246169
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246169

รายงานวิจัย

เรื่อง

คุณสมบัติของสารพิษและเอนไซม์ของเชื้อวิบริโอ คลอลีรี นอนโอหนึ่ง ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

Characterization of toxin and enzyme in *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from patients and environment

โดย

คณะผู้วิจัย ฐิติมา นุตราวงศ์
จริยา ชมวารินทร์
จริยา หาญวจนวงศ์

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2553
ชุดโครงการการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วง
โดยเทคนิค multiplex PCR และการศึกษาคุณสมบัติสารพิษ
และเอนไซม์ของเชื้อวิบริโอ คลอลีรี เพื่อเพิ่ม คุณภาพชีวิต

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246169
b00251700

รายงานวิจัย

เรื่อง

คุณสมบัติของสารพิษและเอนไซม์ของเชื้อวิบริโอ คลอลีรี นอนโอหนึ่ง ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

Characterization of toxin and enzyme in *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from patients and environment

โดย

คณะผู้วิจัย ฐิติมา นุตราวงศ์
จริยา ชมวารินทร์
จริยา หาญวจนวงศ์

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2553
ชุดโครงการการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วง
โดยเทคนิค multiplex PCR และการศึกษาคุณสมบัติสารพิษ
และเอนไซม์ของเชื้อวิบริโอ คลอลีรี เพื่อเพิ่ม คุณภาพชีวิต

คุณสมบัติของสารพิษและเอนไซม์ของเชื้อวิบริโอ คลอเลรี นอนโอหนึ่ง ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

ฐิติมา นุตราวงศ์[1] จริยา ชมวารินทร์[1] จริยา หาญวจนวงศ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

246169

บทคัดย่อ

เชื้อกลุ่ม *Vibrio cholerae* ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ การศึกษาเชื้อกลุ่ม *V. cholera* O1 and non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในจังหวัดขอนแก่น เพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงในการก่อโรค โดยนำมาตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องคือ *rtxA* และ *rtxC* ด้วยวิธี duplex PCR พบว่า เชื้อ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วยมียีนทั้งสองชนิดคือ 88.7% และ 78.1% ตามลำดับ ขณะที่สิ่งแวดล้อมพบ 75% และ 76.4% ตามลำดับ การทดสอบ hemagglutinin/protease พบว่า เชื้อ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 จากผู้ป่วยสร้าง hemagglutinin/protease ได้อยู่ในค่าเฉลี่ย 8.7% และ 9.3% ตามลำดับ และเชื้อที่แยกได้สิ่งแวดล้อมสร้างได้อยู่ในค่าเฉลี่ย 7.9% and 8.2% ตามลำดับ การสร้าง hemolysin พบว่าเชื้อที่มี *hlyA+* จะมีการสร้าง hemolysin ได้สูง (19.0-23.9%) กว่าเชื้อที่ไม่มี *hlyA*$^-$ อย่างมีนัยสำคัญ (13.5%) เช่นเดียวกับความสามารถในการทำให้เกิด cytotoxicity เชื้อกลุ่มที่มี *hlyA*$^+$ ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมมีการเกิด cytotoxicity เฉลี่ยอยู่ในช่วง 59%-79% ในขณะที่เชื้อกลุ่มไม่มี *hlyA*$^-$ เกิด cytotoxicity เฉลี่ยเท่ากับ 32 เชื้อกลุ่มที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อมมีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เฉลี่ย 68-79% และ 59-63% ตามลำดับ กาวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ายีน *hlyA* มีผลต่อการสร้าง hemolysin และเหนี่ยวนำให้เกิด cytotoxic activity และพบว่า กลุ่มเชื้อ *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมสามารถสร้างสารพิษและเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน ถึงแม้ไม่มียีน *ctxA, zot, ace* และ *tcpA* ช่วยในการก่อโรค

คำสำคัญ : วิบริโอ คลอเลรี นอนโอหนึ่ง, RTX toxin, hemolysin, hemagglutinin/protease

Characterization of toxin and enzyme in *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from clinical and environment

Thitima Nutravong Chariya Chomvarin, Chariya Hahnvajanawong

DEPARTMENTS OF [1]MICROBIOLOGY, FACULTY OF MEDICINE, KHON KAEN UNIVERSITY

Abstract

246169

Vibrio cholerae isolated from clinical and environmental sources in Khon Kaen were analyzed for the presence of *rtxA* and *rtxC*, and to determine their ability to produce hemagglutinin/protease, hemolysin and cytotoxic activity. The *rtxA* and *rtxC* were detected using duplex PCR. The presence of *rtxA* and *rtxC* in *V.cholerae* O1 and *V. cholerae* non-O1/non-O139 of clinical strains were 88.7% and 78.1%, and those of environmental strains were 75.0 and 76.4%, respectively. The hemagglutinin/protease production in *V.cholerae* O1 and *V. cholerae* non-O1/non-O139 of clinical strains was average of 8.7% and 9.3%, respectively, and that of environmental strains was 7.9 and 8.2%, respectively. The *hlyA* gene had effect on hemolysin production and cytotoxic activity. For the hemolysin production, the *V. cholerae* strains which carried *hlyA*-positive strains produced a higher hemolysin (19.0-23.9%) than *hlyA*- negative strains (13.5%) in significant difference whereas those carried *hlyA*-positive strains had a higher cytotoxic activity (59%-79%) than *hlyA*- negative strains (32.0%) and the clinical strains showed 68-79% average of cytotoxic activity whereas the environmental strains showed 59-63% average of cytotoxic activity. These findings suggest that *V. cholerae* non-O1 non-O139 strains were found to produce exocellular enzyme and a toxin other than cholera toxin with associated pathogenic and these factors may be contributed virulence of these strains.

Keywords: *Vibrio cholerae* non-O1, RTX toxin, hemolysin, hemagglutinin/protease

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณ 2553 จึงขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นมา ณ. โอกาสนี้

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ผู้ดำเนินการวิจัย

30 พฤษภาคม 2554

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		**i**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		**iii**
กิตติกรรมประกาศ		**v**
สารบัญเนื้อหา		**vi**
สารบัญตาราง		**vii**
บทที่ 1 บทนำ		
1.1	ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3	ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4	ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5	ประโยชน์ที่ได้จากโครงการวิจัย	2
1.6	สถานที่ทำการทดลอง และเก็บข้อมูล	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		
2.1	คุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio cholerae* และการก่อโรค	4
2.2	El Tor hemolysin	4
2.3	Repeats-in-toxin (RTX)	5
2.4	Hemagglutinin/Protease	6
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย		
3.1	การตรวจหายีน *rtxA* และ *rtxC* ด้วยวิธี duplex PCR	7
3.2	การตรวจการสร้าง hemolysin ด้วยวิธี hemolysin assay	8
3.3	การตรวจการสร้าง protease ด้วยวิธี protease assay	8
3.4	การตรวจ cytotoxic activity	9

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1	ผลการตรวจหายีน *rtxA* และ *rtxC* ด้วยวิธี duplex PCR	10
4.2	ผลการสร้าง hemolysin และ protease	12
4.3	ผลการตรวจ cytotoxic activity	14
4.4	สรุปผลการวิจัย	15
เอกสารอ้างอิง		16

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	Primer sequence และ PCR condition ของ duplex PCR	8
ตารางที่ 4.1	ผลการตรวจหายีน *rtxA* และ *rtxC* ด้วยวิธี duplex PCR	10
ตารางที่ 4.2	ผลการสร้าง hemolysin ด้วยวิธี hemolysin assay	12
ตารางที่ 4.3	ผลการสร้าง protease ด้วยวิธี protease assay	13
ตารางที่ 4.4	ผลการตรวจ cytotoxic activity	14

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 4.1	ความสามารถในการก่อให้เกิด cytotoxic activity ของเชื้อ *V. cholerae* non-O1	15