

### 3 ผลการทดลอง

#### 3.1 การแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล โดยวิธี immunomagnetic technique

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเลทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากตลาดสดใน อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา คือ ตลาดปลาซ่า 65 ตัวอย่าง ตลาดกิมหยง 23 ตัวอย่าง ตลาดคลองเรียน 46 ตัวอย่าง ตลาดเกาะหมี่ 32 ตัวอย่าง และตลาดสดใน อ. เมือง จ.สงขลา คือ ตลาดเก้าเส้ง 34 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นตัวอย่างหอย 180 ตัวอย่าง กุ้ง 6 ตัวอย่าง ปู 5 ตัวอย่าง และปลา 9 ตัวอย่าง (ตารางที่3.1)

ตารางที่ 3.1 จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลซึ่งสุ่มเก็บจากตลาดสดใน อ. หาดใหญ่ และ อ. เมือง จ.สงขลา

ตลาดสด / ชนิดอาหารทะเล	ปลาซ่า	กิมหยง	คลองเรียน	เกาะหมี่	เก้าเส้ง	รวม
หอย	64	22	46	21	27	180
กุ้ง	1	1		4		6
ปู					5	5
ปลา				7	2	9
รวม	65	23	46	32	34	200

จากการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี immunomagnetic technique และนำโคโลนีสีเขียว ลักษณะหนืด เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร บน TCBS ไปทดสอบ TSI ให้ผล K/A<sup>-</sup> H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> ทดสอบ oxidase, lysine decarboxylase, indole และ motility พบเชื้อที่คาดว่าจะเป็ *V. parahaemolyticus* จำนวน 704 สายพันธุ์ จากจำนวน 178 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 89.0 จากจำนวนตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด โดยแบ่งเป็น

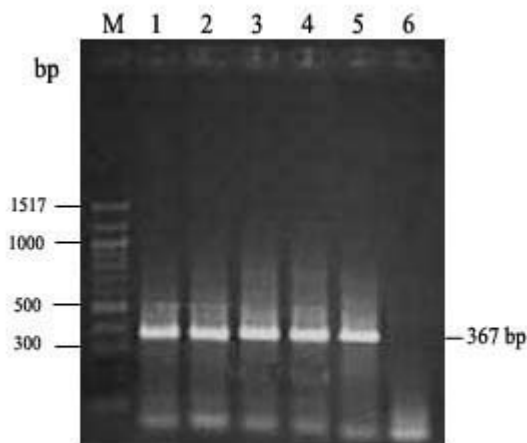
หอย 168 ตัวอย่าง กุ้ง 4 ตัวอย่าง ปู 2 ตัวอย่าง และปลา 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 93.3, 66.7, 40.0 และ 44.4 จากจำนวนตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิด ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่พบ *V. parahaemolyticus*

ชนิดอาหารทะเล	จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นบวก	ร้อยละ
หอย	180	168	93.3
กุ้ง	6	4	66.7
ปู	5	2	40.0
ปลา	9	4	44.4
รวม	200	178	89.0

### 3.2 การตรวจยืนยัน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย

เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากอาหารทะเลซึ่งให้ผลทางชีวเคมีเป็นบวกและคาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 704 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยซึ่งมีอาการท้องเสียในโรงพยาบาลขนาดใหญ่จำนวน 198 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตรวจยืนยันโดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย (รูปที่ 3.1) พบยีน *toxR* ใน *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากอาหารทะเล 666 สายพันธุ์ และที่แยกจากผู้ป่วย 188 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 94.6 และ 94.9 ตามลำดับ จากจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่นำมาตรวจยืนยัน



รูปที่ 3.1 ผลการทำ PCR โดยใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย

M : 100 bp DNA ladder

1 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

2 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

3 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

4 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

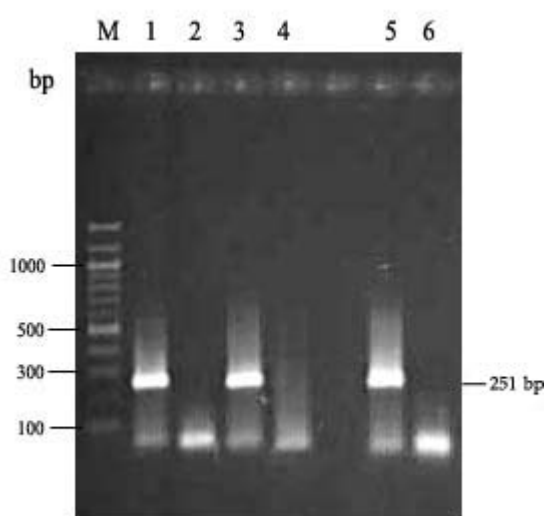
5 : *V. parahaemolyticus* 2019

6 : *V. cholerae* O1 NIH

### 3.3 การตรวจหาชิ้นสร้างสารพิษ *tdh* และ *trh* ใน *V. parahaemolyticus*

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากอาหารทะเลและผู้ป่วยซึ่งผ่านการตรวจยืนยันว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จากการตรวจพบยีน *toxR* จำนวน 666 สายพันธุ์ และ 188 สายพันธุ์ ตามลำดับ มาตรวจหาชิ้นสร้างสารพิษ *tdh* (รูปที่ 3.2) และ *trh* (รูปที่ 3.3) โดยวิธี PCR พบ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากอาหารทะเลมียีน *tdh* 14 สายพันธุ์ (ร้อยละ 2.1) และ มียีน *trh* 2 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.3) (ตารางที่ 3.3 และ 3.4) และ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยมียีน *tdh* จำนวน 168 สายพันธุ์ (ร้อยละ 89.4) โดยแยกเป็นเชื้อที่แยกได้ในปีพ.ศ. 2543 จำนวน 54 สายพันธุ์ และเป็นเชื้อที่แยกได้ในปีพ.ศ.

2544 จำนวน 114 สายพันธุ์ มียีน *trh* จำนวน 10 สายพันธุ์ (ร้อยละ 5.3) โดยแยกเป็นเชื้อที่แยกได้ในปีพ.ศ. 2543 จำนวน 3 สายพันธุ์ และเป็นเชื้อที่แยกได้ในปีพ.ศ. 2544 จำนวน 7 สายพันธุ์ มีทั้งยีน *tdh* และ *trh* จำนวน 5 สายพันธุ์ (ร้อยละ 2.7) โดยทั้งหมดเป็นเชื้อที่แยกได้ในปีพ.ศ. 2544 ไม่มีทั้ง *tdh* และ *trh* จำนวน 15 สายพันธุ์ (ร้อยละ 8.0) โดยแยกเป็นเชื้อที่แยกได้ในปีพ.ศ. 2543 จำนวน 7 สายพันธุ์ และเชื้อที่แยกได้ในปีพ.ศ. 2544 จำนวน 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.3)



รูปที่ 3.2 ผลการตรวจหายีนสร้างสารพิษ *tdh* ใน *V. parahaemolyticus*

M : 100 bp DNA ladder

1 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

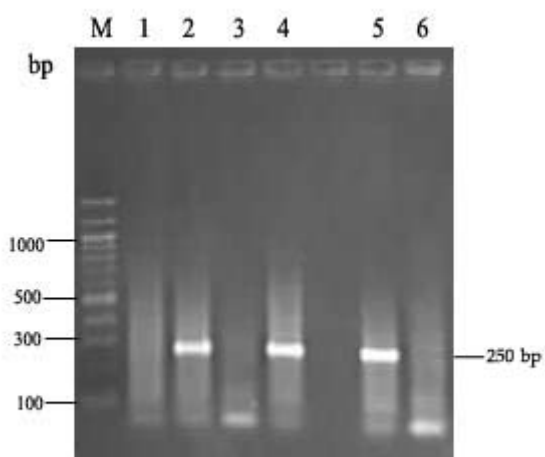
2 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

3 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

4 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

5 : *V. parahaemolyticus* 2019

6 : *V. cholerae* O1 NIH



รูปที่ 3.3 ผลการตรวจหายีนสร้างสารพิษ *trh* ใน *V. parahaemolyticus*

M : 100 bp DNA ladder

1 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

2 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

3 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

4 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

5 : *V. parahaemolyticus* 2480

6 : *V. cholerae* O1 NIH

ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจหายีนสร้างสารพิษใน *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากอาหารทะเลและจากผู้ป่วย

แหล่ง	จำนวนสายพันธุ์ที่มี <i>toxR</i> (ร้อยละ )	จำนวนสายพันธุ์ที่มี <i>tdh</i> (ร้อยละ)	จำนวนสายพันธุ์ที่มี <i>trh</i> (ร้อยละ)	จำนวนสายพันธุ์ที่มี ทั้ง <i>tdh</i> และ <i>trh</i> (ร้อยละ)	จำนวนสายพันธุ์ที่ไม่มีทั้ง <i>tdh</i> และ <i>trh</i> (ร้อยละ)
อาหารทะเล	666 (100)	14 (2.1)	2 (0.3)	0	650 (97.6)
ผู้ป่วย	188 (100)	168 (89.4)	10 (5.3)	5 (2.7)	15 (8.0)

### 3.4 การทำ group-specific PCR

เมื่อนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนสร้างสารพิษซึ่งแยกได้จากอาหารทะเลมาทำ GS-PCR (รูปที่ 3.4) พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลที่มียีน *tdh* จำนวน 14 สายพันธุ์ให้ผล GS-PCR เป็นบวกทุกสายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารทะเลที่มียีน *trh* จำนวน 2 สายพันธุ์ให้ผล GS-PCR เป็นลบทั้ง 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.4)

สำหรับ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยให้ผล GS-PCR เป็นบวกจำนวน 127 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543 จำนวน 43 สายพันธุ์ และเป็นเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544 จำนวน 84 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อการทำ GS-PCR เป็นสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เพียงชนิดเดียวทุกสายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *tdh* สายพันธุ์ที่มียีน *trh* เพียงชนิดเดียว และสายพันธุ์ที่มีทั้งยีน *tdh* และยีน *trh* ให้ผลลบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น 1 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากผู้ป่วยในปีพ.ศ. 2543 ไม่มีทั้งยีน *tdh* และยีน *trh* แต่ให้ผล GS-PCR เป็นบวก (ตารางที่ 3.5 และ 3.6)



รูปที่ 3.4 ผลการทำ GS-PCR

M : 100 bp DNA ladder

1 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

2 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

3 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

4 : *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

5 : *V. parahaemolyticus* 2019

6 : *V. cholerae* O1 NIH

### 3.5 การทำ serotyping

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีถิ่นสร้างสารพิษซึ่งแยกได้จากอาหารทะเล จำนวน 16 สายพันธุ์ ถูกนำมาทำ serotyping พบว่าเป็นซีโรทัยป์ O3:K6 สูงที่สุดคือ 8 สายพันธุ์ รองลงมาคือ O1:K25 5 สายพันธุ์ O1:KUT 2 สายพันธุ์ และ O3:KUT 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.4) และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจยืนยันว่าเป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 188 สายพันธุ์ ถูกนำมาทำ serotyping โดยเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยในปีพ.ศ. 2543 พบว่าเป็นซีโรทัยป์ O3:K6 สูงที่สุดคือ 32 สายพันธุ์ รองลงมาคือ O1:K25 8 สายพันธุ์ O4:K68 2 สายพันธุ์ และซีโรทัยป์อื่นๆ 23 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.5) และ ปีพ.ศ. 2544 พบว่าเป็นซีโรทัยป์ O3:K6 สูงที่สุดคือ 66 สายพันธุ์ รองลงมาคือ



O4:K8 12 สายพันธุ์ O1:K25 11 สายพันธุ์ O4:K68 8 สายพันธุ์ และ ชิโรทัยป์อื่นๆ 26 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.6)

ตารางที่ 3.4 ลักษณะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

ลำดับของสายพันธุ์ <i>V. parahaemolyticus</i>	ชนิดของตัวอย่าง อาหารทะเล	ผลการตรวจหาชิ้น สร้างสารพิษ		O:K Serotype	GS-PCR
		<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
1	หอยตลับ*	+	-	3:6	+
2	หอยแมลงภู่	+	-	3:6	+
3	หอยแมลงภู่	+	-	3:6	+
4	หอยแมลงภู่	+	-	3:6	+
5	หอยแมลงภู่	+	-	3:6	+
6	หอยแมลงภู่	+	-	3:6	+
7	หอยแมลงภู่	+	-	3:UT	+
8	หอยแมลงภู่	+	-	3:6	+
9	หอยแมลงภู่	+	-	3:6	+
10	หอยตลับ	+	-	1:25	+
11	หอยตลับ	+	-	1:25	+
12	หอยตลับ	+	-	1:25	+
13	หอยตลับ	+	-	1:25	+
14	หอยตลับ	+	-	1:25	+
15	หอยแครง	-	+	1:UT	-
16	หอยตลับ	-	+	1:UT	-

UT = Untypeable

\* = เก็บเชื้อ 5 สายพันธุ์ (5 โคโลนี) ต่อ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.5 ลักษณะเชื้อของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาล  
หาดใหญ่ปี พ.ศ. 2543

จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)	GS-PCR	O:Kserotype	<i>tdh</i> gene	<i>trh</i> gene
31 (47.7)	+	3:6	+	-
8 (12.3)	+	1:25	+	-
2 (3.1)	+	4:68	+	-
1 (1.5)	+	2:3	+	-
1 (1.5)	+	3:6	-	-
4 (6.2)	-	4:8	+	-
3 (4.6)	-	4:9	+	-
2 (3.1)	-	4:UT	+	-
1 (1.5)	-	4:13	+	-
1 (1.5)	-	2:3	+	-
1 (1.5)	-	2:28	+	-
2 (3.1)	-	1:UT	-	+
1 (1.5)	-	UT:UT	-	+
1 (1.5)	-	1:69	-	-
1 (1.5)	-	3:54	-	-
1 (1.5)	-	11:UT	-	-
1 (1.5)	-	12:UT	-	-
1 (1.5)	ND	3:UT	-	-
2 (3.1)	ND	12:UT	-	-

ND = Not detected

UT = Untypeable

ตารางที่ 3.6 ลักษณะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลหาดใหญ่ปี พ.ศ. 2544

จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)	GS-PCR	O:Kserotype	<i>tdh</i> gene	<i>trh</i> gene
64 (52.0)	+	3:6	+	-
11 (8.9)	+	1:25	+	-
8 (6.5)	+	4:68	+	-
1 (0.8)	+	1:UT	+	-
1 (0.8)	-	1:56	+	-
1 (0.8)	-	1:UT	+	-
2 (1.6)	-	2:3	+	-
2 (1.6)	-	3:6	+	-
1 (0.8)	-	3:29	+	-
12 (9.8)	-	4:8	+	-
1 (0.8)	-	4:9	+	-
1 (0.8)	-	4:UT	+	-
1 (0.8)	-	5:17	+	-
1 (0.8)	-	8:41	+	-
1 (0.8)	-	8:UT	+	-
1 (0.8)	-	Rough:UT	+	-
1 (0.8)	-	1:UT	-	+
1 (0.8)	-	4:UT	-	+
1 (0.8)	-	1:UT	+	+
2 (1.6)	-	3:UT	+	+
1 (0.8)	-	11:36	+	+
1 (0.8)	-	12:UT	+	+
1 (0.8)	-	1:46	-	-
1 (0.8)	-	1:56	-	-
1 (0.8)	-	8:UT	-	-
1 (0.8)	-	11:UT	-	-
1 (0.8)	ND	1:UT	-	-
1 (0.8)	ND	7:UT	-	-
1 (0.8)	ND	UT:UT	-	-

ND = Not detected

UT = Untypeable

### 3.6 ผลการทดสอบ urease

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วย ที่มียีน *trh* ถูกนำมาทดสอบ urease พบว่า ทุกสายพันธุ์ที่มียีน *trh* ให้ผลบวกกับการทดสอบ urease ทุกสายพันธุ์

### 3.7 การศึกษาความแตกต่างของ เชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์

จาก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคซึ่งแยกจากอาหารทะเลทั้งหมด 16 สายพันธุ์ และแยกจากผู้ป่วยจำนวน 188 สายพันธุ์ ถูกคัดเลือกมาศึกษาความแตกต่างโดยวิธีการสุ่มจำนวน 19 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.7) มีทั้งสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วยซึ่งมาจากระยะเวลาการแยกเชื้อที่ใกล้เคียงกันตั้งแต่ปีพ.ศ. 2541 จนถึงปีพ.ศ. 2544 และเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผล GS-PCR เป็นบวกจำนวน 10 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ให้ผล GS-PCR เป็นลบคือสายพันธุ์ที่เป็นตัวควบคุมลบจำนวน 9 สายพันธุ์

- PSU = *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกโดยภาควิชาจุลชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- TCVP = *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกโดย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย  
สงขลานครินทร์
- E = Environmental strain
- C = Clinical strain
- ND = Not detected
- UT = Untypeable

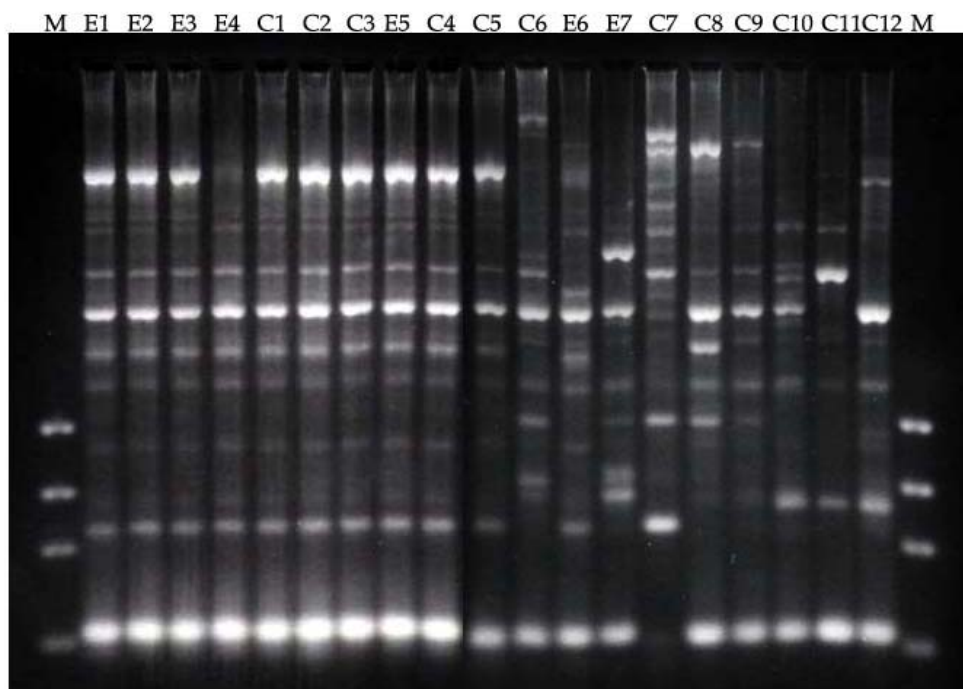
ตารางที่ 3.7 เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ถูกนำมาศึกษาความแตกต่างโดยวิธี AP-PCR และ PFGE

ลำดับ	หมายเลขของสายพันธุ์	เดือน/ปี ที่แยกเชื้อ	แหล่ง	GS-PCR	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	O:K serotype
1	PSU 46	ธ.ค./2541	E1	+	+	-	3:6
2	PSU 166	ส.ค./2543	E2	+	+	-	3:6
3	PSU 474	ส.ค./2544	E3	+	+	-	3:6
4	PSU 434	พ.ค./2544	E4	+	+	-	3:UT
5	TCVP 62	ม.ค./2542	C1	+	+	-	3:6
6	PSU 199	ND/2543	C2	+	+	-	3:6
7	PSU 335	ND/2544	C3	+	+	-	3:6
8	PSU 476	ส.ค./2544	E5	+	+	-	1:25
9	PSU 414	ND/2544	C4	+	+	-	1:25
10	PSU 226	ND/2543	C5	+	+	-	3:6
11	PSU 253	ND/2543	C6	-	-	-	3:6
12	PSU 47	ม.ค./2542	E6	-	-	+	11:36
13	PSU 513	ธ.ค./2544	E7	-	-	+	1:UT
14	PSU 373	ND/2544	C7	-	-	+	1:UT
15	PSU 282	ND/2544	C8	-	-	+	4:UT
16	TCVP 120	ND/2542	C9	-	-	+	8:UT
17	TCVP 128	ND/2542	C10	-	-	+	12:UT
18	TCVP 149	ND/2542	C11	-	-	+	13:UT
19	TCVP 264	ND/2543	C12	-	-	+	UT:UT

ผลการศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.7) โดยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 2 (รูปที่ 3.5) และ primer 4 (รูปที่ 3.6) พบว่า ไม่มีความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่าง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ ลำดับที่ 1-10 ซึ่งเป็นซีโรทัยป์ O3:K6, O3:KUT และ O1:K25 ที่แยกได้จากอาหารทะเล และผู้ป่วย และให้ผลGS-PCRเป็นบวก แต่ทั้งหมดมีความแตกต่างกับสายพันธุ์ลำดับที่ 11-19 ซึ่งเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เป็นตัวควบคุมลบและให้ผล GS-PCR เป็นลบ

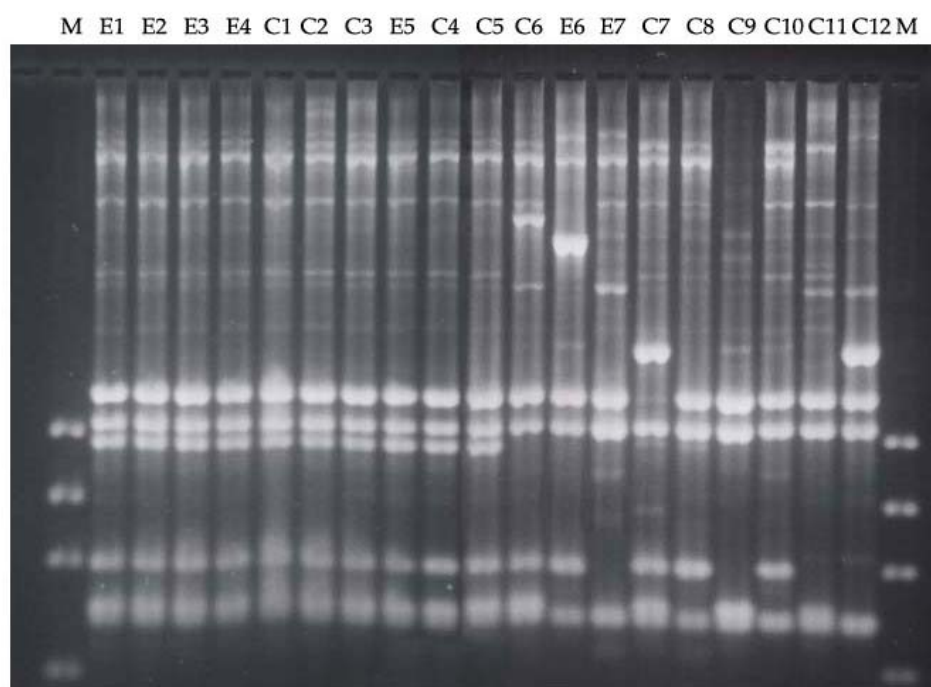
- M :  $\emptyset$  x174HaeIII
- E1-E3 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, environmental strain, GS-PCR positive
- E4 : *V. parahaemolyticus* O3:KUT, environmental strain, GS-PCR positive
- E5 : *V. parahaemolyticus* O1:K25, environmental strain, GS-PCR positive
- E6 : *V. parahaemolyticus* O11:K36, environmental strain, GS-PCR negative
- E7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, environmental strain, GS-PCR negative
- C1-C3,C5 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR positive
- C4 : *V. parahaemolyticus* O1:K25 , clinical strain, GS-PCR positive
- C6 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR negative
- C7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C8 : *V. parahaemolyticus* O4:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C9 : *V. parahaemolyticus* O8:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C10 : *V. parahaemolyticus* O12:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C11 : *V. parahaemolyticus* O13:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C12 : *V. parahaemolyticus* OUT:KUT, clinical strain, GS-PCR negative





รูปที่ 3.5 ผลการศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 2

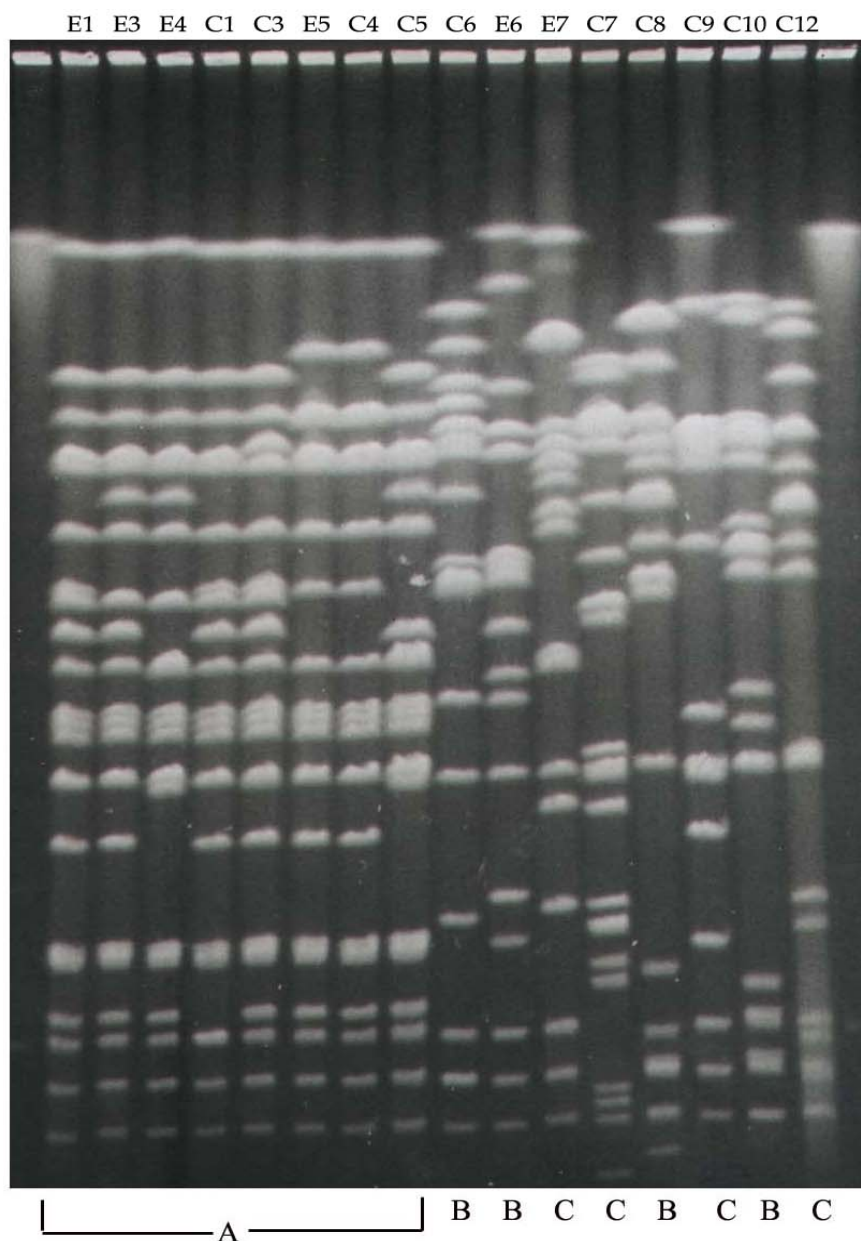
- M :  $\emptyset$  x174HaeIII
- E1-E3 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, environmental strain, GS-PCR positive
- E4 : *V. parahaemolyticus* O3:KUT, environmental strain, GS-PCR positive
- E5 : *V. parahaemolyticus* O1:K25, environmental strain, GS-PCR positive
- E6 : *V. parahaemolyticus* O11:K36, environmental strain, GS-PCR negative
- E7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, environmental strain, GS-PCR negative
- C1-C3,C5 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR positive
- C4 : *V. parahaemolyticus* O1:K25 , clinical strain, GS-PCR positive
- C6 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR negative
- C7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C8 : *V. parahaemolyticus* O4:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C9 : *V. parahaemolyticus* O8:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C10 : *V. parahaemolyticus* O12:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C11 : *V. parahaemolyticus* O13:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C12 : *V. parahaemolyticus* OUT:KUT, clinical strain, GS-PCR negative



รูปที่ 3.6 ผลการศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 4

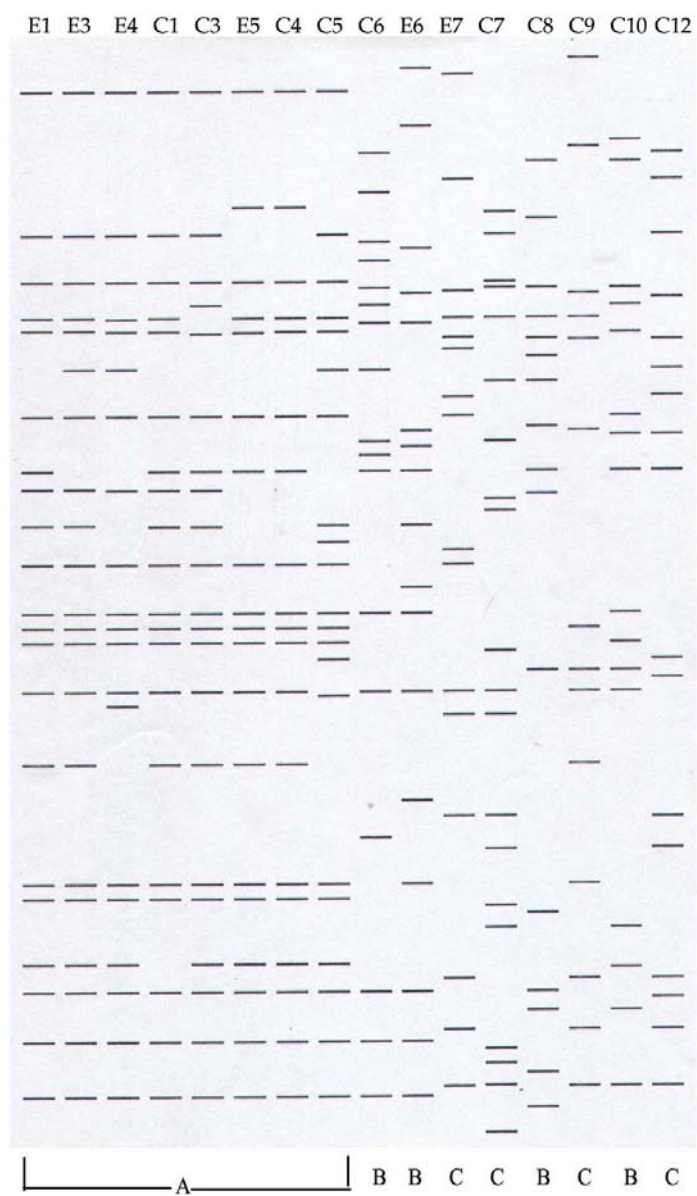
เมื่อนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ลำดับที่ 1 3-5 7-17 และ 19 ดังแสดงในตารางที่ 3.7 มาศึกษาความแตกต่างโดยวิธี PFGE พบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ E1 และ E3 ซึ่งเป็นซีโรทัยป์ O3:K6 ที่แยกจากอาหารทะเล สายพันธุ์ E4 ซึ่งเป็นซีโรทัยป์ O3:KUT ที่แยกจากอาหารทะเลและสายพันธุ์ C1 C3 และ C5 เป็นซีโรทัยป์ O3:K6 ที่แยกจากผู้ป่วย มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ E5 และ C4 ซีโรทัยป์ O1:K25 ซึ่งแยกจากอาหารทะเลและผู้ป่วยตามลำดับ (รูปที่ 3.7 และ 3.8) และเมื่อนำผลของ PFGE ไปสร้างเป็น dendrogram (รูปที่ 3.9) จะพบว่าอยู่ในกลุ่ม A (cluster A) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อในกลุ่ม A ซึ่งมีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันจะแตกต่างจาก C6 E6 C8 และ C10 ในกลุ่ม B (cluster B) ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบและแตกต่างจากสายพันธุ์ E7 C7 C9 และ C12 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม C (cluster C) และเป็นตัวควบคุมลบเช่นกัน เป็นที่น่าสนใจว่าสายพันธุ์ E5 และ C4 มีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการ (รูปที่ 3.9) แสดงว่าเชื้อทั้งสองมีต้นกำเนิดมาจากกลุ่ม clone เดียวกัน

- E1,E3 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, environmental strain, GS-PCR positive
- E4 : *V. parahaemolyticus* O3:KUT, environmental strain, GS-PCR positive
- E5 : *V. parahaemolyticus* O1:K25, environmental strain, GS-PCR positive
- E6 : *V. parahaemolyticus* O11:K36, environmental strain, GS-PCR negative
- E7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, environmental strain, GS-PCR negative
- C1,C3,C5 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR positive
- C4 : *V. parahaemolyticus* O1:K25 , clinical strain, GS-PCR positive
- C6 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR negative
- C7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C8 : *V. parahaemolyticus* O4:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C9 : *V. parahaemolyticus* O8:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C10 : *V. parahaemolyticus* O12:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C12 : *V. parahaemolyticus* OUT:KUT, clinical strain, GS-PCR negative



รูปที่ 3.7 PFGE แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วย

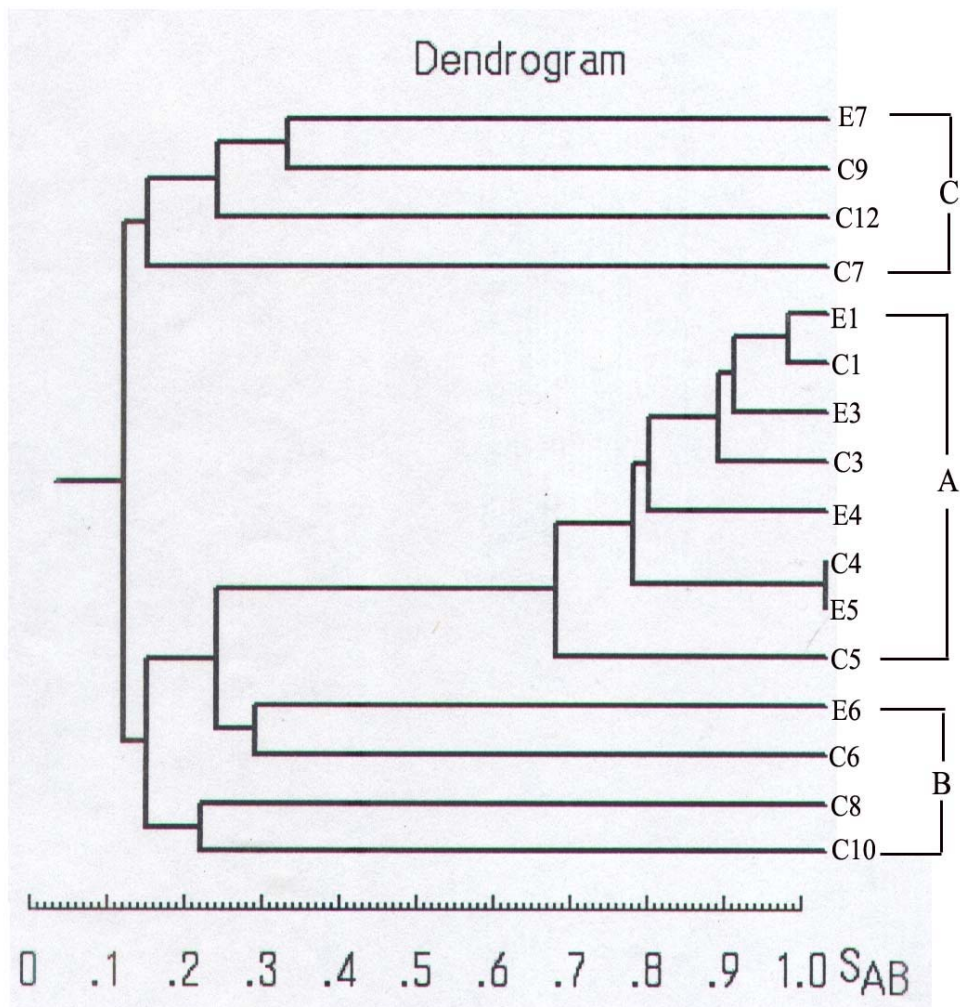
- E1,E3 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, environmental strain, GS-PCR positive
- E4 : *V. parahaemolyticus* O3:KUT, environmental strain, GS-PCR positive
- E5 : *V. parahaemolyticus* O1:K25, environmental strain, GS-PCR positive
- E6 : *V. parahaemolyticus* O11:K36, environmental strain, GS-PCR negative
- E7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, environmental strain, GS-PCR negative
- C1,C3,C5 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR positive
- C4 : *V. parahaemolyticus* O1:K25 , clinical strain, GS-PCR positive
- C6 : *V. parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR negative
- C7 : *V. parahaemolyticus* O1:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C8 : *V. parahaemolyticus* O4:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C9 : *V. parahaemolyticus* O8:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C10 : *V. parahaemolyticus* O12:KUT, clinical strain, GS-PCR negative
- C12 : *V. parahaemolyticus* OUT:KUT, clinical strain, GS-PCR negative



รูปที่ 3.8 ไดอะแกรม แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PFGE จากรูป 3.7



- E1,E3 : *V parahaemolyticus* O3:K6, environmental strain, GS-PCR positive
- E4 : *V parahaemolyticus* O3:KUT, environmental strain, GS-PCR positive
- E5 : *V parahaemolyticus* O1:K25, environmental strain, GS-PCR positive
- E6 : *V parahaemolyticus* O11:K36, environmental strain, GS-PCR negative
- E7 : *V parahaemolyticus* O1:KUT, environmental strain, GS-PCR negative
- C1,C3,C5 : *V parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain, GS-PCR positive
- C4 : *V parahaemolyticus* O1:K25 , clinical strain strain, GS-PCR positive
- C6 : *V parahaemolyticus* O3:K6, clinical strain strain, GS-PCR negative
- C7 : *V parahaemolyticus* O1:KUT, clinical strain strain, GS-PCR negative
- C8 : *V parahaemolyticus* O4:KUT, clinical strain strain, GS-PCR negative
- C9 : *V parahaemolyticus* O8:KUT, clinical strain strain, GS-PCR negative
- C10 : *V parahaemolyticus* O12:KUT, clinical strain strain, GS-PCR negative
- C12 : *V parahaemolyticus* OUT:KUT, clinical strain strain, GS-PCR negative



รูปที่ 3.9 Dendrogram แสดงความใกล้ชิดของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ ต่างๆ ที่ได้จากการทำ PFGE