

ปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อก่อโรคที่พบในอาหาร *วibriโอ พาราฮีโมไลติคัส*

กนกรัตน์ ชลศิลป์

สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

Received: August 27, 2019

Revised: February 23, 2020

Accepted: March 24, 2020

บทคัดย่อ

Vibrio parahaemolyticus เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษหรือโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ซึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลแบบดิบ หรือกึ่งสุกกึ่งดิบ การแพร่กระจายของการติดต่อของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่างๆ ในคนและสิ่งแวดล้อมซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อโรคนั้นยังคงมีการศึกษาค้นคว้าต่อไป บทความนี้กล่าวถึงปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคที่สำคัญของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค อันประกอบด้วย สารพิษ 2 ชนิด คือ thermostable direct hemolysin (TDH) และ thermostable direct-related hemolysin (TRH) กับระบบขนส่งโปรตีน type three secretion system (T3SS) 2 ระบบ คือ ระบบที่ 1 T3SS1 และระบบที่ 2 T3SS2 จากการศึกษาคุณสมบัติของปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคแต่ละชนิดพบว่า สารพิษ TDH กับ TRH และระบบขนส่งโปรตีน T3SS2 มีผลให้เกิดอาการระว่ง (enterotoxicity) สำหรับระบบขนส่งโปรตีน T3SS1 ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (cytotoxicity) และส่งเสริมให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดในเซลล์โฮสต์ได้ การใช้ตัวติดตามปัจจัยรุนแรงในการก่อโรคของสายพันธุ์ก่อโรคจะเป็นประโยชน์สำหรับการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาและการติดตามสายพันธุ์

คำสำคัญ: *วibriโอ พาราฮีโมไลติคัส* ปัจจัยก่อความรุนแรง สารพิษ TDH สารพิษ TRH ระบบขนส่งโปรตีน T3SS

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:

กนกรัตน์ ชลศิลป์

สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

272 หมู่ 9 ถนนสุราษฎร์-นาสาร ตำบลขุนทะเล

อำเภอเมืองฯ จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

อีเมล: kaknokrat.cho@sru.ac.th

Virulence factors of foodborne pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*

Kaknokrat Chonsin

Public Health Program, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is one of the major causes of food poisoning or gastroenteritis outbreaks in Thailand and other countries due to the improper seafood consumption. The spread of transmission of *V. parahaemolyticus* strains in humans and environments and their virulence factors remains to be established. This study reviewed the virulence factors of pathogenic *V. parahaemolyticus* strains which composed of 2 hemolysins, thermostable direct hemolysin (TDH) and thermostable direct-related hemolysin (TRH), as well as 2 kinds of type three secretion system (T3SS), T3SS1 and T3SS2. The TDH, TRH and T3SS2 cause enterotoxicity while the T3SS1 contributes to cytotoxicity and enhances the survival of bacteria in host cells. More significantly, probing the virulence factors of pathogenic strains would be essential for the epidemiological surveillance and monitoring.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, virulence factors, TDH, TRH, T3SS

Corresponding Author:

Kaknokrat Chonsin

Public Health Program, Faculty of Science and Technology,

Suratthani Rajabhat University

272 Moo 9, Surat-Nasan Rd., Khun Talae,

Muang, Surat Thani, 84100 Thailand

E-mail: kaknokrat.cho@sru.ac.th

บทนำ

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญเติบโต และอาศัยอยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย ดังนั้น จึงมักแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากทั้งน้ำทะเล อาหารทะเล รวมถึงตะกอนดินชายฝั่งทะเล^{1,2} แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ถูกพบครั้งแรกจากการระบาดของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ในเมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ. 1950 ผู้ป่วยมีประวัติการรับประทานลูกปลาสดแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ ที่เรียกในชื่อภาษาญี่ปุ่นว่า ชิราสุ (Shirasu)³ ทั้งนี้การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *V. parahaemolyticus* มักจะสัมพันธ์กับการรับประทานอาหารทะเลแบบดิบหรือกึ่งสุกกึ่งดิบ จากรายงานต่างๆ พบแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุหลักของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ได้แก่ อเมริกา ยุโรป และเอเชีย รวมทั้งประเทศไทย^{4,5,6} และจากข้อมูลของสำนักโรคติดต่อทั่วไป กระทรวงสาธารณสุข พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2554 โดยพบว่าสัดส่วนของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* คิดเป็นร้อยละ 50 ต่อปี⁷ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *V. parahaemolyticus* ทั้งในประเทศไทยและประเทศญี่ปุ่นมีแนวโน้มลดลง^{8,9}

V. parahaemolyticus แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic strain) และสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) สายพันธุ์ไม่ก่อโรคพบได้ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมถึงร้อยละ 98-99 ในขณะที่สายพันธุ์ที่ก่อโรคนั้น โดยทั่วไปพบได้จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) สายพันธุ์ก่อโรคสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ชนิด thermostable direct hemolysin (TDH) และ/หรือ

TDH-related hemolysin (TRH) การสร้าง TDH และ TRH ถูกควบคุมโดยยีน *tdh* และ *trh* ตามลำดับ^{10,11,12} ต่อมาในปี 2003 ภายหลังจากทำ completed genome sequencing ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 พบปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคชนิดใหม่ คือ type three secretion systems (T3SSs) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ T3SS1 และ T3SS2 โดยพบว่า T3SS1 จะอยู่บนโครโมโซมที่ 1 สำหรับ T3SS2 นั้นจะอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว¹³ สำหรับ T3SS1 นั้นพบได้ใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ทั้งสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ไม่ก่อโรค แต่สำหรับ T3SS2 พบได้ในสายพันธุ์ที่ก่อโรคเท่านั้น โดย T3SS2 สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ชนิดด้วยกัน คือ T3SS2- α และ T3SS2- β ซึ่งพบได้ในสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และ *trh* ตามลำดับ¹⁴

สายพันธุ์ที่ระบาดทั่วโลก หรือ pandemic strain ของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* คือ สายพันธุ์ที่มียีน *tdh* (*tdh*⁺) ซีโรไทป์ O3:K6 ซึ่งเริ่มระบาดเป็นครั้งแรกที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดีย ในปี 1996 ต่อมาภายหลังพบการระบาดของสายพันธุ์ดังกล่าวทั่วโลก ซึ่งนอกเหนือจากซีโรไทป์ O3:K6 ยังพบ pandemic serovariants เช่น O1:KUT, O1:K25 และ O4:K68 เป็นต้น โดย pandemic serovariants ดังกล่าวนี้นี้ ให้ผล *toxRS* sequence หรือ group-specific PCR (GS-PCR), arbitrarily prime PCR, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles, ribotyping และ multilocus sequence typing (MLST) เดียวกันกับ *tdh*⁺ O3:K6 pandemic strain ดังนั้น การอุบัติและแพร่กระจายของ *tdh*⁺ *V. parahaemolyticus* serotype O3:K6 และ serovariants ในประเทศต่างๆ ตั้งแต่ปี 1996 นั้นถือเป็นจุดเริ่มต้นของการระบาดของสายพันธุ์ระบาดทั่วโลก หรือ pandemic strain¹⁵ ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบสายพันธุ์ระบาด

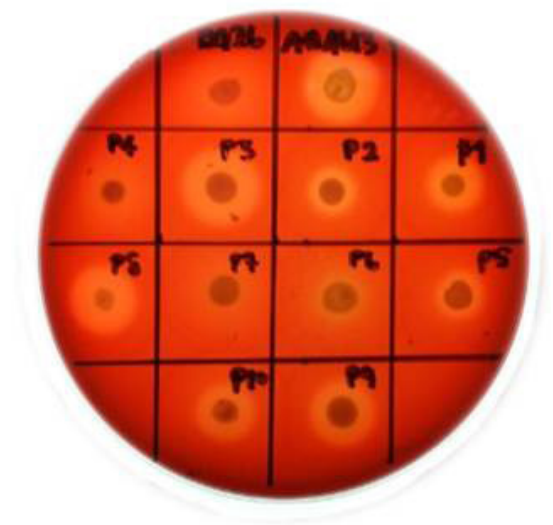
ทั่วโลกได้ ทั้งในตัวอย่างผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงและตัวอย่างน้ำทะเล^{16,17} นอกเหนือจากนี้ ซีโรไทป์ O3:K6 ก่อนการระบาดทั่วโลกปี 1996 นั้น เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษชนิด *trh*¹⁸ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันที่ทำให้สายพันธุ์ระบาดทั่วโลก ซีโรไทป์ O3:K6 เปลี่ยนมาสร้างสารพิษชนิด *tdh* รวมถึงปัจจัยที่มีผลต่อความคงอยู่ของสายพันธุ์ O3:K6 *tdh*⁺ ในสิ่งแวดล้อมนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

โรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมีอาการเล็กน้อย ไม่รุนแรงและสามารถหายเองได้ สำหรับในรายที่มีอาการรุนแรง ในผู้ใหญ่จะแนะนำให้ใช้ยา tetracycline ในการรักษา นอกจากนี้ อาจจะใช้ยา doxycycline ยา fluoroquinolones ยา gentamicin และยา cefotaxime ในการรักษาโรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียชนิดนี้ได้¹⁹ สำหรับปัจจัยก่อความรุนแรง (virulence factors) ที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ประกอบด้วย สารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น มี 2 ชนิด คือ thermostable direct hemolysin (TDH) กับ TDH-related hemolysin (TRH) และระบบการขนส่งโปรตีน type three secretion system (T3SS) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

สารพิษชนิด thermostable direct hemolysin (TDH)

สารพิษ thermostable direct hemolysin หรือ TDH ถูกควบคุมโดยยีน *tdh* ซึ่งยีนชนิดนี้พบได้ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิดของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค²⁰ สารพิษชนิด TDH เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ มีชื่อว่า Wagatsuma agar เกิดเป็นวงใสรอบโคโลนีแบบ β -hemolysis ซึ่งเรียก

ปรากฏการณ์นี้ว่า Kanagawa phenomenon (KP) เป็นบวก หรือ KP⁺²¹ (รูปที่ 1) โดยส่วนใหญ่ มากกว่าร้อยละ 90 ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจะให้ผล KP⁺ ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ให้ผล KP⁺ มีเพียงร้อยละ 1-2 เท่านั้น²² จากการทดสอบคุณสมบัติของสารพิษ TDH ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง พบว่า สารพิษ TDH มีคุณสมบัติย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) ทำให้เกิดอุจจาระร่วง (enterotoxigenicity) เป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxic activity) และเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)^{23,24,25,26,27,28,29,30,31}



รูปที่ 1 การทดสอบ Kanagawa phenomenon (สายพันธุ์ AQ4613 และ BG26 คือ ตัวควบคุมบวกและลบ ตามลำดับ)

Honda และคณะ²⁸ ทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของสารพิษ TDH พบว่า สารพิษชนิดนี้ทำให้เกิดรูพรุนขนาดประมาณ 2 นาโนเมตร บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งทำให้สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคน กระต่ายและแกะ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของม้าได้¹¹ กลไกการทำลายเม็ดเลือดแดงของสารพิษ TDH ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้ 1) สารพิษ TDH

จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง 2) สารพิษ TDH ทำให้เกิดรูพรุนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และ 3) สารพิษ TDH ย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง Yoh และคณะพบว่า สารพิษ TDH เหนียวน้ำให้เกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันของโปรตีนขนาด 25 kDa บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งถือเป็นขั้นตอนสำคัญของการสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของสารพิษดังกล่าว ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นี้จะต้องอาศัย protein kinase C ดังนั้น ถ้ามีการยับยั้ง protein kinase C จะสามารถยับยั้งการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยสารพิษ TDH ได้³¹ นอกจากนี้คุณสมบัติย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงดังกล่าวแล้ว สารพิษ TDH ยังมีคุณสมบัติทำลายเซลล์ (cytotoxicity) โดยพบว่า สารพิษ TDH สามารถทำลายโครงสร้างของ lipid rafts ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยไปทำให้เกิดการลดลงของ cholesterol หรือ sphingomyelin²⁹

สารพิษ TDH มีคุณสมบัติทำให้เกิดความเป็นพิษต่อหัวใจของสัตว์ทดลอง โดยการทดลองของ Honda และคณะ พบว่า สารพิษ TDH มีผลทำให้จังหวะการเต้นของหัวใจหนูทดลองผิดปกติ และส่งผลให้หนูทดลองตายอย่างรวดเร็วภายหลังฉีดสารพิษ TDH ให้แก่หนูทดลองทางเส้นเลือดดำหรือทางช่องท้อง โดยที่สารพิษ TDH มีค่า lethal dose (LD) เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อหนูทดลอง ซึ่งสารพิษ TDH ทำให้หนูทดลองตายภายใน 1 นาที^{26,27}

สารพิษ TDH ถือเป็น enterotoxin ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง โดยทำให้เกิดการสะสมของสารน้ำในลำไส้กระต่ายและหนูทดลอง^{23,24} จากการศึกษาพบว่า กลไกดังกล่าวจะต้องอาศัยแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ที่อยู่ภายในเซลล์เป็นตัวช่วยในการออกฤทธิ์³² Baffone และคณะ ทดสอบคุณสมบัติ enteropathogenic activity ของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ 2067 และ 3305 ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ให้ผลบวกต่อ TDH

พบว่า แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมของสารน้ำในลำไส้ของหนูทดลองได้²³

สายพันธุ์ที่ให้ผล KP^+ จะมียีน *tdh* 2 ชุด³³ คือ *tdh1* และ *tdh2* (หรือ *tdhA* และ *tdhS*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมวงที่ 2 ของ *V. parahaemolyticus*^{13,34,35} การโคลนยีน *tdh* เกิดขึ้นครั้งแรกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ให้ผล KP^+ ชื่อว่าสายพันธุ์ WP1³⁶ ยีน *tdh* ดังกล่าวถูกตั้งชื่อว่า *tdh1*³⁵ และทราบลำดับเบสโดยการทำการ sequencing ภายหลังในปี ค.ศ. 1985³⁷ ต่อมา Nishibuchi และคณะ พัฒนา *tdh* probe ที่ใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อ *tdh* โดยวิธี DNA colony hybridization ผลการสำรวจพบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยให้ผลบวกร้อยละ 81 (82/101) และร้อยละ 15 (6/40) สำหรับสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ยีน *tdh* ดังกล่าวนี้นี้มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค ไม่ตรวจพบในแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น รวมถึงแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ยกเว้น *V. hollisae* โดยที่ยีน *tdh* จาก *V. hollisae* ให้ผลคล้ายคลึงแต่ไม่เหมือนกันร้อยละ 100 กับยีน *tdh* จาก *V. parahaemolyticus*³⁸

การตรวจยีน ยีน แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*⁺ สำหรับตัวอย่างทางการแพทย์ และการตรวจติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อาหารทะเล น้ำทะเล น้ำกร่อย และดินตะกอนชายฝั่ง ในปัจจุบันใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัย oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อยีน *tdh* ซึ่งสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วกว่าและแม่นยำกว่าวิธีดั้งเดิม^{39,40,41,42,43,44,45}

สารพิษชนิด TDH-related hemolysin (TRH)

Honda และคณะ ศึกษาแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ 4307 ที่แยกได้จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่เป็นนักท่องเที่ยวที่เดินทางไปยังประเทศมัลดีฟส์ ในระหว่างเกิดการระบาดของ

โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ในปี ค.ศ. 1985 ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวให้ผล KP เป็นลบ (KP⁻) และสร้างสารพิษที่ชื่อว่า TDH-related hemolysin หรือ TRH สารพิษชนิดนี้มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับสารพิษ TDH ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติการทนความร้อนพบว่า สารพิษ TRH จะไม่ทนต่อความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ในขณะที่สารพิษ TDH สามารถทนความร้อนมากกว่าสารพิษ TRH โดยสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 70-100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที¹⁰ การเปรียบเทียบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของสารพิษ TDH และ TRH ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเม็ดเลือดแดงของ คนและสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ หนู กระต่าย ลูกวัว หนูตะเภา ไก่ แกะ และม้า ผลปรากฏว่า สารพิษ TRH สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแกะ ลูกวัว และ ไก่ ตามลำดับ แต่สารพิษ TDH สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของหนู กระต่าย และคน ตามลำดับ และสารพิษ TRH แสดงคุณสมบัติเป็น enterotoxin คือ กระตุ้นให้เกิดการสะสมของสารน้ำในลำไส้ของ กระต่ายอีกด้วย⁴⁶ นอกจากนี้ ลำดับกรดอะมิโนของ สารพิษ TRH ยังมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรด อะมิโนของสารพิษ TDH ถึงร้อยละ 67¹¹

สารพิษ TRH เป็นโปรตีนที่ถูกควบคุม การสร้างโดยยีน *trh* แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ *trh1* และ *trh2*³⁵ สายพันธุ์ TRH⁺ พบได้จาก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *tdh* จากรายงานพบว่าสายพันธุ์ที่มียีน *trh* จะพบได้ถึง ร้อยละ 8 ของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วย และพบว่าสายพันธุ์ที่มียีน *trh* จะให้ผลบวกต่อเอนไซม์ยูรีเอสเสมอ แสดงให้เห็น ว่ายีน *trh* มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งถูกควบคุมการผลิตโดยยีน *ure*⁴⁷ มีหลักฐาน แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของยีน *trh* และยีน *ure* อยู่ใกล้เคียงกัน คือ อยู่บนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

ชิ้นเดียวกัน เมื่อย่อยโครโมโซมของแบคทีเรียด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI*⁴⁸ ดังนั้น การสร้างเอนไซม์ ยูรีเอสจึงใช้เป็นตัวตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *trh*⁴⁷

ระบบขนส่งโปรตีน type three secretion system (T3SS)

การวิเคราะห์จีโนมของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 ซีโรไทป์ O3:K6 ซึ่งเป็น สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อ KP และยีน *tdh* แสดง ให้เห็นว่านอกจากสารพิษ TDH แล้ว ยังพบปัจจัย ก่อความรุนแรงของโรคชนิดใหม่ คือ ระบบการ ขนส่งโปรตีน type three secretion system หรือ T3SS แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมี T3SS จำนวน 2 ระบบ ซึ่งระบบที่ 1 (T3SS1) อยู่บน โครโมโซมวงที่ 1 และระบบที่ 2 (T3SS2) อยู่บน โครโมโซมวงที่ 2¹³ T3SS เป็นระบบการขนส่ง โปรตีนหรือสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้นแล้ว ส่งตรงยังไซโทพลาสซึมของเซลล์ยูคาริโอต เพื่อ เปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ยูคาริโอต โดยอาศัยโครงสร้างที่มีลักษณะคล้าย เข็มฉีดยา (needle-like apparatus) ซึ่งโครงสร้าง ดังกล่าวประกอบขึ้นด้วยโปรตีนมากกว่า 20 ชนิด และมีลำดับกรดอะมิโนเป็นแบบอนุรักษ์ที่จำเพาะ ต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด⁴⁹

ระบบขนส่งโปรตีน *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1

ยีนกลุ่ม T3SS1 (T3SS1 gene cluster) ของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีความ คล้ายคลึงกับ T3SS ของแบคทีเรีย *Yersinia* spp. เปรียบเทียบตามจำนวนของยีนโดยเฉพาะกลุ่มยีน *ysc* ของ *Yersinia* T3SS ความเหมือนกันของยีน (gene identity) และการเรียงลำดับของยีน⁵⁰ การแสดงออก ของยีน T3SS1 จะถูกเหนี่ยวนำโดยการเจริญในอาหาร

เลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมต่ำ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งคล้ายกับสภาวะการเจริญสำหรับเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *Yersinia* T3SS⁵¹

T3SS1 จะปรากฏบนโครโมโซมที่ 1 ของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ และถือว่าเป็นยีนที่จำเพาะกับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โปรตีนหรือสารพิษที่ส่งผ่านระบบการขนส่งโปรตีน T3SS1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเจริญร่วมกับเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa แต่ไม่มีผลทำให้เกิดการสะสมของสารน้ำในลำไส้กระต่าย จึงไม่มีผลทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วง ยีนที่สร้างสารพิษที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa คือ ยีน VP1680 โดยไปทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ฆ่าตัวตายแบบ apoptosis⁵² อย่างไรก็ตามระบบขนส่งโปรตีน T3SS1 นอกจากจะพบใน *V. parahaemolyticus* แล้ว ยังสามารถพบได้ในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุล *Vibrio* เช่น *V. alginolyticus*, *V. harveyi* และ *V. tubiashii*⁵⁰

โปรตีน effectors ที่สำคัญของระบบ T3SS1 ได้แก่ VopQ (VP1680) VopR (VP1683) VopS (VP1686) และ VPA0450 (รูปที่ 2) โปรตีน VopQ เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ภายหลังจากการติดเชื้อ⁵³ และป้องกันการถูกจับกิน (phagocytosis) โดยเซลล์แมคโครเฟจ⁵⁴ โปรตีน VopR จับกับไขมันในเซลล์เมมเบรนชนิด phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) ซึ่งส่งเสริมให้เกิดการม้วนตัวของโปรตีน T3SS หลังจากที่ถูกฉีดเข้าสู่เซลล์โฮสต์⁵⁵ โปรตีน VopS กระตุ้นการหลั่งของ cAMP ภายในเซลล์⁵² ทำลายการสื่อสารของโฮสต์เซลล์ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Rho family GTPases และส่งผลยับยั้งการสร้างแอกตินภายในโฮสต์เซลล์⁵⁶ ซึ่งโปรตีน effector ที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Rho family GTPases นั้น ยังส่งผลยับยั้งกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์แมคโครเฟจอีกด้วย⁵⁷

โปรตีน VPA0450 ของระบบ T3SS1 เป็นเอนไซม์ phosphatidylinositol phosphatase ที่เปลี่ยน phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate (PI(4,5)P2) เป็น D5 phosphate (PI4P) ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส PI4P ทำให้เซลล์หดพบบเนื่องจากทำลายความสัมพันธ์ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับโครงสร้าง actin ภายในเซลล์ โปรตีน VPA0450 เหนี่ยวนำให้เซลล์มีรูปร่างกลมและแตก โดยการทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ และอาจมีบทบาทที่สำคัญต่อโปรตีนตัวอื่นๆ ในกระบวนการติดเชื้อ⁵⁵

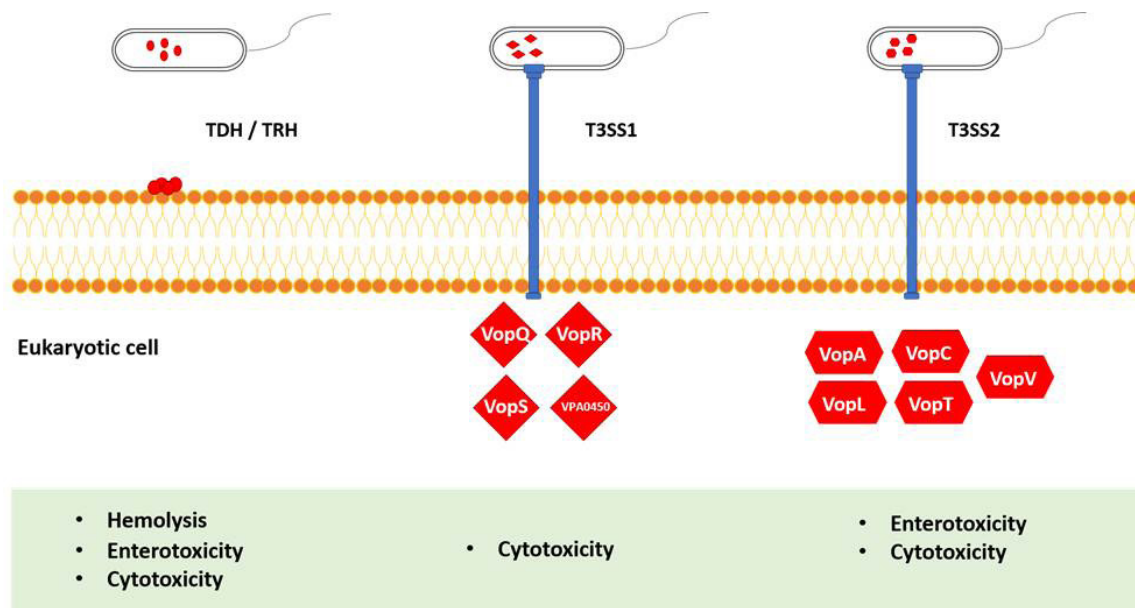
ระบบขนส่งโปรตีน *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2

ยีนควบคุมการสร้าง T3SS2 อยู่ใน pathogenicity island บนโครโมโซมวงที่ 2 ของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โดย T3SS2 พบครั้งแรกจากสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสัมพันธ์กับการระบาดทั่วโลกภายหลังปี 1996¹³ T3SS2 พบได้ในสายพันธุ์ KP⁺ เท่านั้น โดยทำให้เกิดการสะสมของสารน้ำในลำไส้เมื่อทดสอบในโมเดลสัตว์ทดลองโดยใช้ลำไส้ของกระต่าย⁵⁰ T3SS2 แบ่งออกเป็นสองชนิดคือ T3SS2 α และ T3SS2 β ¹⁴ T3SS2 α พบได้ในสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และ KP สายพันธุ์ RIMD2210633⁵⁰ สำหรับ T3SS2 β สามารถพบได้ในสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อยีน *trh* และมี KP เป็นลบ ของสายพันธุ์ TH3996¹⁴

โปรตีน effectors ที่สำคัญของระบบ T3SS2 ได้แก่ VopA VopC VopL VopT และ VopV (รูปที่ 2) โปรตีน VopA หรือ VopP ยับยั้งวิถีไมโทเจนแอกทีเวเตดโปรตีนไคเนส (MAPK) และป้องกันการเหนี่ยวนำไซโทไคน์⁵⁹ โปรตีน VopC เป็นสื่อให้แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* บุกรุกเข้าเซลล์โฮสต์ และเพิ่มจำนวนแบคทีเรียภายในเซลล์ของโฮสต์⁶⁰ โปรตีน VopL ยับยั้งการทำลายเซลล์แบคทีเรียด้วยกระบวนการ reactive oxygen species ของเซลล์โฮสต์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีชีวิต

รอดภายในเซลล์โฮสต์ได้⁶¹ โปรตีน VopT เป็นเอนไซม์ชนิด ADP-ribosyltransferase ทำหน้าที่ปรับเปลี่ยนโปรตีน GTPase Ras ขนาดเล็ก⁶² และเหนี่ยวนำให้

เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์⁶³ โปรตีน VopV เป็นโปรตีน effector ที่จับกับ F-actin และเหนี่ยวนำให้เกิดอาการระว่ง⁶⁴



รูปที่ 2 ปัจจัยก่อความรุนแรงของแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

ปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคที่สำคัญของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคประกอบด้วย สารพิษ TDH และ TRH รวมถึงระบบขนส่งโปรตีน T3SS คุณสมบัติดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นตัวจำแนก และตรวจติดตามสายพันธุ์ก่อโรคในตัวอย่างผู้ป่วยและตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ซึ่งประโยชน์สำหรับการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาและการติดตามสายพันธุ์ ในอดีตการบ่งชี้สายพันธุ์ก่อโรคอาศัยวิธีการจำแนกด้วยเทคนิคพีโนไทป์ ได้แก่ การทดสอบ Kanagawa phenomenon และการทดสอบเอนไซม์ยูรีเอส สำหรับสายพันธุ์ TDH⁺ และ TRH⁺ ตามลำดับ สำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาอาศัยการจำแนกด้วยวิธีซีโรไทป์ (O:K serotype) อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวจำเป็นต้องใช้แรงงานคนและเวลาเป็นอย่างมาก

ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบ (primers) ที่จำเพาะต่อ *tdh*, *trh* และยีนสร้างโปรตีน effector ของ T3SS ซึ่งสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและแม่นยำกว่าวิธีดั้งเดิม สำหรับในประเทศไทย เครื่องมือสำหรับทดสอบ PCR ยังถือว่ามีราคาแพง มีเพียงการใช้ในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยหรือโรงพยาบาลขนาดใหญ่ที่มีหน่วยงานวิจัยเท่านั้น นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์จีโนมของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 ทำให้ทราบถึงปัจจัยก่อความรุนแรงของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ชนิดใหม่ โดยเฉพาะระบบขนส่งโปรตีน ได้แก่ ระบบขนส่งโปรตีน T3SS ซึ่งมีโปรตีน effector หลายชนิดที่ขนส่งเข้าสู่เซลล์โฮสต์ด้วยระบบนี้ บทความนี้กล่าวถึงโปรตีน effector ที่มีรายงานในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม

ยังคงมีโปรตีน effector อีกหลายชนิดที่ยังคงต้องศึกษาต่อไป

อนึ่ง การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *V. parahaemolyticus* สัมพันธ์กับการรับประทานอาหารทะเลแบบดิบหรือกึ่งสุกกึ่งดิบ โดยเฉพาะหอยนางรมและกุ้ง ประเทศไทยโดยเฉพาะภาคตะวันออกและภาคใต้ เป็นพื้นที่ที่มีผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงกุ้งและหอยนางรมเป็นจำนวนมาก ทั้งเพื่อการส่งออกและจำหน่ายในประเทศ การพัฒนาชุดทดสอบโดยใช้ probe ที่จำเพาะกับ *tdh* และ *trh* เพื่อตรวจวิเคราะห์และติดตามสายพันธุ์ก่อโรคนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร

สรุปผล

แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงไม่สุก หรือแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ สายพันธุ์ก่อโรคสามารถผลิตสารพิษชื่อว่า TDH และ TRH นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคอีกหนึ่งชนิด คือ ระบบขนส่งโปรตีน T3SS ซึ่งมี 2 ระบบ คือ T3SS1 และ T3SS2 สารพิษ TDH TRH และระบบขนส่งโปรตีน T3SS2 มีความเป็นพิษแบบ enterotoxicity คือทำให้เกิดอุจจาระร่วง นอกจากนี้ สารพิษ TDH มีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนแตกอีกด้วย สำหรับระบบขนส่งโปรตีน T3SS1 มีความเป็นพิษแบบ cytotoxicity ทำให้เซลล์ตาย

References

1. DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, et al. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. Appl Environ Microbiol 1990;56:2299-302.
2. Alipour M, Issazadeh K, Soleimani J. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. Comp Clin Path 2014;23:129-33.
3. Fujino T, Okuno Y, Sakada D, et al. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning. J Jpn Assoc Infect Dis 1953;25:11-2.
4. Haendiges J, Jones J, Myers RA, et al. A nonautochthonous U.S. strain of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Chesapeake bay oysters caused the outbreak in Maryland in 2010. Appl Environ Microbiol 2016;82:3208-16.
5. Martinez-Urtaza J, Powell A, Jansa J, et al. Epidemiological investigation of a foodborne outbreak in Spain associated with the U.S. West coast genotypes of *Vibrio parahaemolyticus*. Springerplus 2016;5:87.
6. Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol 2007;24:549-58.
7. Chobkatanyoo A. Food poisoning. Annual Epidemiological Surveillance Report. 2011:105-7.
8. Pansuwan N. Food poisoning. Annual Epidemiological Surveillance Report. 2016:121-2.
9. Yoshikura H. Declining *Vibrio parahaemolyticus* and Salmonella, increasing Campylobacter and persisting norovirus food poisonings: inference derived from Food Poisoning Statistics of Japan. Jpn J Infect Dis 2019; doi:10.7883/yoken.JJID.2019.247.

10. Honda T, Ni Y, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect Immun* 1988;56:961-5.
11. Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* 1993;4:106-13.
12. Robert-Pillot A, Guenole A, Lesne J, et al. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int J Food Microbiol* 2004;91:319-25.
13. Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet* 2003;361:743-9.
14. Okada N, Iida T, Park K. Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery. *Infect Immun* 2009;77:904-13.
15. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:39-48.
16. Serichantalergs O, Bhuiyan NA, Nair GB, et al. The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhoea in Thailand, and a new emergent serovar (O3:K46) with pandemic traits. *J Med Microbiol* 2007;56:608-13.
17. Powell A, Baker-austin C, Wagley S, et al. Isolation of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* from UK water and shellfish produce. *Microb Ecol* 2013;2:2-5.
18. Han H, Wong H, Kan B, et al. Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group'. *BMC Genomics* 2008;9:570.
19. Manatsathit S, Dupont HL, Farthing M, et al. Guideline for the management of acute diarrhea in adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:S54-71.
20. Nishibuchi M, Kaper JB. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* 1990;4:87-99.
21. Wagatsuma S. A medium for the test of hemolytic reaction of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle* 1968;13:159-62.
22. Sakazaki R, Tamura K, Kato T, et al. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Jpn J Med Sci Biol* 1968;21:325-31.

23. Baffone W, Casaroli A, Campana R, et al. "In vivo" studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH+ induced secretion. Microb Pathog 2005;38:133-7.
24. Brown DF, Spaulding PL, Twedt RM. Enteropathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in the ligated rabbit ileum. Appl Environ Microbiol 1977;33:10-4.
25. Douet J, Castroviejo M, Dodin A, et al. Purification and characterization of Kanagawa haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. Res Microbiol 1992;143:569-77.
26. Honda T, Goshima K, Takeda Y, et al. Demonstration of the cardiotoxicity of the thermostable direct hemolysin (lethal toxin) produced by *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 1976;13:163-71.
27. Honda T, Taga S, Takeda T, et al. Identification of lethal toxin with the thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus*, and some physicochemical properties of the purified toxin. Infect Immun 1976;13:133-9.
28. Honda T, Ni Y, Miwatani T, et al. The thermostable direct haemolysin of *V. parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. Can J Microbiol 1992;38:1175-80.
29. Matsuda S, Kodama T, Okada N, et al. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. Infect Immun 2010;78:603-10.
30. Miyamoto Y, Obara Y, Nikkawa T, et al. Simplified purification and biophysicochemical characteristics of hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 1980;28:567-76.
31. Yoh M, Tang GQ, Iida T. Phosphorylation of a 25 kDa protein is induced by thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. Int J Biochem Cell Biol 1996;28:1365-9.
32. Raimondi F, Kao JPY, Kaper JB, et al. Calcium dependent intestinal chloride secretion by *V. parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model. Gastroenterol 1995;109:381-6.
33. Iida T, Park KS, Suthienkul O, et al. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiology 1998;144:2517-23.
34. Iida T, Yamamoto K. Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysins from a Kanagawa-phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* T4750 strain. Gene 1990;93:9-15.
35. Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infect Immun 1995;63:2093-9.
36. Kaper JB, Campen RK, Seidler RJ, et al. Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 1984;45:290-2.

37. Nishibuchi M, Kaper JB. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol 1985;162:558-64.
38. Nishibuchi M, Hill WE, Zon G, et al. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. J Clin Microbiol 1986;23:1091-5.
39. Alam MJ, Miyoshi S, Shinoda S. Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in the Seto Inland Sea, Japan. Environ Microbiol 2003;5:706-10.
40. Borthong J, Utrarachkij, Assavanig A, et al. A novel sensitive and locus-specific single tube multiplex polymerase chain reaction for detecting and/or identifying *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in shrimp samples. Inter J Infect Dis 2012;16(S1):e404.
41. Caburlotto G, Gennari M, Ghidini V, et al. Presence of T3SS2 and other virulence-related genes in *tdh*-negative *Vibrio parahaemolyticus* environmental strains isolated from marine samples in the area of the Venetian Lagoon, Italy. FEMS Microbiol Ecol 2009;70:506-14.
42. Chao G, Jiao X, Zhou X, et al. Serodiversity, pandemic O3:K6 clone, molecular typing, and antibiotic susceptibility of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Jiangsu, China. Foodborne Pathog Dis 2009;6:1021-8.
43. Chen X, Zhu Q, Yu F, et al. Serology, virulence and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood in Zhejiang province. PLoS One 2018;13:e0204892.
44. Roque A, Lopez-Joven C, Lacuesta B, et al. Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean coast. Appl Environ Microbiol 2009;75:7574-7.
45. Suktua N, Siripanichgon K, Kositanont U, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical and environmental samples by multiplex polymerase chain reaction. Thai J Genet 2013;S(1):321-4.
46. Honda T, Ni YX, Hata A, et al. Properties of a hemolysin related to the thermostable direct hemolysin produced by a Kanagawa phenomenon negative, clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*. Can J Microbiol 1990;36:395-9.
47. Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T, et al. Urease production correlates with the possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. J Infect Dis 1995;172:1405-8.
48. Iida T, Suthienkul O, Park K, et al. Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. J Med Microbiol 1997;46:639-45.
49. Honda T, Iida T, Akeda Y, et al. Sixty years of *Vibrio parahaemolyticus* research: Despite decades of research following a severe foodborne outbreak in Japan, this pathogen remains mysterious at the molecular level. Microbe 2008;3:462-6.

50. Park KS, Ono T, Rokuda M, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 2004;72:6659-65.
51. Gode-potratz CJ, Chodur DM, Mccarter LL. Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol 2010;192:6025-38.
52. Ono T, Park KS, Ueta M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. Infect Immun 2006;74:1032-42.
53. Sreelatha A, Bennett TL, Zheng H, et al. *Vibrio* effector protein, VopQ, forms a lysosomal gated channel that disrupts host ion homeostasis and autophagic flux. PNAS 2013;110:11559-64.
54. Burdette DL, Seemann J, Orth K. *Vibrio* VopQ induces PI3-kinase-independent autophagy and antagonizes phagocytosis. Mol Microbiol 2009;73:639-49.
55. Wang R, Zhong Y, Gu X, et al. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. Front Microbiol 2015;6:144.
56. Casselli T, Lynch T, Southward CM, et al. *Vibrio parahaemolyticus* inhibition of Rho family GTPase activation requires a functional chromosome I type III secretion system. Infect Immun 2008;76:2202-11.
57. Black DS, Bliska JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. Mol Microbiol 2000;37:515-27.
58. Frithz-Lindsten E, Du Y, Rosqvist R, et al. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. Mol Microbiol 1997;25:1125-39.
59. Trosky JE, Mukherjee S, Burdette DL, et al. Inhibition of MAPK signaling pathways by VopA from *Vibrio parahaemolyticus*. J Biol Chem 2004;279:51953-7.
60. Zhang L, Krachler AM, Broberg C, et al. Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. Cell Rep 2012;1:453-60.
61. de Souza Santos M, Salomon D, Orth K. T3SS effector VopL inhibits the host ROS response, promoting the intracellular survival of *Vibrio parahaemolyticus*. PLOS Pathog 2017;13:e1006438.
62. Kodama T, Rokuda M, Park K, et al. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. Cell Microbiol 2007;9:2598-609.
63. He Y, Wang H, Chen L. Comparative secretomics reveals novel virulence-associated factors of *Vibrio parahaemolyticus*. Front Microbiol 2015;6:707.
64. Hiyoshi H, Kodama T, Saito K, et al. VopV, an F-actin-binding type III secretion effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity. Cell Host Microbe 2011;10:401-9.