

3. ผลการทดลอง

3.1 การตรวจยืนยัน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR โดยใช้จีน *toxR* เป็นเงินเป้าหมาย

เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 868 ไอโซเลต ซึ่งตรวจสอบโดยวิธีทางชีวเคมี และ คาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* ถูกนำมาตรวจยืนยันโดยวิธี PCR โดยใช้จีน *toxR* เป็นเงินเป้าหมาย (รูปที่ 3.1) โดยแยกเป็นเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543 -2548 จำนวน 64 , 123, 142, 127, 205 และ 207 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)

3.2 การตรวจหาจีน *tdh* และ *trh* ใน *V. parahaemolyticus*

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วย จำนวน 868 ไอโซเลต นำมาตรวจหาจีน สร้างสารพิษ *tdh* (รูปที่ 3.1) และ *trh* (รูปที่ 3.1) โดยวิธี PCR แยกเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ 4 กลุ่ม คือ สายพันธุ์ที่มีจีน *tdh* ($tdh^+ trh^-$) สายพันธุ์ที่มีจีน *trh* ($tdh^- trh^+$) สายพันธุ์ที่มีทั้งจีน *tdh* และ *trh* ($tdh^+ trh^+$) และสายพันธุ์ที่ไม่มีทั้งจีน *tdh* และ *trh* ($tdh^- trh^-$) ซึ่งสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในทุกๆปี คือ สายพันธุ์ $tdh^+ trh^-$ จำนวน 722 ไอโซเลต ส่วนสายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ ซึ่งตรวจไม่พบในปี พ.ศ. 2543 ได้เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 เป็น ร้อยละ 4.1, 5.6, 5.5, 8.8 และ 8.2 ตามลำดับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2548 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปี พ.ศ. 2543-2546 เทียบกับปี พ.ศ. 2547 และปี พ.ศ. 2548 มีค่า p-value = 0.031 และ 0.038 ตามลำดับ และสายพันธุ์ $tdh^- trh^+$ ก็ตรวจพบได้ทุกปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2548

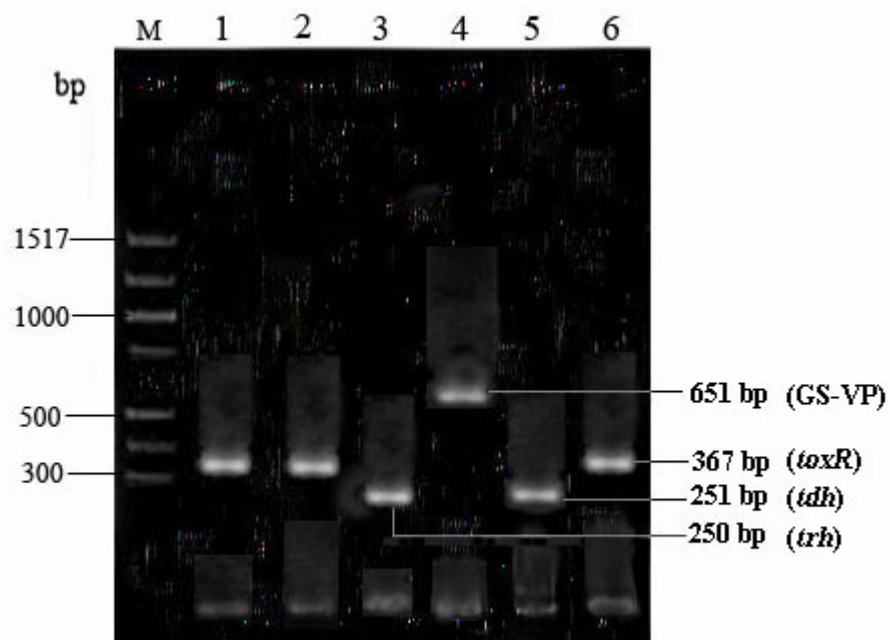
3.3 การทำ Group-specific PCR

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ $tdh^+ trh^-$ จำนวน 722 ไอโซเลต ถูกนำมาทดสอบ GS-PCR (รูปที่ 3.1) พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543-2548 ที่ให้ผล GS-PCR positive ซึ่งเป็นสายพันธุ์ระบาดทั่วโลก (pandemic strains) มีจำนวน 540 ไอโซเลต (74.8%) คือ จากร้อยละ 64.1, 68.3, 69.7, 68.5, 56.1 และ 55.5 ตามลำดับ และพบสูงสุดในปี พ.ศ. 2545 อย่างไรก็ตามพบว่าสายพันธุ์ระบาดทั่วโลกได้ลดลงมากกว่า 10% จากปี พ.ศ. 2546 ไปยังปี พ.ศ. 2547 - 2548 คือจากร้อยละ 68.5 เป็น 56.1 และ 55.5 ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญมีค่า p-value = 0.012 (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ลักษณะสายพันธุ์และจำนวนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จาก ร.พ. หาดใหญ่ ระหว่าง พ.ศ. 2543-2548

พ.ศ.	จำนวนไอโซเลต	<i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻ (%)	<i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁺ (%)	<i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁺ (%)	<i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁻ (%)	GS-PCR positive
2543	64	54 (84.4)	3 (4.7)	0 ^{a1}	7 (10.9)	41 (64.1) ^{a2}
2544	123	108 (87.8)	2 (1.6)	5 (4.1) ^{a1}	8 (6.5)	83 (67.5) ^{b2}
2545	142	117 (82.4)	3 (2.1)	8 (5.6) ^{a1}	14 (9.8)	99 (69.7) ^{b2}
2546	127	111 (87.4)	2 (1.6)	7 (5.5) ^{a1}	7 (5.5)	87 (68.5) ^{b2}
2547	205	165 (80.5)	3 (1.5)	18 (8.8) ^{b1}	19 (9.3)	115 (56.1) ^{c2}
2548	207	167 (80.7)	3 (1.4)	17 (8.2) ^{b1}	20 (9.7)	115 (55.5) ^{c2}

a1 # b1 โดยใช้ Yates-chi²; p-value > 0.05 , a2=b2=c2 แต่ b2 # c2 โดยใช้ Pearson chi²; p-value > 0.05



รูปที่ 3.1 ผลการทำ PCR เพื่อตรวจหาจีน *toxR*, *tdh*, *trh* และ GS-PCR

M	:	100 bp DNA ladder
lane 1, 2, 6	:	จีน <i>toxR</i> ของ <i>V. parahaemolyticus</i> (367 bp)
lane 3	:	จีน <i>trh</i> ของ <i>V. parahaemolyticus</i> (250 bp)
lane 4	:	จีน GS-VP ของ <i>V. parahaemolyticus</i> (651 bp)
lane 5	:	จีน <i>tdh</i> ของ <i>V. parahaemolyticus</i> (251 bp)

3.4 ลักษณะทาง phenotype ของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

3.4.1 serotype

เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระดับโลก tdh^+trh^- และ GS-PCR positive จำนวน 540 ไอโซเลต สายพันธุ์ tdh^+trh^+ จำนวน 55 ไอโซเลต และสายพันธุ์ tdh^-trh^+ จำนวน 16 ไอโซเลต ถูกนำมาทดสอบซีโรทัยป์ สายพันธุ์ระดับโลกพบซีโรทัยป์ O3:K6 สูงที่สุดคือ 393 ไอโซเลต (72.8%) รองลงมาคือ O1:K25 จำนวน 88 ไอโซเลต (16.3%) และ O4:K68 จำนวน 28 ไอโซเลต (5.2%) ในขณะที่ KUT จะมีเพียง 25 ไอโซเลต (4.6%) (ตารางที่ 3.2) ส่วนสายพันธุ์ tdh^+trh^+ พบซีโรทัยป์ O1:KUT สูงที่สุดคือ 10 ไอโซเลต (18.2%) และพบ O ซีโรทัยป์ที่ตรวจไม่พบในสายพันธุ์ tdh^+trh^- คือ O8, O11 และ O12 (ตารางที่ 3.3) และที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งก็คือ พบ KUT สูงถึง 34 ไอโซเลต (61.8%) ส่วนสายพันธุ์ tdh^-trh^+ พบซีโรทัยป์ O1:KUT สูงที่สุดเช่นกันคือ 7 ไอโซเลต (43.8%) พบ O ซีโรทัยป์ที่ตรวจไม่พบในสายพันธุ์ tdh^+trh^- คือ O11 (ตารางที่ 3.4) และพบ KUT สูงถึง 11 ไอโซเลต (68.7%)

ตารางที่ 3.2 ซีโรทัยป์และจำนวนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^-$ และ GS-PCR positive ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2548

พ.ศ. (จำนวนทั้งหมด)	จำนวนไอโซเลต	O:K Serotypes
2543 (41)	30	O3:K6
	8	O1:K25
	2	O4:K68
	1	O2K3
2544 (83)	63	O3:K6
	11	O1:K25
	8	O4:K68
	1	O1:KUT
2545 (99)	74	O3:K6
	18	O1:K25
	5	O1:KUT
	1	O3:K29, O1:K41
2546 (87)	62	O3:K6
	12	O1:K25
	6	O1:KUT
	3	O4:K68
	1	O3:K29, O5:KUT, OR:KUT, UT:UT
2547 (115)	81	O3:K6
	22	O1:K25
	6	O4:K68
	4	O1:KUT
	1	O3:KUT, O3:K46
2548 (115)	83	O3:K6
	17	O1:K25
	9	O4:K68
	5	O1:KUT
	1	O4:K4

ตารางที่ 3.3 ซีโรทัยป์และจำนวนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2548

พ.ศ. (จำนวนทั้งหมด)	จำนวนไอโซเลต	O:K Serotypes
2543 (0)	0	
2544 (5)	2	O3:KUT
	1	O1:KUT, O5:KUT, O12:KUT
2545 (8)	2	O12:KUT, O8:K74
	1	O1:K69, O1:KUT, O4:KUT, O5:K15
2546 (7)	4	O1:KUT
	1	O3:K6, O1:K69, O1:K6
2547 (18)	4	O11:KUT
	3	O5:KUT
	2	O3:K56, O5:K15, O12:KUT
	1	O1:K6, O4:K67, O3:K6, O3:K72, O8:KUT
2548 (17)	4	O1:KUT, O11:KUT
	2	O3:K6, O4:KUT
	1	O1:K9, O4:K4, O4:K13, O5:KUT, O8:K20

ตารางที่ 3.4 ซีโรทัยป์และจำนวนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^- trh^+$ ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2548

พ.ศ. (จำนวนทั้งหมด)	จำนวนไอโซเลต	O:K Serotypes
2543 (3)	3	O1:KUT
2544 (2)	1	O1:KUT
	1	O4:KUT
2545 (3)	1	O1:KUT
	1	O11:KUT
	1	O1:K58
2546 (2)	1	O3:KUT
	1	O1:K48
2547 (2)	1	O1:KUT
	1	O3:KUT
2548 (4)	1	O1:KUT
	1	O4:K13
	1	O4:K55
	1	O4:K49

3.4.2 ผลการทดสอบ urease

เชื้อ *V. parahaemolyticus trh*⁺ จำนวน 66 ไอโซเลต แบ่งเป็น *tdh*⁻*trh*⁺ 16 ไอโซเลต และ *tdh*⁺*trh*⁺ 50 ไอโซเลต ถูกนำมาทดสอบ urease พบว่าทุกไอโซเลตให้ผลบวกกับการทดสอบ urease (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 ความสัมพันธ์ระหว่าง *V. parahaemolyticus trh*⁺ และการสร้างเอนไซม์ urease

พ.ศ.	จำนวนไอโซเลต	<i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁺	<i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁺	urease บวก
2543	3	3	0	3
2544	7	2	5	7
2545	11	3	8	11
2546	9	2	7	9
2547	20	3	17	20
2548	16	3	13	16
รวม	66	16	50	66

3.4.3 ผลการทดสอบความทนเกลือของเชื้อ (NaCl tolerance)

เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 120 ไอโซเลต แบ่งเป็น *tdh*⁺*trh*⁻ 23 ไอโซเลต ซึ่งคัดเลือกจากสายพันธุ์ระดับโลก (GS-PCR positive) *tdh*⁺*trh*⁺ 50 ไอโซเลต (เหมือนข้อ 3.4.2) *tdh*⁻*trh*⁺ 16 ไอโซเลต (เหมือนข้อ 3.4.2) และ *tdh*⁻*trh*⁻ 31 ไอโซเลต ทั้งหมดถูกนำมาทดสอบในหลอด nutrient broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0%, 0.5%, 1%, 3%, 6%, 8% และ 10% ตามลำดับ เนื่องจากเกลือเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้เมื่อมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5%-8% ความเข้มข้นซึ่งเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่าเชื้อเจริญมากที่สุดคือหลอดที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3% ส่วนหลอดที่ใสไม่เห็นการเจริญของเชื้อคือหลอดที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 10% (ตารางที่ 3.6)

ตารางที่ 3.6 ผลการทดสอบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ

V. parahaemolyticus

สายพันธุ์	จำนวนไอโซเลตที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์						
		0%	0.5%	1%	3%	6%	8%	10%
<i>tdh⁺trh⁻</i>	23	0 *	100**	100	100	100	100	0
<i>tdh⁺trh⁺</i>	50	0	100	100	100	100	100	0
<i>tdh⁻trh⁺</i>	16	0	100	100	100	100	100	0
<i>tdh⁻trh⁻</i>	31	0	100	100	100	100	100	0

* = no growth, ** = % ของเชื้อที่สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์

3.4.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชือบนสารอาหารกึ่งแข็ง (swarming activity)

เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 120 ไอโซเลต (เหมือนข้อ 3.4.3) ถูกนำมาทดสอบการเคลื่อนที่บนสารอาหารกึ่งแข็ง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเคลื่อนที่ที่เวลา 4 และ 6 ชม. พบว่าไม่มีความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของเชือบนสารอาหารกึ่งแข็งของเชื้อทั้งสี่กลุ่ม คือ สายพันธุ์ *tdh⁺trh⁻* มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 15.5 ± 5.3 และ 25.8 ± 9.8 ที่เวลา 4 และ 6 ชม. ตามลำดับ สายพันธุ์ *tdh⁺trh⁺* มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.6 ± 4.8 และ 24.4 ± 7.9 สายพันธุ์ *tdh⁻trh⁺* มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.5 ± 6.0 และ 22.2 ± 10.6 และสายพันธุ์ *tdh⁻trh⁻* มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.6 ± 5.3 และ 23.6 ± 8.8 มิลลิเมตร ที่เวลา 4 และ 6 ชม. (ตารางที่ 3.7) ที่เวลา 4 ชม. มีค่า p-value = 0.532 และที่เวลา 6 ชม. มีค่า p-value = 0.289 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.7 ผลการศึกษา swarming activity ที่ 37°C ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้
ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2548

<i>V. parahaemolyticus</i>	จำนวนไอโซเลตที่ทดสอบ	เวลาที่บ่มเพาะ	
		4 ชม.	6 ชม.
<i>tdh⁺ trh⁻</i>	23	15.5 ± 5.3*	25.8 ± 9.8
<i>tdh⁺ trh⁺</i>	50	14.6 ± 4.8	24.4 ± 7.9
<i>tdh⁻ trh⁺</i>	16	13.5 ± 6.0	22.2 ± 10.6
<i>tdh⁻ trh⁻</i>	31	15.6 ± 5.3	23.6 ± 8.8

* หน่วยวัดเป็น mm

3.4.5 การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี disk diffusion

เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 189 ไอโซเลต (ไอโซเลตข้อ 3.4.3 จำนวน 120 ไอโซเลตและเพิ่มสายพันธุ์ *tdh⁺ trh⁻* 69 ไอโซเลต) ไอโซเลตทั้งหมดถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ โดยใช้แผ่นยามาตรฐาน 7 ชนิด ได้แก่ ampicillin (AP) 10 µg, azithromycin (AZM) 15 µg, chloramphenicol (C) 30 µg, ciprofloxacin (CI) 5 µg, co-trimoxazole (SXT) 25 µg, norfloxacin (NA) 10 µg และ tetracycline (TE) 30 µg พบว่าเชื้อทั้งสี่กลุ่มจะไวต่อยา azithromycin, chloramphenicol, norfloxacin และ tetracycline 100% แต่รูปแบบความไวต่อยา ampicillin, ciprofloxacin และ co-trimoxazole พบว่าเชื้อกลุ่ม *tdh⁺ trh⁻* จะต่างจากอีกสามกลุ่ม โดย *tdh⁺ trh⁺* จะให้ผลความไวต่อยาคล้ายกับกลุ่ม *tdh⁻ trh⁺* และกลุ่ม *tdh⁻ trh⁻* คือ ส่วนใหญ่จะไวต่อยา ciprofloxacin และ co-trimoxazole แต่ *tdh⁺ trh⁻* ส่วนใหญ่จะไวต่อยา ciprofloxacin และไวต่อยา co-trimoxazole มากกว่าอีกสามกลุ่ม เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะไวต่อยา ampicillin ยกเว้นสองไอโซเลตในกลุ่ม *tdh⁻ trh⁻* (ตารางที่ 3.8)

ตารางที่ 3.8 รูปแบบความไวต่อยาของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2548

		<i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻	<i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁺	<i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁺	<i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁻
		(%)	(%)	(%)	(%)
Azithromycin (15 µg)	ไวต่อยา	92 (100)	50 (100)	16 (100)	31 (100)
	คือยา	0	0	0	0
Chloramphenicol (30 µg)	ไวต่อยา	92 (100)	50 (100)	16 (100)	31 (100)
	คือยา	0	0	0	0
Norfloxacin (10 µg)	ไวต่อยา	92 (100)	50 (100)	16 (100)	31 (100)
	คือยา	0	0	0	0
Tetracyclin (30 µg)	ไวต่อยา	92 (100)	50 (100)	16 (100)	31 (100)
	คือยา	0	0	0	0
Ampicillin (10 µg)	ไวต่อยา	0	0	0	2 (6.5)
	คือยา	92 (100)	50(100)	16 (100)	29 (93.5)
Ciprofloxacin (5 µg)	ไวต่อยา	17 (18.5)	35 (70)	9 (56.3)	20 (64.5)
	คือยา	75 (81.5)	15 (30)	7 (43.7)	11 (35.5)
Co-trimoxazole (25 µg)	ไวต่อยา	73 (79.3)	47 (94)	16 (100)	31 (100)
	คือยา	19 (20.7)	3 (6)	0	0

ลักษณะทางอนุชีววิทยาของ *V. parahaemolyticus*

3.5 การศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่ละไอโซเลตโดยวิธี AP-PCR

ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของเชื้อโดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AP-PCR การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นในสายพันธุ์ที่มีจिन *trh* ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2548 แบ่งเป็น tdh^-trh^+ 12 ไอโซเลต และ tdh^+trh^+ 48 ไอโซเลต (ตารางที่ 3.9) ซึ่ง *V. parahaemolyticus* ที่นำมาศึกษาได้คัดเลือกจากซีโรทัยป์ที่พบบ่อย (ตารางที่ 3.10 – 3.11)

ตารางที่ 3.9 เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 60 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

พ.ศ.	จำนวนไอโซเลต	สายพันธุ์ที่มีจिनก่อโรค	
		tdh^-trh^+	tdh^+trh^+
2543	3	3	0
2544	7	2	5
2545	9	2	7
2546	7	0	7
2547	18	2	16
2548	16	3	13
รวม	60	12	48

ตารางที่ 3.10 ซีโรทัยป์ของ tdh^+trh^+ จำนวน 12 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

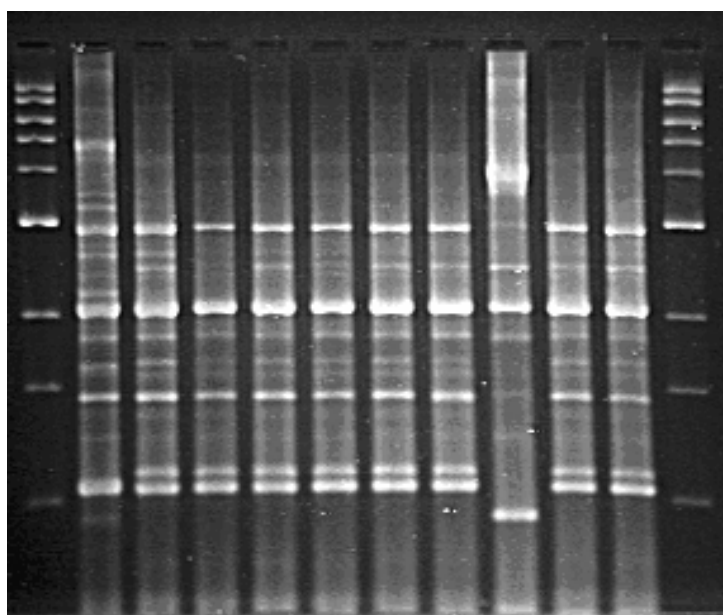
พ.ศ. (จำนวนทั้งหมด)	จำนวนไอโซเลต	หมายเลขของไอโซเลต	ซีโรทัยป์
2543 (3)	3	PSU 207, 264, 269	O1:KUT
2544 (2)	1	PSU 373	O1:KUT
	1	PSU 282	O4:KUT
2545 (2)	1	PSU 628	O1:KUT
	1	PSU 721	O11:KUT
2547 (2)	1	PSU 1170	O1:KUT
	1	PSU 1163	O3:KUT
2548 (3)	1	PSU 2552	O1:KUT
	1	PSU 2117	O4:K13
	1	PSU 2490	O4:K55

ตารางที่ 3.11 ซีโรทัยป์ของ $tdh^+ trh^+$ จำนวน 48 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

พ.ศ. (จำนวนทั้งหมด)	จำนวนไอโซเลต	หมายเลขของไอโซเลต	ซีโรทัยป์
2544 (5)	1	PSU 333	O1:KUT
	2	PSU 467, 469	O3:KUT
	1	PSU 459	O5:KUT
	1	PSU 305	O12:KUT
2545 (7)	1	PSU 719	O1:KUT
	1	PSU 601	O4:KUT
	2	PSU 604, 606	O12:KUT
	1	PSU 763	O1:K69
	1	PSU 711	O5:K15
	1	PSU 694	O8:K74
2546 (7)	4	PSU 931, 947,1058 ,1059	O1:KUT
	1	PSU 913	O1:K6
	1	PSU 934	O1:K69
	1	PSU 771	O3:K6
2547 (16)	2	PSU 1164,1941	O5:K15
	3	PSU 866, 1462, 1867	O5:KUT
	1	PSU 1969	O8:KUT
	4	PSU 1691,1802,1913,1966	O11:KUT
	1	PSU 1994	O12:KUT
	1	PSU 2002	O1:K6
	1	PSU 1958	O3:K6
	2	PSU 1696, 1702	O3:K56
	1	PSU 2014	O3:K72
2548 (13)	4	PSU 2055,2152,2457,2586	O1:KUT
	2	PSU 2023, 2052	O4:KUT
	1	PSU 2076	O5:KUT
	4	PSU 2056,2057,2270,2461	O11:KUT
	1	PSU 2070	O1:K9
	1	PSU 2022	O4:K4

ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 60 ไอโซเลต โดยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ primer 2 และ primer 4 พบว่ามีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่าง *V. parahaemolyticus* ในเชื้อที่แยกได้แต่ละปี อย่างไรก็ตามซีโรทัยป์ที่เหมือนกันส่วนใหญ่จะให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันโดยพบว่า 8 ใน 9 ไอโซเลตของซีโรทัยป์ O1:KUT สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2545, 2546 และ 2548 จำนวน 1, 4 และ 4 ไอโซเลต ตามลำดับ จะให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน(รูป 3.2 และ 3.3) เป็นที่น่าสนใจว่าบางไอโซเลตในปี พ.ศ. 2544-2546 ที่มีซีโรทัยป์ต่างกันกลับให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกัน เช่น ซีโรทัยป์ O5:KUT แยกจากปี พ.ศ. 2544 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกับซีโรทัยป์ O3:KUT แยกจากปี พ.ศ. 2544 (รูป 3.4 และ 3.5) ส่วนสายพันธุ์ $tdh^- trh^+$ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุกไอโซเลตไม่มีความคล้ายคลึงกันเลย

พ.ศ. 2544 2545 2546 2548
 Lane M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

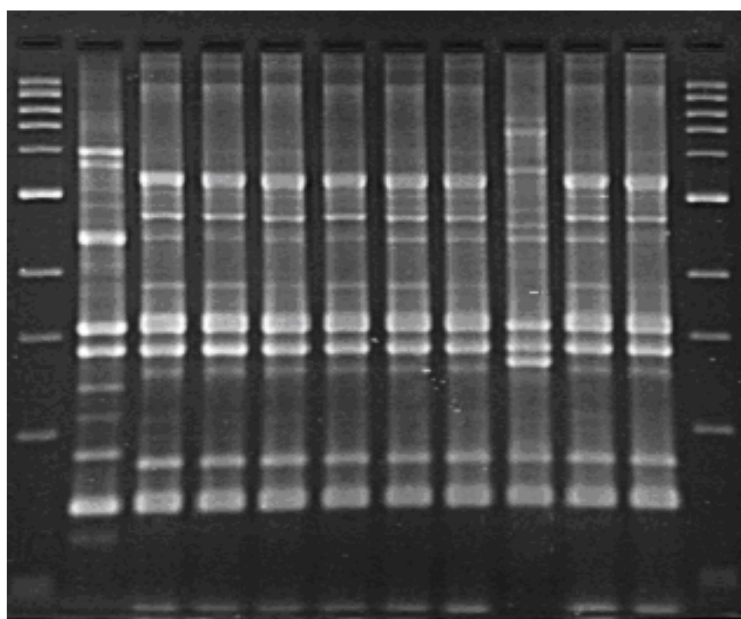


รูปที่ 3.2 ายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ ซีโรทัยป์ O1:KUT ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544-2548 โดยใช้ primer 2

M	:	1kb DNA ladder
lane 1	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2544
lane 2	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2545
lane 3-6	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2546
lane 7-10	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2548

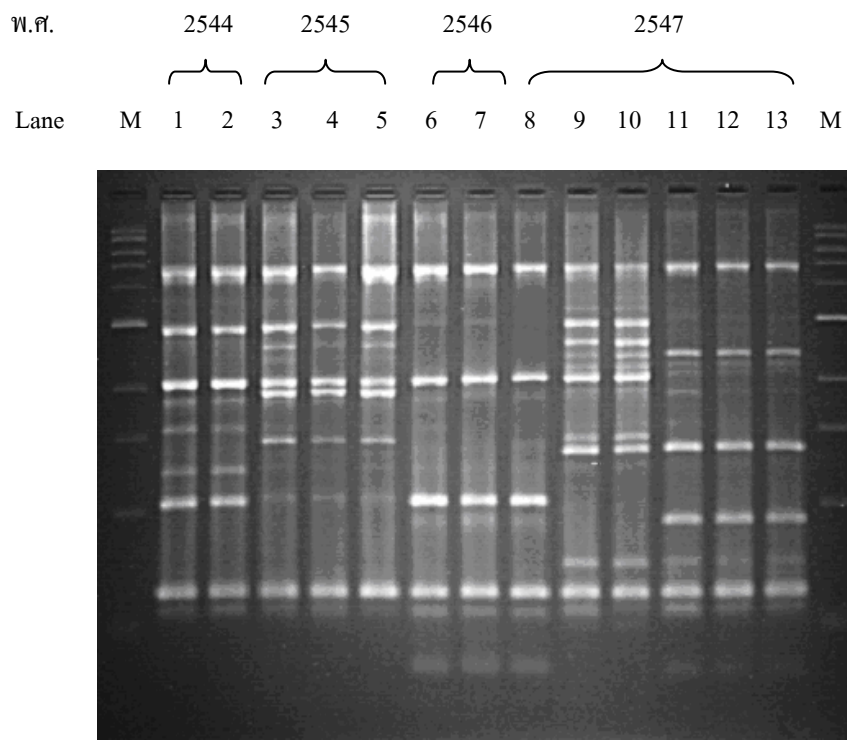
พ.ศ. 2544 2545 2546 2548

Lane M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



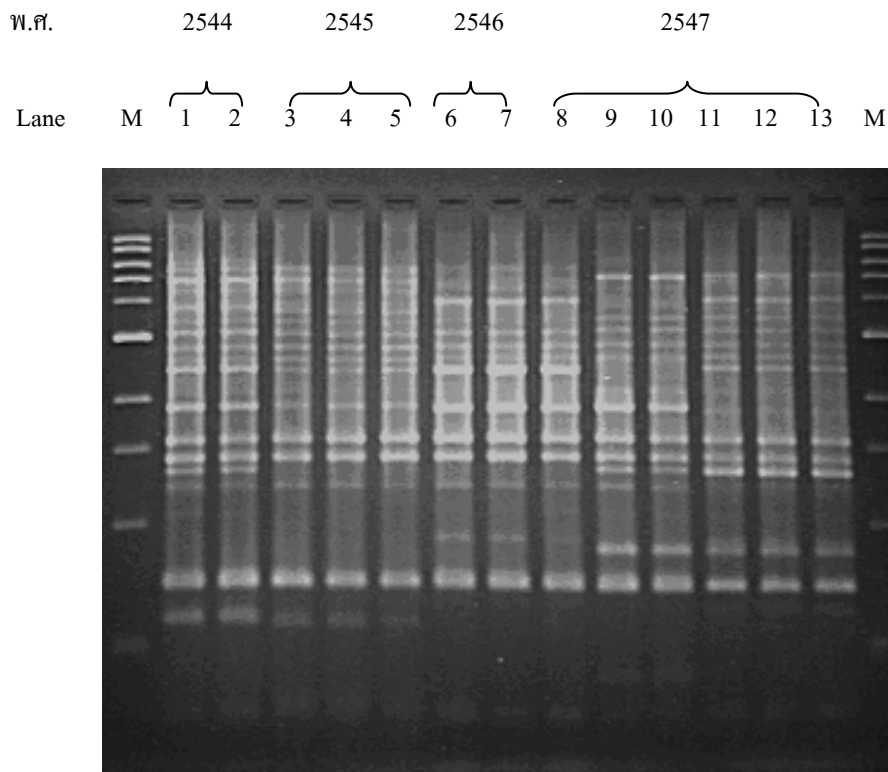
รูปที่ 3.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ ซีโรทัยป์ O1:KUT ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544-2548 โดยใช้ primer 4

M	:	1kb DNA ladder
lane 1	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2544
lane 2	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2545
lane 3-6	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2546
lane 7-10	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:KUT, isolates in 2548



รูปที่ 3.4 ายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544-2547 โดยใช้ primer 2

M	:	1kb DNA ladder
lane 1	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O5:KUT, isolates in 2544
lane 2	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O3:KUT, isolates in 2544
lane 3	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O4:KUT, isolates in 2545
lane 4-5	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O12:KUT, isolates in 2545
lane 6	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:K69, isolates in 2546
lane 7	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:K6, isolates in 2546
lane 8	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:K6, isolates in 2547
lane 9-10	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O3:K56, isolates in 2547
lane 11-13	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O5:KUT, isolates in 2547



รูปที่ 3.5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544-2547 โดยใช้ primer 4

M	:	1kb DNA ladder
lane 1	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O5:KUT, isolates in 2544
lane 2	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O3:KUT, isolates in 2544
lane 3	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O4:KUT, isolates in 2545
lane 4-5	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O12:KUT, isolates in 2545
lane 6	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:K69, isolates in 2546
lane 7	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:K6, isolates in 2546
lane 8	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O1:K6, isolates in 2547
lane 9-10	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O3:K56, isolates in 2547
lane 11-13	:	<i>V. parahaemolyticus</i> O5:KUT, isolates in 2547

3.6 การศึกษา *trh* subgroup ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยวิธี

Southern blot hybridization

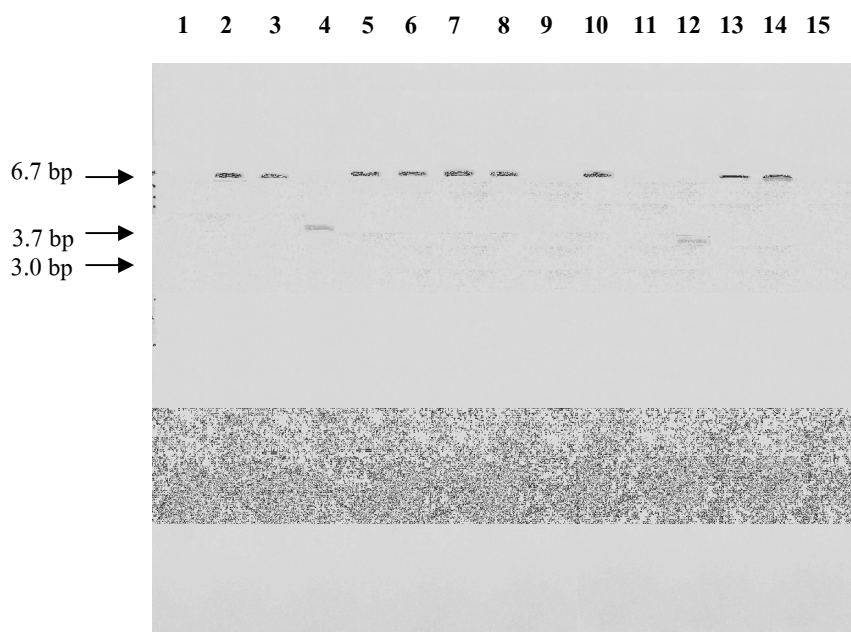
ได้คัดเลือกสายพันธุ์ *tdh⁻trh⁺* 12 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตเดียวกับที่ทำ AP-PCR และสายพันธุ์ *tdh⁺trh⁺* 10 ไอโซเลต แบ่งเป็นปี พ.ศ. 2544 และ 2545 ปีละ 1 ราย พ.ศ. 2546 และ 2548 ปีละ 4 ราย

ผลการทดสอบพบว่า subgroup *trh1* จะพบมากในสายพันธุ์ *tdh⁺trh⁺* (90.0%) ในขณะที่ subgroup *trh2* จะพบได้มากในสายพันธุ์ *tdh⁻trh⁺* (66.7%) (ตารางที่ 3.12)

ตารางที่ 3.12 *Trh* subgroup ของ *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจพบในสายพันธุ์ *tdh⁻trh⁺* และสายพันธุ์ *tdh⁺trh⁺*

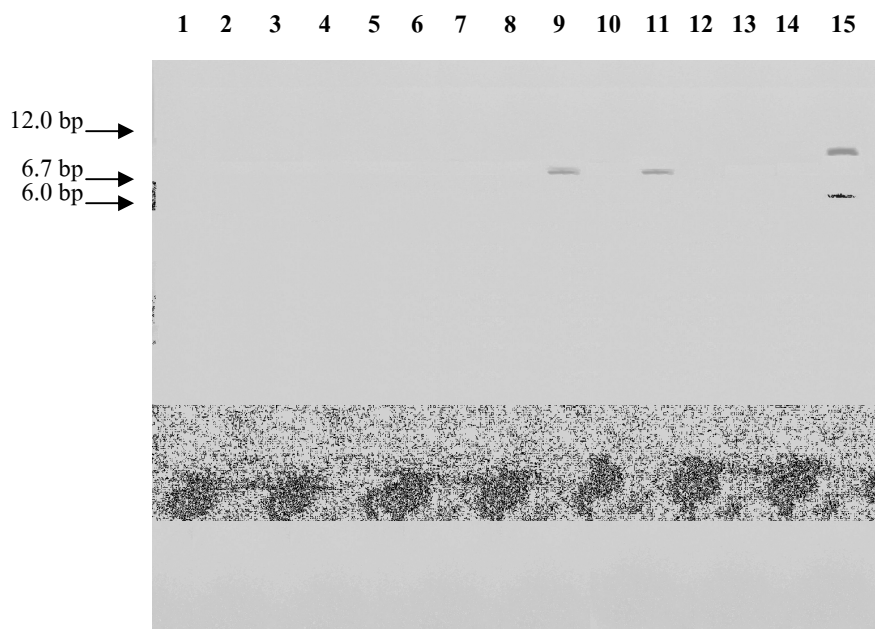
เชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	จำนวนไอโซเลต	<i>trh1</i> (%)	<i>trh2</i> (%)
<i>tdh⁺trh⁺</i>	10	18 (90)	2 (10)
<i>tdh⁻trh⁺</i>	12	4 (33.3)	8 (66.7)

รูปที่ 3.6 Southern blot hybridization ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ และ $tdh^- trh^+$ ด้วยตัวตรวจจับ *trh1*



- 2 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 3 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 4 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 5 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 6 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 7 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 8 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 9 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 10 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2545
 11 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh^+$ O4:K55, isolates in 2548
 12 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2544
 13 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh^+$ O4:K13, isolates in 2548
 14 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh1^+$ control
 15 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh2^+$ control

รูปที่ 3.7 Southern blot hybridization ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $tdh^+ trh^+$ และ $tdh^- trh^+$ ด้วยตัวตรวจจับ *trh2*



- 2 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 3 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 4 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 5 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 6 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 7 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 8 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2546
 9 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2548
 10 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2545
 11 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh^+$ O4:K55, isolates in 2548
 12 : *V. parahaemolyticus* $tdh^+ trh^+$ O1:KUT, isolates in 2544
 13 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh^+$ O4:K13, isolates in 2548
 14 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh1^+$ control
 15 : *V. parahaemolyticus* $tdh^- trh2^+$ control