1 บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มีแหล่งธรรมชาติในน้ำทะเลและน้ำกร่อย แยกได้จากน้ำทะเลทั่วโลก พบได้ในกุ้ง หอย ปลา และปูหลายชนิด เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophile) เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อโรคลำไส้อักเสบในประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่นิยมรับประทานอาหารดิบหรือปรุงแบบสุกๆ ดิบๆ รายงานจากประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อินเดีย และหลายๆ ประเทศทางเอเชียรวมทั้งอเมริกาพบว่ามากกว่า 50% ของโรคอาหารเป็นพิษมีสาเหตุจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางบาดแผล 34 % และการติดเชื้อในกระแสโลหิต 5 % (http://webdb.dmsc.moph.go.th) เชื้อ *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์เท่านั้นที่ก่อโรค สายพันธุ์ที่ก่อโรคเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารชนิดพิเศษที่เติมเลือดชื่อ Wagatsuma agar สามารถทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (β-hemolysis) เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Kanagawa phenomenon (KP) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตสารพิษชนิดทนความร้อน เรียกว่า thermostable direct hemolysin (TDH) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคอาหารเป็นพิษหรือทางเดินอาหารอักเสบ จึงใช้การทดสอบ KP เป็น virulence marker สำหรับตรวจสายพันธุ์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรค การสร้าง TDH ถูกควบคุมโดยจีน *tdh* ซึ่งส่วนใหญ่พบในสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย แต่พบเพียงส่วนน้อยในสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (Miyamoto *et al.*, 1969; Iida and Yamamoto, 1990) ต่อมาพบ hemolysin ชนิดใหม่จากสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยซึ่งไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์บน Wagatsuma agar จากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้าง thermostable direct hemolysin related hemolysin (TRH) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคเช่นกัน โดยจะมีคุณสมบัติทางชีววิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยาและทางฟิสิกส์คล้าย TDH (Honda *et al.*, 1988; Nishibuchi *et al.*, 1989) จากการศึกษาพบว่าการสร้าง TRH ถูกควบคุมโดยจีน *trh* (Nishibuchi *et al.*, 1989)

V. parahaemolyticus แบ่งเป็นซีโรทัยป์ตามชนิดของ O และ K antigen โดยแบ่งเป็น O antigen (แอนติเจนที่ผนังเซลล์) 13 ชนิด และ K antigen (แอนติเจนที่แคปซูล) 71 ชนิด จากการศึกษาการระบาดของเชื้อ ในอดีตพบว่าเกิดจากเชื้อหลายซีโรทัยป์ แต่ในปี ค.ศ. 1996 เกิดการระบาดใหญ่ ที่เมือง Calcutta ประเทศอินเดีย จากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของสายพันธุ์ O3:K6

และเกิดการระบาดไปสู่ประเทศต่างๆทั่วโลกเช่น เกาหลี ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อเมริกา รวมทั้งประเทศไทย (Okuda *et al.*, 1997; Chiou *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000) ต่อมามีรายงานถึงซีโรทัยป์ O4:K68 O1:KUT (untypeable) O1:K25 O1:K41 และ O4:K12 ระบาดร่วมกับ O3:K6 ด้วย จากการศึกษาโดยการตรวจจีน *toxRS* พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน และต่างจาก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 (Matsumoto *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000) ดังนั้นการศึกษาลักษณะ *parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยจึงมีความสำคัญในการอธิบายถึงระบาดวิทยาของ *parahaemolyticus* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังเชื้อนี้ในอนาคต

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 สกุล *Vibrio*

สกุล *Vibrio* จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งประกอบด้วย 4 สกุล คือ *Aeromonas* *Photobacterium* *Plesiomonas* และ *Vibrio* เชื้อในสกุล *Vibrio* มีมากกว่า 72 เชื้อสาย ซึ่งเชื้อสายที่มีความสำคัญทางการแพทย์ทำให้เกิดโรคในคน คือ *V. cholerae* *V. mimicus* *V. fluvialis* *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* *V. vulnificus* *V. furnissii* *V. metschnikovii* *V. cincinnatiensis* และ *V. carchariae* มี 3 เชื้อสายที่เป็นสาเหตุใหญ่ซึ่งทำให้เกิดโรคในคน คือ *V. cholerae* *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Farmer *et al.*, 1985; Balows *et al.*, 1992; Tarr *et al.*, 2007)

แบคทีเรียสกุล *Vibrio* มีรูปร่างเป็นแท่งลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งหัว-ท้ายมนแบบ comma-shaped มีขนาดกว้าง 0.5-0.8 µm ยาว 1.4 -2.6 µm ติดสีแกรมลบ ไม่มีสปอร์หรือ microcyst หลายเชื้อสายเคลื่อนที่โดยใช้ polar flagellum 1 เส้น แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella ได้เจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อในสกุล *Vibrio* สามารถสร้างเอนไซม์หลั่งออกภายนอกเซลล์ (exoenzyme) ได้หลายชนิด เช่น gelatinase, amylase, chitinase และ DNase (Joseph *et al.*, 1982) ให้ผลบวกกับการทดสอบ oxidase ยกเว้น *V. metschnikovii* (Baumann and Schubert, 1984) เชื้อสายที่เป็นสาเหตุใหญ่ซึ่งทำให้เกิดโรคในคน คือ *V. cholerae* *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ให้ผลบวกกับการทดสอบ lysine decarboxylase และ ornithine decarboxylase แต่ให้ผลลบกับการทดสอบ arginine dihydrolase คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของ *Vibrio* คือ ความไวต่อการทดสอบ O/129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine) *Vibrio* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแต่ไม่ให้แก๊ส โดยทั่วไปสามารถสร้าง indole และ catalase สามารถย่อยเคซีนได้ เชื้อในสกุลนี้จะให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ (ตารางที่ 1.1) ซึ่งบางลักษณะใช้จำแนกชนิดในระดับโมเลกุล จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลพบว่า *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีปริมาณ guanine รวมกับ cytosine (ค่า G+C content) ของดีเอ็นเอเท่ากับ 39-51 mol % (Love *et al.*, 1990; Ripabelli *et al.*, 1997) เชื้อจะถูกทำลายเมื่อต้มที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสายที่ทำให้เกิดโรคในคนเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (halophile) โดยเชื้อสายที่ก่อให้เกิดโรคในคนต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-3% เข้าสู่ *Vibrio* เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางและด่างถึง pH 9.0 เชื้อนี้ไม่ทนต่อกรดและสามารถสร้างเอนไซม์ยังเชื้อชนิด

	V. alginolyticus	*V. cholerae*	*V. cincinnatiensis*	*V. damsela*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V. hollisae*	*V. metschnikovii*	*V. mimicus*	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*
TCBS	Y	Y	Y	G	Y	Y	N	Y	G	G	G
mCPC	N	P	nd	N	N	N	N	N	N	N	Y
AGS	KA	Ka	nd	nd	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA
Growth (0% NaCl)	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Growth (3% NaCl)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth (6% NaCl)	+	–	+	V	+	+	+	+	–	+	+
Growth (8% NaCl)	+	–	–	–	V	+	–	V	–	+	–
Growth (10% NaCl)	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Growth at 42°C	+	+	–	–	V	–	nd	V	+	+	+
Sucrose	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	–
Cellobiose	–	–	+	+	+	–	–	–	–	V	+
Lactose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Arabinose	–	–	+	–	+	+	+	–	–	+	–
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	–	–	+	+	–	+	+	+	V
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
ONPG	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+
Voges-Proskauer	+	V	+	+	–	–	–	+	–	–	–
Arginine dihydrolase	–	–	–	+	+	+	–	+	–	–	–
Lysine decarboxylase	+	+	+	V	–	–	–	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+	+
Sensitivity 0/129 (10 μg)	R	S	R	S	R	R	nd	S	S	R	S
Sensitivity 0/129 (150 μg)	S	S	S	S	S	S	nd	S	S	S	S
Gelatinase	+	+	–	–	+	+	–	+	+	+	+
Urease	–	–	–	+	–	–	–	–	–	V	–

Y, yellow; G, green; P, purple; N, no growth; nd, not determined; K, alkaline; A, acid; a, mildly acid; +, 80% (or more) of strains are positive; 80% (or less) of strains are negative; V, variable reaction; S, sensitive; R, resistant.

selective และ enrichment ค่ า pH จะอยู่ ระหว่ าง 8.0-8.8 *parahaemolyticus* ทำให้ เกิ ดโรคในสั ตว์ ทะเลที่ มีและไม่ มีกระดูกสั นหลั ง การศึ กษาเชื้ อนี้ จึ งมีความสำคัญมากขึ้น เมื่อมีการระบาด ไปสู่ สั ตว์ น้ ำเศรษฐกิ จ (Mauget al., 2000)

1.2.1.1 แหล่ งที่ อยู่

Vibrio สามารถพบได้ ในน้ ำทะเลทั่ วโลก ชายฝั่ งทะเล แหล่ งน้ ำกร่อย ในตะกอนดิ น อนุ ภาคแขวนลอย สั ตว์ ทะเล เช่ น กุ้ ง หอย ปู จะพบเชื้ อเป็ นจำนวนมาก ในลำไส้ ของสารอิ นทรีย์ และสายพั นธุ์ ที่ มีความรุ นแรงก็ อาจจะมี intermediate host นสั ตว์ ที่ อาศั ยทั้ งบนบก และในน้ ำ เช่ น นกทะเล (West, 1989; Cavallo *et al.*, 1998) พบเชื้ อทั้ งในน้ ำจืด (Tantillo *et al.*, 2004) และน้ ำเค็ มและเป็ น normal microbiota ในสั ตว์ น้ำถึงมีชีวิตอยู่ ในน้ ำทะเลหรื อน้ ำที่ มีสภาพเป็ นด่ างได้ นาน 1-2 สั ปดาห์ แต่ จะตายได้ ง่ ายในน้ำจืดที่มีความเค็มต่ำ โดยเฉพาะผั ก ผลไม้ และในอาหารต่ างๆได้ สาเหตุ สำคั ญที่ ทำให้ เกิ ดกระจายตั วของเชื้ อในสิ่ งแวดล้ อมคื อ อุ ณหภูมิ ของน้ ำ ความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ สารอาหาร และสั ตว์ หรื อต้ นไม้ เช่ น *Vibrio* จะมีความไวต่ อสภาวะแวดล้ อมต่ างๆกั นแต่ อุ ณหภูมิ ของน้ ำจะเป็ นปั จจั ยที่ สำคั ญที่สุ ด (Cavallo and Stabili, 2002) ปริ มาณของเชื้ อจะลดลงถ้ าอุ ณหภูมิ ต่ ำกว่ า 20 องศาเซลเซียส ปริ มาณของเชื้ อจะสูงสุ ดเมื่ ออุ ณหภูมิ อยู่ ระหว่ าง 20-30 องศาเซลเซียส *Vibrio* ที่ เป็ นสาเหตุ ซึ่ งทำให้ เกิ ดโรคในคนจะพบได้ น้ อยถ้ าอุ ณหภูมิ ของน้ ำต่ ำกว่ า 10 หรื อสูงกว่ า 30 องศาเซลเซียส โดยตรงของเชื้ อนี้ กั บอุ ณหภูมิ ของน้ ำได้ ทำการศึ กษาในหลายส่ วนของโลก เช่ น ในทวีปอเมริ กา และทวีปยุ โรป (Heath *et al.*, 2002) สามารถตรวจเจอเชื้ อนี้ ได้ ในน้ ำทะเลและอาหารทะเล ในดู ใบไม้ ผลิ และฤดูร้ อน ถ้ าอุ ณหภูมิ ต่ ำกว่ า 10 องศาเซลเซียส ไม่ สามารถตรวจได้ ในน้ ำทะเลแต่ เชื้ อจะฝั งตั วอยู่ ในตะกอนดิ นและจะเพิ่ มจำนวนเมื่ ออยู่ ในสภาวะที่ เหมาะสม

ความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ ก็ เป็ นปั จจั ยที่ สำคั ญต่ อการเจริ ญเติ บโตของเชื้ อ *Vibrio* ชนิ ดและสายพั นธุ์ ซึ่ งทำให้ เกิ ดโรคจะต้ องการโซเดียมคลอไรด์ ที่ ระดั บแตกต่ างกั น (Yu *et al.*, 1991) โดยทั่ วไปเชื้ อต้ องการความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ ระหว่ าง 0.5-3.0% การศึ กษาพบว่ าอาจจะอยู่ นอกเหนื อช่ วงนี้ ได้ ทั้ งนี้ ขึ้ นอยู่ กั บอุ ณหภูมิ ของน้ ำและความเข้ มข้ นของสารอื่ นๆ

ในสภาวะที่ ไม่ เหมาะสมต่ อการเจริ ญของเชื้ อ เช่ น ขาดสารอาหารที่ จำเป็ น ซึ่ งทำให้ เกิ ดโรค เช่ น *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ส่ วนใหญ่ จะไม่ ตายแต่ เข้ าสู่ ภาวะ viable but non culturable (VBNC) การเข้ าสู่ ภาวะ VBNC ยั งขึ้ นกั บความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ และอุ ณหภูมิ ของน้ ำ ในภาวะนี้ เชื้ อแบคทีเรียยั งมีขบวนการเมตาบอลิซึมอยู่ แต่ ไม่ สามารถสร้ างโคโลนี ได้ นำมาเลี้ ยงบนอาหารเลี้ ยงเชื้ อ อย่ างไรก็ ตามเมื่ ออยู่ ในสภาวะที่ เหมาะสมเชื้ อก็ จะกลั บมาเจริ ญเติ บโตและแบ่ งจำนวนได้ เหมื อนเดิ ม (Oliver, 1995; Stabili *et al.*, 2000)

เชื้อ *Vibrio* ยังมีความเกี่ยวข้องกับสารไคตินบนแพลงก์ตอนสัตว์และสัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้มต่างๆ เพราะเชื้อที่อยู่ในสัตว์จะอยู่รอดในน้ำรวมทั้งเป็นแหล่งอาหาร และนี้คือสาเหตุที่สำคัญซึ่งทำให้สัตว์ทะเลเหล่านี้เป็นรังเก็บและถ่ายทอดเชื้อ (vector) ให้เกิดโรคในคน (Dumontet *et al.*, 1996; Montanari *et al.*, 1999) *Vibrio* สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของสัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้มเช่นหอยกาบ หอยนางรม และหอยแมลงภู่ เนื่องจากสัตว์เหล่านี้รับอาหารโดยวิธี filter-feeding จึงทำให้เจอเชื้อมากกว่าในน้ำที่อาศัยอยู่ (Pruzzo *et al.*, 1997 ; Richards, 1998; Croci *et al.*, 2001; Jaksic *et al.*, 2002)

1.2.1.2 การก่อโรคและการระบาด

Vibrio บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในลำไส้โดยมีสาเหตุมาจากรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ผู้ป่วยมีอาการปวดท้องท้องเสียคลื่นไส้อาเจียนมีไข้อุจจาระอาจมีมูกเลือดปนเชื้อภายในลำไส้ที่รู้จักกันดีคือการติดเชื้อ *V. cholerae* เนื่องจากมีความรุนแรงสูงทำให้ผู้ติดเชื้อถ่ายเหลวเป็นน้ำซาวข้าว (rice water stool) การก่อโรคของ *Vibrio* สายพันธุ์อื่นซึ่งมีรายงานทั้งในประเทศที่พัฒนาและกำลังพัฒนาเช่นทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย ทวีปยุโรป และตะวันออกได้แก่ การทำให้เกิดลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ติดเชื้อทางบาดแผล และติดเชื้อในกระแสเลือด (ตารางที่ 2) ซึ่งอาการลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) และติดเชื้อในกระแสเลือดเกิดจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อหรือปรุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ อาการลำไส้อักเสบผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียคลื่นไส้อาเจียน สามารถแยกเชื้อได้จากอุจจาระเท่านั้น (Fuller, 2002) ในรายที่ติดเชื้อไม่รุนแรงสามารถหายเองได้ แต่ในรายที่ติดเชื้อรุนแรงผู้ป่วยจะมีอาการไข้ขึ้นสูงอุจจาระมีมูกหรือเลือดปนมักไม่พบในประเทศที่พัฒนาในกรณีนี้ผู้ป่วยต้องได้รับยาปฏิชีวนะหรือน้ำเข้าไปทดแทนอัตราการตายต่ำถ้ามีเฉพาะอาการลำไส้อักเสบ *Vibrio* ที่ติดต่อสาย *parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบแต่ผู้ป่วยส่วนมากสามารถหายได้เองนอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *V. fluvialis* *V. mimicus* และ *V. vulnificus* ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *Vibrio* มีหลายชนิดได้แก่ การสร้าง elastase, collagenase, lipase, haemagglutinin protease, siderophore, adhesion factor, enterotoxin, cytotoxin, protease และ hemolysin โดย hemolysin เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญในเชื้อ *Vibrio* ในสายเชื้อสายได้แก่ *V. cholerae* *V. mimicus* *V. parahaemolyticus* *V. vulnificus* (Alouf and Freer, 1999; Daniels and Shafaie, 2000)

นอกจากนี้บางเชื้อสายยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้แก่ *cholerae* *V. mimicus* *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* *V. vulnificus* *V. metschnikovii*

และ *V. cincinnatiensis* (ตารางที่ 1.2) การติดเชื้อในกระแสโลหิตเกิดเนื่องจากเชื้อแสโลหิตผ่านทางเส้นเลือดดำใหญ่ จากทางเดินอาหารไปตับหรือบางครั้งผ่านทางน้ำเหลืองของลำไส้ ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ ความดันต่ำอ่อนแรง หนาวสั่น ปวดท้อง คลื่นไส้ ท้องเสีย และอาเจียรร่วมด้วยเสมอ (Tacket *et al.*, 1984) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสโลหิตมากกว่า 70% จะมีตุ่มน้ำพองใสที่ผิวหนังบริเวณปลายแขน-ขา เนื่องจากมีน้ำออกมาใต้ผิวหนังและเนื้อเยื่อ เชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดคือ *V. vulnificus* เนื่องจากเชื้อสร้างสารพิษได้หลายตัว มีโพลีแซคคาไรด์แคปซูลสามารถใช้เหล็กในรูป transferrin ได้ (Heelan, 2001)

ตารางที่ 1.2 อาการทางคลีนิกที่เกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio* กลุ่ม

เชื้อสาย	อาการทางคลีนิก		
	ติดเชื้อในกระแสโลหิต	ลำไส้อักเสบ	ติดเชื้อทางบาดแผล
V. cholerae O1	*	+++	+
V. cholerae non-O1	+	+++	++
V. parahaemolyticus	+	+++	++
V. vulnificus	+++	++	+++
V. fluvialis	*	++	*
V. alginolyticus	+	*	+++
V. furnissii	*	+	*
V. mimicus	*	++	++
V. metschnikovii	+	+	*
V. cincinnatensis	+	*	*

+++ = มีการรายงานบ่อยครั้ง ++ = มีการรายงานบ้างเป็นครั้งคราว + = มีการรายงานน้อยมาก
* = มีอาการทางคลีนิคไม่ชัดเจน
ที่มา : West (1989)

จากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *Vibrio* พบว่าคนที่สุขภาพดีเมื่อได้รับเชื้อมีโอกาสต่ำมากที่จะติดเชื้อในกระแสเลือด กลุ่มเสี่ยงคือผู้ป่วยโรคตับ ไตเบาหวาน มะเร็ง การติดเชื้อในกระแสเลือดมีโอกาสเกิดขึ้นน้อยแต่จะมีความรุนแรงและมีโอกาส

เสียชีวิตมากกว่า 50% ดังนั้นเมื่อมีบาดแผลที่ผิวหนังสัมผัสกับน้ำทะเล และสัตว์ทะเลหรืออาจสัมผัสต้องล้างบริเวณที่สัมผัสทุกครั้งทำการติดเชื้อในบริเวณที่อยู่ใกล้ๆ แข็งแรงและไม่แข็งแรง เชื้อที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงรวดเร็วและเสียชีวิตจาก *V. vulnificus* อาการของโรคคือแผลจะบวมแดงมีการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังและหลังจากนั้นจะมีการตายของเนื้อเยื่อตามมาด้วยการติดเชื้อในกระแสเลือดซึ่งอาจเสียชีวิตได้ภายใน *V. cholerae* non-O1 *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* อาการจะรุนแรงน้อยกว่า (Johnson *et al.*, 1984; Levine and Griffin, 1993; Strom and Paranjpye, 2000; Collier, 2002)

การติดเชื้อทางบาดแผลส่วนใหญ่จะมีรายงานจากบริเวณ Gulf Coast บริเวณชายฝั่งทะเลแถบแปซิฟิกของสหรัฐอเมริกา และมีรายงานบ้างจากประเทศเดนมาร์ก เยอรมัน สวีเดน และเนเธอร์แลนด์ แต่ไม่เคยมีรายงานจากแถบเมดิเตอร์เรเนียนอาจเป็นไปได้ว่าน้ำทะเลแถบนั้นมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงจึงมีปริมาณน้อย (Arias *et al.*, 1999; Feldhusen, 2000)

ที่ประเทศฮ่องกงได้มีการศึกษาการปนเปื้อนของ *Vibrio* จากอาหารทะเลที่จำหน่ายในตลาด พบว่าสามารถแยกเชื้อ *alginolyticus* ได้มากที่สุดรองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* *V.harveyi* *V. fluvialis* *V. vulnificus* ตามลำดับ (Chan *et al.*, 1989) ในประเทศออสเตรเลียสามารถแยกเชื้อ *Vibrio* ได้จากน้ำตะกอน พืช และอุจจาระ จากแถบชายฝั่งแม่น้ำ 8 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของรัฐควีนแลนด์ เชื้อที่พบส่วนใหญ่ *V. cholerae* *V. fluvialis* และ *Aeromonas* spp. (Myatt and Davis, 1989) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1989 จากการศึกษาของ Lowy และคณะพบว่าหอยนางรมดิบ 100% ปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* และ 67% ปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* แต่ในหอยนางรมจากชายฝั่งทะเลประเทศบราซิลพบเชื้อ *alginolyticus* (81%) *V. parahaemolyticus* (77%) *V. cholerae* non-O1 (37%) *V. fluvialis* (27%) *V. furnissii* (19%) และ *V. vulnificus* (12%) (Oliver and Kaper, 1997) ที่ประเทศอิตาลีในปี ค.ศ. 2000 Baffone และคณะได้ตรวจแยกเชื้อ *Vibrio* ในอาหารทะเลจากทะเล Adriatic พบเชื้อ *V. alginolyticus* (81.48%) มากที่สุดรองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* (14.8%) และ *V. cholerae* non-O1 (3.7%) นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาในกุ้งทะเลสดพบว่าเกิน 30% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 129 ตัวอย่างมีเชื้อ *parahaemolyticus* *V.vulnificus* *V. metschnikovii* *V. cholerae* non-O1 และ *V. fluvialis* ในประเทศฝรั่งเศสจากการศึกษา *Vibrio* ในหอยและน้ำทะเลระหว่างเดือนกรกฎาคม-กันยายน ปี ค.ศ. 1999 พบ *alginolyticus* มากที่สุดรองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* *V. vulnificus* และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ตามลำดับ (Hervio-Heath *et al.*, 2002) การติดเชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบในประเทศ

สหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1988-1997 ในรัฐแถบชายฝั่งทะเลทั้ง 4 รัฐ คือ Alabama, Florida, Lousiana และ Texas มีผู้ป่วยลำไส้อักเสบอันเนื่องมาจากเชื้อ *Vibrio* จำนวน 236 คน (53%) จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 445 คน โดยมีสาเหตุมาจากการรับประทานหอยดิบ (Altekruse *et al.*, 2000) ช่วงพฤษภาคม – กรกฎาคม ค.ศ. 2006 ที่รัฐนิวยอร์กและวอชิงตันได้มีรายงานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 177 ราย ซึ่งมีสาเหตุจากการรับประทานหอยกุ้งปูและซึ่งมาจากแหล่งเดียวกัน (Deerdirdt *et al.*, 2006) และได้ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียใน Norwegian Blue Mussels จำนวน 885 ตัวอย่าง พบ *parahaeumolyticus* สายพันธุ์ที่มีเฉพาะยีนเพียง 0.3% *V. cholerae* non -O1/non-O139 *ctx A* negative 1.0% และ *V. vulnificus* 0.1% (Bauer *et al.*, 2006) และรายงานจาก Waterborne disease and outbreak (WBDO) ของ Center for Disease Control (CDC) ซึ่งเก็บข้อมูลเกี่ยวกับน้ำเพื่อการพักผ่อนหย่อนใจในแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำในสวนสนุก (recreational water) โดยมีการรวบรวมข้อมูลจาก 62 องค์กรที่เกี่ยวข้องกับ WBDO ใน 26 รัฐของสหรัฐอเมริกาพบว่าในปี ค.ศ. 2003-2004 มีผู้ป่วยจากน้ำกำร่อยเพื่อการพักผ่อนหย่อนใจ 2698 คน ในจำนวนนี้ 142 รายได้รับเชื้อจากเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificul* *V. alqinolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล พบว่า 87.2% เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus* และมีอัตราการตายจากเชื้อนี้ถึง 12.8% (Dziuban *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการกระจายของ *Vibrio* บริเวณชายฝั่งประเทศฝรั่งเศสช่วงหน้าร้อนอุณหภูมิตั้งแต่ 19-22 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาปริมาณเชื้อในหอยในเขตที่มีหอยที่มีชีวิต (healthy oysters) จะพบ *Vibrio* ในปริมาณน้อย ในขณะที่หอยตายจะพบ *Vibrio* ในเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆ โดยพบเชื้อ *V. aestuarianus* (56%) ซึ่งเป็นสมาชิกของ *V. nigriegens* *V. parahaemolyticus* และ *Psendoalteromonas* sp. (Garnier *et al.*, 2007)

ในประเทศไทยระหว่างปี ค.ศ. 1980-1981 พบผู้ป่วย 660 รายมีอาการท้องร่วงซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Shigella* 27% *V. parahaemolyticus* 19% *E. coli* 5% *Salmonella* spp. 3% *V. cholerae* non-O1 3% *Campylobacter jejuni* 1% และ *Vibrio* อื่นๆ น้อยกว่า 1% (Echeverria *et al.*, 1983) ในปี ค.ศ. 1999 มีรายงานการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลส่งออกจำนวน 686 ตัวอย่างซึ่งมาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และพบ *V. parahaemolyticus* สูงถึง 45.9% โดยส่วนใหญ่พบเชื้อในตัวอย่างที่มาจากฮ่องกงและไทยมากกว่าตัวอย่างที่มาจากอินโดนีเซียและเวียดนามมากซึ่งตัวอย่างที่พบส่วนใหญ่เป็นปูและกุ้ง (Wong *et al.*, 1999) นอกจากนี้ในเดือนธันวาคม ปี 1998 ถึงมกราคม ปี 1999 ได้มีการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในตลาดสดในอำเภอหาดใหญ่จังหวัดสงขลาจำนวน 114 ตัวอย่าง แบ่งเป็นหอย 54 ตัวอย่าง กุ้ง 30 ตัวอย่าง ปลา 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ

parahaemolyticus จากหอย 51 ตัวอย่าง (94%) กุ้ง 25 ตัวอย่าง (83%) และปลา 22 ตัวอย่าง (73%) โดยพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีจีนสร้างสารพิษในตัวอย่างหอย 2 ตัวอย่าง (Vuddhakul *et al.*, 2000)

จากการสำรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษจากอาหารทะเลพื้นบ้านพร้อมบริโภคจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานครและนนทบุรีจำนวน 300 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกุ้งจ่อม 34 ตัวอย่าง ปลาจ่อม 66 ตัวอย่าง ปูดอง 100 ตัวอย่าง และหอยดอง 100 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และเชื้อก่อพิษในกลุ่ม *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* พบว่ากุ้งจ่อม ปลาจ่อม ปลาร้า และปูดอง มีค่าพีเอชเฉลี่ยที่ 4.02, 4.26, 4.79 และ 7.44 ตามลำดับ ขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเกลือเฉลี่ยอยู่ที่ 8.06, 8.75, 14.85 และ 15.23 ตามลำดับ ตัวอย่างทั้งหมดตรวจไม่พบ *Vibrio cholerae* O1 อาหารหมักดองพื้นบ้านกลุ่มดังกล่าวตรวจพบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* 8 ตัวอย่าง (2.67 %) โดยพบมากในตัวอย่างปูดอง 6 ตัวอย่าง และปลาจ่อม 2 ตัวอย่าง (http://weekly.dmsc.moph.go.th)

1.2.1.3 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เชื้อในสกุล *Vibrio* สามารถเจริญบน nutrient agar ที่มีเกลือ 0.5% โดยทั่วไปมีโคโลนีมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ สีครีม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร แต่บางเชื้อสายพันธุ์ เช่น *alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โคโลนีมีลักษณะแผ่ (swarm) *Vibrio* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีระดับของเกลือน้ำดีสูงและเจริญได้ดีในภาวะที่ปราศจากเกลือ จึงสามารถใช้ selective pre-enrichment โดยนำเชื้อลงใน selective media ดูลักษณะโคโลนีและบ่งชี้เชื้อในสกุล *Vibrio* จะอาศัยความแตกต่างของปฏิกิริยาเคมี และเทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นหลักการพื้นฐานที่ใช้ในการแยกเชื้อและบ่งชี้ *V. cholerae* *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (ISO method 8914, 1990; FDA, 1998) ใช้ selective enrichment medium APW (alkaline peptone water) ซึ่งมีเกลือ 0.5-2% เพื่อส่งเสริมการเจริญและบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากนั้นทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ thiosulphate citrate bile-salt sucrose (TCBS) agar ซึ่งสามารถแยกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักน้ำตาลซูโครสได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ โคโลนีจะมีสีเขียว 2 ชนิด ได้แก่ *cincinnatiensis* *V. metschnikovii* *V. cholerae* *V. alginolyticus* *V. fluvialis* *V. furnissii* และ *V. carchariae* ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส โคโลนีจะมีสีเขียว ได้แก่ *parahaemolyticus* *V. mimicus* และ *V. vulnificus* (Baumann and Schubert 1984; Balow *et al.*, 1992; Serratore *et al.* 1999; Kong *et al.* 2002) ต่อจากนั้นทำการทดสอบต่างๆ เช่น ย้อม Gram stain, motility, oxidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxilase, ortho-nitrophenil-galactopyranoside (ONPG) การใช้น้ำตาล glucose, sucrose และ cellobiose (Baumann and

Schubert, 1984; Serratore *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2002) เชื้อ *Vibrio* หลายเชื้อสายถูกแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม polymyxin B เพื่อคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือแยกเชื้อ *V. cholerae* El Tor ออกจาก *V. cholerae* Classical เนื่องจาก *V. cholerae* Classical มีความไวต่อ polymyxin B (Hagen *et al.*, 1994; Donovan and van Netten, 1995)

วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ใช้เวลาหลายวันในการทดสอบ และมีหลายขั้นตอน ในกรณีที่มีเชื้อในปริมาณน้อยก็อาจจะตรวจสอบไม่พบ จึงนิยมใช้วิธีทางชีวโมเลกุลเช่น PCR เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจเชื้อในปริมาณน้อยหรืออยู่ในภาวะ viable but non culturable (VBNC) ได้ เชื้อที่ได้ยังสามารถบอกความแตกต่างโดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่นิยมคือ Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) หรือ random amplified restriction polymorphic DNA (RAPD) amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) และ PFGE ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์สายเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ได้ (Versalovic *et al.*, 1991; Kaysner *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1996; Aono *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998)

1.2.2 *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus พบครั้งแรกเมื่อปลายเดือนตุลาคมปี ค.ศ. 1950 โดย Fujino และคณะ โดยขณะนั้นเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในเมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากการรับประทานชิราสุ (Shirasu) ซึ่งเป็นปลาขาวหรือลูกปลาไส้ตัน (*Engraulis japonica Hottuyn*) ต้มในน้ำเกลือก่อนทำกึ่งตากแห้ง มีผู้ป่วยที่แสดงอาการได้พิษเกิดเสบอย่างรุนแรง จำนวน 272 ราย และเสียชีวิต 20 ราย โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการหลังจากบริโภคเพียง 2-6 ชั่วโมง อาการโดยทั่วไปประกอบด้วย ปวดเกร็งในช่องท้องอย่างแรงและเหลวเป็นน้ำแต่บางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน ปวดศีรษะ หนาวสั่น Fujino ตั้งชื่อเรียกเชื้อเป็นสาเหตุว่า *Pasteurella parahaemolytica* ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 ได้มีการศึกษาลักษณะของเชื้อพบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นตรงหรือโค้งหัวท้ายมน ขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมครอน และยาว 1-5 ไมครอน เคลื่อนไหวได้ด้วยแส้ 1 เส้นที่อยู่ตรงปลายด้านหนึ่ง (single polar flagellum) หมักน้ำตาล glucose ให้กรดแต่ไม่ให้แก๊ส ให้ผลบวกในการทดสอบ indole ต่อมาในปี ค.ศ. 1955 Takikawa พบว่า *P. parahaemolytica* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophile) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3% ในปี ค.ศ. 1963 Sakazaki และคณะ ได้ศึกษาลักษณะรูปร่าง การเพาะเลี้ยงเชื้อ และลักษณะทางชีวเคมีของ *P. parahaemolyticus* จึงเปลี่ยนจากสกุล *Pasteurella* เป็นสกุล *Vibrio* (Miwatani and Takeda, 1976)

V. parahaemolyticus เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษพบได้บ่อยในทวีปเอเชียและสหรัฐอเมริกาส่วนในทวีปยุโรปจะพบน้อย สาเหตุการติดเชื้อจากอาหารทะเลโดยตรงและโดยอ้อมการติดเชื้อโดยตรงเกิดจากการรับประทานอาหารดิบหรือปรุงไม่สุกส่วนการติดเชื้อโดยอ้อมเกิดจากการปนเปื้อนของอาหารภายหลังการปรุงการศึกษาพบว่าปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่ก่อให้เกิดโรค (infective dose) เท่ากับ 10 ยกกำลัง 6 ถึง 10 ยกกำลัง 8 เซลล์ (Baker and Gangarosa, 1974; Farmer *et al.*, 1985; Daniels *et al.*, 2000) ในญี่ปุ่นพบ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษประมาณ 50-70% ของผู้ป่วยทั้งหมดที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย (Miwatani and Takeda, 1976; Sakazaki and Balows, 1981) จากรายงานที่ญี่ปุ่นพบว่าสาเหตุจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 เกิดการระบาด 496 ครั้งระหว่างปี 1963-1998 ค.ศ. ในปี 1996 เป็นจำนวน 102 ครั้งในปี ค.ศ. 1996, 160 ครั้งปี ค.ศ. 1997 และ 234 ครั้งปี ค.ศ. 1998 ส่วนใหญ่จะเป็นการระบาดเล็กๆมีผู้ป่วยน้อยกว่า 50 ราย มีเพียง 6% ของการระบาดที่มีผู้ป่วยระหว่าง 50-499 ราย และการระบาดครั้งใหญ่ที่มีผู้ป่วยมากกว่า 500 รายมีเพียงสองครั้งคือในเดือนเมษายน ค.ศ. 1996 ที่เมือง Niigata มีผู้ป่วย 691 ราย เกิดจากการรับประทานปูต้มและ ค.ศ. 1998 ที่เมือง Shiga มีผู้ป่วย 1167 ราย ที่รับประทานอาหารที่ปรุงในงานรื่นเริงการระบาดในญี่ปุ่นมีบ่งออกแต่จะมีผู้ป่วยครั้งละไม่มาก (Anonymous, WER, 1999)

ส่วนการระบาดในไต้หวันระหว่างปี ค.ศ. 1986-1995 มีการระบาด 197 ครั้งจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Pan *et al.*, 1997) มีการระบาดมากกว่า 200 ครั้งในปี ค.ศ. 1997 รวมถึงผู้ป่วย 146 รายที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการรับประทานอาหารกล่องเป็นอาหารเที่ยง (Anonymous, Promed, 1999)

ในสหรัฐอเมริกาการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ครั้งสำคัญครั้งแรกเกิดในรัฐ Maryland ปี ค.ศ. 1971 ทำให้มีผู้ป่วย 320 ราย ซึ่งเกิดจากการรับประทานปูนึ่งและต่อมาเกิดการระบาดขึ้นตลอดชายฝั่งของสหรัฐอเมริกาและมีการระบาด 42 ครั้งระหว่างปี 1973-1987 มีสาเหตุจากหอยกุ้งปู 33 ครั้ง ปี 1989 Hoge และคณะ รายงานจากโรงพยาบาลที่อ่าว Chesapeake พบว่าผู้ป่วยติดเชื้อ *Vibrio* 9 ใน 13 ราย (>69%) เป็น *V. parahaemolyticus* และจากการประชุมที่ New Orleans ก็รายงานว่าเชื้อนี้พบได้ในอ่าวเม็กซิโกและผู้ป่วยที่ติดเชื้อในอ่าวแห่งนี้ (Lowry *et al.*, 1989; Bean and Griffin, 1990) การระบาดครั้งใหญ่ที่สุดเกิดในช่วงหน้าร้อนปี ค.ศ. 1978 มีผู้ป่วย 1,133 ราย จาก 1,700 ราย ที่รับประทานกุ้งต้มเป็นอาหารเย็นใน Port Allen La. สาเหตุเนื่องจากเอาไปในตอนเช้าเพื่อเป็นอาหารเย็นกลับเข้าไปใส่ในกล่องเดิมที่เก็บกุ้งแล้วขนส่งไปต่ออีกหลายไมล์ได้โดยการเก็บในตู้เย็นหลัง

จากนั้น 7-8 ชั่วโมงจึงรับประทานซึ่งเป็นการติดเชื้อก่อโรคที่เป็นมลทินของอาหาร ภายหลังการปรุง (Oliver and Kaper, 1997) ได้มีการสำรวจบริเวณชายฝั่งรอบๆอ่าวสี่แห่งใน สหรัฐอเมริกาปี ค.ศ. 1991 Desenclos และคณะพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุที่สำคัญอันดับสอง(มากกว่า 26%) ที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบเป็นพิษจากการรับประทานหอยนางรมดิบใน Florida ปี ค.ศ. 1993 Levine และคณะพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (37% ใน 71 ราย) การระบาดสามครั้งในสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1997-1998 มีสาเหตุมาจากการรับประทานหอยนางรมดิบในเดือนสิงหาคม ค.ศ. 1997 ผู้ป่วย 209 ราย เกิดจากการรับประทานหอยนางรมจากชายฝั่งแถบ California, Oregon, Washington และ British Columbia (Anonymous, 1997; CDC, 1998) ในหน้าร้อนปี ค.ศ. 1998 ผู้ป่วย 416 ราย เกิดอาการท้องเสียหลังรับประทานหอยนางรมจากอ่าว Galveston ใน Texas ได้รับการยืนยันว่าเกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* 110 ราย ระหว่างเดือนกรกฎาคม-กันยายน ค.ศ. 1998 ผู้ที่ป่วยให้รับการยืนยันว่าติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* เกิดจากการรับประทานหอยนางรมดิบและปูจากบริเวณ Long Island (CDC, 1999)

ในประเทศฝรั่งเศสมีรายงานการระบาดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพียงหนึ่งครั้ง (Lemoine *et al.*, 1999) ในเดือนเมษายน ค.ศ. 1997 มีผู้ป่วย 44 ราย เกิดอาการท้องเสียหลังรับประทานกุ้งที่มาจากทวีปเอเชีย ได้นำอุจจาระผู้ป่วย 5 รายมาทำการตรวจสอบ ปรากฏว่า 3 รายติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่ไม่สามารถแยกเชื้อได้จากอาหาร จากการศึกษาย้อนหลังพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ non-cholera vibrio ในประเทศฝรั่งเศสระหว่างปี 1995-1998 มี 7 รายที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ผู้ป่วย 1 รายที่มีปัญหาสุขภาพติดเชื้อในกระแสเลือด 6 รายมีอาการลำไส้อักเสบ ในจำนวนนี้ 2 รายมาเที่ยวเอเชียในเวลาใกล้เคียงกัน 2 รายรับประทานหอยนางรมดิบส่วนอีก 2 รายไม่ทราบสาเหตุ (Geneste *et al.*, 2000)

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงสูงถึงร้อยละ 25 ของสาเหตุทั้งหมดซึ่งสูงกว่า *Salmonella* และ *Shigella* (อรสา สุตเธียรกุล, 2541) และจากการสำรวจผู้ที่มีสุขภาพสมบูรณ์จำนวน 450 คน พบ 3.8% (17 คน) เป็นพาหะเชื้อ *V. parahaemolyticus* และมีผู้ป่วย 3 รายที่มีอาการท้องเดินไม่รุนแรง (บุญเยี่ยม เกียรติคุณ, 2527) และจากรายงานการสำรวจ *V. parahaemolyticus* ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยาประเทศไทยพบเชื้อนี้เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 60.56, 56.78 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ. 2540-2545 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเชื้อต่อต้านจุลชีพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขในการเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อก่อโรคกลุ่มอุจจาระร่วง

ใน 32 โรงพยาบาลเครือข่ายพบว่าในปี พ.ศ.2543 พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 คือพบเชื้อ 1,310 จากผู้ป่วย 5,337 ราย (24.5%) ในปี พ.ศ.2544-46 พบเป็นสาเหตุอันดับ 2 รองจากเชื้อ *Salmonella* คือพบเชื้อจากผู้ป่วย 1,148 คนใน 6,879 ราย, 805 คนใน 4,194 ราย และ 636 คนใน 4,081 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.7, 19.1 และ 15.6 ของผู้ป่วยตามลำดับ ผลการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขระหว่างปี พ.ศ. 2543-มิถุนายน 2547 เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวนรวมทั้งสิ้น 629 สายพันธุ์ จากผู้ป่วย 543 สายพันธุ์ 78 สายพันธุ์ และน้ำ 8 สายพันธุ์ (http://webdb.dmsc.moph.go.th)

1.2.2.1 ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 µm สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) แต่เจริญในภาวะที่มีออกซิเจนดีกว่าอนึ่งไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูลเมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่ด้วย single polar flagellum แต่ริเริ่มในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella เพื่อใช้ในการเกาะติด (Bellas, 1986; McCarter *et al.*, 1988) สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (chemoorganotrophic) *V. parahaemolyticus* สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ไม่สามารถหมักน้ำตาล sucrose แต่หมักน้ำตาล glucose ให้กรดแต่ไม่ให้แก๊สดังนั้นลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS จึงมีสีเขียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร *V. parahaemolyticus* สามารถหมักน้ำตาล mannitol และ mannose แต่ไม่สามารถหมัก lactose, salicin และ cellubiose สามารถย่อยสลาย tryptophan เป็น indole ให้ผลบวกกับการทดสอบ lysine ให้ผลลบกับการทดสอบ arginine และ Voges-Proskauer

V. parahaemolyticus มีโครงสร้างทางแอนติเจนประกอบด้วย somatic (O) antigens 13 กลุ่ม capsular (K) antigens 71 ชนิด และ flagellar antigens มากกว่า 70 กลุ่ม K antigen จะถูกทำลายด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส เวลา 1-2 ชั่วโมง (Ohmi, 1966) การ autoclave เชื้อก่อนเพื่อทำลาย K antigen จะทำให้สามารถตรวจสอบ O antigen ได้ การตรวจสอบจะใช้วิธี agglutination ด้วย antiserum ซึ่ง O- antiserum ของแต่ละกลุ่มมักจะมีชนิดของ K antigen ที่จำเพาะเจาะจง (Sakazaki, 1968) (ตารางที่ 1.3) แอนติเจนของ polar flagellum จะต่างจาก peritrichous (lateral) flagella (Shinoda *et al.*, 1974) แอนติเจนจากโปรตีน flagellin ที่พบใน polar flagellum จะพบใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ (Shinoda *et al.*, 1976)

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส (mesophilic) อุณหภูมิต่ำสุด

ที่ สามารถทนได้ คือ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ สูงสุดที่ สามารถทนได้ 44 องศาเซลเซียส แต่ อุณหภูมิ ที่ เหมาะสมในการเจริ ญอยู่ ระหว่ าง 30-37 องศาเซลเซียส ผลของความร้ อนต่ อการ อยู่ รอดของ *V. parahaemolyticus* พบว่ าที่ อุณหภูมิ 60 80 หรื อ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที สามารถทำ ลายเชื้ อจำ นวน 10^2 เซลล์ ได้ แต่ หากเชื้ อมีปริ มาณเพิ่ มมากขึ้ น เช่ น ปริ มาณเชื้ อ 10^5 เซลล์ พบว่ าที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หรื อ 80 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที อาจจะมีบาง เซลล์ รอดแต่ เชื้ อสามารถถูกทำ ลายได้ หมดในน้ ำเดื อดที่ (Vanderzant and Nickelson, 1972) เชื้ อ *V. parahaemolyticus* จะตายถ้ าอุณหภูมิ ต่ ำกว่ า 5 องศาเซลเซียส ในการทำ อาหารถ้ า อุณหภูมิ ถึ ง 65 องศาเซลเซียสก็ จะฆ่ าเชื้ อนี้ ได้ เพราะ Thermal D time ของเชื้ อ *V. parahaemolyticus* ที่ 65 องศาเซลเซียสจะใช้ เวลาน้ อยกว่ า 1 นาที และที่ 55 องศาเซลเซียส 28 นาที Thermal D time จะเพิ่ มขึ้ นถ้ า pH เพิ่ มจาก 5 เป็ น pH 8 (Vanderzant and Nickelson, 1972; Andrews *et al.*, 2000) ในการทำ อาหารทะเลถ้ าไม่ สามารถฆ่ าเชื้ อ *Vibrio* ได้ ทั้ งหมดเชื้ อจะกลั บมาเจริ ญได้ อีกถ้ ายั งไม่ ได้ รั บประทานหรื อไม่ ได้ เก็ บไว้ ที่ อุณหภูมิ ต่ ำกว่ า 4 องศาเซลเซียส หรื อสูงกว่ า 60 องศาเซลเซียส (Blake, 1984; Paparella, 1984) ถ้ าเชื้ ออยู่ ในหอยนางรมที่ อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส หลั ง 24 ชั่ วโมงเชื้ อจะเพิ่ มจำ นวน 13-26 เท่ า (Kaufman, 2003) เชื้ อสามารถเจริ ญได้ ที่ pH ค่ อนข้ างกว้ าง คื อ 4.8-11 แต่ pH ที่ เหมาะสมในการเจริ ญอยู่ ในช่ วง pH 7-8 ค่ ำจะทำ ให้ การเจริ ญของเชื้ อลดลง การเจริ ญเติ บโตจะถูกยั บยั้ งถ้ ามี 0.1% (Kaufman, 2003) sodium diacetate และ 0.1% sorbic acid เชื้ อ *V. parahaemolyticus* จะไวต่ อการฉายแสงยูวี ในปลาน้ ำจื ดที่ อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส D value (Decimal Death Dose) คื อ ระดั บความเข้ มข้ นของรั งสีที่ ทำ ให้ จำ นวนแบคทรี ย์ ลดลง 90% เท่ ากั บ 0.022 kGy แต่ ในกุ้ งแช่ แข็ งเท่ ากั บ 3 kGy และ 1 kGy ในหอยนางรมลง 5-6 $\log_{10}$ (Jakabal M *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ โซเดียมคลอไรด์ ก็ เป็ นปั จจั ยสำ คั ญในการเจริ ญของเชื้ อ โซเดียมคลอไรด์ ที่ เชื้ อสามารถเจริ ญได้ อยู่ ในช่ วง 0.5-8% ความเข้ มข้ นที่ เหมาะสมคื อ 2-3% ภายใต้ สภาวะที่ เหมาะสมจะมี generation time สั้ นประมาณ 9-10 ชั่ วโมง (Kaufman *et al.*, 2003) ได้ ทำ การศึ กษาการเจริ ญของเชื้ อ *V. parahaemolytiums* ในหอยเป๋ าอื้ อ (Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta*) โดยเลี้ ยง *V. parahaemolyticus* ใน tripical soy broth (TSB) ที่ มีความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ ที่ ระดั บต่ างๆ คื อ 0.5 1.5 2.5 3.5% แล้ วฉีด *V. parahaemolyticus* ในปริ มาณเท่ ากั นเข้ าหอยเป๋ าอื้ อ หลั งจากนั้ น 48 ชั่ วโมง พบว่ าการลดลงของจำ นวนแบคทีเรี ยในหอยจะสูงใน *V. parahaemolyticus* ที่ เลี้ ยงในโซเดียมคลอไรด์ 2.5% นอกจากนี้ ยั งพบว่ าการเจริ ญของเชื้ อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร TSB ที่ มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 2.5 3.5 และ 4.5% หลั ง 12 ชั่ วโมง จะเจริ ญมากกว่ าที่ มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5% *V. parahaemolyticus* จะเจริ ญได้ ดีในอาหาร

เลี้ ยงเชื ้ อ TSB – 2.5% NaCl นาน 24 ชั ่ วโมง ในขณะที่ ถ้ าความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ อยู่ ระหว่ าง 2.5 – 3.5% จะเจริ ญได้ ดีที่ 48 และ 72 ชั ่ วโมง แต่ ถ้ าความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ ดั งกล่ าวข้ างต้ น 0.5-4.5% หลั ง 96 ชั ่ วโมง (Cheng *et al.*, 2004)

V. parahaemolyticus จะมีการสร้ าง unsheated peritrichous หรื อ lateral flagella บนสารอาหารแข็ งหรื อกึ ่ งแข็ ง (solid or semisolid medium) มีการสร้ าง sheated polar flagellum เมื ่ ออยู่ ในอาหารเหลว (Allen and Baumann, 1971; Baumann *et al.*, 1971; Yabuuchi *et al.*, 1974; Belas *et al.*, 1986) การสร้ าง polar flagellum ถื อว่ าเป็ นภาวะปรากฏ (Yabuuchi *et al.*, 1974) *V. parahaemolyticus* ที่ มี polar flagellum จะเคลื ่ อนที่ ได้ เร็ วในที่ ที่ มีโซเดียมคลอไรด์ สูง มีการยอมรับกันโดยทั่ วไปว่ ามีการเพิ ่ มขึ ้ นของ polar flagella เนื ่ องจากเชื ้ อมีการเจริญเติบโตที่ ดี (McCarter *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 2004) โครงสร้ างของ peritrichous จะไม่ เหมื อน polar flagellum จะถูกยั บยั ้ งการสร้ างในอาหารที่ มี pH ตั ้ งแต่ 8.5 คาดว่ า pH สูงมีผลต่ อเมมเบรนโดยตรง (Kimura *et al.*, 1979) การเคลื ่ อนที่ ของเชื ้ อ *V. parahaemolyticus* บนสารอาหารกึ ่ งแข็ ง (semisolid medium) หรื อเรียกว่ า swarming จะอยู่ ภายใต้ การควบคุ มของจีน lateral flagella (*laf*) ซึ ่ งประกอบด้ วยจีน 38 ชนิ ด *laf* จีน จะมีการแสดงออกเมื ่ อมีการยั บยั ้ งการสร้ าง polar flagellum การแสดงออกของจีน *laf* ขึ ้ นกั บปั จจั ยของสิ ่ งแวดล้ อมและตั วควบคุ ม (Guvener and McCarter, 2003; Hsieh *et al.*, 2003; Jaques and McCarter, 2006) ต่ อมามีการพบจีน *Vpa* H ซึ ่ งไม่ ได้ มีความใกล้ เคียงกั บจีนอื ่ นๆ ในสกุ ล *Vibrio* เพราะ phylogenetic branch จะต่ างจาก hns (histone-like nucleotide sequence) ซึ ่ ง hns ถื อเป็ นโครงสร้ างที่ สำ คั ญของ enteric bacteria *Vpa* H มีปริ มาณ guanine ร่ วมกั บ cytosine (ค่ า G+C content) ของดีเอ็ นเอเท่ ากั บ 38.6 mol% ในขณะที่ G+C content บริ เวณอื ่ นๆ ของ *Vibrio* เท่ ากั บ 45.4 mol% จีน *Vpa* H จะพบเฉพาะในสายพั นธุ์ ที่ มีจีน *tdh* และ KP$^-$ มีขนาด 2.6 kb อยู่ ถั ดจาก *tdh* gene จึ งมีความเป็ นไปได้ ที่ *Vibrio* ได้ รั บจีนนี้ มาจากแหล่ งอื ่ น swarming activity มีบทบาทสำ คั ญในการที่ แบคทีเรียจะเกาะผิ วของเซลล์ โฮสต์ และจีน *Vpa* H ที่ ถูกทำ mutant ปรากฏว่ า swaming activity ลดลง 50% ช่ วยยื นยั นว่ าจีนทั ้ งสองมีบทบาทสำ คั ญต่ อการสร้ าง lateral flagella (Stewart and Gode, 2005)

โคโลนี *V. parahaemolyticus* มี 2 แบบ *V. parahaemolyticus* ที่ มีโคโลนีเป็ น opaque (OP) จะมี capsular polysaccharide มากจะทำ ให้ การ swarm ไม่ ดี ในขณะที่ โคโลนีแบบ translucent (TR) จะมี capsular polysaccharide น้ อยกว่ าดั งนั ้ นการ swarm จะดีกว่ า จะมีการเปลี่ ยนแปลงระหว่ าง OP และ TR ขึ ้ นกั บอาหารที่ ใช้ เลี้ ยงเชื ้ อ (McCarter, 2003; Hsieh *et al.*, 2003)

จากการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *V. parahaemolyticus* 21 ตัวอย่างที่ได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลสามแห่งประเทศมาเลเซียพบว่าเชื้อไวต่อยา streptomycin norfloxacin และ chloramphenicol แต่เชื้อจะดื้อต่อยา penicillin (100) ampicillin (95.2%) carbenicillin (95.2%) erythromycin (95.2%) bacitracin (71.4%) cephalpthin (28.6%) moxalactam (28.6%) kanamycin (19.1%) tetracycline (14.3%) nalidixic acid (9.5%) และ gentamycin (9.5%) เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ทดสอบทั้งหมดไม่ไวต่อยา tetracycline แต่มีเพียงหนึ่งตัวอย่างที่ดื้อ (Thail *et al.*, 2005) และที่ประเทศชิลีตั้งแต่ปี ค.ศ. 1998 ถึงปัจจุบันพบการระบาดของ *V. parahaemolyticus* สามครั้งครั้งล่าสุดในช่วงหน้าร้อนปี ค.ศ. 2005 มีผู้ป่วยมากกว่า 10,000 คน มีผู้เสียชีวิตหนึ่งคน มีเพียง 6% ของผู้ป่วยจะพบเม็ดเลือดขาวในอุจจาระ สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกเป็นสายพันธุ์ O3:K6 พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไวต่อยา tetracycline ciprofloxacin และ chloramphenicol ดื้อต่อยา ampicillin (Heitmann *et al.*, 2005)

ในธรรมชาติพบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เชื้อจะไม่ตาย แต่ไม่สามารถเจริญได้ มีการศึกษาเลี้ยงเชื้อในน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ heart infusion agar และ TCBS แต่เชื้อยังมีขบวนการ metabolism และเซลล์เมมเบรนยังมีสภาพสมบูรณ์ แต่มีการเปลี่ยนลักษณะรูปร่างของเซลล์จากรูปแท่งเป็นเต่นรูปก้อนกลม บางสายพันธุ์สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้ หากมีการเพิ่มอุณหภูมิก่อนการเพาะเชื้อ (Allen and Baumann, 1971; Johnston and Brown, 2002)

การอยู่รอดในอาหารต่างๆ พบว่าเมื่อนำแผ่นเนื้อปลาที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีปริมาณ 10 องศาเซลเซียส ปริมาณ *V. parahaemolyticus* จะลดลง 100-1000 เท่าการเก็บแผ่นเนื้อปลาที่ 4 หรือ 8 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อจะลดลงน้อยกว่าเก็บในที่แช่แข็ง หรืออยู่อุณหภูมิห้องเก็บคล้ายกัน (Vanderzant and Nickelson, 1972; Vasudevan P *et al.*, 2002) เมื่อนำกุ้งทั้งตัวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3, 7, 10 หรือ -18 องศาเซลเซียส ปริมาณ *V. parahaemolyticus* จะลดลงแต่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 8 วัน ในหอยนางรมที่วางบนชั้นจำหน่ายอาหารอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสยังมีชีวิตอยู่ได้อย่างน้อย 3 อาทิตย์ และสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วัน และเช่นเดียวกับ *V. parahaemolyticus* ในซูริมิ (surimi) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อลดลงแต่สามารถเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Wong *et al.*, 1994) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใน TSB -3% NaCl ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อเข้าสู่ระยะ mid-exponential phase แล้วนำเชื้อไปเลี้ยงต่อใน Morita mineral salt (MMSN-0.5% NaCl) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อจะเข้าสู่ภาวะ Viable but nonculturable state (VBNC) ยกเว้นเชื้อ *V. parahemolyticus* ที่เดิมเลี้ยงที่

อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส หลัง 49 วัน เชื้อจะเข้าสู่ ภาวะ VBNC ที่เชื้อที่เลี้ยงที่ อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียสจะเข้าสู่ ภาวะ VBNC หลัง 35 วัน แต่เชื้อที่เริ่มอยู่ในระยะ mid – exponential และ stationary phase แล้วนำไปเลี้ยงใน MMS – 3% NaCl จะเข้าสู่ ภาวะ VBNC หลัง 56 วัน แต่เชื้อในระยะ mid-exponential phase จะลดลงมากกว่าระยะ stationary phase อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เชื่อว่าเนื่องจากมีการสร้างสารขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองจากการอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมทำให้เข้าสู่ VBNC ช้าลง (Wong and Wang, 2004) การทดสอบการอยู่รอดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อโดนสารเคมีเช่น ethanol พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะมีการเปลี่ยนลักษณะรูปร่างและดัดแปลงในเซลล์ที่มีการเสียหาย การอยู่รอดของเชื้อมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญคือจะสูงขึ้นเมื่อนำมาเพาะเชื้อบน TSA – 3.0% NaCl มากกว่าบน TCBS เซลล์ที่โดน ethanol จะพบว่ามีสารโปรตีนและ nucleic acid สูงในของเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อเนื่องจากเซลล์เมมเบรนได้รับความเสียหาย การอยู่รอดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่สัมผัส ethanol จะคล้ายกับการอยู่รอดของเซลล์ที่ 4 และ -18 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ที่สัมผัส ethanol จะมีความทนต่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ *V. parahaemolyticus* ที่สัมผัส ethanol เป็นเวลา 60 นาที จะมีการอยู่รอดที่ -18 องศาเซลเซียสมากกว่าสัมผัส ethanol แค่ 30 นาที (Chiang *et al.*, 2006)

1.2.2.2 แหล่งที่อยู่

V. parahaemolyticus พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งทะเลในน้ำทะเลทั่วโลก ในตะกอนดิน อนุภาคแขวนลอย สัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู ปลา แพลงก์ตอน และสาหร่าย การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นกับฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนจะพบมากที่สุด การปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล เมื่ออุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและปนเปื้อนในน้ำทะเลมากขึ้นทำให้จำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสูงขึ้น พบเชื้อนี้ในหอยนางรม 7.2, 500, 1,350, 150 MPN/g ช่วงฤดูฝน ใบไม้ร่วง ใบไม้ ผลิ และฤดูร้อน ตามลำดับ พบเชื้อนี้ในปลาช่วงฤดูใบไม้ผลิ 43% แต่ในช่วงฤดูร้อนจะพบสูงถึง 43.6% ที่ประเทศอิตาลีปกติจะพบเชื้อนี้ในหอยทั่วไปน้อยกว่า 10 CFU/g แต่จะสูงขึ้นในหน้าร้อน (Miyamoto, 1969; DePaola *et al.*, 1990; Daniels *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2002) ในช่วงฤดูหนาวเชื้อจะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้น้ำ นอกจากนี้พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ในแพลงก์ตอนสัตว์เมื่ออุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 15 ถึง 19 องศาเซลเซียส โดยเชื้อดูดซับสารไคตินบนแพลงก์ตอนเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อนี้จะเจริญในเซลล์ของแพลงก์ตอนและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในน้ำทะเล จากการศึกษาพบว่าเชื้อไม่เจริญในน้ำทะเลที่

อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส แต่สามารถแยกเชื้อจากน้ำที่มีอุณหภูมิของตะกอนดินจะต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (Kaneko and Colwell, 1973)

ประเทศไทยมีอุณหภูมิตลอดปีไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นการระบาดของโรคจึงพบได้ทุกเดือน แต่พบผู้ป่วยมากที่สุดในเดือนมิถุนายน และพบน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม จากการสำรวจเชื้อบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทย โดยเก็บตัวอย่างน้ำ 234 ตัวอย่าง จากระดับผิวน้ำ ระดับกลาง และระดับผิวดินจากตะกอนดิน พบว่าตัวอย่างบริเวณฝั่งอ่าวไทยตอนบนมีเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน (เกรียงศักดิ์ สุวรรณโชติ, 2524) โดยบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีเชื้อในน้ำทะเล 54% ตะกอนดิน 72% ฝั่งทะเลอันดามันมีเชื้อในน้ำทะเล 8% ตะกอนดิน 44% ผลดังกล่าวอาจเกิดจากบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ กล่าวคือเป็นบริเวณที่ประชากรหนาแน่น มีสารอินทรีย์และสิ่งปฏิกูลจากคนและสัตว์น้ำไหลลงสู่อ่าวไทยจำนวนมาก จึงทำให้สภาวะเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน (บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ และคณะ, 2527)

1.2.2.3 ปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค

1.2.2.3.1 Thermostable direct hemolysin

ความสามารถในการสร้าง hemolysin เป็นปัจจัยหนึ่งของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์เท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในมนุษย์ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้าง hemolysin ซึ่งทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ β-hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษที่เติมเลือดลงไป เช่น Wagatsuma agar ซึ่งจะมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7% (ตารางที่ 1.4) ปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่า Kanagawa phenomenon (KP) ซึ่งใช้การทดสอบนี้เป็น virulence marker สำหรับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรค การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดงยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อย่างเช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ถ้าต่ำกว่า 5% สายพันธุ์ก็จะให้ผล KP การอ่านผล ถ้าใช้เชื้อ 1 หยด (จากที่บ่มเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวประมาณ 3-6 ชั่วโมง) บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แต่ถ้าเป็น steak ในจานเพาะเชื้อ และส่งตรวจโดยตรงอาจจะใช้เวลาบ่มเพาะถึง 48 ชั่วโมง จึงจะได้ผล KP ที่ถูกต้อง สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยประมาณ 88-96% ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมพบเพียง 1-2% เท่านั้น (Sakazaki *et al.*, 1968; Miyamoto *et al.*, 1969) แสดงว่า hemolysin ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการก่อโรค ซึ่งเรียกว่า thermostable direct hemolysin (TDH) (Janda *et al.*, 1988; Iida and Yamamoto, 1990; Honda *et al.*, 1991; Nishibuchi *et al.*, 1992; Honda and Iida, 1993; Nishibuchi and Kaper, 1995) TDH จัดเป็น pore-forming toxin

ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำให้เซล์อแดงในหลอด human anioic membrane cell (FL cell) โดยไปลดจำนวน microvilli ที่ผิวเซลล์ ทำให้ไซโทพลาสซึมเสื่อมและนิวเคลียสแตกซึ่งกลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ TDH สามารถยับยั้งการ phosphorylation ของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง (Sakurai, 1976; Honda *et al.*, 1992; Huntley *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1994) TDH เป็นพิษต่อเซลล์หลายชนิดทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดเช่น คน สุนัข หนู และให้ผล hemolysis ในการสลายเม็ดเลือดแดงกระต่ายและแกะ แต่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงกับเม็ดเลือดแดงม้าไม่มี neuraminidase-sensitive gangiosides G_{T1} และ G_{D1a} โดยเฉพาะอย่างยิ่ง G_{T1} ganglioside ซึ่งเป็น receptor site ของ TDH ดังนั้นจึงใช้เม็ดเลือดแดงม้าของ TDH ไม่ได้ (Takeda *et al.*, 1976; Honda and Iida, 1993) การศึกษาการสร้าง hemolysis ที่ระดับ pH ต่างๆ พบว่าจะมีการสร้าง hemolysin ที่ช่วง pH 5.5-6.5 และสร้างในระยะ late exponential หรือ early stationary สำหรับสายพันธุ์ KP ความสำคัญของ pH ต่อการสร้าง hemolysin จะมีผลต่อกลุ่มมากกว่ากลุ่มที่ให้ผล weak หรือ KP สามารถตรวจพบ hemolysin เมื่อพบเชื้อ 10^6 cell/g ทนความร้อนที่ pH 5.5-6.5 ได้ดีกว่า pH 7.0-8.0 (Cherwonogrodzky and Clark, 1981; Osawa and Yamai, 1996) TDH มีผลทำให้สัตว์ทดลองขนาดเล็กเสียชีวิตทำให้เกิด vascular permeability ที่หนังกระต่ายเกิด increased permeability ของ myocardial membrane และ intestinal จึงทำให้เกิด cardiotoxicity และ enterotoxicity เมื่อทดสอบกับ rabbit ileal loop (RIL) (Takeda, 1988) TDH ทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ (fluid accumulation, FA) ของกระต่ายคล้ายกับ cholera toxin เพียงแต่ใช้ปริมาณมากกว่าหลายร้อยเท่า (Honda *et al.*, 1990) พบว่าเมื่อ TDH จับกับ receptor ที่ intestinal mucosa ของกระต่าย จะทำให้เพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ ซึ่งนำให้เกิดการหลั่งคลอไรด์ โดยจะขึ้นกับปริมาณของ TDH และเวลา (Raimondi *et al.*, 1995) คาดว่าเมื่อ TDH จับกับ receptor จะมีการส่งสัญญาณไปกระตุ้นภายในเซลล์ ทำให้มีผลต่อการ calcium channel และเมื่อทดสอบกับ rat crypt small intestinal cell monolayer (IEC-6) และ human colonic epithelial cell (CaCo-2) พบว่า TDH มีฤทธิ์เหนี่ยวนำเข้าเซลล์ ทำให้เกิดการหลั่งไอออนคลอไรด์ ตรวจการแบ่งตัวของเซลล์ และทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนไป TDH จะมีผลต่อ IEC-6 มากกว่า CaCo-2 cell และ TDH บริสุทธิ์ ความเข้มข้นมากกว่า 25 µg สามารถกระตุ้นให้ rabbit ileal loop ทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ สายพันธุ์ KP ทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้มากกว่าสายพันธุ์ KP (Osawa and Yamai, 1996; Fabbri *et al.*, 1999; Raimondi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000)

TDH เป็น homodimer protein ที่ไม่มีฟอสโฟไลปิดและคาร์โบไฮเดรต มีน้ำหนักโมเลกุล 44 kDa ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน isoelectric point เท่ากับ 4.9

โดยแต่ ละหน่ วยย่ อยมีขนาด 22 kDa แต่ ละหน่ วยประกอบด้วยกรดอะมิ โน 165 ตั ว (Takeda *et al.*, 1978; Honda and Iida, 1993) เมื่ อรวมส่ วนที่ เป็ น propeptide จะประกอบด้ วยกรดอะมิ โน 189 ตั ว (Nishibuchi and Kaper, 1995) กรดอะมิ โน glycine ที่ ตำแหน่ ง 62 จะมีบทบาทสำ คั ญมากต่ อ TDH ในการที่ จะแทรกเข้ าไปใน lipid bilayer ของเซลล์ (Takashi *et al.*, 2006) TDH มี คุ ณสมบั ติ ทนความร้ อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ที่ pH 6 และไวต่ อ trypsin (Miyamoto *et al.*, 1980) TDH ถูกควบคุ มการสร้ างโดยจีน *tdh* จากการหาลำ ดั บนิ วคลีโอไทด์ ของยีนใน *V. parahaemolyticus* สายพั นธุ์ ต่ างๆ *tdh1-tdh 5 tdhA tdhS tdhX tdh/I* และ *tdh/II* ทั้ งหมดมี ลำ ดั บนิ วคลีโอไทด์ เหมื อนกั นมากกว่ า 97% ดั งนั้ นยีนเหล่ านี้ จึ งน่ าจะเป็ นจีนกลุ่ มเดียวกั น เนื่ องจากจีน *tdh* มีความเหมื อนกั นมากโดยโปรตีนที่ ได้ จะไม่ สามารถแยกความแตกต่ างทางภูมิ คุ้ มกั นได้ จากการศึ กษาต่ อมาพบว่ าเหมื อน *tdhS tdh 2* เหมื อน *tdhA tdh 3* เหมื อน *tdh/I* และ *tdh/I* เหมื อน *tdh X* (Iida and Yamamoto, 1990; Yoh *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1994; Nagayama *et al.*, 1995; Nishibuchi and Kaper, 1995) จีน *tdh* ส่ วนใหญ่ อยู่ บนโครโมโซม ยกเว้ น *tdh 4* อยู่ บนพลาสมิ ด (Nishibuchi and Kaper, 1995) จากการศึ กษา *V. parahaemolyticus* สายพั นธุ์ KP^+ และ KP^- พบว่ า KP^+ ทุ กสายพั นธุ์ จะมีจีน *tdh* 2 ชุ ด คื อ *tdh1* และ *tdh2* จากการศึ กษาพบว่ าเชื้ อที่ แยกได้ จากผู้ ป่วย 81% มีจีน *tdh* 2 ชุ ด (Nishibuchi and Kaper, 1990; Iida *et al.*, 1998) *V. parahaemolyticus* ที่ ให้ ผล weakly hemolysis หรื อเรียกว่ า KP-intermediate นั่ น 86% ของสาย พั นธุ์ KP-intermediate มีจีน *tdh* เพียงชุ ดเดียวเช่ นเดียวกั บสายพั นธุ์ ที่ ให้ มีการแสดงออกของจีนต่ ำ จึ งไม่ เกิ ดการย่ อยสลายเม็ ดเลื อดแดงบน Wagatsuma agar หรื อเกิ ดการย่ อยสลายแบบ weak hemolysis แม้ ว่ าโปรตีนจาก *tdh1* และ *tdh2* จะไม่ สามารถแยกจากกั นได้ ทางภูมิ คุ้ มกั น แต่ พบว่ า โปรตีนหลั กมีลำ ดั บอะมิ โนต่ างกั น 7 ตั ว จากการศึ กษาสามารถแยกยีน TDH ที่ ทำให้ บริ สุ ทธิ์ พบว่ ามีความคล้ ายกั บโปรตีนที่ ได้ จาก *tdh1* มากกว่ า *tdh1* (Nishibuchi and Kaper, 1990) แสดงให้ เห็ นว่ ามีการแสดงออกของ *tdh2* มากกว่ า มีการศึ กษาการนำ *V. parahaemolyticus* สายพั นธุ์ KP^+ ทำให้ กลายพั นธุ์ โดยทำ ให้ มีการบกพร่ องของ *tdh1* หรื อ *tdh2* เพื่ อดูการสร้ าง TDH พบว่ า 90% ของปริ มาณ TDH ทั้ งหมดสร้ างโดย *tdh1* สามารถผลิ ต TDH ได้ เพียง 0.5-9.4% จาก *V. parahaemolyticus* สายพั นธุ์ ที่ มีทั้ ง 2 จีน ดั งนั้ นจีนที่ มีความสำ คั ญในการทำให้ เกิ ดปรากฏการณ์ Kanagawa phenomenon คื อ *tdh 2* (Nishibuchi and Kaper, 1990; Nishibuchi *et al.*, 1991) จากการศึ กษาพบว่ าการสร้ าง TDH จะขึ้ นกั บความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ กรดอะมิ โน และฟอสเฟตในอาหารเลี้ ยงเชื้ อ และน้ ำดีของมนุ ษย์ จะมีองค์ ประกอบคื อ glycine และกรด taurocholic ซึ่ ง *V. parahaemolyticus* ใช้ เป็ นสารตั้ งต้ นในการสร้ าง TDH ถ้ าในอาหารเลี้ ยงเชื้ อมีส่ วนประกอบของ glycholic และ taurocholic (5 mM/liter) จะทำ ให้ การสร้ าง TDH เพิ่ มขึ้ น 4-16

เท่ า ซึ่ งกรด taurocholic จะสำ คั ญมากกว่ า และความเข้ มข้ นของโซเดียมคลอไรด์ เพิ่ มความรุ นแรง ของ TDH เนื่ องจากโซเดียมคลอไรด์ ทำ ให้ เกิ ดการแยกของ TDH เป็ นเส้ นเล็ กๆ และทำ ให้ มีปฏิ กิ ริ ยา ต่ อระบบภูมิ ต้ านทานเพิ่ มขึ้ น (Osawa and Yamai, 1996)

นอกจากพบจีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* แล้ วยั งพบใน *Grimontia hollisae* (*V. hollisae*) ทุ กสายพั นธุ์ ที่ แยกได้ จากผู้ ป่วยและสิ่ งแวดล้ อม จากการศึ กษาโดยใช้ DNA probe ซึ่ งมี ความจำ เพาะกั บจีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ตรวจจั บ DNA ของ *G. hollisae* โดยการทำ DNA colony hybridization พบว่ าให้ ผลบวก (Nishibuchi *et al.*, 1985; Nishibuchi *et al.*, 1988; Shirai *et al.*, 1990) ดั งนั้ นจึ งเป็ นไปได้ ว่ ามีการถ่ ายทอดจีน *tdh* ระหว่ างแบคทีเรียด้ วยกั น ซึ่ งการ ถ่ ายทอดจีน *tdh* อาจจะผ่ านทาง transposition หรื อ transduction เนื่ องจากพบโครงสร้ าง insertion sequence-like element ขนาบข้ างจีน *tdh* (Terai *et al.*, 1991) นอกจากนั้ นยั งพบจีนนี้ ใน *V. mimicus* และ *V. cholerae* non-O1 บางสายพั นธุ์ ที่ แยกได้ จากผู้ ป่วย การศึ กษาลำ ดั บนิ วโอไทด์ พบว่ าจีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* พบว่ าคล้ ายกั นกั บของ *G. hollisae, V. cholerae* non-O1 และ *V. mimicus* 93.3% 97.0% และ 98.6% ตามลำ ดั บ (Baba *et al.*, 1991; Yamasaki *et al.*, 1991; Nishibuchi and Kaper, 1995)

ตารางที่ 1.3 ตารางแอนติเจนของ *parahaemolyticus*

O group	K antigen
1	1, 25, 26, 32, 38, 41, 56, 64, 69
2	3, 28
3	4, 5, 6, 7, 29, 30, 31, 33, 37, 43, 45, 48, 54, 57, 58, 59, 65
4	4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55, 63, 68
5	15, 17, 30, 47, 60, 61, 68
6	18, 46
7	19
8	20, 21, 22, 39, 70
9	2, 3, 44
10	19, 24, 52, 66, 71
11	36, 40, 50, 51, 61

จาก R.M. Twedt (1989)

ตารางที่ 1.4 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma (Wagatsuma, 1968)

Yeast extract	5.0	g
Peptone	10.0	g
Mannitol	5.0	g
K_2HPO_4	5.0	g
NaCl	70.0	g
Agar	15.0	g
dH_20	1.0	L

ปรับ pH เป็น 7.5 เติมเลือด 5% defibrinated ของกระต่ายหรือคนชิงล้างเซลล์เม็ดเลือดแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ sterile แล้ว

1.2.2.3.2 Thermostable direct hemolysin-related hemolysin

พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 จากการระบาดของโรคลำไส้อักเสบจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเกาะ Maldive มีรายงานผู้ป่วยท้องร่วงจากการรับประทานอาหารทะเล จากการแยกเชื้อในผู้ป่วย 51 ราย พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย (94%) เป็นสายพันธุ์แรก ให้ผลลบจากการทำ colony hybridization โดยใช้ *tdh* probe เป็นตัวตรวจจับ (Honda, 1987; Honda *et al.*, 1988) จากการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิต exotoxin ชนิดใหม่ชื่อว่า thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) ซึ่งมีคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันทางฟิสิกส์เคมีและทางชีววิทยาคล้ายTDH โดยสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงบางชนิดแตกเช่นวัวไก่ แกะ ทำให้สัตว์ทดลองตาย (Honda, 1988) มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มการซึมผ่านของของเหลวออกจากหลอดเลือดบริเวณผิวหนังและทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ (Honda *et al.*, 1988; Honda *et al.*, 1990; Ming *et al.*, 1994) จากการศึกษา *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนน้อยจะให้ซีโรกรุ๊ป K8 สร้าง TRH

TRH เป็น homodimer protein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 189 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 48 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกันแต่ละหน่วยมีน้ำหนัก 23 kDa ถูกทำลายด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ควบคุมการสร้างโดยยีน *trh* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *tdh1* 68.4% และ *tdh2* 68.6% โดยความแตกต่างของลำดับเบสจะกระจายตลอดทั่วทั้งจีน จากการศึกษาพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ TDH และ TRH มีความคล้ายกันและมี cysteine 2 ตัวอยู่บริเวณ interchain bond ซึ่งเป็นบริเวณของทั้ง TDH และ TRH (Nishibuchi *et al.*, 1989) เชื่อว่ายีน *tdh* และ *trh* มาจากบรรพบุรุษเดียวกันในช่วงเริ่มต้นของวิวัฒนาการและจีนนี้ตัวใดตัวหนึ่งหรือทั้งสองจีนก็เป็นมาตลอดจนถึงปัจจุบัน (Nishibuchi *et al.*, 1990; Kishishita *et al.*, 1992) *trh* แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ *trh1* และ *trh2* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 84% (ตารางที่ 1.5) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *trh1* และ *trh2* ที่ต่างกันอย่างชัดเจนคือ 6-20 bases ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 205-224 และ 8-20 bases ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 440-459 และมีบริเวณที่เป็น conserved sequence ของทั้งสองจีนคือ 20 bases ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 387-406 *trh1* แสดง hemolytic activity ต่อเม็ดเลือดแดงของคน กระต่ายและวัว ในขณะที่ *trh2* แสดง weak hemolytic activity ต่อเม็ดเลือดแดงของกระต่าย และจะไม่แสดง hemolytic activity เมื่อลดเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงลงจาก 5% เป็น 2.5% *trh1* จะรุนแรงและมีระดับการแสดงออกมากกว่า *trh2* จากการทำ hybridization โดยใช้ oligonucleotide probe พบว่ามีความหลากหลายของ *trh1* และ *trh2* ใน *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ โดยการกระจายตัวของจีน *trh* มีมากกว่าจีน *tdh* จากเหตุผลดังกล่าวเมื่อทำการตรวจหา TRH ด้วย polyclonal antibody โดยวิธี

ELISA จะตรวจพบในสายพันธุ์ที่มียีนเพียง 37.5% (Kishishita *et al.*, 1992) การแสดงออกของ *trh1* น้อยกว่า *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ K8 (Shirai *et al.*, 1990) และการแสดงออกของ *trh1* ไม่ขึ้นกับ ToxRS (Lin *et al.*, 1993) เชื้อในสกุล *Vibrio* เชื้อสาย *cholerae* O1 and non O1 *V. minicus* *V. metchnikovii* *V. fluvialis* และ *V. furnissii* จำนวน 113 สายพันธุ์ ได้นำมาทดสอบ hybridization โดย *trh1* และ *trh2* probe ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบยีนทั้งสองความสัมพันธ์ระหว่างการมียีนดิมจะพบเฉพาะใน *V. parahaemolyticus* แต่จากการศึกษาสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากหอยนางรม Alaska พบยีนที่คล้าย *trh* ใน *V. alginolyticus* จากการ clone และ sequence พบว่าจีนจะคล้าย *trh2* ของ *V. parahaemolyticus* ถึง 98% (Gonzalez-Escalona *et al.*, 2006) Kishishita และคณะได้ศึกษาการกระจายของยีน *tdh* *trh1* และ *trh2* ใน *V. parahaemolyticus* 285 สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วย และ 71 สายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อม โดย colony hybridization พบว่า สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย 112 สาย พบยีน *tdh* อย่างเดียว (39.3%) 17 สายพันธุ์ *trh1* อย่างเดียว (6.0%) 35 สายพันธุ์ *trh2* อย่างเดียว (12.2%) 22 สายพันธุ์มีทั้ง *tdh* และ *trh1* (7.7%) 2 สายพันธุ์มี *tdh* และ *trh2* (0.7%) และ 26 สายพันธุ์ตรวจไม่พบทั้ง 3 จีน (9.1%) ส่วนสายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม 66 สายพันธุ์ตรวจไม่พบ (93.0%) ที่เหลือ 5 สายพันธุ์ตรวจพบ *trh2* (7.0%) ทำให้สรุปได้ว่ายีน *trh1* และ *trh2* เป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคของ *parahaemolyticus*

มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *trh* จีนและการสร้างเอนไซม์ urease ใน *parahaemolyticus* เนื่องจากโดยทั่วไป *V. parahaemolyticus* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ Sakazaki และคณะรายงานว่ามีเพียง 4% ของ *V. parahaemolyticus* ที่สร้างเอนไซม์นี้ได้ (Sakazaki *et al.*, 1963) *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมสามารถสร้างเอนไซม์ urease แต่ให้ผลบวก (Kelly and Stroh, 1989; Kaysner *et al.*, 1990) ซึ่งภายหลังพบว่า *parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนสามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้จากการศึกษา *V. parahaemolyticus* ของโรงพยาบาลบำราศนราดูร ในปี ค.ศ. 1990-1991 จำนวน 489 สายพันธุ์ พบว่า *parahaemolyticus* จำนวน 8% สามารถสร้างเอนไซม์ urease และทุกสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ urease จะมียีน *trh* ในทางกลับกันสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ urease จะไม่มียีน *trh* เมื่อนำมาทดสอบเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมให้ผลเช่นเดียวกัน (Suthienkul *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยซึ่งได้ทำการศึกษา *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ urease จากผู้ป่วยบริเวณ West Coast ของสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1979-1995 เพื่อตรวจหายีน *tdh* *trh1* และ *trh2* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ urease จำนวน 60 สายพันธุ์ 8% (5/60) มียีน *trh1* หรือ *trh2* และ 90% (54/60) มียีน *tdh* ส่วน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง

เอนไซม์ urease จำนวน 25 สายพันธุ์ พบว่า 80% (20/25) มีแต่ ไม่มีจีน จากงานวิจัย ทั้งหมดดังกล่าวจึงเป็นที่ยอมรับว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเอนไซม์ urease และการมีจีน *trh* ใน *V. parahaemolyticus* (Okuda *et al.*, 1997) โดยสายพันธุ์ที่มีจีน สามารถสร้างเอนไซม์ urease เสมอ แต่สายพันธุ์ที่ไม่มีจีนสามารถสร้างเอนไซม์ urese ได้ ความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นผลมาจาก genetic linkage ระหว่างยีน urease (*ure*) และจีน *trh* บนโครโมโซมของเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Iida *et al.*, 1997) จากการศึกษาสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย KP ที่สามารถสร้างเอนไซม์ urease เมื่อนำ urease มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกระตุ้น rabbit ileal loop ทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ได้เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่สูงของแอมโมเนียมอิออนจะมีผลต่อการซึมผ่านเข้าออกของเซลล์บุผนังลำไส้นอกจากนี้ว่าการสร้างเอนไซม์ urease เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ถึงความรุนแรงของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้าง TRH ได้ ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ urease และจีน *trh* ใน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี colony hybridization โดยใช้ *ure* probe และ *trh* probe เป็นตัวตรวจจับพบว่า *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ urease จะสามารถสร้าง TRH แสดงว่าสายพันธุ์ที่สร้างได้มีจีน *trh* อยู่ด้วยกันและเมื่อนำโครโมโซมสายพันธุ์ดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ *Not*I วิเคราะห์ pulse field gel electrophoresis และ hybridize ด้วย *ure* และ *trh* probe พบดีเอ็นเอเพียง 1 band แสดงว่ายีน *trh* และ *ure* อยู่ในชิ้นส่วนเดียวกัน (Iida *et al.*, 1997) และเมื่อนำ *V. parahaemolyticus* 115 สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยซึ่ง 81% มียีน 2 ชุดแต่ไม่มียีน *tdh* และ *ure* อีก 7% มียีน *tdh trh* และ *ure* เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I แล้วทำ pulse field gel electrophoresis และทำ southern blot hybridization ด้วย *tdh* probe *trh* probe และ *ure* probe เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของยีนทั้งสามบนโครโมโซม พบว่ายีน *tdh* ทั้ง 2 ชุดอยู่บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเดียวกันส่วนสายพันธุ์ที่มียีน *trh* และ *ure* ก็มียีนทั้งสามอยู่บนชิ้นส่วนเดียวกันโดยมีขนาด 40 Kb และยีนอยู่ห่างกัน 8.5 Kb ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของยีน *tdh* และ *trh* และ *ure* อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันบนโครโมโซมของ *V. parahaemolyticus* (Iida *et al.*, 1998) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ $^{+}$KP ที่มียีน *tdh1* และ *tdh2* จะมีการสร้าง TDH สูง แต่สายพันธุ์ที่มียีน *tdh* และ *trh* อยู่ด้วยกันจะมีการสร้าง TDH ต่ำกว่าสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* เพียงยีนเดียว ทั้งนี้เนื่องจากยีน *trh* ไม่ถอดยีน *tdh* ในการสร้าง TDH (Okuda *et al.*, 1997)

ตารางที่ 5 ความเหมือนของลำดับ nucleotide ของ *trh 2* เปรียบเทียบกับจีนอื่นๆ

Gene	Origin	Reference (GenBank Accession no.)	% Homology with The *trh 2* gene
trh 2	*V. parahaemolyticus* AT4, chromosome	This study (M88112)	100
trh 1	*V. parahaemolyticus* AQ4037, chromosome	27	84.0
Vp-*tdh 1*	*V. parahaemolyticus* WPI, chromosome	23, 33 (M10069)	68.5
Vp-*tdh 2*	*V. parahaemolyticus* WPl, chromosome	24	68.8
Vp-*tdh 3*	*V. parahaemolyticus* AQ3776, chromosome	24	68.3
Vp-*tdh 4*	*V. parahaemolyticus* AQ3776, plasmid	24	69.0
Vp-*tdh 5*	*V. parahaemolyticus* S19, chromosome	2	69.1
tdhA	*V. parahaemolyticus* T4750, chromosome	11 (D90100)	68.8
tdhS	*V. parahaemolyticus* T4750, chromosome	11 (D90101)	68.6
Vm-*tdh*	*V. mimicus* 6, chromosome	34 (M64120)	68.2
NAG-*tdh*	*V. cholerae* non-01 91, plasmid	1 (M55316)	68.8
Vh-*tdh*	*V.hollisae* 9041, chromosome	37 (M57900)	54.8

(Kishishita *et al.*, 1992)

1.2.2.4 จีน *toxR*

toxR เป็นจีนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved sequence) ในวงศ์ Vibrionaceae พบครั้งแรกใน *V. cholerae* โดยทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ cholare toxin และต่อมาพบว่าสามารถควบคุมการทำงานของจีนอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น *tcpA* gene, *OmpT* gene และ *OmpU* gene (Miller *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989; Dirita, 1992) โดยจีน *toxR* ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของจีนก่อความรุนแรงของโรค โดยสร้างโปรตีน ToxR ไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง upstream ของ promoter ของจีนก่อความรุนแรงของโรค (Miller *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1993)นอกจากนี้ยังพบจีน *toxR* ใน *V. mimicus V. alginolyticus V. fisheri V. parahaemolyticus Photobacterium damselae* subsp. *damselae* และ *P. damselae* subsp. *piscicida* (Lin *et al.*, 1993; Reich and Schoolnik, 1994; Kim *et al.*, 1999; Osorio and Klose, 2000) จากการศึกษาพบว่า ToxR เป็น integral membrane protein ที่มีขนาด 32 kDa ประกอบด้วย 3 domain คือ N-terminal cytoplasmic DNA-binding domain central transmembrane domain และ C-terminal periplasmic domain (Miller *et al.*, 1987) ต่อมามีการพบจีน *toxS* บริเวณ *toxR* operon ทำงานร่วมกับ *toxR* ใน

การกระตุ้นการถอดรหัสของจีนก่อความรุนแรงของโรคของ *V. cholerae* (Miller *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังพบ *toxR* และ *toxS* ใน *V. parahaemolyticus* ทำงานร่วมกันเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของจีน *tdh* มีรายงานว่า *toxR* เกี่ยวข้องกับการควบคุมการถอดรหัสและกระตุ้นการสร้าง TDH ในปริมาณที่สูงซึ่งแตกต่างกับ *tdh2* ผลนี้แสดงให้เห็นว่า *toxRS* กระตุ้นการแสดงออกของ *tdh2* สามารถพบจีนทั้ง *toxR* และ *toxS* ในทุกสายพันธุ์ทั้งในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมโดยจีน และ *toxS* ใน *V. parahaemolyticus* เหมือนกับจีน *toxR* และ *toxS* ใน *V. cholerae* 52% และ 62% ตามลำดับ (Lin *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังพบจีน *toxR* และ *toxS* ใน Vibrio อื่นๆ อีกโดย *toxR* และ *toxS* ของ *V. fisheri* เหมือนกับ *toxR* และ *toxS* ใน *V.cholerae* 43% และ 42% ตามลำดับ และ *toxR* ของ *V. alginolyticus* และ *G. hollisae* เหมือนกับ *toxR* ของ *V. cholerae* 59% และ 61.7% ตามลำดับ (Reich and Schoolnik, 1994) การเปรียบเทียบ 16s rRNA แทน *toxR* ใน *V. parahaemolyticus* กับ *V. cholerae* และ *V. alginolyticus* พบว่าจะคล้ายกัน 92% และมากกว่า 99% ตามลำดับ และถ้าใช้จีน *gyrB* พบว่า *V. parahaemolyticus* จะเหมือนกับ *V. alginolyticus* 86.8% (Kim *et al.*, 1999) *toxR* และ *toxS* ของ *V. vulnificus* เหมือนกับ *toxR* และ *toxS* ของ *V. cholerae* 55% และ 71.5% ตามลำดับ (Lee *et al.*, 2000) *tox R* ของ *V. harveyi* เหมือนกับ *tox R* ของ *V. parahaemolytiums* 87% *V. fluvialis* 84% และ *V. vulmiticus* 89% ตามลำดับ และมีบางส่วนที่คล้ายกับ *V. campbellii* การศึกษา phylogenetics diagram โดยการใช้จีน *tox R* พบว่าสามารถแยก *V. harveyi* ออกจาก *V. parahaemolytiums* และ *V. campbelli* ได้โดยง่าย (Branco and Hedreyda, 2006) มีการใช้ *toxR* เป็นจีนเป้าหมายในการบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR ซึ่งพบว่าให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำและรวดเร็ว (Kim, 1999; Vuddhakul *et al.*, 2000)

1.2.2.5 การก่อโรค

V. parahaemolyticus ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ผู้ป่วยแสดงอาการปวดท้องอุจจาระร่วงบางครั้งมีคลื่นไส้อ้าเจียนมีไข้ขาย ผู้ป่วยบางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปนอาการของโรคเกิดขึ้นหลังได้รับ 10^{9} (Barker and Gangarosa, 1974; Sakazaki *et al.*, 1974) มีการทดสอบในกลุ่มอาสาสมัครพบว่าปริมาณเชื้อที่ให้ 2×10^{5} - 3×10^{7} CFU สายพันธุ์ KP และทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบอย่างรวดเร็วในทางตรงกันข้ามเชื้อ 1.6×10^{10} CFU สายพันธุ์ KP ไม่มีอาการท้องเสีย (Sanyal and Sen, 1974; Oliver and Kapper, 1997) โดยพบว่าผู้ป่วยมากกว่า 90% มีอาการอุจจาระร่วง 82% ปวดท้องและ 71% คลื่นไส้ และ 52% อาเจียร (Barker and Gangarosa, 1974) อาการมักปรากฏหลังจากที่นำเข้าไป 12 ถึง 46 ชั่วโมง บางรายแสดงอาการภายใน 4 ถึง 74 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและผู้ป่วย และขึ้นอยู่กับ

ความเป็นกรดหรือด่างภายในระบบทางเดินอาหาร ผู้ป่วยมักมีอาการโดยเฉลี่ย 2.5 วัน อาการรุนแรงที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมีประมาณ 7% อุจจาระเหลวเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือนกุ้งเน่าปนเลือดมักมีกรดเกลือปนเปื้อนเชื้อนี้แต่ส่วนใหญ่จะทุเลาลงเองโดยไม่ต้องรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ โรคนี้ไม่ค่อยพบในประเทศไทย (CCFH, 2002; http://webdb.dmsc.moph.go.th)

1.2.2.6 ระบาดวิทยา

จากการศึกษาการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอดีตการก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษหรือทางเดินอาหารอักเสบเนื่องจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* เกิดจากซีโรทัยป์ที่หลากหลาย (Suthienkul *et al.*, 1995; Okuda *et al.*, 1997) ซีโรทัยป์ O3 : K6 พบครั้งแรกที่เมือง Calcutta ประเทศอินเดียในเดือนกุมภาพันธ์ ปี ค.ศ. 1996 ในผู้เป็นโรคติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3 : K6 จำนวนมากประมาณ 50-80% ซึ่งซีโรทัยป์นี้มีจีนที่สร้างสารพิษเพียงชนิดเดียว (Okuda *et al.*, 1997) จากการศึกษาในระดับโมเลกุลโดยวิธี Arbitrarily primer polymerase chain reaction (AP-PCR) พบว่าซีโรทัยป์ O3:K6 ที่พบในปี ค.ศ. 1996 เป็นสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งกำเนิด (clone) เดียวกันแต่ต่างจากซีโรทัยป์ที่พบ O3:K6 ก่อนปี ค.ศ. 1996 หลังการระบาดที่เมือง Calcutta ประเทศอินเดียแล้ว *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 ได้แพร่ระบาดไปสู่ประเทศอื่นๆ ทั่วโลกได้แก่ ชิลี ฝรั่งเศส เกาหลี ญี่ปุ่น บังกลาเทศ สเปน ไต้หวัน สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก และประเทศไทย (Chiu, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000; Cabanillas-Beltran *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2007) การระบาดของซีโรทัยป์ O3:K6 เพิ่มสูงขึ้นจากเดิมถึง 75% เปรียบเทียบกับซีโรทัยป์อื่นๆที่มีการระบาดเพียง 56% (Daniels *et al.*, 2000) ในประเทศไต้หวันพบซีโรทัยป์ O3:K6 ครั้งแรกในเดือนกรกฎาคม ค.ศ. 1995 เพียง 0.6% ของการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด แต่ในปี ค.ศ. 1996 ปริมาณการติดเชื้อ

parahaemolyticus ซีโรทัยป์ O3:K6 เพิ่มสูงขึ้นเป็น 50% และเพิ่มสูงสุดในปี ค.ศ. 1998 เป็น 83.3% ต่อจากนั้นได้ลดลงในปี ค.ศ. 1998 และ 1999 แต่ยังคงมีประมาณ 70.5% และ 61.3% ตามลำดับ (Chiou *et al.*, 2000) สำหรับในประเทศไทยจากการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ในปี ค.ศ. 1998 เช่นเดียวกันยายนถึงตุลาคม จำนวน 23 สายพันธุ์ พบซีโรทัยป์ O3:K6 จำนวน 20 สายพันธุ์ (Vuddhakul *et al.*, 2000) นอกจากประเทศในแถบทวีปเอเชียแล้วในปี ค.ศ. 1998 *parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 ยังได้แพร่ระบาดไปถึงประเทศสหรัฐอเมริกาใน Long Island, Sound, Connecticut, New Jersey และ New York จากการศึกษาทางพันธุกรรมโดยวิธี AP-PCR, PFGE และ ribotyping พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 ที่ระบาดไปทั่วโลกมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันและมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรม *tdh* เพียงชนิดเดียว (Okuda *et al.*, 1997; Chowdhury *et al.*, 2000; Chowdhury *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000) แม้แต่ในประเทศชิลีซึ่งก่อนปี ค.ศ. 2004 ไม่เคยมีรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำทะเลไม่สูง แต่ในปี ค.ศ. 2004-2005 อันทำให้น้ำทะเลมีอุณหภูมิสูงขึ้น สายพันธุ์ที่ระบาดก็เป็น O3:K6 เช่นเดียวกันที่เป็นสายพันธุ์ที่ระบาดทั่วโลก พบว่าในอาหารประเภทมีเปลือกแข็งหุ้มเช่น หอย กุ้ง ปู มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงถึง 53% (Fuenzalida *et al.*, 2006)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1998 ในเมือง Catcutta ประเทศอินเดียและบังคลาเทศ พบ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O4:K68 และ O1:KUT ระบาดร่วมกับซีโรทัยป์ O3:K6 ที่มีลักษณะรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยวิธี AP-PCR PFGE และ Ribotyping พบว่าทั้งสามซีโรทัยป์มีลักษณะของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันแต่ non-O3:K6 O4:K68 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันแสดงว่าสายพันธุ์ที่มีการระบาดทั่วโลกในปัจจุบันมาจากแหล่งเดียวกันแต่มาจากแหล่งกำเนิดที่ต่างกับสายพันธุ์ที่ไม่มีการระบาด (Chowdhury, Chowdhury *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2007) ในประเทศไทยมีการระบาดของซีโรทัยป์ O4:K68 ร่วมกับซีโรทัยป์ O3:K6 เช่นกันแต่ไม่มีรายงานการระบาดของซีโรทัยป์ O1:KUT ซึ่งซีโรทัยป์ O4:K68 และ O3:K6 ดังกล่าวแยกมาจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศูนราดูร จากการทำ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และ PFGE พบว่าทั้งสองซีโรทัยป์มาจากแหล่งเดียวกับ O3:K6 ในประเทศอินเดีย (Chowdhury *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2006)

จากการศึกษาเพื่อแยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์ที่พบในปี ค.ศ. 1996 และสายพันธุ์ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 โดย PCR, AFLP, PFGE และ ribotyping เป็นวิธีที่ยุ่งยากซับซ้อนต้องอาศัยเวลาและใช้เวลานาน ไม่เหมาะต่อการศึกษาจำนวนเชื้อปริมาณมากๆ ดังนั้น Mataumoto และคณะ (2000) ได้พัฒนาการตรวจสอบ

เพื่อหาความแตกต่างของจีน *tdh* และ *trh* ทำให้แยกกลุ่มซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์ที่พบในปี ค.ศ. 1996 และซีโรทัยป์อื่นที่มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันออกจากซีโรทัยป์ที่พบก่อนปี 1996 เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า Group Specific-Polymerase Chain Reaction (GS-PCR) ซึ่งจากการทำ GS-PCR ดังกล่าวพบว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6, O4:K68 และ O1:KUT ที่ระบาดในประเทศต่างๆ มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน

1.2.3 วิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

1.2.3.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็น *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณจีน (gene) หรือชิ้นส่วนของดีเอนเอเฉพาะบริเวณที่กำหนดให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง ค้นพบครั้งแรกโดย Kary B. Mullis ในปี ค.ศ. 1983 โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติของกระบวนการจำลองดีเอนเอใหม่ (DNA repilication) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การสังเคราะห์สายดีเอนเอขึ้นใหม่ต้องอาศัยดีเอนเอต้นแบบ เป็นจุดเริ่มต้นโดยอาศัยดีเอนเอสายสั้นๆ หรือ primer ที่เข้าจับกับดีเอนเอต้นแบบ และมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยต่อสายดีเอนเอโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ได้แก่ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอนเอสายที่เป็นแม่แบบได้ดีเอนเอสายใหม่เกิดขึ้นเมื่อทำเช่นนี้หลายๆ รอบ จะได้ปริมาณดีเอนเอเพิ่มมากขึ้นประมาณล้านเท่าภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง ประกอบด้วยส่วนสำคัญของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ดีเอนเอต้นแบบที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา primer ซึ่งก็คือ oligonucleotide ท่อนสั้นๆ ขนาดประมาณ 18-30, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), thermostable DNA polymerase และ buffer ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอนเอจะเพิ่มขึ้นมากน้อยอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการคลายเกลียวของดีเอนเอสายคู่ออกเป็นเส้นเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

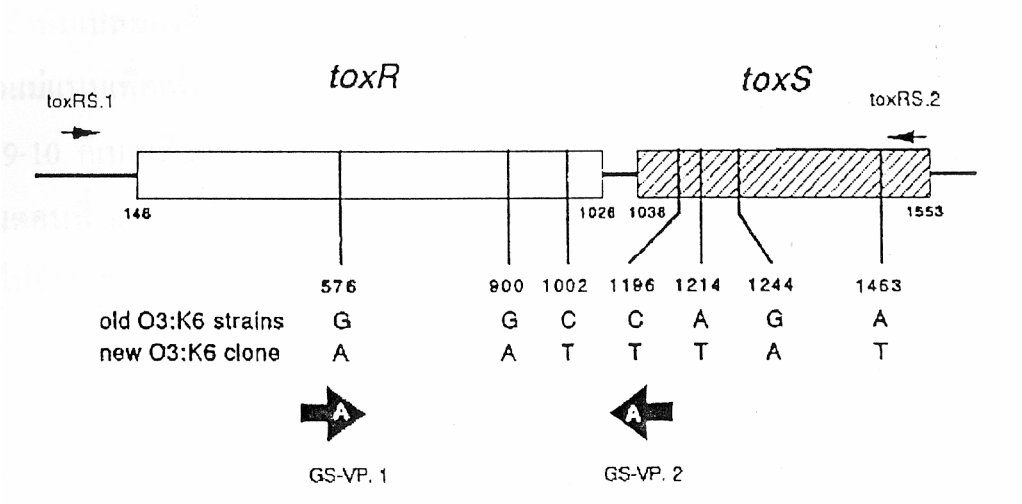
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าไปจับกับดีเอนเอต้นแบบในตำแหน่งที่มีเบสคู่สม โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำกว่าค่าอุณหภูมิแยกตัว (melting temperature, Tm) ของ primer ประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส

3. Extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอนเอ โดยการต่อเบสเข้าที่ปลาย 3′ ของ primer และมีการขยายสายดีเอนเอสายใหม่จากทิศทาง 5′ ไปทาง 3′ โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase ซึ่งอุณหภูมิปกติประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น 2 เท่าของทุกๆ รอบ โดยจำนวนผลผลิต (PCR product) ที่ได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตโดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกตามขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน จากนั้นย้อมชิ้นเจลด้วย ethidium bromide แล้วไปส่องดูด้วยแสงอุตราไวโอเลต (สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล)

1.2.3.2 Group Specific-Polymerase Chain Reaction (GS-PCR)

การตรวจสอบสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มาจาก pandemic strain หรือไม่ด้วยวิธี GS- PCR เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นวิธีการตรวจสอบความแตกต่างของจีน *toxRS* ของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์ใหม่ที่กำลังมีการระบาดและเปลี่ยนไปจากซีโรทัยป์ O3:K6 เดิม ซึ่งมี *toxR* และ *toxS* อยู่ในตำแหน่งของ *toxRS* operon จากการศึกษาลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีน *toxR* และ *toxS* ซึ่งมีขนาด 1364 คู่เบสของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์ pandemic strain พบว่าสำหรับสายพันธุ์ดังกล่าว 7 ตำแหน่งต่างจากสายพันธุ์ O3:K6 ที่พบก่อนหน้านี้ คือตำแหน่งที่ 576 900 1002 1196 1214 1244 และ 1463 (รูปที่ 1.1) จากลำดับเบสเดิมคือ G G C C A G และ A เปลี่ยนเป็นเบส A A T T T A และ T ตามลำดับ Matsuda (2000) ได้ออกแบบ primer GS-VPI ซึ่งมีลำดับเบส 5′-TAAATGAGGTAGAAACA-3′ ครอบคลุมลำดับเบสในตำแหน่งที่ 576 และ primer GS-VP2 ซึ่งมีลำดับเบส 5′-AAGGTAACGGGCCTACA-3′ ครอบคลุมลำดับเบสในตำแหน่งที่ 1196 ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ GS-PCR มีขนาดต่างกันให้แยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 pandemic strain ออกจากซีโรทัยป์อื่น



รูปที่ 1.1 ตำแหน่งของ primer (GS-VP1 และ GS-VP2) ที่จับอยู่บนยีน *toxR* และ *toxS* ในการทำ GS-PCR และลำดับเบสที่เปลี่ยนไปของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์เก่าและสายพันธุ์ใหม่ (ที่มา : Matsumoto et al., 2000)

นอกจากวิธี GS-PCR ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นในการแยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ใหม่ที่กำลังระบาดยังมีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อแยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศต่างๆ โดยการใช้เทคนิค AFLP, ribotyping, AP-PCR และ PFGE ซึ่งวิธี AP-PCR และ PFGE เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* อย่างแพร่หลาย (Wong *et al.*, 1996; Chowdhury *et al.*, 2000; Chowdhury *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000)

1.2.3.2 Arbitrarily Primed Polymerase Chain reaction (AP-PCR)

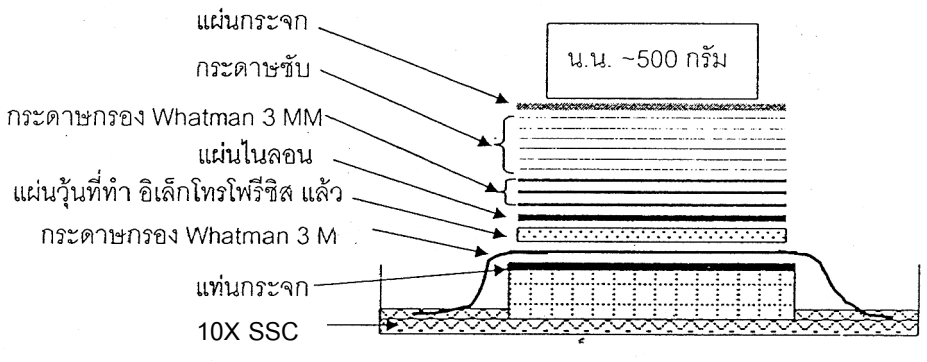
Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) หรือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคการศึกษาความผันแปรดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตโดยพิมพ์ขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR เพื่อให้ได้สายพันธุ์ดีเอ็นเอโดยใช้ primer สั้นๆ ประมาณ 10 bp และเป็นชนิดสุ่ม (random primers หรือ universal primers) ในการขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในสภาวะ low stringency คือมีอุณหภูมิ annealing ต่ำอยู่ในช่วง 36-45 องศาเซลเซียส และมีปริมาณของ $MgCl_2$ มากกว่าหรือเท่ากับ 2 mM ทำให้ primer สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้หลายตำแหน่งในจีโนมอาจจะมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ในบริเวณที่ห่างไกลกันมากๆ หรือในทิศทางเดียวกันหลังจากนั้นจะไม่มีการขยายผลิตแต่ถ้าไปเกาะ

ได้ ในบริ เวณใกล้ กั นและทิ ศทางเข้ าหากั นจะเกิ ดผลผลิ ตขึ้ PCR หนังสือที่ นเอที่ เพิ่ ม ชิ้ นส่ วนได้ จะแตกต่ างกั นทำให้ ได้ ลายพิ มพ์ ดีเอ็ นเอ ถ้ายีนเดียวกันที่เรียกว่า ต่อสงสายพั นธุ์ มี การเรียงตั ว จำนวนและตำแหน่ งที่ primer ไปจั บกั บดีเอ็นเอแต่ละต่ างกั น (Olive. and Bean., 1999) ผลผลิ ตที่ ได้ สามารถตรวจสอบได้ โดยการทำ electrophoresis ข้ อดีของ AP-PCR คื อ ทำได้ ง่ ายได้ ผลรวดเร็ วโดยไม่ จำเป็ นต้ องทราบลำดั บนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือจีโนม ที่ สิ่งมีชีวิ ตที่ ต้ องการ ศึ กษามาก่ อนและไม่ จำเป็ นต้ องนำเอาผลผลิ ต PCR มาตั ดด้ วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymer) สามารถดูผลจากรูปแบบของดีเอนเอได้ ด้ วยวิ ธี electrophoresis บน agarose gel หรื อ polyacrylamide gel ผู้ วิ จั ยส่ วนใหญ่ มั กใช้ เทคนิ ค AP-PCR ในการแยกความแตกต่ างของ เชื้ ออุ ลิ นทรีย์ ระหว่ างสปี ชีส์ หรื อภายในสปี ชีส์ เดียวกั น เพื่อใช้อธิบายเป็นลายพิมพ์ genotype หรื อ subtype แม้ ว่ าวิ ธี AP-PCR จะมีความสามารถในการแยกความแตกต่างของเชื้ อแต่ ละสายพั นธุ์ ได้ ดี แต่ ยั งขาด reproducibility มีข้ อจำกั ดในด้ านความไวในการตรวจสภาวะที่ เหมาะสมในการ ทำปฏิ กิ ริ ยาและการแยก electrophoresis อาจไม่ แน่ นอนเปลี่ยนแปลงแต่ ละครั้ งและแต่ ละห้ องปฏิ บั ติ การทำให้ บางครั้ งแปลผลได้ ยาก โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบในแต่ ละสาย พั นธุ์ ที่ ต่ างกั นดั งนั้ นในแต่ ละขั้ นตอนการทดสอบควรทำอย่างระมัดระวังและควบคุมสภาวะการ ทดสอบแต่ ละครั้ งต้ องใกล้ เคียงกั นที่ สุ ด (Williams, 1990)

1.2.3.3 เซาเทอร์ นบลอตติ ง (Southern blotting)

ดีเอ็ นเอทั้ งหมดที่ แยกมาได้ จากเซลล์ เมื่ อนำมาตั ดด้ วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ ชิ้ นส่ วนดีเอ็ นเอขนาดเล็ กเป็ นจำนวนมาก ชิ้ นส่ วนดีเอ็ นเอที่ เรียงอยู่ในแถบที่ไม่ต้องการ ชิ้ นส่ วนดีเอ็ นเอเหล่ านี้ ชิ้ นส่ วนดั งกล่ าวสามารถจะแสดงออกมาเป็นแถบที่ต้องการได้ โดย ใช้ โพรบ (probe) ซึ่ งอาจจะเป็ นดีเอ็ นเอ หรื ออาร์ เอ็ นเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาสามารถจะไปเข้ าคู่ กั บลำดั บ เบสของชิ้ นส่ วนดีเอ็ นเอที่ มีจีนที่ ต้ องการได้ โดยโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกั มมั นตรั งสี หรื อสารเคมี เมื่ อโพรบนี้ ไปจั บหรื อเข้ าคู่ กั บชิ้ นส่ที่วัดด้วยแสง (hybridize) ก็ จะทำให้ ทราบตำแหน่ งของจีนนั้ นซึ่ งเทคนิ คดั งกล่ าวนี้ พบครั้ งแรกโดย E.M. Southern) จึ งเรียกเทคนิ คนี้ ว่ าเซาเทอร์ นบลอตติ ง (Southern blotting) โดยรายละเอียดของการทดสอบทำโดย นำดีเอ็ นเอที่ แยกได้ จากแบคทีเรียมาตั ดด้ วยเอนไซม์ ตั ดจำเพาะ ชิ้ นส่ วนดีเอ็ นเอขนาดเล็ กเป็ น จำนวนมาก ทำการแยกชิ้ นส่ วนดีเอ็ นเอขนาดต่ างๆ เหล่ านี้ ด้ วย electrophoresis บน agarose gel และทำให้ โมเลกุ ลของดีเอ็ นเอแถบต่ างๆ เสียสภาพ จากดีเอ็ลายคู่กให้ อยู่ ในสภาพสายเดี่ ยว โดยการแช่ ในสารละลายด่ างแล้ วย้ ายแถบดีเอ็ นเอเหล่ านี้ ไปยังไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose filter) โดยวาง agarose gel ที่ มีแถบดีเอ็ นเอบนกระดาษที่ จุ่ มอยู่ ในสารละลายเกลื อ

บัฟเฟอร์ที่เข้มข้น (รูปที่ 1.2) และวางแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสบน agarose gel อีกทีหนึ่ง จากนั้นวางทับด้วยกระดาษกรองและใช้น้ำหนักทับบนกระดาษกรองเพื่อให้สารละลายผ่าน agarose gel และย้ายแถบดีเอ็นเอเหล่านั้นซึ่งอยู่ในสภาพสายเดี่ยวไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส จากนั้นนำแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสไปทำปฏิกิริยากับโพรบ (hybridization) ที่ติดฉลากด้วย DIG แล้วนำไปตรวจสอบผลบวกโดยนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี DIG ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ ปฏิกิริยาสุดท้ายเติม substate ไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ถ้าปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินแสดงตำแหน่งที่โพรบเข้าไปจับชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (รูปที่ 1.3) (ประดิษฐ์ พงศ์ปรีชาวงค์ 2541)



รูปที่ 1.2 เทคนิคเซาเทอร์นบลอตติง

การติดฉลากกรดนิวคลีอิกหรือโพรบ (probe)

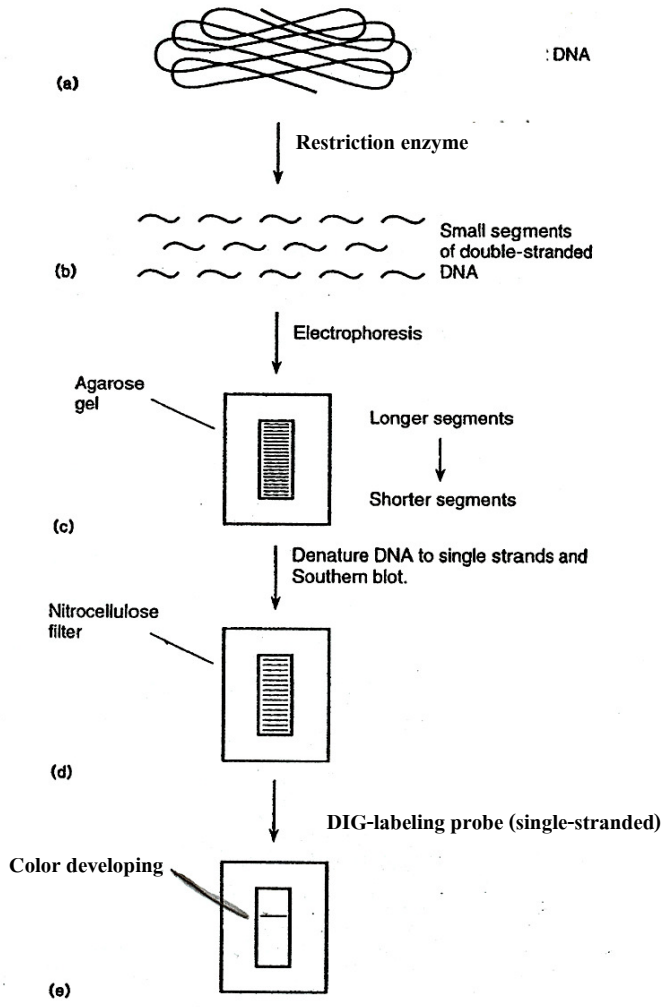
เมื่อคัดเลือกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่จะใช้เป็นโพรบได้แล้วก็ต้องทำการติดฉลากเพื่อการติดตามในขั้นต่อไป การติดฉลากอาจจะใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive labels) หรือติดฉลากโดยใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive labels) ก็ได้ ซึ่งการที่จะใช้ติดฉลากจะคล้ายคลึงกันมีหลายวิธี เช่น random primer หรือ nick translation

วิธี random primer โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากมาทำให้อยู่ในรูปสายเดี่ยวแล้วใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวเพียงหกนิวคลีโอไทด์ และมีการเรียงลำดับแบบสุ่ม (random primer) ให้เข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นแล้วใช้เอนไซม์ DNA polymerase I ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยใส่นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากลงไป วิธีนี้มีผู้นิยมใช้กันมาก เพราะไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขนาดความยาวเป็น 9 นิวคลีโอไทด์

อีกวิธีที่นิยมมากคือ nick translation (Rigby และคณะ, 1977) โดยใช้เอนไซม์ *E. coli* DNA polymerase I ร่วมกับเอนไซม์ DNase เอนไซม์ DNase จะทำให้เกิดรอยขาดแบบสุ่มในโมเลกุลของดีเอ็นเอ และเอนไซม์ DNA polymerase I ซึ่งจะมีคุณสมบัติ 5′→3′ exonuclease ดังนิวคลีโอไทด์ออกทางปลาย 5′ ขณะเดียวกันก็ใช้คุณสมบัติ polymerase ต่อนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่เข้าที่ปลาย 3′ ของรอยขาด จึงมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เดิมด้วยนิวคลีโอไทด์ใหม่ที่ติดฉลาก จะได้สายดีเอ็นเอที่ติดฉลากในบางตำแหน่งใช้เป็นโพรบต่อไป

การติดฉลากโดยใช้สารปลอดรังสี

สารที่นำมาใช้ติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสีมีหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) อนุพันธุ์ของไบโอดิน, digoxigenin, fluorescein เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะใช้ติดฉลากโดยทำให้อยู่ในรูปของอนุพันธุ์ของนิวคลิโอไทด์ก่อน เช่น biotin-dUTP, digoxigenin-dUTP หรือ fluorescein-dUTP แล้วเติมเข้าไปในสายดีเอ็นเอหรือออร์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ด้วยเอนไซม์ต่างๆ ตามวิธีเดียวกับการใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น nick translation หรือ random primer เมื่อติดฉลากด้วยสารเหล่านี้แล้ว เวลาที่ใช้ตรวจสอบสำหรับไบโอดินจะตรวจสอบโดยทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ avidin หรือ streptavidin ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ สำหรับ digoxigenin หรือ fluorescein จะตรวจโดยนำมาทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนติบอดีที่จำเพาะที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ เช่นเดียวกับไบโอติน ซึ่งเอนไซม์ของเอนไซม์อีกทีหนึ่ง เอนไซม์ที่ใช้กันมากคือ alkaline phosphatase (AP) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยทำปฏิกิริยากับ substate คือ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) และ nitro blue tetrazolium (NBT) ทำให้เกิดสารสีฟ้า (ร.ศ. สุรินทร์ ปิณฑวนิช พ.ศ.2536)



รูปที่ 1.3 การตรวจหาจีนด้ วยเทคนิ คเซาเทอร์ นบลอตติ ง