



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจหาลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค
ในเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเลสด
Detection of virulence-related characteristics
among *Vibrio cholerae* isolated from fresh seafood

คณะนักวิจัย

ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร
ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล

คณะวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ SCI560370S

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	i
รายการภาพ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อ	
ภาษาไทย	iv
ภาษาอังกฤษ	iv
บทสรุปผู้บริหาร	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	3
สรุปผลการทดลอง	14
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	
สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว	19
ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	20
Abstract การเผยแพร่ผลงานในงานประชุมวิชาการ	21

รายการตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 1	จำนวน <i>V. cholerae</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ	4
ตารางที่ 2	กลุ่มของ <i>V. cholerae</i> ตามรูปแบบการมีถิ่นที่เกี่ยวเนื่องกับการก่อโรค	6
ตารางที่ 3	ลักษณะของ <i>V. cholerae</i> ตัวแทนที่สุ่มมาจากแต่ละกลุ่ม (A-H) จำนวน 35 ไอโซเลต	7
ตารางที่ 4	แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะใน <i>V. cholerae</i> จำนวน 35 ไอโซเลต	9

รายการภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	การปรากฏของยีนก่อโรคใน <i>Vibrio cholerae</i> สายพันธุ์มาตรฐานที่แยกได้จากผู้ป่วย	5
รูปที่ 2	ผลการทำ colony hybridization ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเล เมื่อใช้ยีน <i>hlyA</i> El Tor เป็นตัวตรวจจับ (<i>hlyA</i> ET probe)	5
รูปที่ 3	การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ของ <i>Vibrio cholerae</i> บนอาหาร congo red agar (CRA) ที่อุณหภูมิ 37°C (A) และ 30°C (B)	9
รูปที่ 4	ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิว ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose) โดยแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยของ OD ₅₇₀ ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง ส่วนเส้นแนวขวางแสดงค่ามัธยฐานของ OD ₅₇₀ ในเชื้อแต่ละกลุ่ม	10
รูปที่ 5	การสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของหลอดของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose)	10
รูปที่ 6	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่ได้จากวิธี AP-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม <i>V. cholerae</i> ตามยีนที่ตรวจพบ	12
รูปที่ 7	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ <i>Vibrio cholerae</i> ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม <i>V. cholerae</i> ตามยีนที่ตรวจพบ	13

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่
SCI560370S

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

อาหารทะเลเป็นแหล่งสำคัญของ *Vibrio cholerae* ในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ภาคใต้ การศึกษาครั้งนี้ได้แยก *V. cholerae* จากอาหารทะเลที่วางจำหน่ายในตลาดต่าง ๆ บริเวณเขตอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ จากการศึกษาในตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด 125 ตัวอย่าง สามารถแยก *V. cholerae* ได้จำนวน 100 ไอโซเลท จากอาหารทะเล 55 ตัวอย่าง โดย *V. cholerae* ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *V. cholerae* ซีโรกรุป non-O1/non-O139 การตรวจหายีนก่อโรคต่าง ๆ พบว่า *V. cholerae* ที่แยกได้จำนวน 20% และ 96% มียีน *stn/sto* และ *hlyA* El Tor ตามลำดับ และไม่พบยีน *ctxA*, *tcp*, *zot* และ *ace* ในทุกไอโซเลท นอกจากนี้ *V. cholerae* เพียง 6% มียีน T3SS (*vcsV2*) ส่วนยีน T6SS (*vasH*) พบได้ในเชื้อส่วนใหญ่ เมื่อสุ่มเลือกเชื้อตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลทที่มีรูปแบบยีนก่อโรคต่าง ๆ มาศึกษาความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง, ความไวต่อยาปฏิชีวนะ, การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์, การสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิว และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อกลุ่มที่ไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้เป็นกลุ่มที่ไม่มียีน *hlyA* (ยกเว้น 1 ไอโซเลท), เชื้อทุกไอโซเลทไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดที่ศึกษา ยกเว้นแอมพิซิลลิน และสามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้ อย่างไรก็ตามเชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวได้แต่ไม่พบความแตกต่างของการสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวในเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบขรุขระและแบบเรียบ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR พบว่า วิธี ERIC-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากกว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี AP-PCR นอกจากนี้ วิธี ERIC-PCR ยังสามารถแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อสอดคล้องกับการมียีนก่อโรคต่าง ๆ

Abstract

Seafood has been identified as one of the important sources of *Vibrio cholerae* in Thailand especially in the Southern coastal region. In this study, we isolated and characterized *V. cholerae* from seafood obtained from several markets in Hat Yai city, Southern Thailand. One hundred of *V. cholerae* isolates were obtained from 55 of 125 seafood samples. Dominant serotypes were non-O1/non-O139. The *stn/sto* and *hlyA* El Tor genes were detected in 20 and 96% of the isolates, respectively. None of the isolates were positive for *ctxA*, *tcp*, *zot* and *ace* genes. Only 6% of the isolates carried the T3SS gene (*vcsV2*), however majority of the isolates (96%) carried T6SS gene (*vasH*). Representative isolates ($n=35$) that exhibited various virulence gene patterns were randomly selected and analyzed for hemolytic activity, antibiotic susceptibility, polysaccharide production, biofilm formation and genotyping. Hemolytic activity was not detected in all *hlyA*-negative isolates, except for one isolate. Apart from ampicillin, all isolates were pan susceptible to 5 test antibiotics. Polysaccharide production was detected in all isolates. However, biofilm production was observed in most of the isolates, and it was not different between the smooth and rugose isolates. Molecular typing by AP-PCR and ERIC-PCR showed that ERIC-PCR is more discriminatory method than AP-PCR. Moreover, when typing with ERIC-PCR, all representative isolates belonged to different clones and clonal relationships were observed among the isolates that exhibited identical virulence gene patterns.

บทสรุปผู้บริหาร

บทนำ

Vibrio cholerae เป็นสาเหตุสำคัญของอหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในประเทศต่าง ๆ รวมทั้งประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2553 สำนักกระบาดวิทยาได้รายงานการพบผู้ป่วยด้วยอหิวาตกโรคในประเทศไทยจำนวน 1,597 ราย ซึ่งจังหวัดสงขลาเป็นจังหวัดที่พบผู้ป่วยอหิวาตกโรคอย่างต่อเนื่องทุก ๆ ปี (AESR, 2010) การติดต่อของอหิวาตกโรคในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลแบบดิบ ๆ หรือมีการปนเปื้อนของ *V. cholerae* ในระหว่างขั้นตอนการเตรียมอาหาร (AESR, 2010; Luo *et al.*, 2013) *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรคคือ *V. cholerae* ซีโรกรุป O1 (*V. cholerae* O1) และ *V. cholerae* ซีโรกรุป O139 (*V. cholerae* O139) เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ส่วนใหญ่มียีนก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ ยีน *ctx* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ cholera toxin ซึ่งเป็นสาเหตุของการหลั่งของสารน้ำในลำไส้ และยีน *tcp* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง toxin-coregulated pili (Tcp) ซึ่งมีบทบาทในการเกาะติดของ bacteriophage (CTX ϕ) และการเกาะติดกับเยื่อบุลำไส้ (Kaper *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998) นอกจาก *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 ยังมียีนอื่น ๆ ซึ่งมีส่วนในการส่งเสริมการก่อโรค คือ ยีน *zot* เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ zonula occludens toxin (Zot) และยีน *ace* เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ accessory cholera enterotoxin (Ace) (Kaper *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตาม *V. cholerae* ที่พบมากในสิ่งแวดล้อมคือ ซีโรกรุป non-O1/non-O139 ที่ไม่มียีน *ctx*, *tcp*, *zot* และ *ace* (Kaper *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998) ถึงแม้ว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 ส่วนใหญ่จะไม่มียีนก่อโรคที่พบได้ในสายพันธุ์ระบาดแต่ก็มีการรายงานเกี่ยวกับโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุมาจาก *V. cholerae* non-O1/non-O139 ในประเทศต่าง ๆ เช่น ประเทศจีน, อิตาลี, อินเดีย และ ไทย (Bagchi *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1998; Ottaviani *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2013) จากงานวิจัยของ Bagchi และคณะ ในปี พ.ศ. 2536 และงานวิจัยของ Sharma และคณะ ในปี พ.ศ. 2541 พบว่า ความสามารถในการก่อโรคของ *V. cholerae* non-O1/non-O139 เกี่ยวข้องกับยีน *stn/sto* และ *hlyA* ซึ่งทำหน้าที่สร้างสารพิษ non-O1 heat-stable enterotoxin (NAG-ST) และ El Tor-like hemolysin ตามลำดับ (Bagchi *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1998) NAG-ST เป็นสารพิษที่ผลิตโดย *V. cholerae* non-O1 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับสารพิษที่สร้างจาก *Escherichia coli* และจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *V. cholerae* non-O1 ที่แยกจากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศญี่ปุ่นและไทยมีความสามารถในการสร้าง NAG-ST (Ogawa *et al.*, 1990; Bagchi *et al.*, 1993) ส่วน El Tor-like hemolysin เป็นสารพิษที่มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง และทำลายเซลล์ โดยการทำให้ยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* ขาดหายไปจะทำให้เชื้อขาดความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงและทำลายเซลล์ จึงถือได้ว่ายีน *hlyA* เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Coelho *et al.*, 2000; Cinar *et al.*, 2010) นอกจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรสดังที่กล่าวมา ระบบการขนส่งโปรตีนของเชื้อ ได้แก่ type III secretion system (T3SS) และ type VI secretion system (T6SS) ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัย

ในการก่อโรค โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตีนของแบคทีเรียไปสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Chatterjee *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009) โดยยีน *vcsV2* เป็นยีนหนึ่งใน T3SS ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *vcrD2* ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดอุจจาระร่วงในโมเดลกระต่าย (Dziejman *et al.*, 2005) และพบว่า *V. cholerae* non-O1 ส่วนใหญ่ที่แยกจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงในประเทศจีน, ไนจีเรีย, เยอรมนี และ ออสเตรเลีย มียีนดังกล่าว (Schirmeister *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2013; Marin *et al.*, 2013) ส่วนยีน *vasH* ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ T6SS (Kitaoka *et al.*, 2011) โดยสรุป *V. cholerae* ในสิ่งแวดล้อมเป็นแหล่งของยีนก่อโรคต่าง ๆ (Rivera *et al.*, 2001) ซึ่งเกิดจากการถ่ายทอดยีนจาก *V. cholerae* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษที่ทำให้เกิดอหิวาตกโรคไปสู่ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ในสิ่งแวดล้อม (Faruque *et al.*, 1998) การระบาดของเชื้อ *V. cholerae* ประจำถิ่นมักขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อในการปรับตัวและอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม *V. cholerae* สายพันธุ์ก่อโรคมีวิวัฒนาการมาจากสายพันธุ์ทั่วไปที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยได้รับการถ่ายทอดยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค นอกจากนี้ยีนก่อโรคแล้วความสามารถในการก่อโรคของ *V. cholerae* ยังเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนได้ดีในสิ่งแวดล้อม โดยเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้จะเกาะติดกับโคตินของสัตว์ทะเลหรือพื้นผิวของสิ่งไม่มีชีวิตอื่น ๆ และสร้างไบโอฟิล์มขึ้นเพื่อช่วยในการอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อโรคในคน ซึ่งพบว่าเชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มได้จะทนทานต่อการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันและต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ การแยกและการตรวจหาลักษณะของ *V. cholerae* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม เช่น อาหารทะเล จึงมีความสำคัญในการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคอุจจาระร่วงจากการรับประทานอาหาร งานวิจัยนี้จึงตรวจหายีนก่อโรคที่สำคัญและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค เช่น ความไวต่อยาปฏิชีวนะ และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเลสดใน จ. สงขลา ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้ทราบข้อมูลวิวัฒนาการของเชื้อที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสายพันธุ์ก่อโรคจากการได้รับการถ่ายทอดยีน และข้อมูลที่ได้ยังใช้เป็นแนวทางในการเฝ้าระวังการติดเชื้อ *V. cholerae* จากการบริโภคอาหารทะเลต่อไป

ระยะเวลาวิจัย 2 ปี (พฤษภาคม 2556 – พฤษภาคม 2558)

แหล่งทุนสนับสนุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเภทงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556
สัญญาเลขที่ SCI560370S

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกและจำแนกเชื้อ *V. cholerae* จากอาหารทะเลสดใน จ.สงขลา
2. เพื่อตรวจหายีนก่อโรคในเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้ เช่น ความไวต่อยาปฏิชีวนะ และความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม
4. เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกและจำแนก *V. cholerae* จากอาหารทะเล

การแยก *V. cholerae* จากอาหารทะเลที่วางจำหน่ายในตลาดสดเขต อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ได้แก่ ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่, ตลาดคลองเรี่ยน, ตลาดเกษตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ตลาดหาดใหญ่ใน และตลาดเกาะหมี่ จำนวน 125 ตัวอย่าง ประกอบด้วย กุ้ง 94 ตัวอย่าง, หมึก 19 ตัวอย่าง, หอย 8 ตัวอย่าง, ปลา 2 ตัวอย่าง และปู 2 ตัวอย่าง เบื้องต้นได้แยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็ น *V. cholerae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ได้จำนวน 254 ไอโซเลท เมื่อยืนยันโดยวิธี PCR ซึ่งใช้ยีน *ompW* เป็นยีนเป้าหมายพบว่าเป็ น *V. cholerae* จำนวน 100 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ซึ่งมาจากอาหารทะเล 55 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 44) ซึ่งมากกว่าการศึกษาในประเทศอิตาลี ที่สามารถแยก *V. cholerae* ในอาหารทะเลได้เพียงร้อยละ 4.7 จากตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด 230 ตัวอย่าง (Ottaviani *et al.*, 2009) การจำแนกซีโรกรุ๊ปของ *V. cholerae* ที่แยกได้จำนวน 100 ไอโซเลทพบว่าเป็ น *V. cholerae* non-O1/non-O139 จำนวน 99 ไอโซเลท และเป็ น *V. cholerae* O1 จำนวน 1 ไอโซเลท

เมื่อจำแนกซีโรกรุ๊ปของ *V. cholerae* ที่แยกได้โดยวิธี agglutination พบว่าเป็ น *V. cholerae* non-O1/non-O139 จำนวน 94 ไอโซเลท และเป็ น *V. cholerae* O1 จำนวน 1 ไอโซเลท นอกจากนี้มี *V. cholerae* จำนวน 5 ไอโซเลทที่ไม่สามารถจำแนกซีโรกรุ๊ปได้ด้วยวิธี agglutination เนื่องจากมีลักษณะโคลิณีแบบขรุขระจึงจำเป็นต้องจำแนกซีโรกรุ๊ปของเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rfb* ซึ่งพบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทเป็ น *V. cholerae* non-O1/non-O139

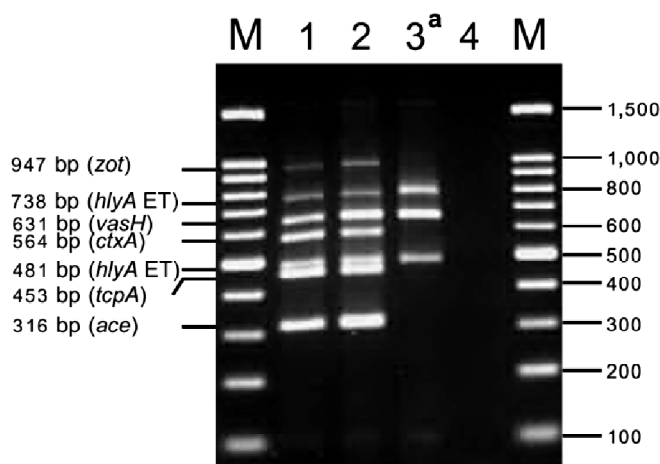
2. การตรวจหาลักษณะของ *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

2.1 การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (*ctxA*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *stn/sto*, *hlyA*, *vcsV2* และ *vasH*)

จากการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *ctxA*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *stn/sto*, *hlyA*, *vcsV2* และ *vasH* ใน *V. cholerae* ทั้ง 100 ไอโซเลท ด้วยวิธี PCR พบว่า เชื้อที่แยกได้ทุกไอโซเลท ไม่มียีน *ctxA*, *tcpA*, *zot* และ *ace* แต่มียีน *stn/sto*, *hlyA* El Tor (ET), *vcsV2* และ *vasH* จำนวนร้อยละ 20, 94, 6 และ 96 ตามลำดับ โดยในการทดลองใช้ *V. cholerae* สายพันธุ์มาตรฐานที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็ น เชื้อควบคุม ได้แก่ *V. cholerae* O1 และ O139 ซึ่งมียีน *ctxA*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *hlyA* El Tor (ET) และ *vasH* ส่วน *V. cholerae* non-O1/non-O139 มีเฉพาะยีน *hlyA* ET, *vcsV2* และ *vasH* (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวน *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ

ชนิดอาหารทะเล และแหล่งที่มา	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท ที่คาดว่าจะ เป็น <i>V. cholerae</i> (TCBS)	<i>V. cholerae</i> (<i>ompW</i>)
1. กุ้ง ($n=94$)			
-ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่	26	57	30
-ตลาดคลองเรียน	35	78	49
-ตลาดหาดใหญ่ใน	7	11	1
-ตลาดเกาะหมี่	24	42	16
-ตลาดเกษตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ	2	6	0
2. หมึก ($n=19$)			
-ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่	6	8	1
-ตลาดคลองเรียน	5	9	0
-ตลาดหาดใหญ่ใน	2	4	0
-ตลาดเกาะหมี่	4	7	1
-ตลาดเกษตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ	2	2	0
3. หอย ($n=8$)			
-ตลาดสดเทศบาลนครหาดใหญ่	5	11	0
-ตลาดหาดใหญ่ใน	1	4	0
-ตลาดเกาะหมี่	2	4	0
4. ปลา ($n=2$)			
-ตลาดเกาะหมี่	2	7	0
5. ปู ($n=2$)			
-ตลาดเกาะหมี่	2	4	2
รวม	125	254	100



รูปที่ 1 การปรากฏของยีนก่อโรคใน *Vibrio cholerae* สายพันธุ์มาตรฐานที่แยกได้จากผู้ป่วย

Lane M: 100 bp DNA Ladder (GeneDireX, Taiwan)

Lane 1: *V. cholerae* O1, El Tor สายพันธุ์ DMST16261

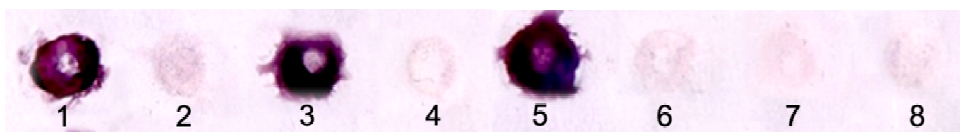
Lane 2: *V. cholerae* O139 สายพันธุ์ DMST9701

Lane 3: *V. cholerae* non-O1/non-O139 สายพันธุ์ DMST2873

Lane 4: reagent control

^aPCR product ที่ได้จากยีน *hlyA* ET (738 bp) และ *vcsV2* (742 bp) เมื่อนำมา run พร้อมกัน ทำให้แยกไม่ชัดเจน

เนื่องจากมีเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทหมายเลข 7, 8, 30, 33, 34, และ 35 ที่ให้ผลลบกับการตรวจหายีน *hlyA* ET โดยวิธี PCR ดังนั้นจึงทำการยืนยันโดยวิธี colony hybridization เนื่องจากการทดลองถัดไปต้องมีการทดสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ ซึ่งยีน *hlyA* ET มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง และเมื่อนำ *V. cholerae* ทั้ง 6 ไอโซเลทมาตรวจหายีน *hlyA* ET อีกครั้งโดยวิธี colony hybridization พบว่ามี 2 ไอโซเลท (ไอโซเลทหมายเลข 7 และ 30) ให้ผลบวก (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลการทำ colony hybridization ของ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเล เมื่อใช้ยีน *hlyA* El Tor เป็นตัวตรวจจับ (*hlyA* ET probe)

1: *V. cholerae* O1, El Tor DMST16261 (*hlyA* ET⁺); positive control

2: *V. parahaemolyticus* PSU3881 (*hlyA*⁻); negative control

3-8: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 7, 8, 30, 33, 34 และ 35 ตามลำดับ

จากผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่าง ๆ ข้างต้น สามารถจัดกลุ่ม *V. cholerae* ที่แยกได้ตามรูปแบบของการมียีนก่อโรคได้ 8 กลุ่ม (A ถึง H) โดยเชื้อส่วนใหญ่ (72%) จัดอยู่ในกลุ่ม F ซึ่งเป็นเชื้อที่มียีน *hlyA* ET และ *vasH* และมีเพียง 2 ไอโซเลท ที่ไม่มียีนก่อโรคทุกชนิดที่ตรวจสอบ (ตารางที่ 2) จึงสุ่มเลือกเชื้อตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลทจากแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 3) เพื่อทำการทดลองถัดไป

2.2 การทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงและการสร้างเอนไซม์เลซิติเนส (lecithinase)

การตรวจหาความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงใน *V. cholerae* ตัวแทนที่สุ่มมาจากแต่ละกลุ่มจำนวน 35 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทที่มียีน *hlyA* ทั้งจากการตรวจหาโดยวิธี PCR และจากการตรวจหาโดยวิธี colony hybridization (ไอโซเลทหมายเลข 7 และ 30) (รูปที่ 2) มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ส่วนเชื้อที่ผ่านการยืนยันโดยวิธี colony hybridization แล้วว่าไม่มียีน *hlyA* จำนวน 4 ไอโซเลท (ไอโซเลทหมายเลข 8, 33, 34, และ 35) (รูปที่ 2) มี 1 ไอโซเลทที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ (ไอโซเลทหมายเลข 33) (ตารางที่ 3)

เนื่องจากมีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท (ไอโซเลทหมายเลข 33) ไม่มียีน *hlyA* แต่มีความสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้จึงทำการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ที่อาจจะมึบทบาทในการสลายเม็ดเลือด เช่น เอนไซม์เลซิติเนส แต่จากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์เลซิติเนสของ *V. cholerae* ไอโซเลทที่ไม่มียีน *hlyA* ทั้งไอโซเลทที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ (ไอโซเลทหมายเลข 33) และไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ (ไอโซเลทหมายเลข 8, 34, และ 35) พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เลซิติเนสได้เหมือนกัน ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงไม่ใช่ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เชื้อไอโซเลทที่ไม่มียีน *hlyA* มีความสามารถสลายเม็ดเลือดแดง

ตารางที่ 2 กลุ่มของ *V. cholerae* ตามรูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

<i>V. cholerae</i> (ไอโซเลท)	ผลการตรวจหายีน ^a				กลุ่ม
	<i>stn/sto</i>	<i>hlyA</i> ET ^b	<i>vcsV2</i>	<i>vasH</i>	
1	+	+	+	+	A
17	+	+	-	+	B
1	+	+	-	-	C
1	+	-	-	-	D
5	-	+	+	+	E
72	-	+	-	+	F
1	-	-	-	+	G
2	-	-	-	-	H

^a*V. cholerae* ทุกไอโซเลทตรวจไม่พบยีน *ctxA*, *tcpA*, *zot* และ *ace*

^bET, El Tor

+: ตรวจพบ; -: ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 3 ลักษณะของ *V. cholerae* ตัวแทนที่สุ่มมาจากแต่ละกลุ่ม (A-H) จำนวน 35 ไอโซเลท

กลุ่ม (จำนวน)	ยีนก่อโรคที่ตรวจพบ	หมายเลข ไอโซเลท	ซีโรกรุ๊ป	Hemolytic activity
A (1)	<i>stn/sto, hlyA</i> ET ^a , <i>vcsV2</i> ,	1	non-O1/non-O139	+
B (5)	<i>stn/sto, hlyA</i> ET, <i>vasH</i>	2, 3, 4, 5	non-O1/non-O139	+
		6	non-O1/non-O139 ^d	+
C (1)	<i>stn/sto, hlyA</i> ET	7 ^c	non-O1/non-O139	+
D (1)	<i>stn/sto</i>	8	non-O1/non-O139	-
E (5)	<i>hlyA</i> ET, <i>vcsV2</i> , <i>vasH</i>	9, 10, 11, 12, 13	non-O1/non-O139	+
F (19)	<i>hlyA</i> ET, <i>vasH</i>	14, 15, 16, 17	non-O1/non-O139 ^d	+
		18	O1	+
		19, 20, 21, 22, 23, 24,	non-O1/non-O139	+
		25, 26, 27, 28, 29,		
		30 ^c , 31, 32		
G (1)	<i>vasH</i>	33 ^c	non-O1/non-O139	+
H (2)	- ^b	34, 35	non-O1/non-O139	-

^a ET, El Tor

^b ไม่พบยีนก่อโรคทุกชนิดที่ตรวจสอบ

^c เชื้อที่ผ่านการตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธี colony hybridization และให้ผล hemolytic activity เป็นบวก

^d มีลักษณะโคโลนีแบบซุซุระ

จากการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่างๆ พบว่า *V. cholerae* ทุกไอโซเลทไม่มียีน *ctxA*, *tcpA*, *zot* และ *ace* แต่เชื้อจำนวนร้อยละ 96 มียีน *hlyA* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศอินเดีย ที่ศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 (Singh *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *hlyA* ของเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลทไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี PCR แต่ตรวจพบได้ด้วยวิธี colony hybridization ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะ ยีน *hlyA* เป็นยีนที่มีบทบาทในการสร้าง El Tor-like hemolysin ซึ่งมีผลในการทำลายเม็ดเลือดแดง และมีส่วนในการทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและโรคอุจจาระร่วง (Menzl *et al.*, 1996; Saka *et al.*, 2008) จากการทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงของแคะในการทดลองนี้พบว่า *V. cholerae* ที่มียีน *hlyA* ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง และที่น่าสนใจคือ มีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลทซึ่งไม่มียีน *hlyA* แต่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อไอโซเลทดังกล่าวมียีนอื่นที่มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดง โดยสารพิษอื่น ๆ ที่มีบทบาทในการสลายเม็ดเลือดแดงที่มีรายงานมาก่อนหน้า ได้แก่ *hlx*-coding hemolysin, hemolysin (II), lecithinase LEC, *V. cholerae* δ -thermostable hemolysin (Vc- δ TH) และ NAG-rTDH เป็นต้น แต่จากการทดลองนี้พบว่า เชื้อที่ไม่มียีน *hlyA*

ทั้งที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้และไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เลติซิเนสได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสารพิษเหล่านี้ไม่ได้มีส่วนในการส่งเสริมความสามารถในการก่อโรคของ *V. cholerae* (Richardson *et al.*, 1986; Yoh *et al.*, 1986; Nagamune *et al.*, 1995; Fiore *et al.*, 1997; Fallarino *et al.*, 2002)

นอกจากการตรวจพบยีน *hlyA* แล้ว การศึกษานี้ยังพบว่า *V. cholerae* ที่แยกได้จำนวนร้อยละ 20 และ 6 มียีน *stn/sto* และ *vcsV2* (T3SS) ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Rivera และคณะ ในปี พ.ศ. 2544 ซึ่งตรวจพบยีน *stn/sto* ใน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมในประเทศบราซิล จำนวนร้อยละ 28.2 และมีรายงานจาก Rahman และคณะในปี พ.ศ. 2551 ซึ่งตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ T3SS(*vcsV2*) ใน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมในประเทศบังคลาเทศจำนวนร้อยละ 11.9 อย่างไรก็ตามการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ T3SS ใน *V. cholerae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยในประเทศอินเดีย พบว่า มีเชื้อจำนวนมากถึงร้อยละ 31.5 มียีนดังกล่าว (Chatterjee *et al.*, 2009) จึงเป็นไปได้ว่า T3SS จะเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. cholerae* นอกจากนี้ *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเล ในการทดลองนี้ส่วนใหญ่มียีน *vasH* (T6SS) (ร้อยละ 96) ซึ่งการศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไนจีเรียพบว่าส่วนใหญ่ก็มียีน *vasH* (Marin *et al.*, 2013) ดังนั้นบทบาทของยีน *vasH* ในการก่อโรค จึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคตที่น่าสนใจคือ เชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 สายพันธุ์มาตรฐาน ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ใช้ในการทดลองนี้ มียีน *hlyA*, *vcsV2* และ *vasH* ซึ่งพบรูปแบบการปรากฏของยีนทั้ง 3 ในเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท (กลุ่ม E) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศอินเดียที่ศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง (Chatterjee *et al.*, 2009) ดังนั้นเชื้อกลุ่มนี้อาจมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้

การศึกษานี้พบว่า *V. cholerae* O1 ซึ่งแยกได้จากอาหารทะเลไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษต่าง ๆ ที่พบใน *V. cholerae* O1 สายพันธุ์ระบาด ซึ่งชี้ให้เห็นว่า *V. cholerae* O1 ไอโซเลทนี้อาจจะมีต้นกำเนิดมาจาก *V. cholerae* non-O1 ที่ไม่สร้างสารพิษ แต่ได้รับการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง O1 antigen ผ่านทางกระบวนการ horizontal transfer (Karaolis *et al.*, 1995) เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *V. cholerae* O1 ไอโซเลทนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *V. cholerae* non-O1/non-O139

2.3 ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะใน *V. cholerae* ตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลท พบว่า เชื้อทุกไอโซเลทไวต่อยาคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol), ไซโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin), โคไตรม็อกซาโซล (cotrimoxazole), นอร์ฟล็อกซาซิน (norfloxacin) และ เตตราไซคลิน (tetracycline) อย่างไรก็ตามพบว่า มีเชื้อ 5 ไอโซเลท (ร้อยละ 14.3) ต่อดื้อยาแอมพิซิลิน (ampicilin) และ 8 ไอโซเลท (ร้อยละ 22.9) ไวปานกลางต่อยาแอมพิซิลิน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะใน *V. cholerae* จำนวน 35 ไอโซเลท

หมายเลขไอโซเลท	แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ¹					
	AMP ²	C	CIP	NOR	SXT	TE
8, 16, 25, 33, 34	R	S	S	S	S	S
18, 21, 22, 24, 26, 28, 29, 31	I	S	S	S	S	S
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 27, 30, 32, 35	S	S	S	S	S	S

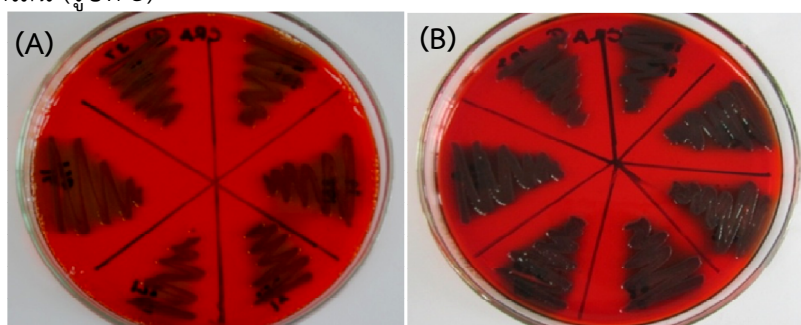
¹R, ตื้อต่อยาปฏิชีวนะ; I, ไวปานกลางต่อยาปฏิชีวนะ; S, ไวต่อยาปฏิชีวนะ

²AMP, แอมพิซิลลิน; C, คลอแรมเฟนิคอล; NOR, นอร์ฟล็อกซาซิน; C, ไซโปรฟลอกซาซิน; SXT, โคไตรม็อกซาโซล; TE, เตตราไซคลิน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *V. cholerae* ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศอินเดีย (Garg *et al.*, 2000) และงานวิจัยที่ศึกษา *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากน้ำในทะเลสาบในประเทศสเปน ที่รายงานว่า *V. cholerae* ที่แยกได้ดื้อต่อยาแอมพิซิลลินในเปอร์เซ็นต์ที่สูง ความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับการมี R plasmids (Amaro *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับการดื้อยาปฏิชีวนะใน *V. cholerae* ในสิ่งแวดล้อมว่าเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีนผ่านทางกระบวนการ horizontal transfer (Zhang *et al.*, 2009)

2.4 การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์, ไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวและปกคลุมพื้นผิวของเหลว

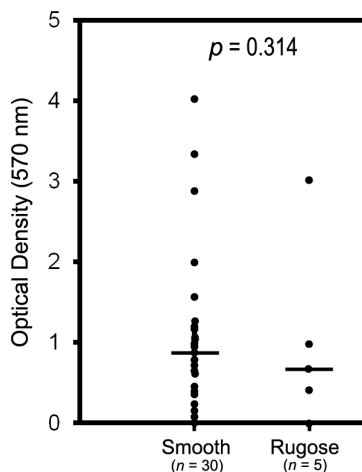
การตรวจสอบการสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ใน *V. cholerae* ด้วยอาหาร congo red agar พบว่าเชื้อทั้ง 35 ไอโซเลท สามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้ โดยสามารถสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C สังเกตจากความเข้มของสีโคโลนี (รูปที่ 3)



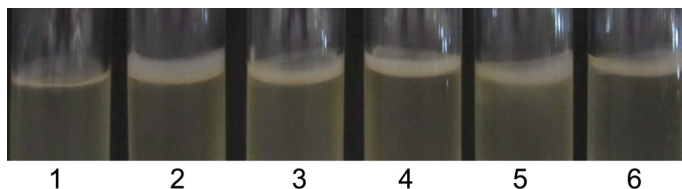
รูปที่ 3 การสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ของ *Vibrio cholerae* บนอาหาร congo red agar (CRA) ที่อุณหภูมิ 37°C (A) และ 30°C (B)

การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิว พบว่า มีเชื้อจำนวน 32 ไอโซเลทที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₅₇₀ อยู่ในช่วง 0.18-4.03 และเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบขรุขระสร้างไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิวไม่แตกต่างจากเชื้อที่มีโคโลนีแบบเรียบ ($p=0.314$, Mann-Whitney test) (รูปที่ 4)

การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลว พบว่า เชื้อที่มีโคโลนีแบบขรุขระสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวได้มากกว่าเชื้อที่มีโคโลนีแบบเรียบ (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มยัดเกาะพื้นผิว ของ *Vibrio cholerae* ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose) โดยแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยของ OD₅₇₀ ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง ส่วนเส้นแนวขวางแสดงค่ามัธยฐานของ OD₅₇₀ ในเชื้อแต่ละกลุ่ม



รูปที่ 5 การสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวของ *Vibrio cholerae* ที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ (smooth) และแบบขรุขระ (rugose)

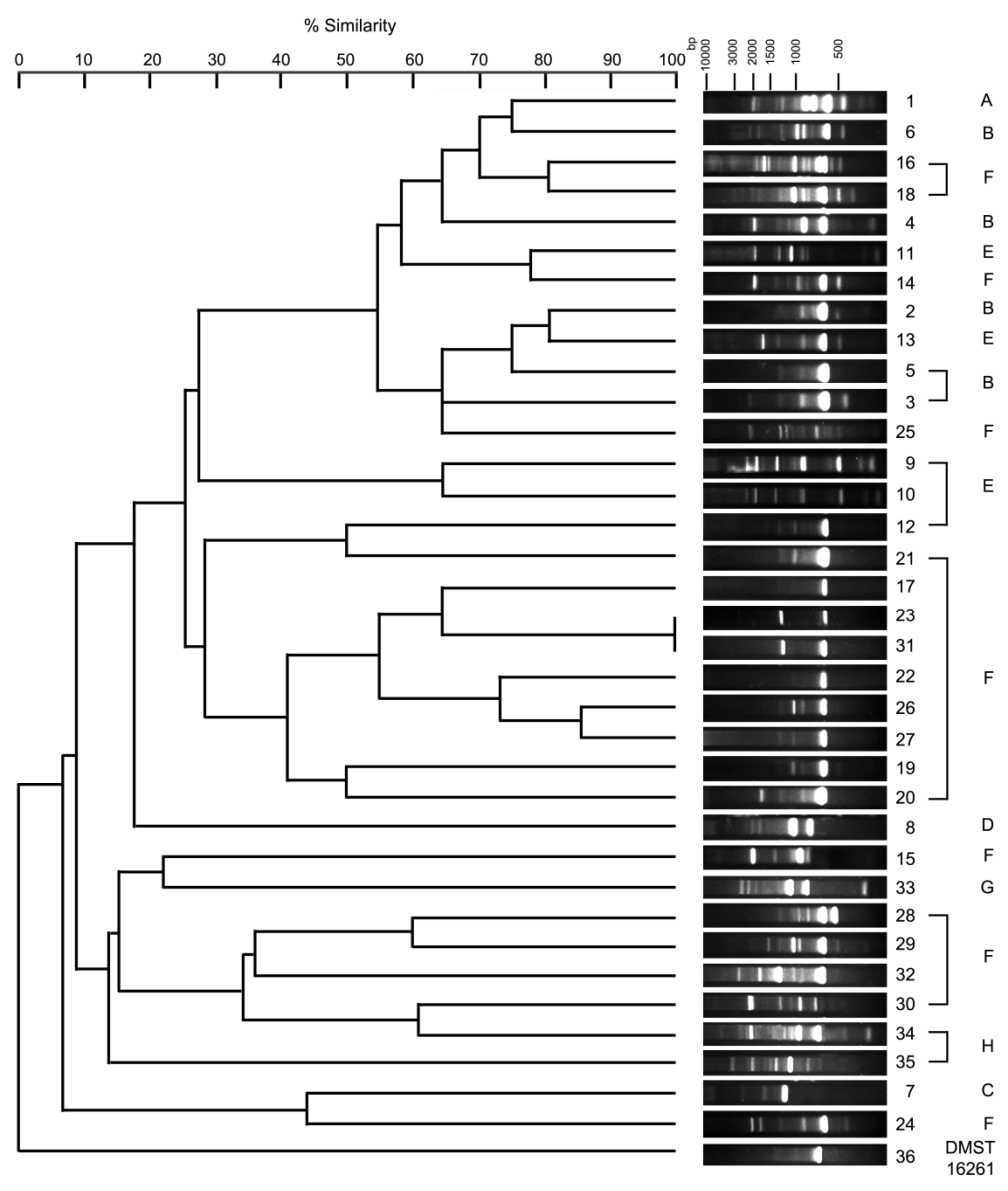
- 1: *V. cholerae* O1, El Tor DMST16261 (smooth colony)
- 2: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 6 (rugose colony)
- 3: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 14 (rugose colony)
- 4: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 15 (rugose colony)
- 5: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 16 (rugose colony)
- 6: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 17 (rugose colony)

ไบโอฟิล์มเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการทำให้ *V. cholerae* สามารถทนทานต่อสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีและมีส่วนในการเพิ่มความสามารถในการเกาะติดกับลำไส้ของหนู (Zhu and Mekalanos, 2003) การศึกษานี้พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิว พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มแตกต่างกัน และบางไอโซเลทไม่สามารถยึดเกาะพื้นผิวได้ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจาก ปัจจัยต่าง ๆ เช่น พื้นที่ หรือ เซลล์เจ้าบ้าน (Mueller *et al.*, 2007) นอกจากนี้พบว่าเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบขรุขระสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวไม่แตกต่างจากเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวแต่ผลของการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวในงานวิจัยนี้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่สร้างโคโลนีแบบขรุขระส่วนใหญ่จะสร้างไบโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวได้มากกว่าเชื้อที่สร้างโคโลนีแบบเรียบ (Yildiz *et al.*, 2004)

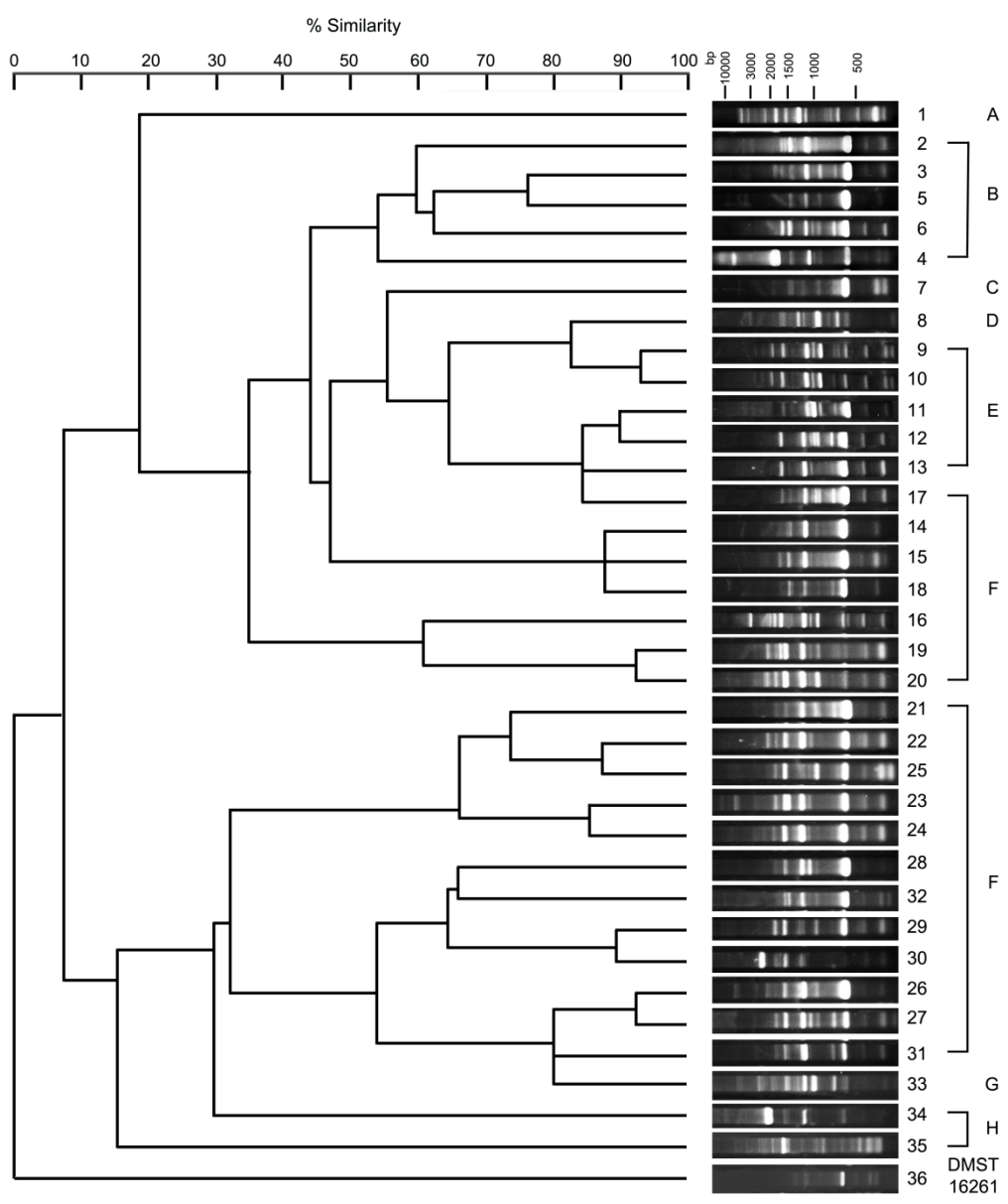
3. การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* โดยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR

การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอใน *V. cholerae* ตัวแทนจำนวน 35 ไอโซเลท โดยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR พบว่า วิธี AP-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนแตกต่างกันเกือบทั้งหมด โดยมีเชื้อ 2 ไอโซเลทที่มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน (lane 23, ไอโซเลทหมายเลข 23 และ lane 31, ไอโซเลทหมายเลข 31) (รูปที่ 6) การจัดกลุ่มของเชื้อโดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวิธี AP-PCR พบว่าไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อในแต่ละกลุ่มได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 6) ส่วนวิธี ERIC-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนแตกต่างกันทั้งหมด (รูปที่ 7) และวิธี ERIC-PCR แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเชื้อสอดคล้องกับการมียีนก่อโรคมกกว่าวิธี AP-PCR โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่มีรูปแบบของยีนก่อโรคในกลุ่ม B, E และ F (รูปที่ 7)

วิธี AP-PCR และ ERIC-PCR เป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ *V. cholerae* โดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งวิธี AP-PCR จะอาศัยไพรเมอร์สายสั้น ๆ เพียงเส้นเดียวในการเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อเพิ่มดีเอ็นเอแบบสุ่ม ส่วนวิธี ERIC-PCR จะใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วน ERIC sequence ที่พบได้เพียงในเชื้อกลุ่ม enteric bacteria และ vibrios (Penner *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 1995) Rivera และคณะ ได้รายงาน่ววิธี ERIC-PCR สามารถแยกความแตกต่างของ *V. cholerae* ซึ่งสร้างสารพิษ (ctx^+ , zot^+) และ *V. cholerae* ที่ไม่สร้างสารพิษ (ctx^- , zot^-) ได้ (Rivera *et al.*, 1995) การศึกษานี้พบว่า วิธี AP-PCR ให้รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนที่เหมือนกันจำนวน 2 ไอโซเลท แต่วิธี ERIC-PCR ให้รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อตัวแทนทั้งหมดแตกต่างกัน และที่น่าสนใจจากการศึกษานี้คือ วิธี ERIC-PCR สามารถแสดงความสัมพันธ์ของ *V. cholerae* ที่ไม่สร้างสารพิษได้สอดคล้องกับการมียีนก่อโรคต่าง ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่มียีนก่อโรคใกล้เคียงกันอาจจะมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน โดยการวิวัฒนาการของเชื้อทำให้มีการได้รับยีนก่อโรคหรือสูญเสียยีนก่อโรคได้ ดังนั้นวิธี ERIC-PCR จึงเป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *V. cholerae* ที่ไม่สร้างสารพิษได้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาทางระบาดวิทยา และประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคอุจจาระร่วงที่เกี่ยวข้องกับรับประทานอาหาร



รูปที่ 6 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ *Vibrio cholerae* ที่ได้จากวิธี AP-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม *V. cholerae* ตามยีนที่ตรวจพบ
หมายเลข 1 ถึง 35: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 1 ถึง 35 ตามลำดับ
หมายเลข 36: *V. cholerae* O1 DMST16261
A-H: กลุ่มของ *V. cholerae* แบ่งตามการมียีนก่อโรคต่าง ๆ (ตารางที่ 3)



รูปที่ 7 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ *Vibrio cholerae* ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR เปรียบเทียบกับการจำแนกกลุ่ม *V. cholerae* ตามยีนที่ตรวจพบ
หมายเลข 1 ถึง 35: *V. cholerae* ไอโซเลทหมายเลข 1 ถึง 35 ตามลำดับ
หมายเลข 36: *V. cholerae* O1 DMST16261
A-H: กลุ่มของ *V. cholerae* แบ่งตามการมียีนก่อโรคต่างๆ (ตารางที่ 3)

สรุปผลการทดลอง

1. การแยก *V. cholerae* จากอาหารทะเลทั้งหมด 125 ตัวอย่าง ได้เชื้อซึ่งผ่านการยืนยันโดยวิธี PCR ที่ใช้ ยีน *ompW* เป็นยีนเป้าหมาย จำนวน 100 ไอโซเลท จากอาหารทะเล 55 ตัวอย่าง โดยเชื้อส่วนใหญ่ เป็น *V. cholerae* non-O1/non-O139 มีเพียง 1 ไอโซเลท เป็น *V. cholerae* O1
2. การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค พบว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้ส่วนใหญ่ มียีน *hlyA* (ร้อยละ 95) และ *vasH* (T6SS) (ร้อยละ 95) รองลงมาคือ ยีน *stn/sto* (ร้อยละ 20) และ *vcsV2* (T3SS) (ร้อยละ 6) ตามลำดับ โดยมีเชื้อ 5 ไอโซเลท ที่มีรูปแบบยีนเหมือนกับที่พบในเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้เป็นเชื้อควบคุมในการทดลอง ส่วน *V. cholerae* O1 ที่แยกได้ไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษต่าง ๆ ซึ่งมักพบใน *V. cholerae* O1 สายพันธุ์ระบาดที่แยกจากผู้ป่วย
3. *V. cholerae* ตัวแทน ($n=35$) แยกได้จากอาหารทะเลส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบ ยกเว้นเชื้อ 5 ไอโซเลทที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน และเชื้อที่มียีน *hlyA* มีความสามารถในการสลาย เม็ดเลือดแดง แสดงให้เห็นบทบาทของยีน *hlyA* กับความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ของเชื้อ อย่างไรก็ตามมีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลทที่ไม่มียีน *hlyA* แต่มีความสามารถในการสลาย เม็ดเลือดแดง ทั้งนี้อาจมีปัจจัยอื่นที่ช่วยในการสลายเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้เชื้อทุกไอโซเลท สามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้แต่อย่างไรก็ตามมีเชื้อ 3 ไอโซเลทที่ไม่สามารถสร้างไปโอฟิล์มเกาะติดพื้นผิว และเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีแบบขรุขระและแบบเรียบสร้างไปโอฟิล์มยึดเกาะพื้นผิวไม่แตกต่างกันแต่ จากการศึกษาการสร้างไปโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวพบว่า เชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีแบบขรุขระ สร้างไปโอฟิล์มปกคลุมพื้นผิวของเหลวได้มากกว่าเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีแบบเรียบ
4. การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. cholerae* โดยวิธี ERIC-PCR พบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกัน บ่งชี้ว่าเชื้อดังกล่าวเป็นคนละสายพันธุ์ และยังพบความสัมพันธ์ของเชื้อที่มีรูปแบบยีนก่อโรคเหมือนกัน บ่งชี้ว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวมีวิวัฒนาการร่วมกัน

เอกสารอ้างอิง

- AESR. 2010. Cholera. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health. <http://www.boe.moph.go.th/Annual/aesr2553/Open.html>. (accessed September 19, 2012).
- Amaro, C., Aznar, R., Garay, E. and Alcaide, E. 1988. R plasmids in environmental *Vibrio cholerae* non-O1 strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(11): 2771-2776.
- Bagchi, K., Echeverria, P., Arthur, J., Sethabutr, O., Serichantalergs, O. and Hoge, C. 1993. Epidemic of diarrhea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 that produced heat-stable toxin among Khmers in a camp in Thailand. *Journal of clinical microbiology*. 31(5): 1315-1317.
- Chatterjee, S., Ghosh, K., Raychoudhuri, A., Chowdhury, G., Bhattacharya, M., Mukhopadhyay, A., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S., Klose, K. E. and Nandy, R. 2009. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(4): 1087-1095.
- Cinar, H. N., Kothary, M., Datta, A. R., Tall, B. D., Sprando, R., Bilecen, K., Yildiz, F. and McCardell, B. 2010. *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, developmental delay, and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*. 5: e11558.
- Coelho, A., Andrade, J. R., Vicente, A. C. P. and Dirita, V. J. 2000. Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infection and Immunity*. 68(3): 1700-1705.
- Dziejman, M., Serruto, D., Tam, V. C., Sturtevant, D., Diraphat, P., Faruque, S. M., Rahman, M. H., Heidelberg, J. F., Decker, J. and Li, L. 2005. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(9): 3465-3470.
- Fallarino, A., Attridge, S. R., Manning, P. A. and Focareta, T. 2002. Cloning and characterization of a novel haemolysin in *Vibrio cholerae* O1 that does not directly contribute to the virulence of the organism. *Microbiology*. 148(7): 2181-2189.
- Faruque, S. M., Albert, M. J. and Mekalanos, J. J. 1998. Epidemiology, Genetics, and ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology Reviews*. 62(4): 1301-1314.

- Faruque, S. M. and Mekalanos, J. J. 2008. Molecular Ecology of *Vibrio cholerae*. In *Vibrio Cholerae: Genomics and Molecular Biology*. Faruque and Nair, editors. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 141-151.
- Fiore, A. E., Michalski, J. M., Russell, R. G., Sears, C. L. and Kaper, J. B. 1997. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. 65(8): 3112-3117.
- Garg, P., Chakraborty, S., Basu, I., Datta, S., Rajendran, K., Bhattacharya, T., Yamasaki, S., Bhattacharya, S., Takeda, Y. and Balakrish Nair, G. 2000. Expanding multiple antibiotic resistance among clinical strains of *Vibrio cholerae* isolated from 1992-7 in Calcutta, India. *Epidemiology and Infection*. 124(03): 393-399.
- Kaper, J. B., Morris, J. G. J. and Levine, M. M. 1995. Cholera. *Clinical microbiology reviews*. 80: 48-49.
- Karaolis, D., Lan, R. and Reeves, P. R. 1995. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxigenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*. 177(11): 3191-3198.
- Kitaoka, M., Miyata, S. T., Brooks, T. M., Unterweger, D. and Pukatzki, S. 2011. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*. 193(23): 6471-6482.
- Luo, Y., Ye, J., Jin, D., Ding, G., Zhang, Z., Mei, L., Octavia, S. and Lan, R. 2013. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *BMC Microbiology*. 13(1): 52.
- Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S. and Mekalanos, J. J. 2009. Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell host & microbe*. 5(3): 234-243.
- Marin, M. A., Thompson, C. C., Freitas, F. S., Fonseca, E. L., Aboderin, A. O., Zailani, S. B., Quartey, N. K. E., Okeke, I. N. and Vicente, A. C. P. 2013. Cholera Outbreaks in Nigeria Are Associated with Multidrug Resistant Atypical El Tor and Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS neglected tropical diseases*. 7(2): e2049.
- Menzl, K., Maier, E., Chakraborty, T. and Benz, R. 1996. HlyA Hemolysin of *Vibrio Cholerae* O1 Biotype El Tor. *European Journal of Biochemistry*. 240(3): 646-654.
- Mueller, R. S., McDougald, D., Cusumano, D., Sodhi, N., Kjelleberg, S., Azam, F. and Bartlett, D. H. 2007. *Vibrio cholerae* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic surface colonization. *Journal of bacteriology*. 189(14): 5348-5360.
- Nagamune, K., Yamamoto, K. and Honda, T. 1995. Cloning and sequencing of a novel hemolysis gene of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters*. 128(3): 265-269.

- Ogawa, A., Kato, J., Watanabe, H., Nair, B. and Takeda, T. 1990. Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from a patient with traveler's diarrhea. *Infection and Immunity*. 58(10): 3325-3329.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., Di Trani, V., Canonico, C., Pianetti, A., Tega, L. and Carraturo, A. 2009. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 132(1): 47-53.
- Penner, G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. and Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Research*. 2(4): 341-345.
- Richardson, K., Michalski, J. and Kaper, J. 1986. Hemolysin production and cloning of two hemolysin determinants from classical *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. 54(2): 415-420.
- 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.
- Rivera, I. N., Chun, J., Huq, A., Sack, R. B. and Colwell, R. R. 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6): 2421-2429.
- Saka, H. A., Bidinost, C., Sola, C., Carranza, P., Collino, C., Ortiz, S., Echenique, J. R. and Bocco, J. L. 2008. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microbial pathogenesis*. 44(2): 118-128.
- Schirmeister, F., Dieckmann, R., Bechlars, S., Bier, N., Faruque, S. and Strauch, E. 2014. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 33:767-778.
- Sharma, C., Thungapathra, M., Ghosh, A., Mukhopadhyay, A. K., Basu, A., Mitra, R., Basu, I., Bhattacharya, S., Shimada, T. and Ramamurthy, T. 1998. Molecular Analysis of Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Associated with an Unusual Upsurge in the Incidence of Cholera-Like Disease in Calcutta, India. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(3): 756-763.
- Singh, D., Matte, M. H., Matte, G., Jiang, S., Sabeena, F., Shukla, B., Sanyal, S., Huq, A. and Colwell, R. 2001. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and

- non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2): 910-921.
- Yildiz, F. H., Liu, X. S., Heydorn, A. and Schoolnik, G. K. 2004. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Molecular Microbiology*. 53(2): 497-515.
- Yoh, M., Honda, T. and Miwatani, T. 1986. Purification and partial characterization of a non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin that cross-reacts with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 52(1): 319-322.
- Zhang, X.-X., Zhang, T. and Fang, H. H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82(3): 397-414.
- Zhu, J. and Mekalanos, J. J. 2003. Quorum Sensing-Dependent Biofilms Enhance Colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental cell*. 5(4): 647-656.

ภาคผนวก

สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
Volume 11, Number 11, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/fpd.2014.1772

Isolation and Characterization of *Vibrio cholerae* Isolates from Seafood in Hat Yai City, Songkhla, Thailand

Sutima Preeprem,¹ Pimonsri Mittraparp-arthorn,¹ Phuangthip Bhoopong,² and Varaporn Vuddhakul¹

Abstract

Seafood has been identified as an important source of *Vibrio cholerae* in Thailand, especially in the Southern coastal region. In this study, we isolated and characterized *V. cholerae* from seafood obtained from several markets in Hat Yai city, Southern Thailand. A total of 100 *V. cholerae* isolates were obtained from 55 of 125 seafood samples. The dominant serotype was non-O1/non-O139. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was used to detect the presence of pathogenesis-related genes. The *stx/stx* and *hlyA* El Tor virulence genes were detected in 20% and 96% of the isolates, respectively. None of the isolates were positive for the *ctxA*, *tcpA*, *zot*, and *ace* genes. Only 6% of the isolates carried the T3SS gene (*vcsV2*); however, the majority of the isolates (96%) carried the T6SS gene (*vasH*). Representative isolates ($n=35$) that exhibited various virulence gene patterns were randomly selected and analyzed for their hemolytic activity, antibiotic susceptibility, biofilm formation, and genotype. Hemolytic activity using sheep red blood cells was detected in only one of the *hlyA*-negative isolates. Apart from ampicillin, all isolates were pansusceptible to five test antibiotics. Biofilm production was observed in most of the isolates, and there was no difference in the presence of a biofilm between the smooth and rugose isolates. Using the enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR method, clonal relationships were observed among the isolates that exhibited identical virulence gene patterns.

ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1. ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อที่ไม่มียีน *hlyA* และปัจจัยที่มีผลทำให้เชื้อไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้
2. ศึกษาบทบาทของยีน *vasH* ในการก่อโรคของเชื้อ
3. ศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิว และบนพื้นผิวของเหลวของเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบและแบบขรุขระ
4. ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ดีเอ็นเอของเชื้อโดยเทคนิคอื่น ๆ ทางอณูชีววิทยา

Abstract การเผยแพร่ผลงานในงานประชุมวิชาการ

การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 2nd International Food Safety Conference
วันที่ 2-3 ธันวาคม 2556 ณ กัวลาลัมเปอร์ ประเทศมาเลเซีย



2nd International Food Safety Conference (IFSAC2013) Food Safety: Critical Dimension of Food Security in Emerging Economies

Paper 44

Distribution of Virulence Genes and Molecular Fingerprinting of *Vibrio cholerae* Isolated from Seafood

Preeprem, S., Sermwittayawong, N. and Mittraparp-arthorn, P.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

Vibrio cholerae is inhabitant in aquatic environment. Human can be infected via drinking water and/or consumption of seafood contaminated with this pathogen. In this study, one hundred and one *V. cholerae* strains were isolated from 105 seafood samples marketed around Hat Yai, Songkhla Province, Thailand. These strains were confirmed by the presence of *V. cholerae* specific gene (*ompW*). Of 101 isolates, 94 were identified as non-O1/non-O139 serotype and 2 were identified as O1. Remaining 5 isolates were found to be untypeable because they form rough colonies. The presence of 6 virulence genes encoding cholera toxin (*ctxA*), toxin coregulated pilus (*tcp*), zonula occludens toxin (*zot*), accessory cholera enterotoxin (*ace*), NAG-heat stable enterotoxin (*stn/sto*) and hemolysin (*hlyA*) was analyzed by PCR. The *ctxA*, *tcp*, *zot*, *ace*, *stn/sto* and *hlyA* genes were present in 4, 1, 1, 2, 20 and 95% of the isolates, respectively. However, four strains of non-O1/non-O139 were negative for all genes. Interestingly, two strains of non-O1/non-O139 were positive for *ctxA* gene. Based on the distribution of 6 virulence genes, all isolates could be grouped into 7 groups (A - G). Group A (*ctxA*⁺, *tcp*⁺, *zot*⁺, *ace*⁺, *hlyA*⁺), group B (*ctxA*⁺, *hlyA*⁺), group C (*ace*⁺, *hlyA*⁺), group D (*stn/sto*⁺, *hlyA*⁺), group E (*stn/sto*⁺), group F (*hlyA*⁺), and group G (negative for all genes) composed 1, 2, 1, 18, 2, 72, and 4% of total isolates, respectively. Molecular typing of 28 representative strains from each group was performed by *arbitrarily primed PCR (AP-PCR)*. The result showed that all *V. cholerae* strains belonged to different clones. Thus, this study demonstrates the presence of virulence genes in various strains of seafood-associated *V. cholerae* isolates which high genetically diverse. These strains may act as an environmental genetic reservoir of virulence genes which might contribute to the emergence of toxigenic *V. cholerae*.