

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 บทนำตั้งเรื่อง	1
1.2 ตรวจสอบเอกสาร	3
1.3 วัตถุประสงค์	42
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	43
2.1 วัสดุ	43
2.2 อุปกรณ์	45
2.3 วิธีการ	47
3 ผลการทดลอง	61
4 วิจารณ์	85
5 สรุป	93
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	128
ภาคผนวก ข	134
ประวัติผู้เขียน	137

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ความแตกต่างระหว่าง biotype Classical และ El Tor	5
1.2 การระบาดใหญ่ทั่วโลกของอหิวาตกโรค	8
1.3 ลักษณะทั่วไปของจีโนม <i>V. cholerae</i>	32
2.1 <i>V. cholerae</i> O1 ที่สุ่มเลือกศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยวิธี AP-PCR จากแต่ละจังหวัดในภูมิภาคของประเทศไทย	57
2.2 ลำดับเบสและขนาดผลผลิต PCR ของ primer	60
3.1 จำนวนตัวอย่างแพลงก์ตอนที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ ในเขต จ.สงขลา และจำนวนที่ให้ผลบวกต่อ <i>V. cholerae</i>	62
3.2 ชนิดและจำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่สุ่มเก็บจากตลาดสดเขต อ.หาดใหญ่ และ อ.เมือง จ.สงขลา	63
3.3 จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่พบ <i>V. cholerae</i>	63
3.4 ชนิดและจำนวน <i>V. cholerae</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ	64
3.5 จำนวน <i>V. cholerae</i> ที่ทดสอบและให้ผลบวกต่อจีน <i>ompW</i>	66
3.6 ผลการตรวจหาจีนก่อโรคใน <i>V. cholerae</i> ที่แยกจากแหล่งต่างๆ	69
3.7 รูปแบบดีเอ็นเอของ <i>V. cholerae</i> O1 ที่สุ่มเลือกศึกษาความแตกต่าง ของสายพันธุ์ โดยวิธี AP-PCR	72
3.8 ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 ที่แยก จากผู้ป่วย จำนวน 6 isolates	82
3.9 รูปแบบยาต้านจุลชีพของ <i>V. cholerae</i> O1 ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย	84

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1 การระบาดทั่วโลกครั้งที่ 7 ของ <i>V. cholerae</i>	11
1.2 จำนวนผู้ป่วยจากเชื้อ <i>V. cholerae</i> O1 และ O139 ที่ตรวจยืนยันโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำแนกรายปี พ.ศ. 2531-2541	13
1.3 <i>Vibrio cholerae</i> pathogenicity island (VPI)	20
1.4 แผนภาพ CTX genetic element ของ <i>V. cholerae</i>	22
1.5 แผนภาพจีโนมของ CTX $\phi$	24
1.6 กลไกการเปลี่ยน non-pathogenic <i>V. cholerae</i> เป็น pathogenic <i>V. cholerae</i> โดยแบคทีเรียโอฟาจ และการเปลี่ยนแปลง serogroup	24
1.7 กลไกการออกฤทธิ์ของ cholera toxin	26
1.8 รูปแบบการควบคุมเป็นลำดับชั้นของ ToxR/ToxT ใน <i>V. cholerae</i>	29
1.9 ซีโรทัยป์ของเชื้อ <i>V. cholerae</i> O1 ที่ตรวจพบ พ.ศ. 2532-2541	35
1.10 โคอะแกรมแสดงปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	40
3.1 ผลผลิต PCR จาก <i>V. cholerae</i> โดยใช้จีน <i>ompW</i> เป็นเงินเป้าหมาย	65
3.2 ผลผลิตจีน <i>tcpA-C</i> , <i>tcpA-E</i> และ <i>ctxA</i> โดยวิธี multiplex PCR	67
3.3 ผลผลิตจีน <i>toxR</i> และ <i>zot</i> โดยวิธี multiplex PCR และจีน <i>ace</i> โดยวิธี PCR	68
3.4 ผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วย (C) และสิ่งแวดล้อม (E) ด้วยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 2	70
3.5 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคกลาง โดยใช้ primer 2 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A	73
3.6 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยใช้ primer 2 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A	74

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.7 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคใต้ โดยใช้ primer 2 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A และ B	75
3.8 เปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 ที่แยกจากภาคต่างๆ ของประเทศไทย โดยใช้ primer 2	76
3.9 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคกลางโดยใช้ primer 4 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A	78
3.10 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยใช้ primer 4 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A	79
3.11 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคใต้โดยใช้ primer 4 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A และ B	80
3.12 เปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ <i>V. cholerae</i> O1 ที่แยกจากภาคต่างๆ ของประเทศไทย โดยใช้ primer 4	81

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

$\mu\text{l}$	=	microlitre
$\mu\text{M}$	=	micromolar
$\mu\text{g}$	=	microgram
mM	=	millimolar
ml	=	millilitre
bp	=	base pair
kb	=	kilobase
kDa	=	kilodalton
A	=	adenosine
C	=	cytosine
T	=	thymidine
G	=	guanine
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
Tris	=	Tris(hydroxyl methyl) aminomethane
PCR	=	polymerase chain reaction
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celcius
OD	=	optical density
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
pH	=	hydrogen ion concentration
%	=	percentage
TCBS	=	thiosulfate citrate bile salt sucrose agar

### ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

AP	=	ampicillin
C	=	chloramphenicol
CI	=	ciprofloxacin
SXT	=	co-trimoxazole
E	=	erythromycin
G	=	gentamicin
NA	=	nalidixic acid
NR	=	norfloxacin
TE	=	tetracycline
S	=	sensitive
I	=	Intermediate
R	=	resistance
ช.ม.	=	ชั่วโมง
ม.ม.	=	มิลลิเมตร