

บทนำ

สินค้าประมงเป็นหนึ่งในสินค้าส่งออกที่ทำรายได้หลักให้กับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2555 มีการส่งออกสินค้าประมงเป็นมูลค่า 264,766.34 ล้านบาท ในบรรดาสินค้าประมง ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้นในรอบหลายสิบปีที่ผ่านมา แต่ก็มีปัญหาหลักที่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อน ซึ่งมีทั้งสารเคมี, โลหะหนัก, สารพิษ และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค อาหารทะเลจัดเป็นแหล่งสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษที่แพร่ระบาดอยู่ทั่วโลก การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอน ตั้งแต่การสัมผัสกับน้ำทะเลและวัชพืช, การจับสัตว์น้ำ, กระบวนการผลิต, การบรรจุหีบห่อ, การเก็บรักษา, การขนส่งที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม ไปจนถึงวิธีการปรุงอาหารซึ่งไม่นิยมปรุงให้สุก (Iwamoto และคณะ 2010) จากรายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลมีอยู่หลายสกุล (genus) เช่น *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคอาหารเป็นพิษ, โรคท้องร่วง, โรคคอหอยคุด, โรคไทฟอยด์, โรคพาราไทฟอยด์, โรคตับอักเสบ, โรคกระเพาะอักเสบ, โรคลำไส้อักเสบ, โรคติดเชื้อในท่อน้ำดี และโรคติดเชื้อในกระแสเลือด (Coburn และคณะ 2005; Iwamoto และคณะ 2010; Kaper และคณะ 1995; Karolis และคณะ 1998; Mellies และคณะ 2001; Morabito และคณะ 2003; Nataro และ Kaper 1998) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารและน้ำ ในบรรดาเชื้อแบคทีเรียแต่ละสกุล จะมีเชื้อบางชนิด (species) และบางสายพันธุ์เท่านั้นที่เป็นเชื้อก่อโรค (Iwamoto และคณะ 2010; Parham และคณะ 2005) ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียถูกควบคุมโดยยีนควบคุมการก่อโรค (virulence gene) ซึ่งมีหลายยีนเรียงลำดับอยู่บน pathogenicity island (PAI) ส่วนใหญ่ PAI มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม (chromosome) (Bhowmick และคณะ 2011; Chakravorty และคณะ 2002; Klein และ Jones 2001; Marcus และคณะ 2000; Morabito และคณะ 2003; Ochman และคณะ 1996; Ostblom และคณะ 2011; Parham และคณะ 2005) ยีนควบคุมการก่อโรคมียีนควบคุมกระบวนการต่างๆ เช่น 1) การสังเคราะห์ virulence factor และ adherence factor (Leavis และคณะ 2004; Morabito และคณะ 2003; Nicholls และคณะ 2000; Saroj และคณะ 2008; Shankar และคณะ 2002) 2) การสังเคราะห์และการปลดปล่อยโปรตีนและสารพิษ เช่น chaperone, hemolysin และ enterotoxin (Bhowmick และคณะ 2011; Buchrieser และคณะ 2000; Galan และ Collmer 1999; Iwen และคณะ 1997; Johnson 1991; Kaper และคณะ 1995; Klein และ Jones 2001; Leavis และคณะ 2004; Mellies และคณะ 2001; Morabito และคณะ 2003; Sarkar และคณะ 2002) 3) การสังเคราะห์สารควบคุม (putative regulator) (Ochman และคณะ 1996) 4) การสังเคราะห์และการปลดปล่อยเอนไซม์ เช่น phosphotransferase และ protease (Reidl และ Boos 1991; Zhang และคณะ 2003) 5) การสังเคราะห์และการปลดปล่อยโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเอนไซม์ protease (Ochman และคณะ 1996) 6) การสังเคราะห์สารประกอบจับธาตุเหล็ก เช่น aerobactin (Johnson 1991) 7) การสังเคราะห์ biofilm (Tendolkar และคณะ 2004; Toledo-Arana และคณะ 2001) 8) การเข้าเกาะและการเกิดบาดแผลที่เซลล์เนื้อเยื่อของลำไส้ (Jarvis และคณะ 1995) 9) การยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันและกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของเซลล์เจ้าบ้าน (Chakravorty และคณะ 2002; Cirillo และคณะ 1998; Klapproth และคณะ 2000; Klein และ Jones 2001) 10) การติดเชื้อในท่อน้ำดีและกระแสเลือด (Johnson และคณะ 2002; 2005; Kurazono และคณะ 2000; Parham และคณะ 2005; Sannes และคณะ 2004) 11) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ flagellin

(Ochman และคณะ 1996) 12) การปรับตัวให้ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในกระเพาะอาหาร (Gantois และคณะ 2006) 13) การปรับตัวให้อยู่รอดท่ามกลางจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microbiota) ภายในลำไส้ (Ibarra และคณะ 2010) 14) กระบวนการปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน (Ostblom และคณะ 2011) และ 15) การกำหนดความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน (host specificity) (Saroj และคณะ 2008) กระบวนการต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต่อการเข้าอยู่อาศัย, การอยู่รอด, การปรับตัว และการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์เจ้าบ้าน จึงมีความสำคัญต่อการก่อโรคและการระบาดของเชื้อ

ทั้งนี้ในการก่อโรค ยีนควบคุมการก่อโรคจะต้องมีการแสดงออกโดยสังเคราะห์ messenger ribonucleic acid (mRNA) มีรายงานถึงปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค เช่น 1) ชนิดและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชนิดของแหล่งคาร์บอน, ค่า pH, ความเข้มข้นของ sodium chloride (NaCl), magnesium (Mg) และสารอินทรีย์ฟอสเฟต (P_i) (Beuzon และคณะ 1999; Cirillo และคณะ 1998; Deiwick และคณะ 1999; Gerlach และคณะ 2007; Ibarra และคณะ 2010; Klein และ Jones 2001; Lee และ Falkow 1990; Lim และคณะ 2007; Song และคณะ 2004) 2) อุณหภูมิ (Sarkar และคณะ 2002) 3) ปริมาณของออกซิเจน (Bajaj และคณะ 1996; Behlau และ Miller 1993; Boddicker และคณะ 2003; Jones และ Falkow 1994; Lee และ Falkow 1990; Lucas และ Lee 2001; Schiemann และ Shope 1991; Temme และคณะ 2008) 4) ระยะการเจริญของเชื้อ (Gerlach และคณะ 2007; Ibarra และคณะ 2010; Sarkar และคณะ 2002) และ 5) butyrate (Gantois และคณะ 2006; van Immerseel และคณะ 2004) พบว่าการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคมีผลต่อการอยู่รอดและคุณลักษณะอื่นๆ ของเชื้อแบคทีเรีย เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ protease และการเคลื่อนที่ รวมถึงการติดเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์เจ้าบ้าน (Chakravorty และคณะ 2002; Cirillo และคณะ 1998; Ibarra และคณะ 2010; Jarvis และคณะ 1995; Johnson และคณะ 2002; 2005; Klapproth และคณะ 2000; Klein และ Jones 2001; Kurazono และคณะ 2000; Ochman และคณะ 1996; Parham และคณะ 2005; Sannes และคณะ 2004)

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคใน 4 สกุล ได้แก่ *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญ และมักพบปนเปื้อนในอาหารและน้ำ รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารทะเล เป็นปัญหาสำคัญต่อสุขอนามัยในประเทศต่างๆ เนื่องจากเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีการระบาดได้รวดเร็วและก่อโรคที่เป็นอันตรายถึงชีวิต ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียใน 4 สกุลดังกล่าวจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยอาศัยลักษณะเฉพาะของโคโลนีบนอาหารคัดเลือก (selective media) จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียจากการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) ระบุสกุลของเชื้อแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ระบุสกุลหรือชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม (molecular marker) ตรวจสอบการมียีนควบคุมการก่อโรค 22 ยีนที่มีรายงานว่าพบในเชื้อแบคทีเรียที่ระบุสกุลได้ จากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีนควบคุมการก่อโรค สามารถยืนยันการมียีนควบคุมการก่อโรคโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละยีนที่อาจพบในเชื้อต่างสกุลได้จากแผนผังแสดงความสัมพันธ์ของยีน (phylogenetic tree) การตรวจสอบการมียีน

ควบคุมการก่อโรคนี้ เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคและความเสี่ยงในการระบาดของโรค ได้ถูกตั้งกว่าวิธีการที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไปในปัจจุบัน ซึ่งเป็นการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างโดยใช้อาหารคัดเลือก, คุณลักษณะทางสรีรวิทยา-ชีวเคมี และลักษณะทางเซรุ่มวิทยา เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันและอยู่ในกลุ่มทางเซรุ่มวิทยา (serovar) เดียวกัน ก็มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค การถ่ายโอนยีนควบคุมการก่อโรคไปยังเชื้อแบคทีเรียต่างสกุลหรือชนิด ทำให้มีโอกาสเกิดเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ใหม่และเพิ่มความเสี่ยงต่อการระบาดของโรค เมื่อตรวจพบยีนควบคุมการก่อโรคแล้ว จึงทดสอบผลของสภาวะต่างๆ ต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค ปัจจัยที่ทำการทดสอบ ได้แก่ 1) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2) ความเข้มข้นของ NaCl 3) การให้อากาศ 4) อุณหภูมิ และ 5) ระยะการเจริญของเชื้อ รวมถึงเปรียบเทียบการเจริญและคุณลักษณะอื่นๆ ของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ การเคลื่อนที่และการสังเคราะห์ biofilm ในสภาวะที่ไม่มีการแสดงออกของยีนและในสภาวะที่มีการแสดงออกของยีน

ผลการศึกษาสามารถใช้เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่จำหน่ายในท้องตลาด การที่พบยีนควบคุมการก่อโรคในเชื้อแบคทีเรียต่างสกุลหรือชนิด อาจเป็นหลักฐานการถ่ายโอนยีนระหว่างเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังทราบสภาวะแวดล้อมที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนแนวทางในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเพื่อควบคุมการระบาดของโรค

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สินค้าประมงเป็นหนึ่งในสินค้าส่งออกที่ทำรายได้หลักให้กับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2555 มีการส่งออกสินค้าประมงเป็นมูลค่า 264,766.34 ล้านบาท สินค้าประมงที่ทำรายได้สูงสุด ได้แก่ กุ้งและผลิตภัณฑ์จากกุ้ง, หนุ่ยกระป๋อง และหมึกสดแช่เย็น-แช่แข็ง (ประพันธ์ โนระดี 2556) ในบรรดาสินค้าประมง ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้นในรอบหลายสิบปีที่ผ่านมา ทั้งเพื่อการบริโภคในประเทศและการส่งออก ตัวอย่างเช่น กุ้งทะเลแช่เย็น-แช่แข็ง, หมึกทะเลแช่เย็น-แช่แข็ง, ปลาทะเลแช่เย็น-แช่แข็ง รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป แต่ก็มีปัญหาหลักที่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อน ซึ่งมีทั้งสารเคมี, โลหะหนัก, สารพิษ และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค อาหารทะเลจัดเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญของโรคอาหารเป็นพิษที่แพร่ระบาดอยู่ทั่วโลก การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอน ตั้งแต่การสัมผัสกับน้ำทะเลและวัชพืช, การจับสัตว์น้ำ, กระบวนการผลิต, การบรรจุหีบห่อ, การเก็บรักษา, การขนส่งที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม ไปจนถึงวิธีการปรุงอาหารซึ่งไม่นิยมปรุงให้สุก (Iwamoto และคณะ 2010) จากรายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในอาหารทะเลมีอยู่หลายสกุล เช่น *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคอาหารเป็นพิษ, โรคท้องร่วง, โรคคอหิวด์, โรคไทฟอยด์, โรคพาราไทฟอยด์, โรคตับอักเสบ, โรคกระเพาะอักเสบ, โรคลำไส้อักเสบ, โรคติดเชื้อในท่อน้ำดี และโรคติดเชื้อในกระแสเลือด (Coburn และคณะ 2005; Iwamoto และคณะ 2010; Kaper และคณะ 1995; Karolis และคณะ 1998; Mellies และคณะ 2001; Morabito และคณะ 2003; Nataro และ Kaper 1998) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพอนามัยในประเทศต่างๆ เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีการระบาดได้รวดเร็วและก่อโรคที่เป็นอันตรายถึงชีวิต สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อมได้ดี และเกิดการระบาดได้แม้มีการปนเปื้อนของเชื้อปริมาณน้อย เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จึงเป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารและน้ำ

ในบรรดาเชื้อแบคทีเรียแต่ละสกุล จะมีเชื้อบางชนิดและบางสายพันธุ์เท่านั้นที่เป็นเชื้อก่อโรค (Iwamoto และคณะ 2010; Parham และคณะ 2005) ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียถูกควบคุมโดยยีนควบคุมการก่อโรคซึ่งมีหลายยีนเรียงลำดับอยู่บน PAI ส่วนใหญ่ PAI มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม (Bhowmick และคณะ 2011; Chakravorty และคณะ 2002; Klein และ Jones 2001; Marcus และคณะ 2000; Morabito และคณะ 2003; Ochman และคณะ 1996; Ostblom และคณะ 2011; Parham และคณะ 2005) การที่ PAI สามารถถ่ายทอดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปยังเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งได้ ทำให้มีโอกาสเกิดเชื้อก่อโรสายพันธุ์ใหม่ (Hacker และคณะ 1997; Morabito และคณะ 2003) ยีนควบคุมการก่อโรคมียีนควบคุมกระบวนการต่างๆ เช่น 1) การสังเคราะห์ virulence factor และ adherence factor (Leavis และคณะ 2004; Morabito และคณะ 2003; Nicholls และคณะ 2000; Saroj และคณะ 2008; Shankar และคณะ 2002) 2) การสังเคราะห์และการปลดปล่อยโปรตีนและสารพิษ เช่น chaperone, hemolysin และ enterotoxin (Bhowmick และคณะ 2011; Buchrieser และคณะ 2000; Galan และ Collmer 1999; Iwen และคณะ 1997; Johnson 1991; Kaper และคณะ 1995; Klein และ Jones 2001; Leavis และคณะ 2004; Mellies และคณะ 2001; Morabito และคณะ 2003; Sarkar และคณะ 2002) 3) การสังเคราะห์สารควบคุม (Ochman และคณะ 1996) 4) การสังเคราะห์และการปลดปล่อยเอนไซม์ เช่น phosphotransferase และ

protease (Reidl และ Boos 1991; Zhang และคณะ 2003) 5) การสังเคราะห์และการปลดปล่อยโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเอนไซม์ protease (Ochman และคณะ 1996) 6) การสังเคราะห์สารประกอบจับธาตุเหล็ก เช่น aerobactin (Johnson 1991) 7) การสังเคราะห์ biofilm (Tendolkar และคณะ 2004; Toledo-Arana และคณะ 2001) 8) การเข้าเกาะและการเกิดบาดแผลที่เซลล์เนื้อเยื่อของลำไส้ (Jarvis และคณะ 1995) 9) การยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันและกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของเซลล์เจ้าบ้าน (Chakravorty และคณะ 2002; Cirillo และคณะ 1998; Klapproth และคณะ 2000; Klein และ Jones 2001) 10) การติดเชื้อในท่อปัสสาวะและกระแสเลือด (Johnson และคณะ 2002; 2005; Kurazono และคณะ 2000; Parham และคณะ 2005; Sannes และคณะ 2004) 11) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ flagellin (Ochman และคณะ 1996) 12) การปรับตัวให้ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในกระเพาะอาหาร (Gantois และคณะ 2006) 13) กระบวนการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน (Ibarra และคณะ 2010) 14) การปรับตัวให้อยู่รอดท่ามกลางจุลินทรีย์ประจำถิ่นภายในลำไส้ (Ostblom และคณะ 2011) และ 15) การกำหนดความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน (Saroj และคณะ 2008) กระบวนการต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต่อการเข้าอยู่อาศัย, การอยู่รอด, การปรับตัวและการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์เจ้าบ้าน จึงมีความสำคัญต่อการก่อโรคและการระบาดของเชื้อ

Escherichia เป็นสกุลของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นท่อน ชนิดที่มีความสำคัญต่อการก่อโรค คือ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ (Ostblom และคณะ 2011) *Esc. coli* มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค *Esc. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม หรือ pathogroup ได้แก่ 1) enterohemorrhagic *Esc. coli* (EHEC) หรืออาจเรียกว่า shiga-toxigenic *E. coli* (STEC) เนื่องจากมีการสังเคราะห์สารพิษ shiga toxin (Stx) เชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด เช่น โรคลำไส้ใหญ่อักเสบ และโรค hemolytic uremic syndrome ซึ่งเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงและไตวาย (Griffin และ Tauxe 1991; O'Brien และคณะ 1984) 2) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ซึ่งไม่สังเคราะห์ shiga toxin แต่ก่อโรคท้องร่วงในเด็ก (Nataro และ Kaper 1998) 3) enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) 4) enteroinvasive *E. coli* (EIEC) 5) enteroaggregative *E. coli* (EAEC or EAaggEc) และ 6) diffusely adherent *E. coli* (DAEC) (Costa 2013) มีรายงานการพบ *Esc. coli* ในสัตว์ทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในประเทศต่างๆ The Centers for Disease Control and Prevention ประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานการระบาดของเชื้อ *Esc. coli* ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล ระหว่างปี ค.ศ. 1973-ปี ค.ศ. 2006 (Iwamoto และคณะ 2010) การพบ *Esc. coli* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเกิดจากการปนเปื้อนน้ำสกปรก และการขาดสุขอนามัยในระหว่างกระบวนการผลิต (Huss 1993) มีรายงานการพบ *Esc. coli* สายพันธุ์ก่อโรคในอาหารทะเล ตัวอย่างเช่น พบว่า 5% ของหอยกาบ และ 3% ของปลาสดที่จำหน่ายในเมือง Mangalore ประเทศอินเดีย มีการปนเปื้อนเชื้อ STEC ที่จัดอยู่ใน serotype อื่นๆ ที่ไม่ใช่ O157 (Kumar และคณะ 2001) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ STEC ในปลาสดที่จำหน่ายในเมือง Cochin ประเทศอินเดีย (Thampuran และคณะ 2005) และพบเชื้อ *Esc. coli* ที่สังเคราะห์ enterotoxin ปนเปื้อนในกุ้ง seabob และในปลากระพงแดงที่จำหน่ายในเมือง Fortaleza ประเทศบราซิล (Teophilo และคณะ 2002) จากการตรวจสอบอาหารทะเล ได้แก่ ปลาแชลมอน, กุ้ง และ ปลานิล ที่นำเข้าจาก 12 ประเทศ

และจำหน่ายในเมือง Baton Rouge รัฐ Louisiana ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า 9.4% มีการปนเปื้อน *Esc. coli* (Wang และคณะ 2011)

Salmonella เป็นสกุลของแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นท่อน มักพบปนเปื้อนในอาหารและน้ำ เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด โรคมีหลายระดับความรุนแรง ตั้งแต่โรคที่ไม่แสดงอาการไปถึงโรคที่เป็นอันตรายถึงชีวิต ตัวอย่างของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* ได้แก่ โรคที่มีอาการเป็นไข้, ปวดท้อง และอาเจียน, โรคท้องร่วง, โรคลำไส้อักเสบ, โรคติดเชื้อในท่อน้ำปัสสาวะ, โรคติดเชื้อในกระแสเลือด, โรคไทฟอยด์ และโรคพาราไทฟอยด์ (Bhowmick และคณะ 2011; Brenner และคณะ 2000; Iwamoto และคณะ 2010; Lacey 1993) *Salmonella* ถูกจัดจำแนกได้ประมาณ 2,500 serovar (Brenner และคณะ 2000; Chakravorty และคณะ 2002) *Salmonella* แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) typhoidal (enteric) *Salmonella* ก่อโรคไทฟอยด์และโรคพาราไทฟอยด์ในมนุษย์ แต่ไม่ก่อโรคในสัตว์ 2) non-typhoidal *Salmonella* ก่อโรคท้องร่วงในสัตว์หลายชนิด ทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, สัตว์เลื้อยคลาน, นก และแมลง และ 3) *Salmonella* ที่จำเพาะต่อสัตว์บางชนิด (Bhowmick และคณะ 2011) เชื้อชนิดที่มักพบว่าเป็นปัญหาด้านสุขอนามัยในประเทศส่วนใหญ่ คือ *Salmonella enterica* (Chakravorty และคณะ 2002) ซึ่งมีอยู่มากกว่า 2,300 serovar มักพบ *Sal. enterica* หลาย serovar ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่ serovar ที่เป็นสาเหตุหลักของการก่อโรคในมนุษย์จากการบริโภคอาหารทะเล ได้แก่ serovar Enteritidis และ Typhimurium (Greig และ Ravel 2009) The Centers for Disease Control and Prevention ประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานการระบาดของเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล ระหว่างปี ค.ศ. 1973-ปี ค.ศ. 2006 (Iwamoto และคณะ 2010) มีรายงานการพบ non-typhoidal *Salmonella* ในอาหารทะเลในหลายประเทศ เช่น อินเดีย (Bhowmick และคณะ 2011; Shabarinath และคณะ 2007) และสิงคโปร์ (Huang และคณะ 2012) จากการสำรวจของ The U.S. Food and Drug Administration ที่ได้ตรวจหา *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1990-ปี ค.ศ. 1998 พบว่าเกือบ 10% ของผลิตภัณฑ์ของอาหารทะเลนำเข้า และ 2.8% ของผลิตภัณฑ์ของอาหารทะเลจากในประเทศ มีการปนเปื้อน *Salmonella* โดย serovar ที่พบบ่อยที่สุดในผลิตภัณฑ์ของอาหารทะเลนำเข้า คือ Weltevreden (Heinitz และคณะ 2000) จากการตรวจสอบอาหารทะเล ได้แก่ ปลาแซลมอน, กุ้ง และ ปลานิล ที่นำเข้าจาก 12 ประเทศ และจำหน่ายในเมือง Baton Rouge รัฐ Louisiana ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า 17.5% มีการปนเปื้อน *Salmonella* (Wang และคณะ 2011) จากการสำรวจของ The National Food Surveillance System ประเทศญี่ปุ่น พบว่า *Salmonella* ที่พบมากที่สุดในอาหารทะเลที่จำหน่ายในประเทศญี่ปุ่นระหว่างปี ค.ศ. 1998-ปี ค.ศ. 2008 เป็น serotype Infantis (Hara-Kudo และคณะ 2013)

Shigella เป็นสกุลของแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นท่อน เป็นเชื้อก่อโรคที่มีหลายระดับความรุนแรง ตั้งแต่โรคที่มีอาการท้องเดิน, ถ่ายเหลว ไปถึงโรคที่เป็นอันตรายร้ายแรง ได้แก่ โรคปวดเบ่ง, โรคท้องร่วง, โรคลำไส้อักเสบ, โรค Reiter's syndrome, โรค hemolytic uremic syndrome, โรค bacillary dysentery และโรคบิดไม่มีตัว (Faruque และคณะ 2002; Iwamoto และคณะ 2010; Speelman และคณะ 1984) โรคที่เกิดจาก *Shigella* มีการระบาดได้อย่างรวดเร็ว มักพบ *Shigella* ปนเปื้อนในอาหารและน้ำ รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารทะเล The Centers for Disease Control and Prevention ประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานการระบาดของเชื้อ *Shigella* ที่

ปนเปื้อนในอาหารทะเล ระหว่างปี ค.ศ. 1973-ปี ค.ศ. 2006 (Iwamoto และคณะ 2010) จากการตรวจสอบอาหารทะเล ได้แก่ ปลาแซลมอน, กุ้ง และ ปลานิล ที่นำเข้ามาจาก 12 ประเทศ และจำหน่ายในเมือง Baton Rouge รัฐ Louisiana ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า 32.2% มีการปนเปื้อน *Shigella* (Wang และคณะ 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับ *Shigella* ชนิดที่พบเป็นส่วนใหญ่ในผู้ป่วยในประเทศบังคลาเทศคือ *Shigella flexneri* และ *Shigella dysenteriae* (Chen และคณะ 1980) และยังพบ *Shigella* ที่มีถิ่นควบคุมการก่อโรคในแหล่งน้ำของประเทศบังคลาเทศ ถึงแม้ *Shigella* จำเป็นต้องอาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์และลิง แต่ก็พบว่า *Shigella* สามารถมีชีวิตรอดในแหล่งน้ำที่ไม่มีมนุษย์และลิงได้เช่นกัน (Faruque และคณะ 2002)

Vibrio เป็นสกุลของแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Vibrionaceae มีรูปร่างคล้ายเครื่องหมายจุลภาค (comma) เป็น halophilic bacteria เจริญได้ดีและแพร่ระบาดในแหล่งน้ำเค็ม มักอาศัยอยู่กับแพลงตอนและสัตว์น้ำ ในบรรดา *Vibrio* ที่มีอยู่ประมาณ 30 ชนิด มีอย่างน้อย 14 ชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์ และมักมีสาเหตุจากการบริโภคอาหารทะเล *Vibrio* ก่อโรคชนิดที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* (Iwamoto และคณะ 2010; Mukhopadhyay และคณะ 2001) *V. cholerae* ก่อโรคหิวาต์ที่ระบาดอย่างรวดเร็วและเป็นอันตรายถึงชีวิต ตามรายงานของ World Health Organization (WHO) มีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคหิวาต์จากทั่วโลก ปีละประมาณ 120,000 ราย (WHO 2001) มีการจัดจำแนก *V. cholerae* ตามลักษณะทางเซรุ่มวิทยาของ O-antigen ได้ประมาณ 200 serogroup ส่วนใหญ่ไม่ก่อโรคในมนุษย์ *V. cholerae* serogroup O1 และ O139 เป็น 2 กลุ่มหลักที่ก่อโรคหิวาต์ และสังเคราะห์สารพิษ cholera toxin แต่ก็มี serogroup อื่นนอกเหนือจาก O1 และ O139 ที่ก่อโรคหิวาต์ด้วยเช่นกัน ในขณะที่ *V. cholerae* บาง serogroup และ *V. parahaemolyticus* ก่อโรคท้องร่วง (Garcia และคณะ 2009; Morris 1990) สำหรับ *V. vulnificus* ก่อโรคติดเชื้อที่บาดแผลและในกระแสเลือด (Oliver 2005) The Centers for Disease Control and Prevention ประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานการระบาดของเชื้อ *Vibrio* ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล ระหว่างปี ค.ศ. 1973-ปี ค.ศ. 2006 (Iwamoto และคณะ 2010) จากการตรวจสอบอาหารทะเล ได้แก่ ปลาแซลมอน, กุ้ง และ ปลานิล ที่นำเข้ามาจาก 12 ประเทศ และจำหน่ายในเมือง Baton Rouge รัฐ Louisiana ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า กุ้งมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* (Wang และคณะ 2011)

ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อเอนเทอร์โรแบคทีเรีย (enterobacteria) ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ สามารถใช้เทคนิค ERIC-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ERIC sequence เป็นหนึ่งใน intergenic repeated sequence ที่พบในเชื้อ enterobacteria นอกเหนือจาก repetitive extragenic palindromic (REP) sequence สำหรับ ERIC sequence นั้น เริ่มแรกพบใน *Esc. coli* และ *Sal. enterica* serovar Typhimurium (ชื่อเต็ม *Salmonella typhimurium*) (Gilson และคณะ 1984; Hulton และคณะ 1991; Sharples และ Lloyd 1990; Stern และคณะ 1984) ต่อมาพบในเชื้อแบคทีเรียสกุลอื่นๆ เช่น *Vibrio* สำหรับ ERIC sequence นั้น มีขนาด 127 เบส (base pairs; bp) มีลักษณะเป็น imperfect palindromic sequence พบกระจายอยู่ตลอดจีโนม (genome) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ERIC sequence ในเชื้อต่างชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่มีจำนวนและการกระจายของ ERIC sequence แตกต่างกัน หน้าที่ของ ERIC sequence ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับการรักษาความเสถียรของ mRNA หรือเกี่ยว

ข้องในกระบวนการ homologous recombination, การจัดโครงสร้างของโครโมโซม, การจับกับ HU protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับกับดีเอ็นเอ (DNA binding protein), เอนไซม์ DNA gyrase และ DNA polymerase I (Rashid และคณะ 2009) เทคนิค ERIC-PCR เป็นการนำหลักการของ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของยีนซึ่งอยู่ระหว่าง ERIC sequence โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่เข้าจับบริเวณ ERIC sequence PCR product ที่ได้จากเชื้อต่างสายพันธุ์จะมีจำนวนชิ้นและขนาดที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 1 ถึง 15 ชิ้น ขนาดประมาณ 100 bp ถึง 5.0 กิโลเบส (kilobases; kb) เทคนิค ERIC-PCR เป็นเทคนิคที่ง่าย, รวดเร็ว และมีความละเอียดสูง สายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค ERIC-PCR สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียได้ถึงระดับสายพันธุ์ และใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรแบคทีเรีย เนื่องจากพบได้ในเชื้อแบคทีเรียหลายกลุ่มที่มีความแตกต่างกันทางอนุกรมวิธาน ในบางกรณีพบความสัมพันธ์ระหว่าง dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ ERIC-PCR กับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย (Pongsilp 2012)

ยีนควบคุมการก่อโรคน PAI ของ *Esc. coli* มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ เช่น 1) การเข้าเกาะของเชื้อที่บริเวณเนื้อเยื่อลำไส้ (Nataro และ Kaper 1998) 2) การสังเคราะห์สารพิษ เช่น hemolysin และ enterotoxin (Griffin และ Tauxe 1991; Johnson 1991; Mellies และคณะ 2001; O'Brien และคณะ 1984) 3) การสังเคราะห์เอนไซม์ phosphotransferase (Reidl และ Boos 1991) 4) การสังเคราะห์สารประกอบจับธาตุเหล็ก เช่น aerobactin (Johnson 1991; Parham และคณะ 2005) 5) การปลดปล่อยโปรตีน เช่น serine protease autotransporter (Parham และคณะ 2004; 2005) 6) การปลดปล่อย effector molecule (Jacob-Dubuisson และคณะ 2001) 7) การย่อยสลาย fucose และ pectin (Parham และคณะ 2005) 8) การยับยั้งกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของเซลล์เจ้าบ้าน (Klapproth และคณะ 2000) และ 9) การปรับตัวของ *Esc. coli* ท่ามกลางจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของเด็กอ่อน (Ostblom และคณะ 2011) ตัวอย่างยีนควบคุมการก่อโรคที่พบได้ทั่วไปใน *Esc. coli* เช่น ยีน *efa1* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ adherence factor Efa1 (Nicholls และคณะ 2000), ยีน *lifA* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเป็น 58% กับสารพิษ entero-toxin ShET2 ที่สังเคราะห์โดย *Shi. flexneri* (Buchrieser และคณะ 2000), ยีน *efa1* และ *lifA* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บน PAI O122 โดยพบว่า PAI O122 มีอยู่ในทุกสายพันธุ์ของ *Esc. coli* กลุ่ม EHEC serogroup O157 ในขณะที่ 87.5% ของ *Esc. coli* กลุ่ม EHEC serogroup อื่น นอกเหนือจาก O157 และ 89.7% ของ *Esc. coli* กลุ่ม EPEC มี PAI O122 (Morabito และคณะ 2003), ยีน *malX* ซึ่งควบคุมระบบของเอนไซม์ phosphotransferase (Reidl และ Boos 1991) และมักพบยีน *malX* ใน *Esc. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อในลำไส้ (Johnson และคณะ 2002; 2005), ยีน *usp* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่อาจมีหน้าที่คล้าย bacteriocin (Parret และ de Mot 2002) และมักพบยีนนี้ใน *Esc. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อในท่อปัสสาวะ (Kurazono และคณะ 2000) จากการตรวจสอบการมียีน *malX* และ *usp* ของ *Esc. coli* ที่อยู่ในลำไส้ของเด็กอ่อนชาวสวีเดนที่มีสุขภาพดีและอายุต่ำกว่า 1 ปี พบว่า 44% และ 45% ของเชื้อมียีน *malX* และ *usp* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายีนทั้งสองเกี่ยวข้องกับการปรับตัวของ *Esc. coli* เมื่ออยู่ท่ามกลางจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของเด็กอ่อน (Ostblom และคณะ 2011) สำหรับยีน *espC* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ enterotoxin พบว่ามีใน *Esc. coli* กลุ่ม EPEC บางสายพันธุ์ (Mellies และคณะ 2001) Parham และคณะ (2005) ตรวจสอบ % การมียีนควบคุมการก่อโรค 5 ยีน ใน *Esc. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคต่อมลูกหมากอักเสบ, โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ และโรคกรวยไตอักเสบ ยีนที่ตรวจสอบ ได้แก่

ยีน *fbp* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนจับธาตุเหล็ก, ยีน *efu* ซึ่งควบคุมกระบวนการย่อยสลาย fucose และ pectin, ยีน *etp* ซึ่งควบคุมการปลดปล่อย effector molecule, ยีน *picU* ซึ่งควบคุมการปลดปล่อยโปรตีน serine protease autotransporter และยีน *tos* ซึ่งควบคุมการหลั่งโปรตีน พบว่า % การพบยีนแต่ละยีนใน *Esc. coli* ที่ก่อโรคทั้งสามชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมี % การพบยีนใน *Esc. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคต่อมลูกหมากอักเสบ, โรคระเพาะปัสสาวะอักเสบและโรครวยไตอักเสบ ตามลำดับ ได้แก่ ยีน *fbp* เป็น 82.8%, 57.9% และ 59.3%, ยีน *efu* เป็น 89.7%, 55.3% และ 48.1%, ยีน *etp* เป็น 72.4%, 52.6% และ 48.1%, ยีน *picU* เป็น 44.8%, 34.2% และ 40.7% และยีน *tos* เป็น 22.2%, 34.2% และ 48.3%

ยีนควบคุมการก่อโรคน PAI ของ *Salmonella* มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ เช่น 1) การสังเคราะห์โปรตีน เช่น chaperone (Bhowmick และคณะ 2011; Klein และ Jones 2001; Ochman และคณะ 1996) 2) การสังเคราะห์ effector molecule ที่ใช้ในกระบวนการที่เชื้อเข้าอยู่อาศัยภายในเซลล์เจ้าบ้าน (Bhowmick และคณะ 2011; Galan และ Collmer 1999; Klein และ Jones 2001) 3) การสังเคราะห์สารควบคุม (Gerlach และคณะ 2007; Ochman และคณะ 1996) 4) การปลดปล่อย adhesin (Gerlach และคณะ 2007) 5) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ flagellin (Ochman และคณะ 1996) 6) การยับยั้งกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในการทำลายเซลล์แบคทีเรีย (Cirillo และคณะ 1998) 7) การเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียภายในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Bhowmick และคณะ 2011; Chakravorty และคณะ 2002; Klein และ Jones 2001; Ochman และคณะ 1996) และ 8) การปรับตัวของ *Salmonella* ให้เข้ากับสภาวะภายในเซลล์เจ้าบ้าน (Ibarra และคณะ 2010) มีรายงานถึงความจำเพาะของ *Salmonella* pathogenic island (SPI) กับ serovar ของ *Samonella* พบว่า SPI-8 มีในทุกไอโซเลท (isolate) ของ *Salmonella* serovar Enteritidis, Paratyphi A, Typhi และ Washington แต่ไม่พบใน serovar Dublin, Paratyphi B, Paratyphi C และ Worthington ในขณะที่ SPI-10 พบใน serovar Dublin, Enteritidis, Gallinarum, Paratyphi และ Typhi (Saroj และคณะ 2008) ตัวอย่างยีนควบคุมการก่อโรคที่พบได้ทั่วไปใน *Salmonella* เช่น ยีนบางยีนบน SPI-2 ได้แก่ ยีน *sseD*, *sseE*, *sseF* และ *sseG* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ effector molecule, ยีน *sscA* และ *sscB* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน chaperone รวมทั้งยีน *ssaB*, *ssaD*, *ssaO*, *ssaP*, *ssaQ*, *ssaR*, *ssaS*, *ssaT* และ *ssaU* พบใน *Sal. enterica* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 57 ไอโซเลทใน 8 serovar ได้แก่ serovar Aba, Anatum, Bareilly, Infantis, Newport, Oslo, Paratyphi C และ Weltevreden (Bhowmick และคณะ 2011)

ยีนควบคุมการก่อโรคน PAI ของ *Shigella* มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ เช่น 1) การสังเคราะห์สารพิษ shiga toxin (Faruque และคณะ 2002) และ 2) การกำหนดลักษณะ antigen (Faruque และคณะ 2002) ตัวอย่างยีนควบคุมการก่อโรคที่จำเพาะต่อ *Shigella* เช่น ยีน *ipaBCD* ซึ่งควบคุมลักษณะ antigen และมีผลต่อการเข้าอยู่อาศัยของ *Shigella* ในเซลล์เยื่อบุทางเดินปัสสาวะ, ยีน *stx1* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ shiga toxin และยีน *ipaH* ซึ่งมีบทบาทต่อการระบาดของเชื้อ ในการตรวจสอบยีนเหล่านี้ใน *Shi. dysenteriae* และ *Shi. flexneri* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคบิดไม่มีตัวและจากแหล่งน้ำในเมือง Dhaka ประเทศบังคลาเทศ พบว่า *Shi. dysenteriae* และ *Shi. flexneri* ทุกสายพันธุ์ทั้งจากผู้ป่วยและจากแหล่งน้ำ มียีน *ipaH* ในขณะที่ยีน *ipaBCD* มีใน *Shi. dysenteriae* และ *Shi. flexneri*

ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย แต่ไม่พบใน *Shi. dysenteriae* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งน้ำ และพบใน *Shi. flexneri* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำเพียง 1 สายพันธุ์ ยีน *stx1* มีใน *Shi. dysenteriae* บางสายพันธุ์ แต่ไม่พบใน *Shi. flexneri* ข้อมูลนี้แสดงถึงการสูญเสียยีนควบคุมการก่อโรค *ipaBCD* ซึ่งอยู่บนพลาสมิดไปเมื่อ *Shigella* อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ในแหล่งน้ำ ในขณะที่ยีน *ipaH* ที่อยู่บนโครโมโซมมีความเสถียรมากกว่า (Faruque และคณะ 2002)

ยีนควบคุมการก่อโรคนบน PAI ของ *Vibrio* มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ เช่น 1) การสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ เช่น transmembrane protein, virulence protein regulatory protein, metalloprotease, aldehyde dehydrogenase และ lipoprotein (Harkey และคณะ 1995; Mukhopadhyay และคณะ 2001; Nandi และคณะ 2000; Parsot และ Mekalanos 1991; Zhang และคณะ 2003) 2) การสังเคราะห์สารพิษ cholera toxin (CT) (Kaper และคณะ 1995; Sarkar และคณะ 2002; Yu และ DiRita 1999) และ 3) การสังเคราะห์ pilin (Mukhopadhyay และคณะ 2001; Nandi และคณะ 2000) ตัวอย่างยีนควบคุมการก่อโรคที่พบได้ทั่วไปใน *Vibrio* เช่น ยีน *aldA*, *tagA*, *tcpP/H*, *toxT*, *acfb/C* และ *int* ที่อยู่บน *Vibrio* pathogenicity island (VPI) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเหล่านี้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเหล่านี้ใน *V. cholerae* สายพันธุ์ 10259 ใน serogroup O53 แตกต่างจากยีนของ *V. cholerae* ใน serogroup O1 เพียง 0.4%-4.8% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสังเคราะห์ cholera toxin ใน *V. cholerae* สายพันธุ์ 10259 แทบจะเหมือนกัน 100% กับยีนของ *V. cholerae* ใน serogroup O1 ในขณะที่ยีน *tcpA* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ pilin ใน *V. cholerae* สายพันธุ์ 10259 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับยีนของ *V. cholerae* ใน serogroup O1 (Sarkar และคณะ 2002) ประมาณ 98% ของ *V. cholerae* มียีน *toxR* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ transmembrane protein (Nandi และคณะ 2000) ส่วนยีน *tcpF* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ virulence protein และ *toxT* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ AraC-type regulatory protein มีใน *V. cholerae* serogroup O8, O10, O11, O27, O35, O42, O44 และ O69 สำหรับ *V. cholerae* ต่างไอโซเลทใน serogroup เหล่านี้ มีความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน TcpF อยู่ระหว่าง 31%-79% *V. cholerae* บางไอโซเลทมียีน *tcpA* หรือ/และ *ctx* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ cholera toxin (Mukhopadhyay และคณะ 2001) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการพบยีน *tcpA* และ *ctx* ใน *Vibrio* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคด้วยเช่นกัน (Chakraborty และคณะ 2000; Nair และคณะ 1988; Nandi และคณะ 2000; Novias และคณะ 1999) ยีน *aldA* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ aldehyde dehydrogenase และยีน *tagA* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ lipoprotein เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการระบาดของ *V. cholerae* ที่สังเคราะห์ cholera toxin พบยีนทั้งสองใน *V. cholerae* serogroup O1 24 สายพันธุ์จาก 29 สายพันธุ์ (Karaolis และคณะ 1998) แต่ไม่พบใน *V. cholerae* serogroup O1 ที่ไม่สังเคราะห์ cholera toxin (Karaolis และคณะ 1994) และไม่พบใน *Vibrio mimicus* นอกจากนี้ยังพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *aldA* มีความเหมือนกันในเชื้อทุกสายพันธุ์ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tagA* แตกต่างกันในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ยีน *aldA* เป็นยีนเครื่องหมายแสดงถึงความสามารถในการก่อโรคของ *V. cholerae* (Karaolis และคณะ 1998)

มีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค เช่น การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารจำกัด (minimal medium), การจำกัดปริมาณของอนุภาคประจุ +2 (divalent cation) และการเจริญที่สภาวะขาดแคลนสารอาหารภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลาหลายชั่วโมง กระตุ้นการแสดงออกของยีนบน SPI-2 ของ *Sal. enterica* (Beuzon และคณะ 1999; Cirillo และคณะ 1998; Deiwick และคณะ 1999) การเจริญใน minimal medium, pH 5.0 ที่มีปริมาณ magnesium จำกัด เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กระตุ้นการแสดงออกของยีน *sseC* และ *sseD* บน SPI-2 ของ *Sal. enterica* serovar Typhimurium แต่การเจริญในอาหาร Lennox ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนทั้งสอง (Klein และ Jones 2001) สภาวะที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic condition) กระตุ้นการแสดงออกของยีนบน SPI-1 ของ *Salmonella* (Bajaj และคณะ 1996; Behlau และ Miller 1993; Boddicker และคณะ 2003; Jones และ Falkow 1994; Lee และ Falkow 1990; Lucas และ Lee 2001; Schiemann และ Shope 1991; Temme และคณะ 2008) การเจริญในอาหาร Luria-Bertani (LB) ถึงระยะ late exponential phase และการเจริญในอาหาร LB-Miller (อาหาร LB ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 10 กรัม/ลิตร) กระตุ้นการแสดงออกของยีนบน SPI-1 ของ *Salmonella* (Ibarra และคณะ 2010; Lee และ Falkow 1990; Song และคณะ 2004) การเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศจนถึงการเจริญระยะ late exponential phase (aer-LL) และการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ให้อากาศจนถึงการเจริญระยะ stationary phase (μ aer-ST) ต่างก็กระตุ้นยีนบน SPI-1 แต่กระตุ้นยีนต่างกลุ่มกัน โดยสภาวะ aer-LL กระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง flagella และการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า (chemotaxis) ในขณะที่สภาวะ μ aer-ST กระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง fimbriae และการตอบสนองต่อสภาวะกดดัน (stress response) สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อความสามารถของเชื้อในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะภายในเซลล์เจ้าบ้าน เชื้อที่เลี้ยงในสภาวะ aer-LL มีการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายได้มากกว่า (Ibarra และคณะ 2010) butyrate ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (millimolar; mM) ลดการแสดงออกของยีน 19 ยีนบน SPI-1 ของ *Sal. enterica* serovar Enteritidis และ Typhimurium รวมถึงยีนควบคุม (regulatory gene) *hilD* และ *invF* โดยลดการแสดงออกของยีนเหล่านี้ได้ถึง 2 เท่าหรือมากกว่า (Gantois และคณะ 2006) สอดคล้องกับรายงานของ van Immerseel และคณะ (2004) ว่า butyrate มีบทบาทต่อกระบวนการปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *Sal. enterica* กับเซลล์เยื่อบุลำไส้ และลดความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อ ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการแสดงออกของยีนบน SPI-1 โดย glucose และ mannose ที่ความเข้มข้น 0.2% น้ำหนัก/ปริมาตร (weight/volume; w/v) เพิ่มการแสดงออกของยีน *hilE* ถึง 2 เท่า แต่ลดการแสดงออกของยีน *hilD* ส่วน arabinose ก็เพิ่มการแสดงออกของยีน *hilE* ด้วยเช่นกัน แต่ในระดับที่น้อยกว่า glucose และ mannose ในขณะที่ glycerol แทบไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *hilD* และ *hilE* (Lim และคณะ 2007) การเจริญในอาหาร LB ถึงระยะ late exponential phase และการเจริญใน minimal medium PCN, pH 7.4 ที่มีสารอินทรีย์ฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 25 mM กระตุ้นการแสดงออกของยีนบน SPI-4 ซึ่งประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเชื้อ และยีนในระบบการปลดปล่อยโปรตีน (secretion system) รวมถึงโปรตีน SiiE ที่มีบทบาทต่อการเข้าเกาะของ *Sal. enterica* serovar Typhimurium กับเซลล์เยื่อบุทางเดินปัสสาวะ (Gerlach และคณะ 2007) การเจริญในอาหาร LB, pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 30°C และการเขย่าที่ความเร็วรอบต่ำ กระตุ้นการแสดงออกของยีน *tcpP/H*, *toxR*, *toxT* และ *tcpA* ของ *V. cholerae* แต่ไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *ctxA* และพบการแสดงออกของยีน *toxT*, *ctxA* และ *tcpA* เมื่อเชื้อเจริญในอาหาร LB

ถึงระยะ early exponential phase (6 ชั่วโมง) แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนเหล่านี้เมื่อเชื้อเจริญถึงระยะ late exponential phase (16 ชั่วโมง) (Sarkar และคณะ 2002)

จากโครงการวิจัยนี้ คาดว่าจะสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สกุลได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลสามารถระบุสกุล และ/หรือชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ โดยอาศัยทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และการตรวจสอบเครื่องหมายทางพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับสกุล และ/หรือชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแต่ละประเภทจากตลาดกลางแหล่งใหญ่ของประเทศ สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ โดยการใช้การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค ERIC-PCR และสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียต่างสกุลเพื่อตรวจสอบการมีอินควบคุมการก่อโรคและการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค ในการตรวจสอบการมีอินควบคุมการก่อโรค 22 ยีนนั้น เป็นยีนที่มีรายงานว่าจำเพาะต่อสกุลหรือชนิดหรือ serovar ของเชื้อ ในโครงการนี้จะตรวจสอบการมีอินควบคุมการก่อโรคทั้ง 22 ยีนในเชื้อแบคทีเรียสกุลต่างๆ สำหรับยีนควบคุมการก่อโรคที่เคยมีรายงานว่าพบเฉพาะในเชื้อแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง ถ้าพบยีนนั้นในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ย่อมเป็นหลักฐานแสดงถึงการถ่ายโอนยีนในสภาวะแวดล้อม และเพิ่มความเสี่ยงต่อการระบาดของโรค การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการก่อโรค ทำให้สามารถสร้าง phylogenetic tree เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละยีนที่อาจพบในเชื้อต่างสกุลหรือชนิด หรือการกลายพันธุ์ของยีน ซึ่งอาจเป็นผลจากการปรับตัวให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อม การตรวจสอบการมีอินควบคุมการก่อโรคนี้ จะเป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค และความเสี่ยงในการระบาดของโรคได้ถูกต้องกว่าวิธีการที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไปในปัจจุบัน นอกจากนี้ ยังมีสมมติฐานเกี่ยวกับสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค ในโครงการวิจัยนี้ จะศึกษาผลของสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคของเชื้อตัวแทนจากแต่ละสกุล ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเข้มข้นของ NaCl, การให้อากาศ, อุณหภูมิ และระยะการเจริญของเชื้อ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะแสดงถึงความสามารถในการก่อโรคของเชื้อที่สภาวะต่างๆ เช่น สภาวะขาดแคลนสารอาหาร และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นสภาวะภายในกระเพาะอาหาร ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลให้มีความปลอดภัย เมื่อทราบปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน จะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีมีการแสดงออกของยีนและในสภาวะที่มีการแสดงออกของยีน เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ, การเคลื่อนที่ และการสังเคราะห์ biofilm ซึ่งจะทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคกับความสามารถในการปรับตัว, การอยู่รอด และลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล

เก็บตัวอย่างอาหารทะเลสดจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเล 3 แห่ง ได้แก่ 1) ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร 2) ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และ 3) ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง รวม 35 ตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างในกล่องปลอดเชื้อ แช่น้ำแข็ง ล้างตัวอย่างอาหารด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ใช้ใบมีดปลอดเชื้อตัดส่วนชิ้นเนื้อ 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag ที่ปลอดเชื้อ เติม peptone water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีตัวอย่างอาหารให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง stomacher [Seward stomacher 400 circulator (UK)] ที่ 200 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 นาที ทำ serial dilution โดยใช้ peptone water จากนั้น spread plate บนอาหารคัดเลือก Eosin Methylene Blue (EMB) agar (HiMedia Laboratories), Salmonella-Shigella (SS) agar (Pronadisa) และ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar (HiMedia Laboratories) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน แยกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารคัดเลือก โดยคัดเลือกโคโลนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร สีม่วงดำ เป็นมันวาว (metallic sheen) ซึ่งเป็นลักษณะของ *Esc. coli* จากอาหารคัดเลือก EMB agar, โคโลนีไม่มีสี โปร่งแสง ซึ่งเป็นลักษณะของ *Shigella* และ *Salmonella* บางชนิดบนอาหารคัดเลือก SS agar, โคโลนีไม่มีสี โปร่งแสง มีจุดสีดำกลางโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะของ *Salmonella* บางชนิดบนอาหารคัดเลือก SS agar, โคโลนีสีเหลือง, สีเขียว และ สีเขียว-น้ำเงิน ซึ่งเป็นลักษณะของ *Vibrio* บนอาหารคัดเลือก TCBS agar คำนวณหาจำนวนเชื้อในตัวอย่างอาหารทะเล [หน่วยเป็น colony forming unit (CFU)/กรัม] เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในอาหาร LB เพื่อเตรียมเป็น stock culture เก็บเชื้อใน LB slant ที่อุณหภูมิ 4°C และเก็บเชื้อใน 20% glycerol แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ERIC-PCR

เลี้ยงเชื้อในอาหาร LB ให้เจริญถึงระยะ mid-exponential phase นำสารแขวนลอยเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาเหวี่ยงปั่นเก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นสกัด total genomic DNA โดยใช้ Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) นำ total genomic DNA ที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ERIC-PCR โดยใช้ primer ERIC2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3') และ ERIC1R (5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TAC C 3') ตามวิธีการที่บรรยายโดย Ogutcu และคณะ (2009); Versalovic และคณะ (1991) เปรียบเทียบกับ negative control ที่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) ตรวจสอบ PCR product ใน 1% agarose gel electrophoresis คัดเลือกเชื้อที่มีรูปแบบ ERIC-PCR แตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์ 40 สายพันธุ์ เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

นำ total genomic DNA ของเชื้อที่แยกได้ 40 สายพันธุ์ มาทำการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA โดยใช้ primer Un16S 926f (5' AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG 3') และ Un16S 1392r (5' ACG GGC GGT GTG TRC 3') (Y = C/T; K = G/T; R = A/G) (Lane 1991) โดยเทคนิค PCR ตามวิธีการที่บรรยายโดย Pongsilp และคณะ (2002) เปรียบเทียบกับ negative control ที่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product ใน 1% agarose gel electrophoresis ทำการแยก PCR product ออกจาก agarose gel โดยใช้ QIA Quick gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย BioBasic Inc. (Markham, Canada) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) โดยใช้โปรแกรม blastn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

4. การระบุสกุล, ชนิด หรือ serovar ของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม

ตรวจสอบการมียีนที่จำเพาะต่อสกุล, ชนิด หรือ serovar ของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR ได้แก่ 1) ยีน *phoA* ซึ่งจำเพาะต่อ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Shigella* (Hu และคณะ 2011) 2) ยีน *fimC* ซึ่งจำเพาะต่อ *Salmonella* (Drahovska และคณะ 2001) และ 3) Sdf I fragment ซึ่งจำเพาะต่อ *Sal. enterica* serovar Enteritidis (Agron และคณะ 2001) ข้อมูลยีนที่ใช้ในการระบุสกุล, ชนิด หรือ serovar ของเชื้อแบคทีเรีย, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer, สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (PCR cycling condition) และขนาดของ PCR product แสดงในตารางที่ 1 สำหรับการระบุชนิดของ *Vibrio* ใช้เทคนิค multiplex PCR ตามวิธีการของ Panicker และคณะ (2004) ดังแสดงในตารางที่ 2 ตรวจสอบ PCR product ใน 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ negative control ที่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ

5. การตรวจสอบยีนควบคุมการก่อโรคในเชื้อแบคทีเรีย

ตรวจสอบยีนควบคุมการก่อโรค 22 ยีนในเชื้อ 40 สายพันธุ์ ยีนที่ตรวจสอบ, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ดังแสดงในตารางที่ 3 ตรวจสอบ PCR product ใน 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ negative control ที่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการก่อโรคและการสร้าง phylogenetic tree

แยก PCR product ของยีนควบคุมการก่อโรคออกจาก agarose gel โดยใช้ QIA Quick gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย BioBasic Inc. (Markham, Canada) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และสร้าง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตามที่บรรยายโดย Pongsilp และคณะ (2010)

ตารางที่ 1. ยีนที่ใช้ในการระบุสกุล, ชนิด หรือ serovar ของเชื้อแบคทีเรีย, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer, สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และขนาดของ PCR product

สกุล, ชนิด หรือ serovar ของเชื้อแบคทีเรีย	ยีนที่จำเพาะ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	ขนาดของ PCR product	เอกสารอ้างอิง
<i>Citrobacter, Esc. coli</i> และ <i>Shigella</i>	<i>phoA</i>	phoA P1 (5' CGA TTC TGG AAA TGG CAA AAG 3') phoA P2 (5' CGT GAT CAG CCG TGA CTA TGA C 3')	94°C 5 min 94°C 45 sec } 58°C 40 sec } 30X 72°C 45 sec } 72°C 10 min	720 bp	Hu และคณะ (2011)
<i>Salmonella</i>	<i>fimC</i>	S212 (5' AAA CGT TTA TCG TTA CGC CG 3') S500 (5' ATC TTG AGA TGG TTG CCG AC 3')	94°C 1 min 90°C 30 sec } 58°C 30 sec } 35X 72°C 1 min } 72°C 8 min	289 bp	Drahovska และคณะ (2001)
<i>Sal. enterica</i> serovar Enteritidis	Sdf I fragment	Sdf I F (5' TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG) Sdf I R (5' CGT TCT TCT GGT ACT TAC GAT GAC 3')	94°C 1 min 94°C 30 sec } 58°C 30 sec } 27X 72°C 1 min } 72°C 7 min	293 bp	Agron และคณะ (2001)

ตารางที่ 2. เทคนิค multiplex PCR ที่ใช้ในการระบุชนิดของ *Vibrio* (Panicker และคณะ 2004)

ชนิดของ <i>Vibrio</i>	ยีนที่ตรวจพบ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR
<i>V. cholerae</i>	<i>ompU</i>	F-OMPU (5' ACG CTG ACG GAA TCA ACC AAA G 3') R-OMPU (5' GCG GAA GTT TGG CTT GAA GTA G 3')	869 bp	94°C 3 min 94°C 1 min 60°C 1 min } 30X 72°C 1 min 72°C 5 min
	<i>tcpI</i>	F-TCPI (5' TAG CCT TAG TTC TCA GCA GGC A 3') R-TCPI (5' GGC AAT AGT GTC GAG CTC GTT A 3')	862 bp	
	<i>toxR</i>	F-TOXR (5' CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C 3') R-TOXR (5' AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G 3')	779 bp	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	F-TRH (5' TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT 3') R-TRH (5' CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G 3')	500 bp	94°C 3 min 94°C 1 min 55°C 1 min } 30X 72°C 1 min 72°C 5 min
	<i>tth</i>	F-TLH (5' AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG 3') R-TLH (5' GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC 3')	450 bp	
	ORF8	F-O3MM824 (5' AGG ACG CAG TTA CGC TTG ATG 3') R-O3MM1192 (5' CTA ACG CAT TGT CCC TTT GTA G 3')	369 bp	
	<i>tdh</i>	F-TDH (5' GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC 3') R-TDH (5' TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC 3')	269 bp	
<i>V. vulnificus</i>	<i>viuB</i>	F-VIUB1728 (5' GGT TGG GCA CTA AAG GCA GAT ATA 3') R-VIUB2231 (5' CGG CAG TGG ACT AAT ACG CAG C 3')	504 bp	94°C 3 min 94°C 1 min 65°C 1 min } 30X 72°C 1 min 72°C 5 min
	<i>vvh</i>	F-VVH (5' TTC CAA CTT CAA ACC GAA CTA TGA C 3') R-VVH (5' ATT CCA GTC GAT GCG AAT ACG TTG 3')	205 bp	

ตารางที่ 3. ยีนควบคุมการก่อโรคที่มีรายงาน พบในเชื้อแบคทีเรีย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ยีนควบคุมการก่อโรคที่มีรายงาน พบในเชื้อแบคทีเรีย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	เอกสารอ้างอิง
<i>Esc. coli</i>				
<i>cest/eae</i>	fp: (5' GTT TGC AGA GAA TGG TGG CCC 3') bp: (5' TAG CTT ATG CTT GTG CCG GGT 3')	333 bp	94°C 4 min 94°C 1 min 56°C 1 min 72°C 1 min 72°C 5 min } 30X	Sandner และคณะ (2001)
<i>cnf1</i>	fp: (5' AAG ATG GAG TTT CCT ATG CAA GGA G 3') bp: (5' CAT TCA GAT CCT GCC CTC ATT ATT 3')	498 bp	94°C 4 min 94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 1 min 72°C 7 min } 30X	Yamamoto และคณะ (1995)
<i>cnf2</i>	fp: (5' GTG AGG CTC AAC GAG ATT ATG CAC TG 3') bp: (5' CCA CGC TTC TTC TTC AGT TGT TCC TC 3')	839 bp	95°C 5 min 95°C 30 sec	Pass และคณะ (2000)
<i>eaeA</i>	fp: (5' TGA GCG GCT GGC ATG AGT CAT AC 3') bp: (5' TCG ATC CCC ATC GTC ACC AGA GG 3')	241 bp	63°C 30 sec 72°C 30 sec 72°C 5 min } 20X	
<i>espB</i>	fp: (5' GCC GCT CTG ATT GGT GGT GCT 3') bp: (5' TGG CGT TGA ACC GGA AAT CCT 3')	387 bp	เหมือน <i>cest/eae</i>	Sandner และคณะ (2001)
<i>LTI</i>	fp: (5' TGG ATT CAT CAT GCA CCA CAA GG 3') bp: (5' CCA TTT CTC TTT TGC CTG CCA TC 3')	360 bp	เหมือน <i>cnf2</i>	Pass และคณะ (2000)
<i>STII</i>	fp: (5' CCC CCT CTC TTT TGC ACT TCT TTC C 3') bp: (5' TGC TCC AGC AGT ACC ATC TCT AAC CC 3')	423 bp		
<i>vt1</i>	fp: (5' ACG TTA CAG CGT GTT GCR GGG ATC 3') bp: (5' TTG CCA CAG ACT GCG TCA GTR AGG 3')	121 bp		
<i>vt2e</i>	fp: (5' CCA GAA TGT CAG ATA ACT GGC GAC 3') bp: (5' GCT GAG CAC TTT GTA ACA ATG GCT G 3')	322 bp		

ตารางที่ 3. (ต่อ)

ยีนควบคุมการก่อโรคที่มีรายงานพบในเชื้อแบคทีเรีย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	เอกสารอ้างอิง
<i>Salmonella</i>				
<i>ssaO</i>	fp: (5' ATG GAA ACT TTG CTG GAG A 3') bp: (5' TCA ACT TTG GTA ATA CGC AT 3')	378 bp	95°C 5 min 95°C 30 sec } 63°C 30 sec } 30X 72°C 30 sec } 72°C 5 min	Bhowmick และคณะ (2011)
<i>sscB</i>	fp: (5' ATG ATG ATG AAA GAA GAT CA 3') bp: (5' TAA AGC AAT AAG AGT ATC AA 3')	435 bp	95°C 5 min 95°C 30 sec } 55°C 30 sec } 30X 72°C 30 sec } 72°C 5 min	
<i>sseG</i>	fp: (5' ATG AAA CCT GTT AGC CCA AA 3') bp: (5' TTA CTC CGG CGC ACG TTG TT 3')	690 bp	95°C 5 min 95°C 1 min } 60°C 30 sec } 30X 72°C 1 min } 72°C 5 min	
<i>Vibrio</i>				
<i>tdh</i>	fp: (5' GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC 3') bp: (5' TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC 3')	269 bp	94°C 3 min 94°C 1 min } 55°C 1 min } 30X 72°C 1 min } 72°C 5 min	Panicker และคณะ (2004)
<i>tlh</i>	fp: (5' AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG 3') bp: (5' GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC 3')	450 bp		
<i>trh</i>	fp: (5' TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT 3') bp: (5' CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G 3')	500 bp		

ตารางที่ 3. (ต่อ)

ยีนควบคุมการก่อโรคที่มีรายงานพบในเชื้อแบคทีเรีย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	เอกสารอ้างอิง
<i>Citrobacter, Enterobacter</i> และ <i>Esc. coli</i>				
<i>csgD</i>	fp: (5' TGA AAR YTG GCC GCA TAT CAA TG 3') bp: (5' ACG CCT GAG GTT ATC GTT TGC C 3')	355 bp	95°C 5 min 95°C 30 sec } 35X 60°C 30 sec } 72°C 30 sec } 72°C 5 min	Akbari และคณะ (2015)
<i>Klebsiella</i>				
<i>kfu</i>	fp: (5' GAA GTG ACG CTG TTT GTG GC 3') bp: (5' TTT CGT GTG GCC AGT GAC TC 3')	797 bp	94°C 5 min 94°C 1 min } 35X 54°C 45 sec } 72°C 1 min } 72°C 7 min	Aher และคณะ (2012)
<i>magA</i>	fp: (5' GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC 3') bp: (5' GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG 3')	1,280 bp	94°C 5 min 94°C 30 sec } 30X 59°C 45 sec } 72°C 2 min } 72°C 6 min	
<i>uge</i>	fp: (5' TCT TCA CGC CTT CCT TCA CT 3') bp: (5' GAT CAT CCG GTC TCC CTG TA 3')	534 bp	94°C 5 min 94°C 1 min } 35X 54°C 45 sec } 72°C 1 min } 72°C 7 min	

ตารางที่ 3. (ต่อ)

ยีนควบคุมการก่อโรคที่มีรายงานพบในเชื้อแบคทีเรีย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas</i>				
<i>aerA</i>	fp: (5' AAC CGA ACT CTC CAT 3') bp: (5' CGC CTT GTC CTT GTA 3')	301 bp	94°C 5 min 94°C 30 sec } 54°C 30 sec } 30X 72°C 1 min } 72°C 10 min	Li และคณะ (2011)
<i>ahp</i>	fp: (5' ATT GGA TCC CTG CCT A 3') bp: (5' GCT AAG CTT GCA TCC G 3')	911 bp	94°C 5 min 94°C 30 sec } 56°C 30 sec } 30X 72°C 1 min } 72°C 10 min	
<i>alt</i>	fp: (5' TGA CCC AGT CCT GG 3') bp: (5' GGT GAT CGA TCA CC 3')	442 bp	94°C 5 min 94°C 30 sec } 60°C 30 sec } 30X 72°C 1 min } 72°C 10 min	

fp: forward primer; bp: backward primer

7. การทดสอบผลของสภาวะต่างๆ ที่มีต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคโดยใช้เทคนิค RT-PCR

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตัวแทนของแต่ละสกุลที่ตรวจพบยีนควบคุมการก่อโรค เลี้ยงเชื้อในอาหาร LB ที่ไม่มี NaCl เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง โดยไม่เขย่า subculture โดยปิเปตสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในอาหารปริมาตร 5 มิลลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่แปรผันตามปัจจัยทดสอบ ได้แก่ 1) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2) ความเข้มข้นของ NaCl 3) การให้อากาศ 4) อุณหภูมิ และ 5) ระยะการเจริญของเชื้อ โดยกำหนดสภาวะการเจริญของเชื้อดังนี้

1) การเจริญในอาหาร LB (pH 6.5) ที่ไม่มี NaCl, อุณหภูมิ 37°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ระยะการเจริญ mid-exponential phase)

2) การเจริญในอาหาร LB (pH 6.5) ที่มี 0.17M NaCl, อุณหภูมิ 37°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3) การเจริญในอาหาร LB (pH 6.5) ที่มี 0.3M NaCl, อุณหภูมิ 37°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4) การเจริญในอาหาร M63 ที่มี 0.2% glucose (pH 6.5) และไม่มี NaCl, อุณหภูมิ 37°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5) การเจริญในอาหาร M63 ที่มี 0.2% glucose (pH 6.5) และ 0.17M NaCl, อุณหภูมิ 37°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

6) การเจริญในอาหาร M63 ที่มี 0.2% glucose (pH 6.5) และ 0.3M NaCl, อุณหภูมิ 37°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

7) การเจริญในอาหาร LB (pH 6.5) ที่มี 0.17M NaCl, อุณหภูมิ 37°C, สภาวะที่มีการให้อากาศ (aerated condition) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

8) การเจริญในอาหาร LB (pH 6.5) ที่มี 0.17M NaCl, อุณหภูมิ 25°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

9) การเจริญในอาหาร LB (pH 6.5) ที่มี 0.17M NaCl, อุณหภูมิ 37°C, microaerophilic condition เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ระยะการเจริญ early exponential phase)

10) การเจริญในอาหาร LB (pH 6.5) ที่มี 0.17M NaCl, อุณหภูมิ 37°C microaerophilic condition เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (ระยะการเจริญ late exponential phase)

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะ microaerophilic condition ใช้การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวในหลอดทดลองที่วางตั้งตรง เติมอาหารเหลวปริมาตรเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาตรหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดทดลองให้แน่นโดยไม่เขย่าหลอดทดลอง การเลี้ยงเชื้อในสภาวะ aerated condition ใช้การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวในหลอดทดลองที่วางลาดเอียง เติมอาหารเหลวปริมาตรเป็น 1/4 ของปริมาตรหลอดทดลอง เขย่าหลอดทดลองที่ 200 รอบต่อนาที (Trachman และ Yasmin 2004)

นำสารแขวนลอยเชื้อมาเหวี่ยงปั่นเก็บตะกอนเซลล์ สกัด total RNA โดยใช้ ZR Fungal/Bacterial RNA Miniprep. Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) สังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) โดยใช้ SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with

Platinum[®] Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) ขั้นตอนแรกของ RT-PCR ใช้อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที สำหรับกระบวนการ reverse transcription ตามด้วยขั้นตอน PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยใช้ primer และ annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละยีน ตรวจสอบ PCR product ใน 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ negative control ที่ไม่เติม total RNA

8. การศึกษาผลของการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคที่มีต่อการเจริญของเชื้อ, การเคลื่อนที่ และการสังเคราะห์ biofilm

ศึกษาการเจริญของเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการแสดงออกและในสภาวะที่มีการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/มิลลิลิตร เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารแขวนลอยเชื้อมาประเมินจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count หน่วยเป็น log CFU/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.00 log CFU/มิลลิลิตร

วิเคราะห์การเคลื่อนที่ของเชื้อโดยวิธีการของ Ibarra และคณะ (2010) แต่เปลี่ยนอาหารที่ใช้เตรียม swimming plate จาก LB เป็นอาหารตามสภาวะทดสอบ และใช้ agarose ในการเตรียมอาหารแทน agar และเลี้ยงเชื้อตามสภาวะทดสอบ สำหรับ microaerophilic condition ใช้การเทหับผิวหน้าอาหารด้วย 0.25% agarose ประเมินการเคลื่อนที่ของเชื้อโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการเจริญ (growth halo)

ศึกษาการสังเคราะห์ biofilm โดยวิธีการของ O'Toole (2011) แต่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อจาก M63 เป็นอาหารตามสภาวะทดสอบ และเลี้ยงเชื้อตามสภาวะทดสอบ วัดปริมาณ biofilm จากค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ 550 นาโนเมตร (nanometer; nm)

9. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

คำนวณค่าเฉลี่ยและค่า standard deviation (SD) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2010

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล

แยกเชื้อ *Esc. coli*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* ในอาหารทะเลสดจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเล 3 แห่ง ได้แก่ 1) ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร 2) ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และ 3) ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง รวม 35 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีสีม่วงดำเป็นมันวาว ที่เจริญบนอาหาร EMB agar (เป็นลักษณะของ *Esc. coli*), โคโลนีไม่มีสี โปร่งแสง และโคโลนีไม่มีสี โปร่งแสง มีจุดสีดำกลางโคโลนี ที่เจริญบนอาหาร SS agar (เป็นลักษณะของ *Salmonella* และ *Shigella*) และโคโลนีสีเหลือง, สีเขียว และ สีเขียว-น้ำเงิน ที่เจริญบนอาหาร TCBS agar (เป็นลักษณะของ *Vibrio*) จากอาหารทะเล 35 ตัวอย่าง มี 14 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับทั้ง 4 สกุล บนอาหารคัดเลือก 3 ชนิด มี 23 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Esc. coli* บนอาหาร EMB agar, มี 22 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Salmonella* และ *Shigella* บนอาหาร SS agar และมี 22 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Vibrio* บนอาหาร TCBS agar ตัวอย่างที่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Esc. coli* บนอาหาร EMB agar มีจำนวนตั้งแต่ 5.33 ± 4.73 ถึง 70.00 ± 7.55 CFU/กรัม, ตัวอย่างที่พบลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Salmonella* และ *Shigella* บนอาหาร SS agar มีจำนวนตั้งแต่ 205.33 ± 20.21 ถึง 272.00 ± 18.52 CFU/กรัม และตัวอย่างที่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Vibrio* บนอาหาร TCBS agar มีจำนวนตั้งแต่ 4.67 ± 2.09 ถึง 150.67 ± 28.04 CFU/กรัม จำนวนเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีบนอาหารคัดเลือกเช่นเดียวกับ *Esc. coli*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* ในตัวอย่างอาหารทะเล 35 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 4 แยกเชื้อบริสุทธิ์จากโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ 42 ไอโซเลท กำหนดรหัสเชื้อเป็น SF ตามด้วยชื่อย่อของอาหารคัดเลือก (EMB, SS และ TCBS) ตามด้วยลำดับของไอโซเลท เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร LB slant ที่อุณหภูมิ 4°C และใน 20% glycerol แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ERIC-PCR

จากการวิเคราะห์รูปแบบ ERIC-PCR ของเชื้อที่แยกได้ 42 ไอโซเลท พบว่าได้รูปแบบ ERIC-PCR 40 รูปแบบ ซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอ (band) 1-8 แถบ และมีขนาดตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 500 bp-3.0 kb ดังแสดงในภาพที่ 1 เชื้อที่มีรูปแบบ ERIC-PCR แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ 40 สายพันธุ์ สำหรับใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

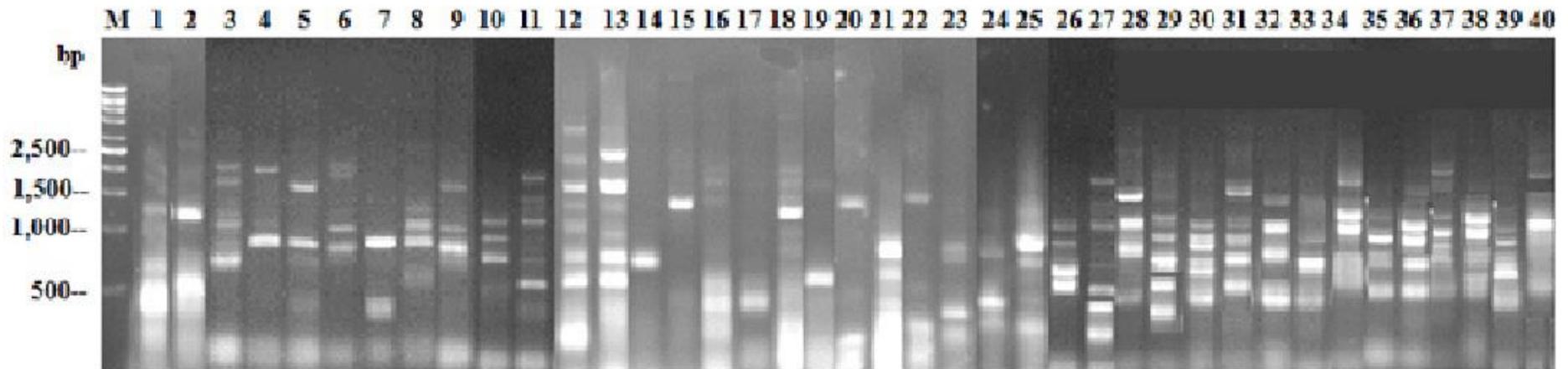
ตารางที่ 4. จำนวนเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีบนอาหารคัดเลือกเช่นเดียวกับ *Esc. coli*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* ในตัวอย่างอาหารทะเล

ลำดับที่	แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสของร้านค้า	ชนิดอาหารทะเล	จำนวนเชื้อ (CFU/กรัม)* ที่มีลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ		
				<i>Esc. coli</i>	<i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i>	<i>Vibrio</i>
1	ตลาดทะเลไทย จ. สมุทรสาคร	สส 1	กุ้งแช่บัว	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	14.67 ± 2.52
2		สส 2	กุ้งแช่บัว	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.67 ± 2.09
3		สส 3	กุ้งลายเสือ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4		สส 2	หอยแครง	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5		สส 2	หอยหวาน	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
6		สส 2	หอยเชลล์	0.00 ± 0.00	227.67 ± 20.82	0.00 ± 0.00
7		สส 2	ปูทะเล	7.33 ± 3.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
8		สส 2	ปูม้า	5.33 ± 4.73	0.00 ± 0.00	32.00 ± 11.00
9		สส 4	ปูม้า	7.67 ± 3.51	0.00 ± 0.00	16.33 ± 4.04
10		สส 1	หมึกกล้วย	12.33 ± 4.51	213.00 ± 17.44	0.00 ± 0.00
11		สส 4	หมึกกระดอง	0.00 ± 0.00	213.33 ± 26.50	0.00 ± 0.00
12		สส 4	หมึกหอม	62.67 ± 9.07	220.00 ± 26.96	111.00 ± 8.72
13		สส 1	ปลาทุ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
14		สส 1	ปลากะระเม็ด	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	57.67 ± 8.62
15		สส 3	ปลาแดงใหญ่	63.33 ± 7.57	272.00 ± 18.52	50.33 ± 23.97

ตารางที่ 4. (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสของร้าน	ชนิดอาหารทะเล	จำนวนเชื้อ (CFU/กรัม)* ที่มีลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ			
				<i>Esc. coli</i>	<i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i>	<i>Vibrio</i>	
16	ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบ-คีรีขันธ์	ปค 1	ปูม้า	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
17		ปค 1	หมึกกล้วย	53.67 ± 11.15	0.00 ± 0.00	79.33 ± 14.98	
18		ปค 1	กุ้งแช่บัว	8.67 ± 5.51	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
19		ปค 1	หอยเชลล์	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
20		ปค 2	หอยหวาน	0.00 ± 0.00	246.00 ± 26.29	0.00 ± 0.00	
21		ปค 2	กุ้งลายดำ	0.00 ± 0.00	232.67 ± 28.92	0.00 ± 0.00	
22		ปค 2	หมึกหอม	70.00 ± 7.55	205.33 ± 20.21	150.67 ± 28.04	
23		ปค 2	ปลาทุ	0.00 ± 0.00	269.67 ± 16.62	0.00 ± 0.00	
24		ปค 2	ปลากระพง	0.00 ± 0.00	226.33 ± 18.90	0.00 ± 0.00	
25		ปค 2	ปูม้า	28.67 ± 12.06	0.00 ± 0.00	9.67 ± 5.86	
26		ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง	รย 1	หอยเชลล์	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
27			รย 1	กุ้งแช่บัว	0.00 ± 0.00	253.00 ± 14.00	0.00 ± 0.00
28			รย 1	หมึกกล้วย	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
29			รย 1	ปูม้า	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
30			รย 2	ปลาจะระเม็ด	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
31	รย 2		ปลากระพง	61.33 ± 7.57	217.00 ± 4.58	62.00 ± 16.00	
32	รย 3		หอยหวาน	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	17.00 ± 3.61	
33	รย 3		หมึกกล้วย	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
34	รย 3		กุ้งแช่บัว	35.33 ± 10.97	226.00 ± 24.56	29.33 ± 10.26	
35	รย 3		ปูม้า	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation (SD)



ภาพที่ 1. รูปแบบ ERIC-PCR ของเชื้อ 40 สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารทะเล

Lane M: 1 kb DNA ladder (Vivantis, Malaysia); 1: SFEMB1; 2: SFEMB2; 3: SFEMB3; 4: SFEMB4; 5: SFEMB5; 6: SFEMB6; 7: SFEMB7; 8: SFSS1; 9: SFSS2; 10: SFSS3; 11: SFSS4; 12: SFSS5; 13: SFSS6; 14: SFSS7; 15: SFSS8; 16: SFSS9; 17: SFSS10; 18: SFSS11; 19: SFSS12; 20: SFSS13; 21: SFSS14; 22: SFSS15; 23: SFSS16; 24: SFSS17; 25: SFSS18; 26: SFSS19; 27: SFSS20; 28: SFSS21; 29: SFSS22; 30: SFSS23; 31: SFSS24; 32: SFSS25; 33: SFSS26; 34: SFSS27; 35: SFTCBS1; 36: SFTCBS2; 37: SFTCBS3; 38: SFTCBS4; 39: SFTCBS5; 40: SFTCBS6

ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ enterobacteria และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ สามารถใช้เทคนิค ERIC-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ERIC sequence เป็นหนึ่งใน intergenic repeated sequence ที่พบในเชื้อ enterobacteria นอกเหนือจาก repetitive extragenic palindromic (REP) sequence สำหรับ ERIC sequence นั้น เริ่มแรกพบในเชื้อ *Esc. coli* และ *Sal. enterica* serovar Typhimurium (ชื่อเดิม *Sal. typhimurium*) (Gilson และคณะ 1984; Hulton และคณะ 1991; Sharples และ Lloyd 1990; Stern และคณะ 1984) ERIC sequence ที่พบในเชื้อต่างชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แทบจะเหมือนกัน แต่มีจำนวนและการกระจายของ ERIC sequence แตกต่างกัน หน้าที่ของ ERIC sequence ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับการคงความเสถียรของ mRNA หรือเกี่ยวข้องในกระบวนการ homologous recombination, การจัดโครงสร้างของโครโมโซม รวมถึงการจับกับ DNA binding protein ต่างๆ เช่น HU protein, เอนไซม์ DNA gyrase และ DNA polymerase I (Rashid และคณะ 2009) เทคนิค ERIC-PCR เป็นการนำหลักการของ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของยีนซึ่งอยู่ระหว่าง ERIC sequence โดยการใช้ primer 1 คู่ เข้าจับบริเวณ ERIC sequence ซึ่ง PCR product ที่ได้จากเชื้อต่างสายพันธุ์จะมีจำนวนชิ้นและขนาดที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 1 ถึง 15 ชิ้น ขนาดประมาณ 100 bp ถึง 5.0 kb เทคนิค ERIC-PCR สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรแบคทีเรีย (Pongsilp 2012)

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อระบุสกุลของเชื้อที่แยกได้ 40 สายพันธุ์ โดยเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจผล PCR product พบว่าได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ขนาดประมาณ 500 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn พบว่าเชื้อที่แยกได้ 40 สายพันธุ์ ได้แก่ SFEMB1, SFEMB2, SFEMB3, SFEMB4, SFEMB5, SFEMB6, SFEMB7, SFSS1, SFSS2, SFSS3, SFSS4, SFSS5, SFSS6, SFSS7, SFSS8, SFSS9, SFSS10, SFSS11, SFSS12, SFSS13, SFSS14, SFSS15, SFSS16, SFSS17, SFSS18, SFSS19, SFSS20, SFSS21, SFSS22, SFSS23, SFSS24, SFSS25, SFSS26, SFSS27, SFTCBS1, SFTCBS2, SFTCBS3, SFTCBS4, SFTCBS5 และ SFTCBS6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับเชื้อใน 11 สกุล ได้แก่ *Aeromonas* (9 สายพันธุ์), *Citrobacter* (5 สายพันธุ์), *Enterobacter* (7 สายพันธุ์), *Escherichia* (2 สายพันธุ์), *Hafnia (Obesumbacterium)* (1 สายพันธุ์), *Klebsiella* (4 สายพันธุ์), *Morganella* (4 สายพันธุ์), *Proteus* (2 สายพันธุ์), *Providencia* (1 สายพันธุ์), *Salmonella* (2 สายพันธุ์) และ *Vibrio* (3 สายพันธุ์) ซึ่งมี % ความเหมือน (% identity) อยู่ระหว่าง 98%-99% แต่ไม่พบเชื้อที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Shigella* ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 40 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5. ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (GenBank accession number)	% identity
SFEMB 1	<i>Citrobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0747 (KR189995) (Zhang และคณะ 2015) <i>Citrobacter freundii</i> สายพันธุ์ SI-1 (KC211308) (Kang และคณะ 2014) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ R2A5 (KF938666) (Lade และคณะ 2014)	99%
SFEMB2	<i>Citrobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0785 (KR189901) (Zhang และคณะ 2015) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ R2A5 (KF938666) (Lade และคณะ 2014) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ 128A (3DVM) (KF254749) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015)	99%
SFEMB3	<i>Citrobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0778 (KR190303) (Zhang และคณะ 2015) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ HLR20 (HG974539) (Campos และคณะ 2015) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ S5-19 (KC202272) (Shen และคณะ 2014)	99%
SFEMB4 และ SFEMB5	<i>Citrobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0785 (KR189901) (Zhang และคณะ 2015) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ R2A5 (KF938666) (Lade และคณะ 2014) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ 128A (3DVM) (KF254749) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015)	99%
SFEMB6	<i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ 2009C-3133 (CP013025) (Lindsey และคณะ 2015) <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ ATCC25922 (CP009072) (Minoque และคณะ 2014) <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ clone D i14 (CP002212) (Reeves และคณะ 2011)	99%
SFEMB7	<i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ JJ1887 (CP014316) (Johnson และคณะ 2016) <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ uk_P46212 (CP013658) (Stoesser และคณะ 2016) <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ SF-166 (CP012633) (Stephens และคณะ 2015)	99%

ตารางที่ 5. (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (GenBank accession number)	% identity
SFSS1	Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone JI48H120 (GU356245) (Vandewalle และคณะ 2012) <i>Aeromonas</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF2094 (KR189547) (Zhang และคณะ 2015) <i>Aeromonas allosaccharophila</i> สายพันธุ์ S5-33 (KC202276) (Shen และคณะ 2014)	99%
SFSS2, SFSS4 และ SFSS6	Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone JI48D092 (GU356241) (Vandewalle และคณะ 2012) Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone 3-3-88 (KT461495) (Liu และคณะ 2016a) <i>Aeromonas</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0416 (KR189633) (Zhang และคณะ 2015)	99%
SFSS3	<i>Aeromonas</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0696 (KR190148) (Zhang และคณะ 2015) Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone JI40D021 (GU356064) (Vandewalle และคณะ 2012) <i>Aeromonas aquatica</i> สายพันธุ์ AE235 (NR_136829) (Beaz-Hidalgo และคณะ 2015)	99%
SFSS5	Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone 3-3-88 (KT461495) (Liu และคณะ 2016a) <i>Aeromonas</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0416 (KR189633) (Zhang และคณะ 2015) <i>Aeromonas hydrophila</i> สายพันธุ์ MSSRFQS56 (KJ877664) (Viswanath และคณะ 2015)	99%
SFSS7	Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone JI40D021 (GU356064) (Vandewalle และคณะ 2012) <i>A. aquatica</i> สายพันธุ์ AE235 (NR_136829) (Beaz-Hidalgo และคณะ 2015) <i>Aeromonas veronii</i> สายพันธุ์ AVNIH1 (CP014774) (Hughes และคณะ 2016)	99%

ตารางที่ 5. (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (GenBank accession number)	% identity
SFSS8	<i>Aeromonas</i> sp. สายพันธุ์ IPPW-29 (FJ646660) (Addison และคณะ 2010) <i>Aeromonas dhakensis</i> สายพันธุ์ SA1 (KU248777) (Carriero และคณะ 2016) <i>A. hydrophila</i> สายพันธุ์ YL17 (CP007518) (Lim และคณะ 2016)	99%
SFSS9	<i>Aeromonas</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0294 (KR189547) (Zhang และคณะ 2015) <i>A. allosaccharophila</i> สายพันธุ์ S5-33 (KC202276) (Shen และคณะ 2014) <i>Aeromonas</i> sp. สายพันธุ์ OS5 (KC182746) (Reyes และคณะ 2013)	98%
SFSS10 และ SFSS11	<i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ VRBG-35 (KR265428) (Al-Kharousi และคณะ 2016) <i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF1186 (KR189407) (Zhang และคณะ 2015) <i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ TN38 (LN614535) (Naqqash และคณะ 2016)	99%
SFSS12	<i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0201 (KR189499) (Zhang และคณะ 2015) <i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ XB123 (KF447414) (Achari และ Ramesh 2014) <i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ 230604/c (AY665975) (Moore และคณะ 2005)	98%
SFSS13 และ SFSS14	<i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0340 (KR189582) (Zhang และคณะ 2015) <i>Ent. cloacae</i> (KU981056) (Shahid และคณะ 2012) <i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ B13 (KT184503) (Eminoglu และคณะ 2016)	99%
SFSS15	<i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0891 (KR190427) (Zhang และคณะ 2015) <i>Enterobacter hormaechei</i> สายพันธุ์ AnO (KM035631) (Nechitaylo และคณะ 2014) <i>Ent. cloacae</i> clone CC3 (AB576083) (Benskin และคณะ 2010)	99%

ตารางที่ 5. (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (GenBank accession number)	% identity
SFSS16	<i>Enterobacter cancerogenus</i> สายพันธุ์ MP15_3A (JN644618) (Chandel และคณะ 2013) <i>Ent. cancerogenus</i> สายพันธุ์ M123 (HQ407294) (Gupta และคณะ 2012) <i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0340 (KR189582) (Zhang และคณะ 2015)	99%
SFSS17	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> สายพันธุ์ ATCC700603 (CP014696) (Elliott และคณะ 2016) <i>Klebsiella pneumoniae</i> สายพันธุ์ VRBG-57 (KR265450) (Al-Kharousi และคณะ 2016) <i>K. pneumoniae</i> สายพันธุ์ kdB1 TUC-EEAOC (KM096598) (Dantur และคณะ 2015)	99%
SFSS18	Uncultured <i>Klebsiella</i> sp. clone 3Q-38 (KT461479) (Liu และคณะ 2016a) <i>Klebsiella oxytoca</i> สายพันธุ์ VRBG-9 (KR265402) (Al-Kharousi และคณะ 2016) <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0735 (KR190170) (Zhang และคณะ 2015)	99%
SFSS19	<i>K. pneumoniae</i> สายพันธุ์ U25 (CP012043) (Rafiq และคณะ 2016) <i>K. pneumoniae</i> สายพันธุ์ CAV1193 (CP013322) (Sheppard และคณะ 2016) <i>K. pneumoniae</i> สายพันธุ์ U100 (LC095660) (Bhiwankar และคณะ 2015)	99%
SFSS20	<i>Hafnia alvei</i> สายพันธุ์ HUMV-5920 (CP015379) (Lazaro-Diez และคณะ 2016) <i>Hafnia paralvei</i> สายพันธุ์ B315 (KR106611) (Zhou และคณะ 2016) <i>Obesumbacterium</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0774 (KR190302) (Zhang และคณะ 2015)	99%

ตารางที่ 5. (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อ แบคทีเรีย	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (GenBank accession number)	% identity
SFSS21	<i>H. alvei</i> สายพันธุ์ HUMV-5920 (CP015379) (Lazaro-Diez และคณะ 2016) <i>H. paralvei</i> สายพันธุ์ B315 (KR106611) (Zhou และคณะ 2016) <i>Obesumbacterium</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0907 (KR190249) (Zhang และคณะ 2015)	99%
SFSS22	<i>Morganella</i> sp. สายพันธุ์ AZTITEMP113 (KF462616) (Alfaro และ Hernandez 2013) <i>Morganella psychrotolerans</i> สายพันธุ์ 2F6 (DQ358143) (Emborg และคณะ 2006) <i>Morganella morganii</i> (AB099406) (Takahashi และคณะ 2003)	98%
SFSS23 และ SFTCBS1	<i>Morganella</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0127 (KR189877) (Zhang และคณะ 2015) <i>M. morganii</i> สายพันธุ์ 3D4A (JF710989) (Coton และคณะ 2012) <i>M. morganii</i> subsp. <i>sibonii</i> สายพันธุ์ 8293-1 (HM122051) (Parikh และคณะ 2011)	99%
SFSS24	<i>Proteus</i> sp. สายพันธุ์ S487 (KR232911) (Franca และคณะ 2015) <i>Proteus</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0849 (KR189933) (Zhang และคณะ 2015) <i>Proteus</i> sp. สายพันธุ์ S19 (HG810922) (Angar และคณะ 2016)	99%
SFSS25	<i>Proteus hauseri</i> สายพันธุ์ ZMd44 (JX101457) (Ng และคณะ 2013) <i>Proteus vulgaris</i> สายพันธุ์ U133 (LC095662) (Bhiwankar และคณะ 2015) <i>Proteus mirabilis</i> สายพันธุ์ T7 (KJ626258) (Dabade และคณะ 2015)	99%
SFSS26	<i>Sal. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Thompson สายพันธุ์ RM1986 (CP012514) (Parker และคณะ 2015) <i>Sal. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Panamar สายพันธุ์ ATCC7378 (CP012346) (Yao และคณะ 2016) <i>Sal. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Anatum สายพันธุ์ CDC06-0532 (CP007211) (Nguyen และคณะ 2016)	99%

ตารางที่ 5. (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (GenBank accession number)	% identity
SFSS27	<i>Sal. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium สายพันธุ์ SO2 (CP014356) (Silva และคณะ 2016) <i>Sal. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> สายพันธุ์ YU39 (CP011428) (Calva และคณะ 2015) <i>Sal. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium สายพันธุ์ DT104 (HF937208) (Mather และคณะ 2013)	99%
SFTCBS2	<i>M. morganii</i> สายพันธุ์ MM.2.3 (EF550572) (Moura และคณะ 2007) <i>M. morganii</i> สายพันธุ์ ATCC35200 (AB089244) (Takahashi และคณะ 2003) <i>Morganella</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0593 (KR189727) (Zhang และคณะ 2015)	99%
SFTCBS3	Uncultured <i>Providencia</i> sp. clone XYM_037R (JN426589) (Chandler และคณะ 2011) Uncultured <i>Providencia</i> sp. clone HFC109 (HQ407017) (Gupta และคณะ 2012) <i>Providencia rustigianii</i> สายพันธุ์ DSM4541 (NR_042411) (Somvanshi และคณะ 2006)	98%
SFTCBS4 และ SFTCBS5	<i>Vibrio</i> sp. สายพันธุ์ SD21 (DQ001320) (Anand และคณะ 2006) <i>Vibrio</i> sp. สายพันธุ์ H1-68 (KM979061) (Sun และคณะ 2015) <i>Vibrio alginolyticus</i> สายพันธุ์ 129-63 (KT224384) (Liu และคณะ 2016b)	99%
SFTCBS6	<i>V. alginolyticus</i> สายพันธุ์ J608 (JF836167) (Hoffmann และคณะ 2013) <i>Vibrio</i> sp. สายพันธุ์ 8-1 (AB498798) (Halder และคณะ 2011) <i>Vibrio</i> sp. สายพันธุ์ NAP-4 (AF064637) (Rockne และคณะ 2000)	99%

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อที่แยกได้จากอาหาร EMB agar เป็น *Citrobacter* และ *Esc. coli* ซึ่งมีลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกัน โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร สีม่วงดำเป็นมันวาว, เชื้อที่แยกได้จากอาหาร SS agar จัดอยู่ในสกุล *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia* (*Obesumbacterium*), *Morganella*, *Proteus* และ *Salmonella* ซึ่งมีลักษณะโคโลนีคล้ายกัน โดย *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia* (*Obesumbacterium*), *Morganella* และ *Salmonella* ส่วนใหญ่ โคโลนีไม่มีสี โปร่งแสง ส่วน *Proteus*

และ *Salmonella* บางชนิด โคโลนีไม่มีสี โปร่งแสง มีจุดสีดำกลางโคโลนี และเชื้อที่แยกได้จากอาหาร TCBS agar จัดอยู่ในสกุล *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* และ *Vibrio* ซึ่งมีโคโลนีสีเหลือง สีเขียว และสีเขียว-น้ำเงิน เชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 11 สกุล เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เชื้อใน 9 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Esc. coli*, *Klebsiella*, *Hafnia* (*Obesumbacterium*), *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* และ *Salmonella* เป็นเชื้อในกลุ่ม enterobacteria ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เป็น facultative anaerobe สามารถหมัก glucose และรีดิวซ์ nitrate เชื้อเหล่านี้มักเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร และใช้เป็นตัวชี้ในการประเมินความปลอดภัยของอาหาร พบได้ในลำไส้และในสิ่งแวดล้อม (Anand และ Griffiths 2011)

Citrobacter บางสายพันธุ์ก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, ระบบทางเดินหายใจ และปอด, โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Guentzel 1996)

Enterobacter เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ บางสายพันธุ์ก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, ระบบทางเดินหายใจและปอด และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Guentzel 1996)

Esc. coli เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ (Ostblom และคณะ 2011) บางสายพันธุ์ก่อโรคลำไส้ใหญ่อักเสบ, โรค hemolytic uremic syndrome, โรคท้องร่วงในเด็ก, โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล, ต่อมลูกหมากอักเสบ และกรวยไตอักเสบ (Griffin และ Tauxe 1991; Guentzel 1996; Nataro และ Kaper 1998; O'Brien และคณะ 1984)

Klebsiella เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ บางสายพันธุ์ก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด, หูชั้นกลางอักเสบ และโรคปอดบวม (Guentzel 1996)

Hafnia เป็นจุลินทรีย์ในลำไส้ของมนุษย์ บางสายพันธุ์ก่อโรคระบบทางเดินอาหาร, โรคท้องร่วง, ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด, โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, เยื่อหูหัวใจ, เยื่อหูช่องท้อง, เยื่อหุ้มสมอง, ลูกตา และถุงน้ำดี, ฝี, โรคข้ออักเสบ และโรคปอดบวม (Janda และคณะ 2002; Padilla และคณะ 2015)

Morganella เป็นเชื้อที่พบได้ในดิน, แหล่งน้ำและน้ำทิ้ง บางสายพันธุ์ก่อโรคปอดบวม, โรคกล้ามเนื้ออักเสบ, โรคเยื่อหูช่องท้องอักเสบ, การติดเชื้อภายในลูกตา, การติดเชื้อตามบาดแผล, ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด และภาวะติดเชื้อในทารกแรกเกิด (Lee และ Liu 2006)

Proteus บางสายพันธุ์ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและแผลผ่าตัด, โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด, โรคปอดบวม และโรคนิวโมโต (Guentzel 1996)

Providencia บางสายพันธุ์ก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, โรคเยื่อหูช่องท้องอักเสบ และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Unverdi และคณะ 2011)

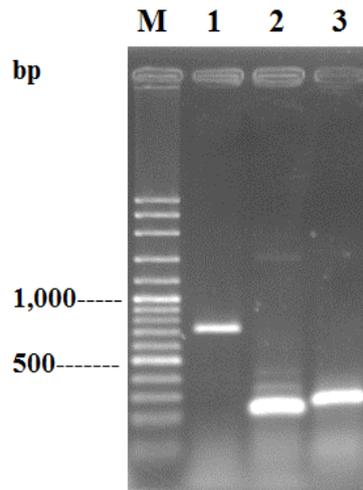
Salmonella เป็นสาเหตุหลักของโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหาร บางสายพันธุ์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ, โรคท้องร่วง, โรคลำไส้อักเสบ, โรคติดเชื้อในท่อน้ำดีและกระเพาะและลำไส้เล็ก, โรคไทฟอยด์ และโรคพาราไทฟอยด์ (Bhowmick และคณะ 2011; Brenner และคณะ 2000; Iwamoto และคณะ 2010; Lacey 1993)

นอกจากเชื้อ enterobacteria แล้วยังพบ *Aeromonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในวงศ์ Aeromonadaceae มีรูปร่างเป็นท่อน บางสายพันธุ์ก่อโรคท้องร่วง, โรคระบบทางเดินอาหาร, โรคผิวหนังอักเสบ, โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, หู, ท่อน้ำดี และตามบาดแผล และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Vila และคณะ 2003) รวมทั้ง *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae มีรูปร่างคล้ายเครื่องหมายจุลภาค บางสายพันธุ์ก่อโรคอหิวาต์, โรคท้องร่วง, โรคติดเชื้อตามบาดแผล และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Garcia และคณะ 2009; Morris 1990; Oliver 2005)

4. การระบุสกุล, ชนิด หรือ serovar ของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม

จากการตรวจสอบยีน *phoA* ซึ่งมีรายงานว่าจำเพาะต่อ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Shigella*, ยีน *fimC* ซึ่งมีรายงานว่าจำเพาะต่อ *Salmonella* และ Sdf I fragment ซึ่งมีรายงานว่าจำเพาะต่อ *Sal. enterica* serovar Enteritidis จากเชื้อ 40 สายพันธุ์ โดยเทคนิค PCR พบ PCR product ขนาด 720 bp ของยีน *phoA* จาก *Citrobacter* 5 สายพันธุ์ (SFEMB1-SFEMB5), *Esc. coli* 2 สายพันธุ์ (SFEMB6-SFEMB7) และ *Hafnia (Obesumbacterium)* 2 สายพันธุ์ (SFSS20-SFSS21), PCR product ขนาด 289 bp ของยีน *fimC* จาก *Citrobacter* 5 สายพันธุ์ (SFEMB1-SFEMB5), *Enterobacter* 7 สายพันธุ์ (SFSS10-SFSS16), *Klebsiella* 3 สายพันธุ์ (SFSS17-SFSS19) และ *Salmonella* 2 สายพันธุ์ (SFSS26-SFSS27) รวมทั้ง PCR product ขนาด 293 bp ของ Sdf I fragment จาก *Salmonella* 1 สายพันธุ์ (SFSS26) สำหรับเทคนิค multiplex PCR ซึ่งใช้ในการระบุชนิดของ *Vibrio* 3 สายพันธุ์ ไม่พบรูปแบบที่ตรงกับ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* PCR product ของยีน *phoA*, ยีน *fimC* และ Sdf I fragment แสดงในภาพที่ 2

มีรายงานการใช้ยีน *phoA* ซึ่งเป็น housekeeping gene ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ alkaline phosphatase เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหา *Esc. coli* ในน้ำทะเลและตัวอย่างทางคลินิกจากเบ็ดที่เป็นโรค เนื่องจากเป็นยีนที่พบใน *Esc. coli* ทุกสายพันธุ์ (Hu และคณะ 2011; Kong และคณะ 1995; 1999) Hu และคณะ (2011) ออกแบบ primer สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *phoA* ร่วมกับยีน *dnaB* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ DnaB helicase ของ *Riemerella anatipestifer* และยีน *invA* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ invasion protein ของ *Sal. enterica* ในเทคนิค multiplex PCR จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phoA* ของ *Esc. coli* พบว่ามี % identity สูงกับยีน *phoA* จาก *Citrobacter* และ *Shigella* ผลการทดลองจากการศึกษาครั้งนี้ พบ PCR product ขนาด 720 bp ของยีน *phoA* ในทุกสายพันธุ์ของ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia (Obesumbacterium)* แสดงว่า ยีน *phoA* มีในเชื้อทั้ง 3 สกุล และ primer ที่ใช้ไม่ได้จำเพาะต่อยีน *phoA* ของ *Esc. coli* เท่านั้น



ภาพที่ 2. PCR product ของยีน *phoA*, ยีน *fimC* และ Sdf I fragment

Lane M: 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia); 1: PCR product ขนาด 720 bp ของยีน *phoA*; 2: PCR product ขนาด 289 bp ของยีน *fimC*; 3: PCR product ขนาด 293 bp ของ Sdf I fragment

Drahovska และคณะ (2001) รายงานการออกแบบ primer S212 และ S500 ที่จำเพาะต่อยีน *fimC* (ควบคุมการสังเคราะห์ chaperone ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ fimbriae เส้นใยบนผิวเซลล์แบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเข้าจับกับตัวรับเฉพาะบน epithelial cell ในขั้นตอนการติดเชื้อ) เพื่อใช้ตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร โดยพบว่า primer S212 และ S500 จำเพาะต่อ *Salmonella* ที่ annealing temperature 58°C ได้ PCR product ขนาด 289 bp จาก *Salmonella* 95 สายพันธุ์ ใน 53 serotype และไม่เกิด PCR product จากเชื้ออื่นๆ รวมทั้ง *Citrobacter*, *Esc. coli*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* และ *Proteus* ผลการทดลองจากการศึกษาครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Drahovska และคณะ (2001) เนื่องจากนอกเหนือจาก *Salmonella* แล้ว ยังได้ PCR product จากการใช้ primer S212 และ S500 ที่ annealing temperature 58°C จากเชื้อ *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella*

Agron และคณะ (2001) ออกแบบ primer เพื่อใช้ตรวจหา *Sal. enterica* serovar Enteritidis โดย primer มีความจำเพาะต่อ Sdf I fragment ซึ่งเป็น DNA restriction fragment ที่ได้จากการใช้เทคนิค Suppression Subtractive Hybridization (SSH) และมีเฉพาะใน serovar Enteritidis ดังนั้น primer ที่ใช้จึงสามารถแยก serovar Enteritidis ออกจาก serovar อื่นๆ อีก 34 serovar ผลการทดลองจากการศึกษาครั้งนี้พบ *Salmonella* สายพันธุ์ SFSS26 ให้ PCR product ขนาด 293 bp ของ Sdf I fragment จึงสามารถระบุได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวเป็น *Sal. enterica* serovar Enteritidis

5. การตรวจสอบยีนควบคุมการก่อโรคในเชื้อแบคทีเรีย

ตรวจสอบยีนควบคุมการก่อโรค 22 ยีน ในเชื้อ 40 สายพันธุ์ที่จัดอยู่ใน 11 สกุล ยีนที่มีรายงานพบใน *Esc. coli* ได้แก่ *cesT/eae*, *cnf1*, *cnf2*, *eaeA*, *espB*, *LTI*, *STII*, *vt1* และ *vt2e*, ยีนที่มีรายงานพบ

ใน *Salmonella* ได้แก่ *ssaO*, *sscB* และ *sseG*, ยีนที่มีรายงานพบใน *Vibrio* ได้แก่ *tdh*, *tlh* และ *trh*, ยีนที่มีรายงานพบใน *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Esc. coli* คือ *csqD*, ยีนที่มีรายงานพบใน *Klebsiella* ได้แก่ *kfu*, *magA* และ *uge* และยีนที่มีรายงานพบใน *Aeromonas* ได้แก่ *aerA*, *ahp* และ *alt*

ในบรรดา ยีนควบคุมการก่อโรค 22 ยีนที่ตรวจสอบ พบยีนควบคุมการก่อโรค 8 ยีน ได้แก่ *cnf2* (PCR product มีขนาด 839 bp), *csqD* (PCR product มีขนาด 355 bp), *kfu* (PCR product มีขนาด 797 bp), *LTI* (PCR product มีขนาด 360 bp), *ssaO* (PCR product มีขนาด 378 bp), *tlh* (PCR product มีขนาด 450 bp), *uge* (PCR product มีขนาด 534 bp) และ *vt2e* (PCR product มีขนาด 322 bp) โดยยีน *cnf2* และ *vt2e* พบเฉพาะใน *Esc. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์, ยีน *csqD* พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter* ทั้ง 5 สายพันธุ์, *Enterobacter* ทั้ง 7 สายพันธุ์ และ *Klebsiella* 2 สายพันธุ์, ยีน *kfu* พบเฉพาะใน *Klebsiella* 1 สายพันธุ์, ยีน *LTI* พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter* 1 สายพันธุ์, *Esc. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และ *Hafnia (Obesumbacterium)* ทั้ง 2 สายพันธุ์, ยีน *ssaO* พบเฉพาะใน *Salmonella* ทั้ง 2 สายพันธุ์, ยีน *tlh* พบเฉพาะใน *Vibrio* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และยีน *uge* พบในเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ *Enterobacter* 4 สายพันธุ์ และ *Klebsiella* 1 สายพันธุ์ ผลการเกิด PCR product ของยีนควบคุมการก่อโรค 8 ยีนที่พบในเชื้อ 40 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 6 PCR product ของยีน *cnf2*, *csqD*, *kfu*, *LTI*, *ssaO*, *tlh*, *uge* และ *vt2e* แสดงในภาพที่ 3

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการก่อโรคและการสร้าง phylogenetic tree

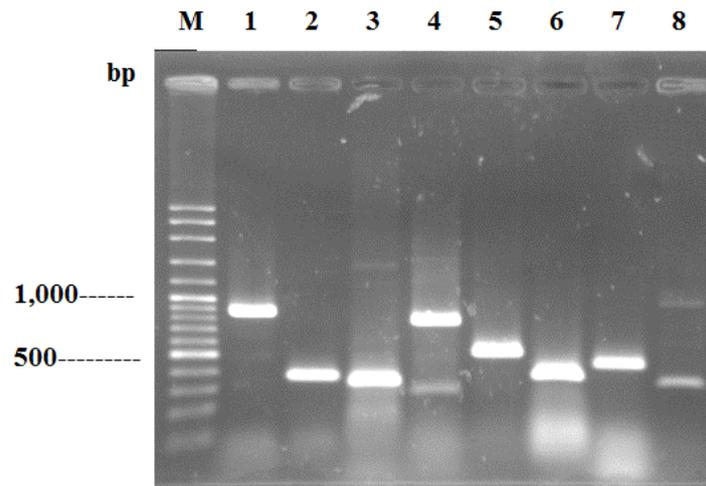
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของยีนควบคุมการก่อโรคที่ตรวจพบในเชื้อแบคทีเรียแต่ละสกุล ซึ่งตรวจพบ 8 ยีน ได้แก่ *cnf2*, *csqD*, *kfu*, *LTI*, *ssaO*, *tlh*, *uge* และ *vt2e* เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn พบว่าเป็นยีนควบคุมการก่อโรคทั้ง 8 ยีน ซึ่งมี % identity อยู่ระหว่าง 83%-100% ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการก่อโรคจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละสกุล แสดงในตารางที่ 7 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันที่พบได้ในเชื้อต่างสกุล ได้แก่ ยีน *csqD* ที่พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella*, ยีน *LTI* ที่พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia (Obesumbacterium)* และยีน *uge* ที่พบในเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ *Klebsiella* และ *Enterobacter* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวจากเชื้ออ้างอิงในฐานข้อมูล GenBank ที่มี % identity สูงสุด ได้นำมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน phylogenetic tree ของยีน *csqD*, *LTI* และ *uge* แสดงในภาพที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 6. ผลการเกิด PCR product ของยีนควบคุมการก่อโรค 8 ยีนที่พบในเชื้อ 40 สายพันธุ์

สกุลเชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ผลการเกิด PCR product ของยีนควบคุมการก่อโรคเฉพาะ 8 ยีนที่ตรวจพบ							
		<i>cnf2</i>	<i>csgD</i>	<i>kfu</i>	<i>LT1</i>	<i>ssaO</i>	<i>tlh</i>	<i>uge</i>	<i>vt2e</i>
<i>Aeromonas</i>	SFSS1	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS2	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS3	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS4	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS5	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS6	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS7	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS8	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	SFEMB1	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFEMB2	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFEMB3	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFEMB4	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFEMB5	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i>	SFSS10	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFSS11	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFSS12	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFSS13	-	+	-	-	-	-	+	-
	SFSS14	-	+	-	-	-	-	+	-
	SFSS15	-	+	-	-	-	-	+	-
	SFSS16	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Esc. coli</i>	SFEMB6	+	-	-	+	-	-	-	+
	SFEMB7	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>Hafnia</i> (<i>Obesumbacterium</i>)	SFSS20	-	-	-	+	-	-	-	-
	SFSS21	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	SFSS17	-	+	+	-	-	-	-	-
	SFSS18	-	+	-	-	-	-	-	-
	SFSS19	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Morganella</i>	SFSS22	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS23	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFTCBS1	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFTCBS2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus</i>	SFSS24	-	-	-	-	-	-	-	-
	SFSS25	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia</i>	SFTCBS3	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salmonella</i>	SFSS26	-	-	-	-	+	-	-	-
	SFSS27	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Vibrio</i>	SFTCBS4	-	-	-	-	-	+	-	-
	SFTCBS5	-	-	-	-	-	+	-	-
	SFTCBS6	-	-	-	-	-	+	-	-

+: เกิด PCR product ของยีนที่ตรวจสอบ

-: ไม่เกิด PCR product ของยีนที่ตรวจสอบ



ภาพที่ 3. PCR product ของยีน *cnf2*, *csgD*, *kfu*, *LTI*, *ssaO*, *tlh*, *uge* และ *vt2e*

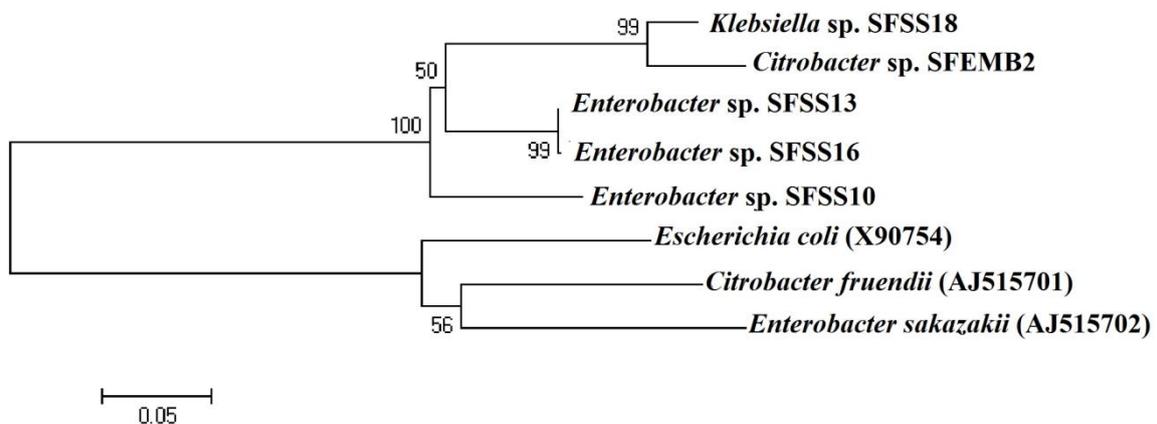
Lane M: 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia); 1: PCR product ขนาด 839 bp ของยีน *cnf2*; 2: PCR product ขนาด 360 bp ของยีน *LTI*; 3: PCR product ขนาด 355 bp ของยีน *csgD*; 4: PCR product ขนาด 797 bp ของยีน *kfu*; 5: PCR product ขนาด 534 bp ของยีน *uge*; 6: PCR product ขนาด 378 bp ของยีน *ssaO*; 7: PCR product ขนาด 450 bp ของยีน *tlh*; 8: PCR product ขนาด 355 bp ของยีน *vt2e*

ตารางที่ 7. ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการก่อโรคที่ตรวจพบในเชื้อแบคทีเรียแต่ละสกุล

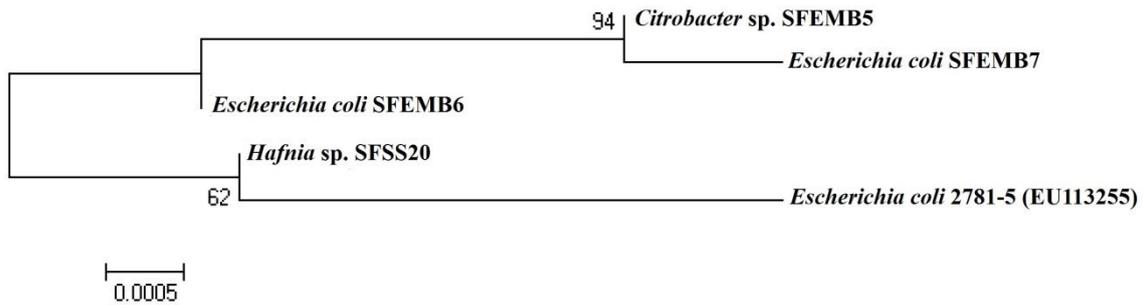
ยีนควบคุมการก่อโรค	สกุลและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย	ตัวอย่างของยีนที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number)	% identity
<i>cnf2</i>	<i>Esc. coli</i> SFEMB6	ยีน <i>cnf2</i> ของ <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ Vir68 (CP001162) (Johnson และคณะ 2010)	96%
<i>csgD</i>	<i>Citrobacter</i> sp. SFEMB2	ยีน <i>csgD</i> ของ <i>Cit. freundii</i> (AJ515701) (Zogaj และคณะ 2003)	96%
	<i>Enterobacter</i> sp. SFSS10	ยีน <i>csgD</i> ของ <i>Enterobacter sakazakii</i> (AJ515702) (Zogaj และคณะ 2003)	93%
	<i>Enterobacter</i> sp. SFSS13	ยีน <i>csgD</i> ของ <i>Ent. sakazakii</i> (AJ515702) (Zogaj และคณะ 2003)	91%
	<i>Enterobacter</i> sp. SFSS16	ยีน <i>csgD</i> ของ <i>Ent. sakazakii</i> (AJ515702) (Zogaj และคณะ 2003)	91%
	<i>Klebsiella</i> sp. SFSS18	ยีน <i>csgD</i> ของ <i>Esc. coli</i> (X90754) (Hammar และคณะ 1995)	85%
<i>kfu</i>	<i>Klebsiella</i> sp. SFSS17	ยีน iron ABC transporter permease ของ <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> สายพันธุ์ NUHL24835 (CP014004) (Liu และคณะ 2016c)	99%
<i>LTI</i>	<i>Citrobacter</i> sp. SFEMB5	ยีน heat-labile enterotoxin ของ <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ 2781-5 (EU113255) (Lasaro และคณะ 2008)	99%
	<i>Esc. coli</i> SFEMB6	ยีน heat-labile enterotoxin ของ <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ 2781-5 (EU113255) (Lasaro และคณะ 2008)	100%
	<i>Esc. coli</i> SFEMB7	ยีน heat-labile enterotoxin ของ <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ 2781-5 (EU113255) (Lasaro และคณะ 2008)	100%
	<i>Hafnia</i> sp. SFSS20	ยีน heat-labile enterotoxin ของ <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ 2781-5 (EU113255) (Lasaro และคณะ 2008)	99%
<i>ssaO</i>	<i>Sal. enterica</i> SFSS26	ยีน <i>ssaO</i> ของ <i>Sal. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium สายพันธุ์ KC14TY193 (KP258194) (McWhorter และ Chousalkar 2015)	98%
<i>tlh</i>	<i>Vibrio</i> sp. SFTCBS4	ยีน <i>tlh</i> ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ 06071-E4 (JX262977) (Gutierrez West และคณะ 2013)	99%

ตารางที่ 7. (ต่อ)

ยีนควบคุมการก่อโรค	สกุลและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย	ตัวอย่างของยีนที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number)	% identity
<i>uge</i>	<i>Enterobacter</i> spp. SFSS13	ยีน NAD dependent epimerase ของ <i>Ent. cloacae</i> สายพันธุ์ ATCC 13047 (CP001918) (Ren และคณะ 2010)	86%
	SFSS14	ยีน <i>uge</i> ของ <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> สายพันธุ์ HS11286 (CP003200) (Liu และคณะ 2012)	84%
	SFSS15		83%
	SFSS16		83%
	<i>Klebsiella</i> sp. SFSS19	ยีน <i>uge</i> ของ <i>K. pneumoniae</i> สายพันธุ์ 342 (CP000964) (Fouts และคณะ 2008)	99%
<i>vt2e</i>	<i>Esc. coli</i> SFEMB6	ยีน verocytotoxin ของ <i>Esc. coli</i> (M36727) (Gyles และคณะ 1988)	97%
	<i>Esc. coli</i> SFEMB7	ยีน verocytotoxin ของ <i>Esc. coli</i> (M36727) (Gyles และคณะ 1988)	97%

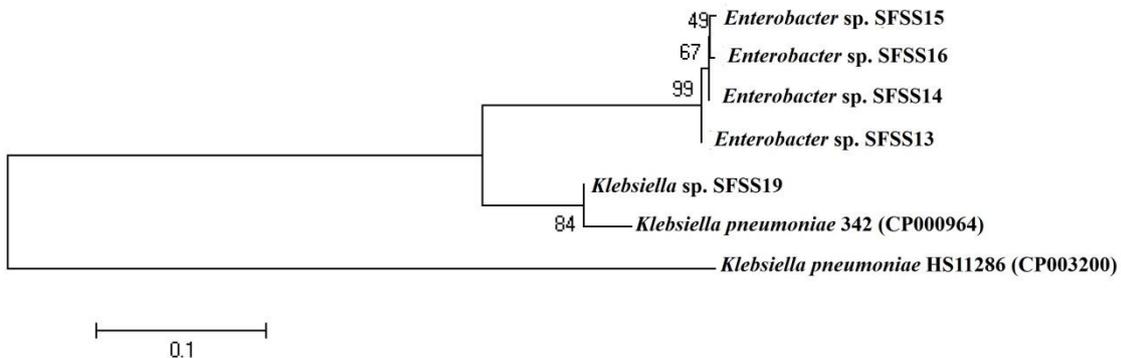


ภาพที่ 4. Phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *csgD* ที่พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella* และเชื้ออ้างอิง ตัวเลขที่ตำแหน่งจุดแยก (node) แสดงค่า bootstrap % ความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้ง แถบด้านล่างที่มีตัวเลขกำกับแสดงจำนวนเบสที่แตกต่างกันต่อความยาวของเส้นแนวนอนใน phylogenetic tree



ภาพที่ 5. Phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LTI* ที่พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia* (*Obesumbacterium*) และเชื้ออ้างอิง

ตัวเลขที่ตำแหน่งจุดแยก (node) แสดงค่า bootstrap % ความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้ง
แถบด้านล่างที่มีตัวเลขกำกับแสดงจำนวนเบสที่แตกต่างกันต่อความยาวของเส้นแนวนอนใน phylogenetic tree



ภาพที่ 6. Phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *uge* ที่พบในเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ *Klebsiella* และ *Enterobacter* และเชื้ออ้างอิง

ตัวเลขที่ตำแหน่งจุดแยก (node) แสดงค่า bootstrap % ความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้ง
แถบด้านล่างที่มีตัวเลขกำกับแสดงจำนวนเบสที่แตกต่างกันต่อความยาวของเส้นแนวนอนใน phylogenetic tree

จาก phylogenetic tree ในภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *csgD* ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ใน 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella* จัดอยู่ใน cluster เดียวกัน มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *csgD* มากกว่าเชื้ออ้างอิงในสกุลเดียวกัน เช่น *Cit. freundii* (GenBank accession number AJ515701) และ *Ent. sakazakii* (GenBank accession number AJ515702) ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ (Zogaj และคณะ 2003) ซึ่งจัดอยู่ในอีก cluster หนึ่ง ในบรรดาเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ใน 3 สกุล *Enterobacter sp. SFSS13* และ *Enterobacter sp. SFSS16* มีความสัมพันธ์ของยีน *csgD* ที่ใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีค่า bootstrap 99% ในขณะที่ *Klebsiella sp. SFSS18* และ *Citrobacter sp. SFEMB2* มีความสัมพันธ์ของยีน *csgD* ที่ใกล้ชิดต่อกันมากกว่าที่มีต่อ *Enterobacter spp.* โดยมีค่า bootstrap 99%

ยีน *LTI* ของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ใน 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter sp. SFEMB5*, *Esc. coli SFEMB6*, *Esc. coli SFEMB7* และ *Hafnia* (*Obesumbacterium*) sp. SFSS20 ต่างก็มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน *LTI* ของ *Esc. coli* สายพันธุ์ 2781-5 (GenBank accession number EU113255) (Lasaro และคณะ 2008) โดยมี % identity อยู่ระหว่าง 99%-100% อย่างไรก็ตาม สามารถวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนได้จาก phylogenetic tree ในภาพที่ 5 *Citrobacter* sp. SFEMB5 และ *Esc. coli* SFEMB7 มีความสัมพันธ์ของยีน *LTI* ใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีค่า bootstrap 94% ซึ่งอยู่ต่าง cluster กับเชื้ออ้างอิง *Esc. coli* สายพันธุ์ 2781-5 (GenBank accession number EU113255) ที่แยกได้เด็กที่ป่วยเป็นโรคท้องร่วงในประเทศบราซิล (Lasaro และคณะ 2008) และยีน *LTI* ของ *Hafnia* (*Obesumbacterium*) sp. SFSS20 มีความใกล้ชิดกับเชื้ออ้างอิงดังกล่าวมากที่สุด โดยจัดอยู่ใน cluster เดียวกัน มีค่า bootstrap 62%

จาก phylogenetic tree ในภาพที่ 6 *Enterobacter* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ SFSS13, SFSS14, SFSS15 และ SFSS 16 มีความสัมพันธ์ของยีน *uge* ใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีค่า bootstrap 99% จัดอยู่ใน cluster เดียวกัน แยกออกจาก cluster ของยีน *uge* จาก *Klebsiella* spp. โดย *Klebsiella* sp. SFSS19 และเชื้ออ้างอิง *K. pneumoniae* สายพันธุ์ 324 (GenBank accession number CP000964) (Fouts และคณะ 2008) มีความสัมพันธ์ของยีน *uge* ใกล้ชิดกันมากที่สุด ที่ค่า bootstrap 94% ในขณะที่ยีน *uge* ของเชื้ออ้างอิง *K. pneumoniae* สายพันธุ์ HS11286 (GenBank accession number CP003200) (Liu และคณะ 2012) แตกต่างอย่างชัดเจน โดยอยู่ใน cluster เดี่ยวแยกออกจาก cluster อื่นๆ

ยีนทั้ง 22 ยีนที่ทำการตรวจหาในเชื้อก่อโรค 11 สกุล ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล เป็นยีนควบคุมการก่อโรคที่มีรายงานว่าพบในเชื้อสกุลต่างๆ ได้แก่ ยีน *cest/ae*, *cnf1*, *cnf2*, *eaeA*, *espB*, *LTI*, *STII*, *vt1* และ *vt2e* มีรายงานพบใน *Esc. coli* (Ahmed และคณะ 2007; Gyles และคณะ 1988; Johnson และคณะ 2010; Lasaro และคณะ 2008; Martins และคณะ 2011; Rahman และ Deka 2014; Rajkhowa และคณะ 2010; Sandner และคณะ 2001; Tomar และคณะ 2015), ยีน *ssaO*, *sscB* และ *sseG* มีรายงานพบใน *Salmonella* (Bhowmick และคณะ 2011; McWhorter และ Chousalkar 2015), ยีน *tdh*, *tlh* และ *trh* มีรายงานพบใน *Vibrio* (Panicker และคณะ 2004; Gutierrez West และคณะ 2013), ยีน *csgD* มีรายงานพบใน *Cit. freundii* (Zogaj และคณะ 2003), *Ent. cloacae* (Akbari และคณะ 2015), *Ent. sukazakii* (Zogaj และคณะ 2003) และ *Esc. coli* (Hammar และคณะ 1995), ยีน *kfu*, *magA* และ *uge* มีรายงานพบใน *Klebsiella* (Aher และคณะ 2012; Fouts และคณะ 2008; Liu และคณะ 2016c; Regue และคณะ 2004) รวมทั้งยีน *aerA*, *ahp* และ *alt* มีรายงานพบใน *A. hydrophila* (Li และคณะ 2011)

ยีน *cesT*, *eae* และ *espB* เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *Esc. coli* กับเซลล์เจ้าบ้าน Sandner และคณะ (2001) ตรวจหายีน *cesT/eae* และ *espB* ใน *Esc. coli* 122 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า 25.4% ของจำนวนสายพันธุ์ มีทั้งยีน *cesT/eae* และ *espB* ในขณะที่ 8.2% ของจำนวนสายพันธุ์ มีเฉพาะยีน *cesT/eae* และ 15.6% ของจำนวนสายพันธุ์ มีเฉพาะยีน *espB*

ยีน *cnf1* และ *cnf2* ควบคุมการสังเคราะห์ cytotoxic necrotizing factor ซึ่งเป็นโปรตีนสารพิษ และเป็น virulence factor ของเชื้อ NTEC สายพันธุ์ก่อโรค มีบทบาทต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Boquet 2001; Yamamoto และคณะ 1995) Rahman และ Deka (2014) ตรวจหายีน *cnf1* และ *cnf2* ในเชื้อ NTEC 84 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ พบว่า 61.9% และ

27.4% ของจำนวนไอโซเลท มียีน *cnf1* และ *cnf2* ตามลำดับ และ 10.7% ของจำนวนไอโซเลท มีทั้งยีน *cnf1* และ *cnf2* Martins และคณะ (2011) รายงานว่า 7.8% ของ *Esc. coli* 64 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเนยผงที่จำหน่ายในตลาดเกษตรกรในประเทศบราซิล มียีน *cnf2*

ยีนควบคุมการสังเคราะห์สารพิษใน *Esc. coli* ได้แก่ ยีน *LTI* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ thermolabile toxin, ยีน *STII* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ heat stable toxin รวมทั้งยีน *vt1* และ *vt2e* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ verocytotoxin Ahmed และคณะ (2007) ตรวจหายีน *LTI* ใน *Esc. coli* 366 ไอโซเลท ที่แยกได้จากมนุษย์, สัตว์ 9 ชนิด และแหล่งน้ำ พบว่า 6 และ 2 สายพันธุ์ มียีน *vt1* และ *vt2e* ตามลำดับ แต่ไม่พบเชื้อที่มียีน *LTI* และ *STII* เช่นเดียวกับใน *Esc. coli* 64 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเนยผงที่จำหน่ายในตลาดเกษตรกรในประเทศบราซิล ที่พบว่าไม่มียีน *LTI* (Martins และคณะ 2011) ในขณะที่ยีน *LTI* พบใน 66.66% ของเชื้อ ETEC ซึ่งก่อโรคท้องร่วงที่แยกได้จากแหล่งน้ำสะอาดในเมือง Gwalior ประเทศอินเดีย (Tomar และคณะ 2015) และยีน *STII* พบใน 14.28% ของเชื้อ STEC serogroup O157 ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรค hemolytic uremic syndrome และโรคท้องร่วง และผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ จากรัฐต่างๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 2000-ปี ค.ศ. 2008 (Rajkhowa และคณะ 2010) ยีน *vt2e* เป็นลักษณะร่วมของ *Esc. coli* 69 สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกหมู 92 ตัวที่ป่วยเป็นโรคบวมน้ำจาก 13 จังหวัดทางตอนเหนือของประเทศเวียดนาม โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *vt2e* จาก *Esc. coli* 19 สายพันธุ์จาก 23 สายพันธุ์ มี % identity เท่ากับ 100% และอีก 4 สายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างเพียงเล็กน้อยในลักษณะ point mutation ที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน (Oanh และคณะ 2010)

ยีน *ssaO* ซึ่งมีบทบาทต่อ type III secretion apparatus, *sscB* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน chaperone และ *sseG* ซึ่งมีบทบาทต่อ secretion system effector ต่างก็เป็นยีนที่อยู่บน SPI-2 Bhowmick และคณะ (2011) พบยีน *ssaO*, *sscB* และ *sseG* ใน *Sal. enterica* ทั้ง 57 ไอโซเลท ใน serovar ต่างๆ ได้แก่ Aba, Anatum, Bareilly, Infantis, Newport, Oslo, Paratyphi และ Weltevreden ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างอาหารทะเล

ยีน *tdh* และ *trh* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ thermostable hemolysin ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง มีบทบาทต่อการก่อโรคของ *Vibrio* ส่วนยีน *tlh* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ thermolabile hemolysin มีรายงานว่าเป็นยีนที่จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* Gutierrez West และคณะ (2013) แยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างน้ำในอ่าว North Inlet รัฐ South Carolina ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า 79%, 48% และ 8.3% ของจำนวนสายพันธุ์ มียีน *tlh*, *tdh* และ *trh* ตามลำดับ Panicker และคณะ (2004) แยก *Vibrio* spp. จากหอยนางรม พบว่า 13%-20% ของจำนวนเชื้อที่แยกได้เป็นสายพันธุ์ก่อโรค ซึ่งมียีน *tdh* หรือ *trh* หรือมีทั้ง 2 ยีน

ยีน *csgD* ควบคุมการสังเคราะห์ curli ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ biofilm (Ogasawara และคณะ 2011) Akbari และคณะ (2015) แยก *Ent. cloacae* 9 ไอโซเลท จากเลือดของผู้ป่วย พบว่าทุกไอโซเลทมียีน *csgD*

ยีน *kfu* ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการดูดซึมธาตุเหล็ก และการแข่งขันแย่งธาตุเหล็กกับเซลล์เจ้าบ้าน, ยีน *magA* (mucoviscosity associated gene) ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) hypermucoviscosity (โคโลนีเป็นเมือกเหนียว) เป็นยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ capsular polysaccharide ของ *K. pneumoniae* serotype K1 จำเป็นต่อการเข้าเกาะเซลล์เจ้าบ้าน และยีน *uge* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ uridine diphosphate galacturonase-4-epimerase จำเป็นต่อการสังเคราะห์ lipopolysaccharide (LPS) ที่มี O-antigen และ capsule polysaccharide (K antigen) (Andrade และคณะ 2014) Aher และคณะ (2012) แยก *Klebsiella* spp. 8 ไอโซเลท จากแพะที่ป่วยและแพะที่มีสุขภาพดี พบว่า 2, 1 และ 5 ไอโซเลท มียีน *kfu*, *magA* และ *uge* ตามลำดับ

ยีน *aerA* ควบคุมการสังเคราะห์สารพิษ aerolysin, ยีน *alt* ควบคุมการสังเคราะห์สารพิษ cytotoxic enterotoxin และยีน *ahp* ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ serine protease และเกี่ยวข้องกับ การกระตุ้นการแสดงออกของยีน *aerA* และการสังเคราะห์ extracellular enzyme อื่นๆ มีการตรวจพบ ยีนเหล่านี้ใน *A. hydrophila* ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก, ปลาที่มีสุขภาพดี และแหล่งน้ำ โดย ไอโซเลทของ *A. hydrophila* ที่มียีนทั้ง 3 ยีน มีความรุนแรงในการก่อโรคต่อปลามากกว่า ไอโซเลทอื่นๆ (Li และคณะ 2011)

ในบรรดาเชื้อแบคทีเรียแต่ละสกุล จะมีเชื้อบางชนิดและบางสายพันธุ์เท่านั้นที่เป็นเชื้อก่อโรค (Iwamoto และคณะ 2010; Parham และคณะ 2005) ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียถูกควบคุมโดยยีนควบคุมการก่อโรคซึ่งมีหลายยีนเรียงลำดับอยู่บน PAI ส่วนใหญ่ PAI มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม (Bhowmick และคณะ 2011; Chakravorty และคณะ 2002; Klein และ Jones 2001; Marcus และคณะ 2000; Morabito และคณะ 2003; Ochman และคณะ 1996; Ostblom และคณะ 2011; Parham และคณะ 2005) การพบยีนควบคุมการก่อโรคเดียวกันในเชื้อแบคทีเรียต่างสกุล ตัวอย่างเช่น ยีน *csgD* ในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella*, ยีน *LTI* ในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia (Obesumbacterium)* และยีน *uge* ในเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ *Enterobacter* และ *Klebsiella* สนับสนุนสมมติฐานที่ว่ายีนควบคุมการก่อโรคสามารถถ่ายทอดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปยังเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งได้ และเพิ่มโอกาสเกิดเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ใหม่

จากการตรวจสอบยีนควบคุมการก่อโรค 22 ยีนในเชื้อก่อโรค 40 สายพันธุ์ซึ่งจัดอยู่ใน 11 สกุลนั้น มีการตรวจพบ 8 ยีน ได้แก่ *cnf2*, *csgD*, *kfu*, *LTI*, *ssaO*, *tlh*, *uge* และ *vt2e* ข้อมูลเกี่ยวกับความถี่ที่พบ ยีนต่างๆ เหล่านี้ในเชื้อแต่ละสกุล สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นเทคนิคในการตรวจหาเชื้อก่อโรค ในตัวอย่างอาหารได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องแยกเชื้อบริสุทธิ์ แต่ใช้การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร และ ยังทราบถึงความเสี่ยงในการก่อโรค ยีน *cnf2* และ *vt2e* พบเฉพาะใน *Esc. coli* และสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เป็นสภาวะเดียวกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เทคนิค multiplex PCR ในการตรวจสอบยีน *cnf2* และ *vt2e* พร้อมกันเพื่อตรวจหา *Esc. coli* ยีน *csgD* พบใน *Citrobacter* และ *Enterobacter* ทุกสายพันธุ์ และใน *Klebsiella* 2 สายพันธุ์จาก 3 สายพันธุ์ที่ตรวจสอบ ดังนั้น ยีน *csgD* สามารถใช้เป็นยีนเป้าหมายเพื่อตรวจหาเชื้อทั้ง 3 สกุลในตัวอย่างอาหาร และเป็นยีนที่มีแนวโน้มการถ่ายโอนไปให้กับเชื้อ

แบคทีเรียในสกุลหรือชนิดอื่นๆ ได้ เช่นเดียวกับยีน *LTI* ซึ่งพบใน *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia* (*Obesumbacterium*) ส่วนยีน *tlh* สามารถใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหา *Vibrio*

7. การทดสอบผลของสภาวะต่างๆ ที่มีต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคโดยใช้เทคนิค RT-PCR

จากผลการทดลองที่พบว่าเชื้อที่แยกได้มียีนควบคุมการก่อโรค ได้แก่ ยีน *cnf2*, *csgD*, *kfu*, *LTI*, *ssaO*, *tlh*, *uge* และ *vt2e* จึงทำการทดสอบผลของสภาวะต่างๆ ที่มีต่อการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในเชื้อแบคทีเรียตัวแทนของแต่ละสกุล ปัจจัยทดสอบที่แปรผันใน 10 สภาวะของการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่

- 1) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหาร LB ซึ่งเป็น rich medium และอาหาร M63 ซึ่งเป็น minimal medium
- 2) ความเข้มข้นของ NaCl ได้แก่ 0M, 0.17M และ 0.3M
- 3) การให้อากาศ ได้แก่ microaerophilic condition และ aerated condition
- 4) อุณหภูมิ ได้แก่ 37°C และ 25°C
- 5) ระยะการเจริญ ได้แก่ early exponential phase (6 ชั่วโมง), mid-exponential phase (12 ชั่วโมง) และ late exponential phase (16 ชั่วโมง)

จากการสกัด total RNA จากตะกอนเซลล์ของเชื้อที่เลี้ยงใน 10 สภาวะทดสอบและสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ตรวจหาการมียีนควบคุมการก่อโรคโดยเทคนิค PCR ในกรณีที่เกิด PCR product ของยีน แสดงว่ายีนนั้นมีการแสดงออกในสภาวะที่ทดสอบ ผลการเกิด PCR product ซึ่งแสดงถึงการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค 8 ยีนใน 10 สภาวะทดสอบ แสดงในตารางที่ 8 และ PCR product ของยีนที่มีการแสดงออก ได้แก่ ยีน *csgD*, *kfu*, *tlh* และ *uge* แสดงในภาพที่ 7 ผลการทดลองพบว่ายีน *tlh* มีการแสดงออกในทุกสภาวะทดสอบ ในขณะที่ยีน *cnf2*, *LTI*, *ssaO* และ *vt2e* ไม่มีการแสดงออกในทุกสภาวะทดสอบ และสภาวะทดสอบมีผลต่อการแสดงออกของยีน *csgD*, *kfu* และ *uge* ดังนี้

สภาวะที่ยีน *csgD* ของเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella* มีการแสดงออก มี 2 สภาวะ ได้แก่ 1) การเจริญในอาหาร M63 ที่ไม่มี NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase และ 2) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl ที่ 37°C, aerated condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase ดังนั้น จากผลการทดลองแสดงว่าปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *csgD* ได้แก่ 1) การมีสารอาหารจำกัดและต้องไม่มี NaCl และ 2) การมีสารอาหารอุดมสมบูรณ์และต้องมีการให้อากาศ

สภาวะที่ยีน *kfu* ของ *Klebsiella* มีการแสดงออก มี 6 สภาวะ ได้แก่ 1) การเจริญในอาหาร LB ที่ไม่มี NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase 2) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase 3) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.3M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase 4) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl ที่ 37°C, aerated condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase 5) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M

NaCl ที่ 25°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase และ 6) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ late exponential phase ดังนั้นปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *kfu* คือ ความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารและระยะการเจริญตั้งแต่ mid-exponential phase ในขณะที่การให้อากาศและอุณหภูมิไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน ส่วนปัจจัยที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *kfu* คือ การมีสารอาหารจำกัด และการเจริญในระยะ early exponential phase

สถานะที่ยีน *uge* ของ *Enterobacter* และ *Klebsiella* มีการแสดงออก มี 2 สถานะ ได้แก่ 1) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase และ 2) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.3M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase ดังนั้นปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *uge* คือ ความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารร่วมกับการมี NaCl, microaerophilic condition ที่ 37°C และการเจริญในระยะ mid-exponential phase ส่วนปัจจัยที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *uge* คือ การมีสารอาหารจำกัด, aerated condition, อุณหภูมิ 25°C และการเจริญในระยะ early exponential phase และ late exponential phase

ข้อมูลเกี่ยวกับสถานะที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค ทำให้ทราบถึงยีนเป้าหมายที่มีความเสี่ยงในการก่อโรค ในขณะที่ยีน *cnf2* ซึ่งพบใน *Esc. coli*, ยีน *LTI* ซึ่งพบใน *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia (Obesumbacterium)*, ยีน *ssaO* ซึ่งพบใน *Salmonella* และยีน *vt2e* ซึ่งพบใน *Esc. coli* ไม่มีการแสดงออกในทุกสถานะที่ทดสอบ ยีน *tlh* ซึ่งพบใน *Vibrio* กลับมีการแสดงออกในทุกสถานะที่ทดสอบ แสดงถึงความเสี่ยงในการก่อโรคของ *Vibrio* ในสถานะที่หลากหลาย ข้อมูลสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวางแผนการเก็บรักษาตัวอย่างอาหาร เช่น ระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาอาหาร จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเซลล์มีการเจริญระยะ early exponential phase (6 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) นั้น ยีน *cnf2*, *csgD*, *LTI*, *ssaO*, *uge* และ *vt2e* ไม่มีการแสดงออก ในขณะที่ยีน *kfu* ซึ่งพบใน *Klebsiella* และยีน *tlh* ซึ่งพบใน *Vibrio* กลับมีการแสดงออก ดังนั้น *Klebsiella* และ *Vibrio* จึงเป็นเชื้อที่มีความเสี่ยงในการก่อโรคในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าเชื้ออื่นๆ นอกจากนี้ การลดอุณหภูมิจาก 37°C เหลือ 25°C และการให้อากาศ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *uge* ซึ่งพบใน *Enterobacter* และ *Klebsiella* ซึ่งเจริญในสถานะเดียวกัน

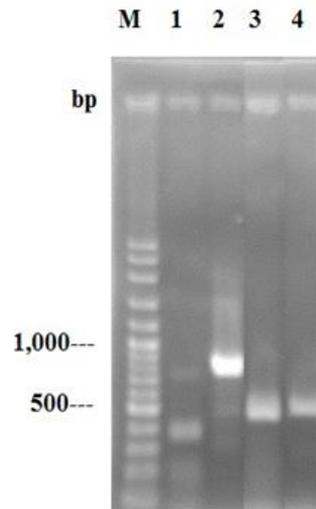
ตารางที่ 8. ผลการเกิด PCR product ซึ่งแสดงถึงการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค 8 ยีนใน 10 สภาวะทดสอบ

สภาวะทดสอบที่	ผลการเกิด PCR product ซึ่งแสดงถึงการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค							
	ยีน <i>cnf2</i> ของ <i>Esc. coli</i> SFEMB6	ยีน <i>csgD</i> ของ <i>Citrobacter</i> SFEMB5, <i>Enterobacter</i> sp. SFSS13 และ <i>Klebsiella</i> sp. SFSS17	ยีน <i>kfu</i> ของ <i>Klebsiella</i> sp. SFSS17	ยีน <i>LTI</i> ของ <i>Citrobacter</i> sp. SFEMB5, <i>Esc. coli</i> SFEMB6 และ <i>Hafnia</i> sp. SFSS20	ยีน <i>ssaO</i> ของ <i>Salmonella</i> sp. SFSS26	ยีน <i>tlh</i> ของ <i>Vibrio</i> sp. SFTCBS4	ยีน <i>uge</i> ของ <i>Enterobacter</i> sp. SFSS13 และ <i>Klebsiella</i> sp. SFSS19	ยีน <i>vt2e</i> ของ <i>Esc. coli</i> SFEMB6
1.	-	-	+	-	-	+	-	-
2.	-	-	+	-	-	+	+	-
3.	-	-	+	-	-	+	+	-
4.	-	+	-	-	-	+	-	-
5.	-	-	-	-	-	+	-	-
6.	-	-	-	-	-	+	-	-
7.	-	+	+	-	-	+	-	-
8.	-	-	+	-	-	+	-	-
9.	-	-	-	-	-	+	-	-
10.	-	-	+	-	-	+	-	-

+: เกิด PCR product ของยีนที่ตรวจสอบ

-: ไม่เกิด PCR product ของยีนที่ตรวจสอบ

สภาวะทดสอบที่ 1: อาหาร LB ที่ไม่มี NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 2: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 3: อาหาร LB ที่มี 0.3M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 4: อาหาร M63 ที่ไม่มี NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 5: อาหาร M63 ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 6: อาหาร M63 ที่มี 0.3M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 7: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, aerated condition, 12 ชั่วโมง; 8: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 9: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 6 ชั่วโมง; 10: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 16 ชั่วโมง



ภาพที่ 7. PCR product ของยีน *csgD*, *kfu*, *tlh* และ *uge* ที่มีการแสดงออกในสภาวะทดสอบ

Lane M: 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia); 1: PCR product ขนาด 355 bp ของยีน *csgD*; 2: PCR product ขนาด 797 bp ของยีน *kfu*; 3: PCR product ขนาด 450 bp ของยีน *tlh*; 4: PCR product ขนาด 534 bp ของยีน *uge*

มีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค โดยผลของปัจจัยอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับยีนแต่ละยีน ตัวอย่างเช่น ปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคที่อยู่บน SPI-1 ของ *Salmonella* ได้แก่ 1) microaerophilic condition (Bajaj และคณะ 1996; Behlau และ Miller 1993; Boddicker และคณะ 2003; Jones และ Falkow 1994; Lee และ Falkow 1990; Lucas และ Lee 2001; Schiemann และ Shope 1991; Temme และคณะ 2008) 2) การเจริญในอาหาร LB ถึงระยะการเจริญ late exponential phase 3) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl (Ibarra และคณะ 2010; Lee และ Falkow 1990; Song และคณะ 2004) 4) การให้อากาศจนถึงการเจริญระยะ late exponential phase (Ibarra และคณะ 2010) 5) glucose 6) mannose และ 7) arabinose (Lim และคณะ 2007) ส่วนปัจจัยที่ลดการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคที่อยู่บน SPI-1 ของ *Salmonella* ได้แก่ 1) 10 mM butyrate (Gantois และคณะ 2006) 2) glucose และ 3) arabinose (Lim และคณะ 2007) ปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคที่อยู่บน SPI-2 ของ *Salmonella* ได้แก่ 1) minimal medium 2) การเจริญที่สภาวะขาดแคลนสารอาหารภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลาหลายชั่วโมง และ 3) การจำกัดปริมาณของ divalent cation (Beuzon และคณะ 1999; Cirillo และคณะ 1998; Deiwick และคณะ 1999; Klein และ Jones 2001) ปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคที่อยู่บน SPI-4 ของ *Salmonella* ได้แก่ 1) การเจริญในอาหาร LB ถึงระยะ late exponential phase และ 2) การเจริญใน minimal medium ที่มีสารอินทรีย์ฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 25 mM (Gerlach และคณะ 2007) ปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคของ *Vibrio* ได้แก่ 1) การเจริญในอาหาร LB ที่ 30°C 2) การเจริญในอาหาร LB ถึงระยะ early exponential phase และ 3) การเขย่าที่ความเร็วรอบต่ำ (Sarkar และคณะ 2002)

ยีนควบคุมการก่อโรคที่ได้ศึกษาผลของสภาวะต่างๆ ที่มีต่อการแสดงออกของยีน ได้แก่ ยีน *cnf2*, *csgD*, *kfu*, *LTI*, *ssaO*, *tlh*, *uge* และ *vt2e* ในการศึกษาที่มีมาก่อน ได้มีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อ

การแสดงออกของยีน *cnf2*, *csgD*, *LT*, *ssaO*, *tlh* และ *uge* สำหรับยีน *kfu* และ *vt2e* ไม่พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน

อุณหภูมิ (37°C และ 20°C) และสถานะความเข้มข้นออสโมติก (osmolarity) ที่มี 0.5M NaCl มีผลต่อการสังเคราะห์สารพิษซึ่งควบคุมโดยยีน *cnf2* เพียงเล็กน้อย (Mourino และคณะ 1996) ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการแสดงออกของยีน *cnf2* ในทั้ง 10 สภาวะทดสอบ

ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *csgD* ได้แก่ 1) cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) (Liu และคณะ 2014) 2) สภาวะ osmolarity ที่มีความเข้มข้นของ sucrose (Jubelin และคณะ 2005) 3) การเจริญในอาหารที่ไม่มีเกลือ (Romling และคณะ 1998) 4) สภาวะขาดแคลนสารอาหาร (ไนโตรเจน, ฟอสเฟต และธาตุเหล็ก) และ 5) microaerophilic condition (Gerstel และ Romling 2001; Romling และคณะ 1998) ในขณะที่ปัจจัยที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *csgD* คือ เอนไซม์ phosphodiesterase (Liu และคณะ 2014) สำหรับอุณหภูมิไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *csgD* (Romling และคณะ 1998; Uhlich และคณะ 2001) ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ายีน *csgD* มีการแสดงออกเมื่อมีการเจริญใน minimal medium ที่ไม่มี NaCl แต่กลับไม่มีการแสดงออกของยีนเมื่อเจริญใน minimal medium ที่มี 0.17M NaCl และ 0.3M NaCl ซึ่งทำให้สภาวะ osmolarity สูงขึ้น และไม่มีการแสดงออกเมื่อเจริญใน rich medium ยกเว้นเมื่อมีการให้อากาศ สอดคล้องกับรายงานของ Romling และคณะ (1998) ที่ว่ายีนควบคุมการสังเคราะห์ curli มีการแสดงออกสูงสุด เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่ไม่มีเกลือ, รายงานของ Prigent-Combaret และคณะ (2001) ที่ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl และ sucrose ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *csgD* และรายงานของ Gerstel และ Romling (2001); Romling และคณะ (1998) ที่ว่าสภาวะขาดแคลนสารอาหารกระตุ้นการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์ curli แต่ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Gerstel และ Romling (2001); Romling และคณะ (1998) ที่ว่ายีน *csgD* มีการแสดงออกสูงสุดที่ microaerophilic condition

ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *LT* ได้แก่ 1) glucose ที่ความเข้มข้น 0.2% w/v (Joffre และ Sjoling 2016) 2) อุณหภูมิ 37°C (Trachman และ Maas 1998; Trachman และ Yasmin 2004) 3) สภาวะ osmolarity ที่มีความเข้มข้นของ NaCl, sucrose และ lithium chloride (LiCl) ((Trachman และ Yasmin 2004) ปัจจัยที่มีผลลดการแสดงออกของยีน *LT* ได้แก่ 1) อุณหภูมิที่ลดลงจาก 37°C (Trachman และ Maas 1998) 2) histone-like nucleoid structuring protein (Trachman และ Yasmin 2004) ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการแสดงออกของยีน *LT* ในทั้ง 10 สภาวะทดสอบ ซึ่งรวมทั้งการเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ early exponential phase แตกต่างจากรายงานของ Trachman และ Yasmin (2004) ที่พบว่ายีน *LT* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเชื้อเจริญในสภาวะดังกล่าว เปรียบเทียบกับการเจริญในอาหาร LB ที่ไม่มี NaCl และการเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.3M NaCl

มีรายงานว่าแสดงออกของยีน *ssaO* เพิ่มขึ้น เมื่อ *Salmonella* เจริญใน human leukocyte antigen (HLA)-B27 (Ge และคณะ 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการแสดงออกของยีน *ssaO* ในทั้ง 10 สภาวะทดสอบ

ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *tlh* ได้แก่ 1) อุณหภูมิต่ำ 9°C และ 2) สภาวะขาดแคลนสารอาหาร ในขณะที่อุณหภูมิต่ำ 9°C ก็มีผลลดการแสดงออกของยีน *tlh* ใน *Vibrio* ต่างสายพันธุ์ (Zhao และคณะ 2015) ในการศึกษาครั้งนี้ พบการแสดงออกของยีน *tlh* ในทั้ง 10 สภาวะทดสอบ

ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *uge* ในข้าว (*Oryza sativa*) คือสภาวะกดดัน เช่น การขาดน้ำ, เกลือ และรังสี UV (Kim และคณะ 2009) ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *uge2* ได้มากใน *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นยีสต์ก่อโรค คือ การเจริญในอาหารที่มี galactose ที่ 30°C และ 37°C โดยที่ยีน *uge1* สามารถทำหน้าที่แทนยีน *uge2* ได้เฉพาะกรณีการเจริญในอาหารที่มี galactose ที่ 37°C (Moyrand และคณะ 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ายีน *uge* มีการแสดงออก เมื่อเชื้อเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl หรือ 0.3M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase

8. การศึกษาผลของการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรคที่มีต่อการเจริญของเชื้อ, การเคลื่อนที่ และการสังเคราะห์ biofilm

จากการทดสอบผลของสภาวะต่างๆ ที่มีต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค พบว่าสภาวะทดสอบมีผลต่อการแสดงออกของยีน *csgD*, *kfu* และ *uge* แต่ยีน *kfu* พบเฉพาะใน *Klebsiella* sp. SFSS17 ซึ่งไม่มี flagella จึงไม่ใช้ *Klebsiella* ในการทดสอบการเคลื่อนที่ สำหรับยีน *csgD* เป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์ curli ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ biofilm (Ogasawara และคณะ 2011) และยีน *uge* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ lipopolysaccharide และ capsule polysaccharide (Andrade และคณะ 2014) จึงทดสอบการแสดงออกของยีน *csgD* และ *uge* ต่อการเคลื่อนที่และการสังเคราะห์ biofilm ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อตัวแทน คือ *Enterobacter* sp. SFSS13 สำหรับการศึกษาผลของการแสดงออกของยีน *csgD* และ *uge* ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ, การเคลื่อนที่ และการสังเคราะห์ biofilm และ *Klebsiella* sp. SFSS17 สำหรับการศึกษาผลของการแสดงออกของยีน *kfu* ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ ผลของการแสดงออกของยีน *csgD* และ *uge* ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ, การเคลื่อนที่ และการสังเคราะห์ biofilm ของ *Enterobacter* sp. SFSS13 แสดงในตารางที่ 9 ผลการแสดงออกของยีน *kfu* ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Klebsiella* sp. SFSS17 แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 9. ผลของการแสดงออกของยีน *csgD* และ *uge* ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ, การเคลื่อนที่ และการสังเคราะห์ biofilm ของ *Enterobacter* sp. SFSS13

สภาวะทดสอบที่	ผลของการแสดงออกของยีน <i>csgD</i> , <i>kfu</i> และ <i>uge</i> ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ, การเคลื่อนที่ และการสังเคราะห์ biofilm			
	การแสดงออกของยีน	จำนวนเชื้อ (log CFU/มิลลิลิตร)	การเคลื่อนที่ (มิลลิเมตร ของเส้นผ่านศูนย์กลางของ growth halo)	การสังเคราะห์ biofilm (ค่า OD550)
1.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> -	8.82 ± 0.09	9.33 ± 0.58	0.17 ± 0.02
2.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> +	9.99 ± 0.03	9.33 ± 0.58	0.22 ± 0.02
3.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> +	9.94 ± 0.04	8.00 ± 1.00	0.24 ± 0.03
4.	<i>csgD</i> + <i>uge</i> -	7.77 ± 0.10	4.67 ± 0.58	0.52 ± 0.03
5.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> -	7.92 ± 0.04	8.00 ± 0.00	0.27 ± 0.05
6.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> -	7.40 ± 0.38	7.67 ± 0.58	0.30 ± 0.02
7.	<i>csgD</i> + <i>uge</i> -	9.91 ± 0.09	5.67 ± 0.58	0.39 ± 0.03
8.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> -	8.87 ± 0.09	7.67 ± 0.58	0.24 ± 0.04
9.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> -	8.21 ± 0.27	6.33 ± 0.58	0.11 ± 0.02
10.	<i>csgD</i> - <i>uge</i> -	9.98 ± 0.09	9.33 ± 0.58	0.33 ± 0.02

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation (SD)

+: มีการแสดงออกของยีน; -: ไม่มีการแสดงออกของยีน

สภาวะทดสอบที่ 1: อาหาร LB ที่ไม่มี NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 2: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 3: อาหาร LB ที่มี 0.3M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 4: อาหาร M63 ที่ไม่มี NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 5: อาหาร M63 ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 6: อาหาร M63 ที่มี 0.3M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 7: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, aerated condition, 12 ชั่วโมง; 8: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 9: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 6 ชั่วโมง; 10: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 16 ชั่วโมง

ตารางที่ 10. ผลของการแสดงออกของยีน *kfu* ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Klebsiella* sp. SFSS17

สภาวะทดสอบที่	ผลของการแสดงออกของยีน <i>kfu</i> ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ	
	การแสดงออกของยีน	จำนวนเชื้อ (log CFU/มิลลิลิตร)
1.	+	9.39 ± 0.15
2.	+	9.99 ± 0.03
3.	+	9.83 ± 0.12
4.	-	7.68 ± 0.03
5.	-	7.94 ± 0.03
6.	-	7.95 ± 0.06
7.	+	9.95 ± 0.02
8.	+	9.87 ± 0.08
9.	-	7.99 ± 0.04
10.	-	9.98 ± 0.02

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation (SD)

+: มีการแสดงออกของยีน; -: ไม่มีการแสดงออกของยีน

สภาวะทดสอบที่ 1: อาหาร LB ที่ไม่มี NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 2: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 3: อาหาร LB ที่มี 0.3M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 4: อาหาร M63 ที่ไม่มี NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 5: อาหาร M63 ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 6: อาหาร M63 ที่มี 0.3M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 7: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, aerated condition, 12 ชั่วโมง; 8: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 12 ชั่วโมง; 9: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 6 ชั่วโมง; 10: อาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl, 37°C, microaerophilic condition, 16 ชั่วโมง

Enterobacter sp. SFSS13 มีการแสดงออกของยีน *csgD* และ *uge* แต่ในต่างสภาวะ โดยยีน *csgD* มีการแสดงออกใน 2 สภาวะ ได้แก่ 1) การเจริญอาหาร M63 ที่ไม่มี NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase และ 2) การเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl ที่ 37°C, aerated condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase ส่วนยีน *uge* มีการแสดงออกเมื่อเจริญในอาหาร LB ที่มี 0.17M NaCl หรือ 0.3M NaCl ที่ 37°C, microaerophilic condition ในระยะการเจริญ mid-exponential phase สภาวะที่มีการแสดงออกของยีน *csgD* ทั้ง 2 สภาวะ มีการสังเคราะห์ biofilm เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างจากสภาวะอื่นๆ และการเคลื่อนที่ของเชื้อแปรผกผันกับการสังเคราะห์ biofilm สภาวะที่มีการแสดงออกของยีน *csgD* ทั้ง 2 สภาวะ เชื้อมีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างจากสภาวะอื่นๆ ยกเว้นสภาวะที่เชื้อมีการเจริญในระยะ early exponential phase เนื่องจากยีน *csgD* ควบคุมการสังเคราะห์ curli ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ biofilm และโปรตีน CsgD ยับยั้งการสร้าง flagella จึงลดการเคลื่อนที่ของเชื้อ (Ogasawara และคณะ 2011) ถึงแม้ว่ายีน *uge* จำเป็นต่อการสังเคราะห์ lipopolysaccharide และ capsule polysaccharide (Andrade และคณะ 2014) แต่พบว่าการแสดงออกของยีน *uge* ไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการสังเคราะห์ biofilm และการเคลื่อนที่ของเชื้อ การสังเคราะห์ biofilm นอกจากรู้ขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน *csgD* แล้ว ยังมีรายงานยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ biofilm เช่น ยีน *fimH* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ type I fimbriae (Andrade และคณะ 2014), ยีน *treC* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ trehalose-6-phosphate hydrolase (Wu และคณะ 2011), ยีนควบคุมการสังเคราะห์ autoinducer-2 (Balestrino และคณะ 2005), type III fimbriae (Di Martino และคณะ 2003) และ poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA) adhesin (Agladze และคณะ 2005)

การแสดงออกของยีน *csgD*, *kfu* และ *uge* ไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของ *Enterobacter* sp. SFSS13 และ *Klebsiella* sp. SFSS17 ในทั้ง 10 สภาวะทดสอบ เชื้อมีการเจริญโดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น แสดงถึงความสามารถของเชื้อในการปรับตัวของเชื้อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อม เช่น สภาวะขาดแคลนสารอาหาร และสภาวะภายในเซลล์เจ้าบ้าน รวมถึงสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งมีความสำคัญต่อการก่อโรคและการระบาดของเชื้อ อย่างไรก็ตาม ชนิดของอาหารและระยะการเจริญมีผลต่อจำนวนเซลล์ เชื้อมีการเจริญในอาหาร LB ซึ่งเป็น rich medium ได้ดีกว่าอาหาร M63 ซึ่งเป็น minimal medium และจำนวนเซลล์ในระยะการเจริญ mid-exponential phase และ late exponential phase สูงกว่าจำนวนเซลล์ในระยะการเจริญ early exponential phase อย่างมีนัยสำคัญ แต่จำนวนเซลล์ในระยะการเจริญ mid-exponential phase เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ late exponential phase เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สรุปผลการวิจัย

1. จากการแยกเชื้อเป้าหมายใน 4 สกุล ได้แก่ *Esc. coli*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* โดยใช้อาหารคัดเลือก พบว่าอาหารทะเล 35 ตัวอย่างจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเล 3 แห่ง ได้แก่ 1) ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร 2) ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และ 3) ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง มี 14 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับทั้ง 4 สกุล ในขณะที่ตัวอย่างที่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Esc. coli* บนอาหาร EMB agar มีจำนวนตั้งแต่ 5.33 ± 4.73 ถึง 70.00 ± 7.55 CFU/กรัม, ตัวอย่างที่พบลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Salmonella* และ *Shigella* บนอาหาร SS agar มีจำนวนตั้งแต่ 205.33 ± 20.21 ถึง 272.00 ± 18.52 CFU/กรัม และตัวอย่างที่พบเชื้อลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับ *Vibrio* บนอาหาร TCBS agar มีจำนวนตั้งแต่ 4.67 ± 2.09 ถึง 150.67 ± 28.04 CFU/กรัม

2. เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 42 ไอโซเลท มีรูปแบบ ERIC-PCR 40 รูปแบบ แสดงว่าเป็นเชื้อ 40 สายพันธุ์

3. จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อระบุสกุลของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 40 สายพันธุ์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับเชื้อใน 11 สกุล ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia (Obesumbacterium)*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella* และ *Vibrio* ซึ่งมีค่า % identity อยู่ระหว่าง 98%-99%

4. จากการตรวจสอบยีน *phoA* ซึ่งมีรายงานจำเพาะต่อ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Shigella*, ยีน *fimC* ซึ่งมีรายงานจำเพาะต่อ *Salmonella* และ Sdf I fragment ซึ่งมีรายงานจำเพาะต่อ *Sal. enterica* serovar Enteritidis จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 40 สายพันธุ์ โดยเทคนิค PCR พบยีน *phoA* ใน *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia (Obesumbacterium)*, ยีน *fimC* ใน *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* และ *Salmonella* และ Sdf I fragment ใน *Salmonella*

5. จากการตรวจสอบยีนควบคุมการก่อโรค 22 ยีน ได้แก่ ยีน *aerA*, *ahp*, *alt*, *cesT/eae*, *cnf1*, *cnf2*, *csgD*, *eaeA*, *espB*, *kfu*, *LTI*, *magA*, *ssaO*, *sscB*, *sseG*, *STII*, *tdh*, *tlh*, *trh*, *uge*, *vt1* และ *vt2e* ในเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 40 สายพันธุ์ พบยีนควบคุมการก่อโรค 8 ยีน ได้แก่ ยีน *cnf2*, *csgD*, *kfu*, *LTI*, *ssaO*, *tlh*, *uge* และ *vt2e* ในเชื้อ 26 สายพันธุ์ โดยยีน *cnf2* และ *vt2e* พบเฉพาะใน *Esc. coli*, ยีน *csgD* พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella*, ยีน *kfu* พบเฉพาะใน *Klebsiella*, ยีน *LTI* พบในเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia (Obesumbacterium)*, ยีน *ssaO* พบเฉพาะใน *Salmonella*, ยีน *tlh* พบเฉพาะใน *Vibrio* และยีน *uge* พบในเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ *Enterobacter* และ *Klebsiella*

6. ข้อมูลเกี่ยวกับความถี่ที่พบยีนควบคุมการก่อโรคในเชื้อแต่ละสกุล สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นเทคนิคในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารได้อย่างรวดเร็ว เช่น ใช้เทคนิค multiplex

PCR ในการตรวจสอบยีน *cnf2* และ *vt2e* พร้อมกันเพื่อตรวจหา *Esc. coli*, ยีน *csgD* สามารถใช้เป็นยีนเป้าหมายเพื่อตรวจหา *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Klebsiella*, ยีน *LTI* สามารถใช้เป็นยีนเป้าหมายเพื่อตรวจหา *Citrobacter*, *Esc. coli* และ *Hafnia (Obesumbacterium)* และยีน *tlh* สามารถใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหา *Vibrio*

7. จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนควบคุมการก่อโรค 8 ยีนในสภาวะทดสอบ 10 สภาวะ พบว่ายีน *tlh* มีการแสดงออกในทุกสภาวะทดสอบ ในขณะที่ยีน *cnf2*, *LTI*, *ssaO* และ *vt2e* ไม่มีการแสดงออกในทุกสภาวะทดสอบ สภาวะทดสอบมีผลต่อการแสดงออกของยีน *csgD*, *kfu* และ *uge* โดยปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *csgD* คือ การมีสารอาหารจำกัดร่วมกับการไม่มี NaCl และการให้อากาศ, ปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *kfu* คือ ความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหาร และระยะเวลาเจริญตั้งแต่ mid-exponential phase และปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *uge* คือ ความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารร่วมกับการมี NaCl, microaerophilic condition ที่ 37°C และการเจริญในระยะ mid-exponential phase

8. การแสดงออกของยีน *csgD* เพิ่มการสังเคราะห์ biofilm อย่างมีนัยสำคัญ และลดการเคลื่อนที่ของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่ส่งเสริมความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ