนจีนของ phage ทำให้ phage สามารถถ่ายทอดจีนจาก *V. cholerae* สายพันธุ์ก่อโรคไปยังสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคได้

ในปี ค.ศ. 1984 มีรายงานการพบ filamentous bacteriophage ของ *V. parahaemolyticus* (Taniguchi *et al.*, 1984) และให้ชื่อว่า Vf12 และ Vf33 phage นี้มีความกว้าง 7 นาโนเมตร ยาว 1,400 นาโนเมตร เป็นดีเอนเอสายเดี่ยวรูปวงกลม ขนาด 8.4 กิโลเบส เมื่อเข้าสู่โฮสต์จะเปลี่ยนเป็นดีเอนเอสายคู่รูปวงกลม (replicative form) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vf12 และ Vf33 รวมทั้งหมด 7,965 คู่เบส พบโครงสร้างจีน 2 ส่วนสำคัญคือ conserved regions กับ distinctive regions ส่วนที่เป็น conserved regions มีความคล้ายคลึงกับ ctx phage ของ *V. cholerae* และ M13 coliphage ของ *E. coli* (ดังรูปที่1.4) แต่ส่วนที่เป็น distinctive regions ซึ่งเป็นจีนที่สร้าง toxin เป็นส่วนที่จำเพาะของ Vf 12 และ Vf33 แม้ว่าจะตรวจไม่พบจีน *tdh* หรือจีน *trh* ซึ่งเป็นจีนสร้าง toxin บน phage genome ทั้งสอง (Chang *et al.*, 1998) แต่พบว่าเมื่อ phage เข้าสู่เซลล์โฮสต์ จีโนมของ phage สามารถแทรกเข้าไปรวมอยู่กับโครโมโซมของโฮสต์ และอาจพบอยู่นอกโครโมโซมของโฮสต์ ซึ่งทำให้เชื่อได้ว่า Vf12 และ Vf33 มีความสามารถที่จะถ่ายทอดจีนสร้าง toxin ของ *V. parahaemolyticus* ตัวหนึ่งไปยัง *V. parahaemolyticus* อีกตัวหนึ่ง นอกจากนี้ยังตรวจพบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ phage Vf33 ใน *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดในช่วงปี ค.ศ. 1995-1999 (Chang *et al.*, 2000) ในทำนองเดียวกันก็มีความเป็นไปได้ที่ Vf12 และ Vf33 จะทำให้เกิดการติดเชื้อใน Vibrio สปีชีส์อื่น ที่มีจีนสร้าง toxin และเป็นตัวการถ่ายทอดจีนนี้จาก Vibrio สปีชีส์นั้นมาสู่ *V. parahaemolyticus* มีรายงานการพบจีน *tdh* ในทุกสายพันธุ์ของ *V. hollisae* ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม จีน *tdh* ของ *V. hollisae* จัดเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรค (virulence factor) โดยเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสะสมน้ำในลำไส้ (fluid accomulation) ซึ่งนำไปสู่อาการท้องร่วง เนื่องมาจากการรับประทานอาหารทะเล เช่น

เดียวกับ จีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้ยังมีความคล้ายคลึงกับ จีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* อยู่ 93.3% (Nishibuchi *et al.*, 1990; Yoh *et al.*, 1986) จึงเป็นไปได้ว่ามีการถ่ายทอดจีน *tdh* จาก *V. hollisae* มาสู่ *V. parahaemolyticus* ดังนั้นการตรวจ genetic elements ซึ่งเป็น conserve regions หรือ distinctive regions ของ filamentous bacteriophage Vf33 บนโครโมโซมของ *V. hollisae* จะช่วยยืนยันสมมติฐานนี้ได้



รูปที่1.4 โครงสร้างของจีน bacteriophage Vf12 และ Vf33 เปรียบเทียบกับ phage ctx ของ *V. cholerae* และ phage M13 ของ *E. coli*

(ที่มา: Chang *et al.*, 1998)

1.2.7 เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

ชีววิทยาระดับโมเลกุลเป็นสาขาวิชาหนึ่งที่มีความเจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว และมีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายๆสาขาวิชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอนเอในหลอดทดลอง โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction PCR) DNA hybridization สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารและสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น เพื่อช่วยในการวินิจฉัยให้แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น ผู้วิจัยได้เลือกเอาเทคนิคทั้งสองมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

1.2.7.1 ทฤษฎีและหลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี่เมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณจีน (gene) หรือชิ้นส่วนของดีเอนเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า ในหลอดทดลอง วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาดีเอนเอของสิ่งมีชีวิตในสิ่งส่งตรวจ โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยทั่วไปสายดีเอนเอสายคู่สามารถจับเข้าคู่กันได้เพราะชนิดของเบสคู่สม (complementary) แต่ละสายจับเข้าคู่กัน ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอนเอขึ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักเดียวกันโดยอาศัยดีเอนเอเดิมเป็นต้นแบบ (template) และอาศัย primer ซึ่งเป็นดีเอนเอสายสั้นๆที่สามารถจับได้กับดีเอนเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสช่วยทำให้สายดีเอนเอยาวออกไปโดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP dCTP dTTP dGTP แล้วนำมาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอนเอสายต้นแบบ ก็จะได้ดีเอนเอสายใหม่ขึ้น ถ้าทำเช่นนี้หลายๆรอบ ก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอนเอขึ้นได้ ดังนั้น ในการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอนเอโดยวิธี PCR ต้องอาศัยส่วนประกอบต่างๆดังนี้ คือ ดีเอนเอต้นแบบ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส dNTPs ทั้งสี่ชนิด primers สายสั้นๆ 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอนเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ

1) Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ ดีเอนเอ แม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนช่วงอุณหภูมิ 90-95 °C

2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ primer สามารถจับกับดีเอนเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (complementary) ซึ่งทำได้โดยการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C

3) Extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอนเอสายใหม่ต่อจาก primer ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ โดยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่นำ dNTPs มาต่อกับสายดีเอนเอในช่วงอุณหภูมิ 70-75 °C

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ดีเอนเอ สายใหม่จำนวนมาก

1.2.7.1.1ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะของการสังเคราะห์ดีเอนเอโดยวิธี PCR ได้แก่

1) ดีเอนเอต้นแบบ

ดีเอนเอต้นแบบนั้นจะอยู่ในรูปสายเดี่ยว (single strand) หรือสายคู่ก็ได้ โดยที่ดีเอนเอมีความยาวตั้งแต่ 100 ถึง 1,000 bp จะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดีกว่าและสามารถตรวจสอบผลที่ได้จากการสังเคราะห์ (DNA product) ง่ายกว่าดีเอนเอที่มีความยาวมากกว่า 10 kb (Henson and French, 1993) นอกจากความยาวของสายดีเอนเอแล้ว รูปร่างและลำดับเบสของดีเอนเอแม่พิมพ์ก็มีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอนเอด้วย กล่าวคือดีเอนเอที่อยู่ในรูปปลายเปิด (Linear DNA) หรือมีค่า G-C content ต่ำๆ จะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีกว่า relaxed DNA หรือ circular DNA หรือดีเอนเอที่มีค่า G-C content สูงๆ (Henson and French, 1993) ทั้งนี้เนื่องจากง่ายต่อการทำให้ดีเอนเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว primer สามารถจับกับดีเอนเอแม่พิมพ์ในบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมได้ง่ายและมีผลผลิตที่ไม่จำเพาะ (non specific product) ลดลง ปริมาณดีเอนเอต้นแบบที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ขึ้นอยู่กับจำนวนชุด (copy number) ของจีนที่ต้องการเพิ่มจำนวน โดยจีนที่จำนวนชุดมาก (high copy number) จะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีกว่าจีนที่มีจำนวนชุดน้อยหรือมีเพียงชุดเดียว (low copy number) (Henson and French, 1993) ดังนั้นจีนที่มีจำนวนชุดมากกว่าย่อมใช้ปริมาณดีเอนเอน้อยกว่าจีนที่มีจำนวนชุดน้อย โดยทั่วไปปริมาณดีเอนเอที่เหมาะสมในการทำ PCR มีค่าเท่ากับ 0.001 ng ถึง 10 ng

2) Oligonucleotide primer

ปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะของ primer ต่อดีเอนเอแม่พิมพ์ ได้แก่ ความยาวของ primer ความเข้มข้นของ magnesium chloride ลำดับเบสของ primer และอุณหภูมิในการ annealing ความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้นจะต้องมากพอที่จะทำให้เกิดการ anneal กับดีเอนเอสายเดี่ยว ของดีเอนเอแม่พิมพ์ โดยทั่วไปความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.1-0.5 μM

3) ปริมาณและความเข้มข้นของ magnesium chloride

magnesium chloride มีส่วนช่วยในการจับกันระหว่างดีเอนเอแม่พิมพ์ และ primer และทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งมีผลทำให้เกิดการขยายสายดีเอนเอในขบวนการ extension ปริมาณความเข้มข้นของ magnesium chloride จะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ dNTPs กล่าวคือถ้า dNTPs มีความเข้มข้นสูง ก็ต้องปรับความเข้มข้นของ magnesium chloride ให้สูงตามด้วย ทั้งนี้เพราะ magnesium บางส่วนจะจับกับ dNTPs ดังนั้นถ้า magnesium chloride มีปริมาณน้อยเกินไป จะทำให้มี DNA product เกิดขึ้นน้อย ถ้า magnesium chloride มีความเข้มข้นมาก จะทำให้เกิด DNA product มากขึ้นแต่ในขณะเดียวกันทำให้มี non specific product และ primer - dimer เกิดขึ้นมากด้วย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ magnesium chloride ในการทำ PCR มีค่าเท่ากับ 1.5 mM (Arnheim and Erlich, 1992)

4) *Taq* DNA polymerase

ในระยะแรกของการศึกษาการเพิ่มจำนวนดีเอนเอนั้นจะใช้เอนไซม์โพลีเมอร์เลสจาก *Escherichia coli* (Klenow fragment) ในปฏิกิริยาของ PCR แต่เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้น้อย เมื่อทำให้ดีเอนเอเสียสภาพโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 95 °C จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพด้วย จึงต้องเติมเอนไซม์ลงไปใหม่ทุกครั้งในปฏิกิริยาทุกๆรอบ ของการสังเคราะห์ ต่อมาได้มีการค้นพบเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase จากแบคทีเรีย *Thermus aquatus* ซึ่งสามารถทนความร้อนที่ 95 °C ได้ จึงนิยมใช้ในการทำ PCR เพราะประหยัดเวลาและเอนไซม์ ไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในรอบใหม่ทุกๆรอบ เหมือนดังที่ใช้ Klenow fragment เป็นเอนไซม์โพลีเมอร์เลส

Taq DNA Polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์ดีเอนเอจากปลาย 5′ PO_4 ไปยังปลาย 3′ OH โดยมี magnesium

chloride เป็น co-factor อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 75-80 °C ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 1.0 ถึง 2.5 unit ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดีเอนเอแม่พิมพ์ primer dNTPs และส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ การใช้เอนไซม์ในปริมาณมากเกินไปมีผลทำให้เกิด non specific product แต่ถ้าใช้ปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้ได้ product น้อยลงด้วย

1.2.7.2 DNA hybridization

เป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้สำหรับการตรวจหากรดนิวคลีอิกหรือจีนเป้าหมายที่สนใจ เช่นจีนก่อโรคในอาหาร หรือ สิ่งส่งตรวจอื่นๆ เช่น จีนควบคุมการสร้าง enterotoxin ของ *Clostridium perfringens Escherichia coli* จีนสร้าง hemolysin ของ *Listeria monocytogenes Vibrio vulnificus V. parahaemolyticus* (*tdh* และ *trh*) เป็นต้น

หลักการพื้นฐานของ DNA hybridization

เมื่อดีเอนเอต้นแบบ (template) สายคู่ถูกทำให้เสียสภาพ (denature) โดยการใช้ความร้อน หรือการใช้สารเคมี เช่น ด่าง หรือ formamide ดีเอนเอสายคู่จะแยกออกจากกัน (dissociation) เป็นสายเดี่ยว ถ้าใส่ probe ซึ่งเป็น ดีเอนเอสายเดี่ยวที่มีคู่สมเดียวกับดีเอนเอต้นแบบ (complementary) แล้วทำให้ดีเอนเอดังกล่าวกลับคืนสู่สภาพเดิม (renature) โดยการลดอุณหภูมิหรือขจัดสารเคมีดังกล่าวข้างต้นออกไป ดีเอนเอต้นแบบจะกลับมาเข้าคู่ (hybridized) กับตัวตรวจจับเป็นดีเอนเอสายคู่ จากหลักการนี้ตัวตรวจจับเป็นจีนหรือดีเอนเอที่รู้หน้าที่แน่นอนแล้วมีการติดฉลากตัวตรวจจับด้วยสารกัมมันตภาพรังสี สารเรืองแสง (chemiluminescence) หรือเอนไซม์ จะทำให้สามารถตรวจหาตำแหน่งของจีน หรือดีเอนเอนั้นบนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาได้

ในการทำ hybridization สามารถแบ่งรูปแบบการทำออกได้เป็น 3 รูปแบบใหญ่ๆ คือ 1) Liquid phase hybridization

ในการทำ hybridization แบบนี้ กรดนิวคลีอิกเป้าหมายและ probe จะทำปฏิกิริยาในสารละลาย วิธีการทำแบบนี้ไม่ค่อยแพร่หลายและการตรวจผลของปฏิกิริยาทำได้ค่อนข้างยุ่งยาก จึงไม่เป็นที่นิยม

2) Solid phase hybridization

การทำ hybridization แบบนี้ กรดนิวคลีอิกเป้าหมายจะถูกแยกสกัดจากตัวอย่างตรวจและนำมาตรึงบนแผ่นค้ำจุน ซึ่งอาจเป็นพวก แผ่น nylon หรือ แผ่น nitrocellulose หลังจากนั้นจึงนำมา hybridized กับ probes และตรวจปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นค้ำจุน ตัวอย่างได้แก่ dot blot hybridization Southern blot hybridization Northern blot hybridization และ colony hybridization เป็นต้น วิธี dot blot hybridization เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย และสามารถตรวจจำนวนตัวอย่างตรวจได้มากกว่าวิธี Southern และ Northern blot hybridization Southern blot hybridization จะเป็นการตรวจวิเคราะห์ดีเอนเอที่แยกสกัดจากตัวอย่างตรวจแล้วนำไปตัดด้วย restriction endonuclease ให้ดีเอนเอเป็นชิ้นขนาดต่างๆก่อน จากนั้นแยกขนาดของดีเอนเอโดยใช้ agarose gel electrophoresis แล้วจึงถ่ายดีเอนเอจาก gel ลงบนแผ่นค้ำจุน นำไป hybridized กับ probes ส่วน Northern blot hybridization มีขั้นตอนการทำคล้ายคลึงกับวิธี Southern blot hybridization แต่ตัวอย่างตรวจเป็น อาร์เอนเอ แม้การทำ Southern blot hybridization จะยุ่งยาก แต่ผลที่ได้ทำให้สามารถรู้ขนาดของชิ้นกรดนิวคลีอิกที่เกิด hybridization กับ probes สำหรับ colony hybridization เป็นวิธีการตรวจหาดีเอนเอเป้าหมายจากโคโลนีของแบคทีเรีย ขบวนการทำเริ่มจากการถ่ายโคโลนีจากจานเพาะเชื้อโดยใช้แผ่นค้ำจุนขนาดพอดีกับจานเพาะเชื้อปะทับลงไปบนอาหารวุ้นที่มีเชื้อขึ้นอยู่ หลังจากนั้นนำแผ่นค้ำจุนที่มีโคโลนีติดอยู่นี้ไปทำให้เซลล์แตกปลดปล่อยดีเอนเอออกมาแล้วจึงนำไปทำ hybridization กับ probes

3) *In situ* hybridization (ISH)

การทำ ISH จะแตกต่างจากรูปแบบ hybridization สองแบบแรก โดยสองแบบแรก กรดนิวคลีอิกถูกแยกสกัดออกมาจากตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ แต่ในกรณี ISH กรดนิวคลีอิกจะไม่ถูกแยกสกัดออกมา แต่จะอยู่ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เมื่อนำมาปะติดบนสไลด์ แล้วทำ hybridization ตัวตรวจจับจะแทรกผ่านช่องว่างของเซลล์เข้าไปจับกับดีเอนเอภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อสามารถติดตามผลได้โดยตรวจหาสารกัมมันตภาพรังสีที่ติดฉลากกับตัวตรวจจับ

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการแยกเชื้อ *V. hollisae*
2. แยกเชื้อ *V. hollisae* ในอาหารทะเล
3. ตรวจหาจีนของ bacteriophage บนโครโมโซมและพลาสมิด ของ *V. hollisae*