

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อมีปัญหาเพิ่มขึ้นในโรงพยาบาลต่าง ๆ เนื่องจากยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อทำให้เกิดการดื้อยา เช่น เชื้อ *Salmonella* spp. กลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการ enteric fevers มักดื้อต่อยา ampicillin, chloramphenicol, cotrimoxazole และ tetracycline (Akinyemi *et al.*, 2005) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็น opportunistic pathogen ดื้อต่อยา imipenem (Sasaki *et al.*, 2004), ceftazidime, ciprofloxacin และ tobramycin (Jung *et al.*, 2004) เชื้อ *Shigella* spp. ดื้อต่อยา streptomycin, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol และ tetracycline พบได้ทั่วไปทั้งในประเทศแถบทวีปเอเชีย (Bhattacharya *et al.*, 1994) แอฟริกา (Ashkenazi *et al.*, 1993) และอเมริกา (Lima *et al.*, 1995; Cheasty *et al.*, 1998) การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) ซึ่งเป็นเชื้อที่สำคัญก่อให้เกิด haemorrhagic colitis, haemolytic-uremic syndrome (HUS) และ thrombocytopenic purpura (TTP) (Yoh *et al.*, 1997) แม้ว่าจะไม่มีรายงานการดื้อยามากนัก แต่ก็มีรายงานของ Yoh และคณะ (1999) พบว่าความเข้มข้นระดับ subinhibitory ของยา quinolones, norfloxacin, sparofloxacin และ grepafloxacin จะมีผลกระทบทำให้เชื้อมีการปล่อย Verocytotoxin 1 (VT1) และ Verocytotoxin 2 (VT2) ซึ่งอาจมีส่วนทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาสารที่จะเป็นทางเลือกใช้แทนยาปฏิชีวนะ

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากทับทิม (*Punica granatum*) ต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ทั้ง Gram-positive bacteria และ Gram-negative bacteria ผลการศึกษาพบว่าทับทิมมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus anthracis* (Trivedi and Kazmi, 1979), *Bacillus subtilis* (Trivedi and Kazmi, 1979; Ahmad *et al.*, 1998; Prashanth *et al.*, 2001), *E. coli* (Anesini and Perez, 1993; Navarro

et al., 1996; Ahmad *et al.*, 1998; Prashanth *et al.*, 2001), *Helicobacter pylori* (Voravuthikunchai *et al.*, 2004a), *P. aeruginosa* (Anesini and Perez, 1993; Navarro *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus* (Anesini and Perez, 1993; Navarro *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1998; Prashanth *et al.*, 2001; Holetz *et al.*, 2002), methicillin-resistant *S. aureus* หรือ MRSA (Machado *et al.*, 2002, 2003; Voravuthikunchai and Kitpipit, 2003) และ *Vibrio cholerae* (Trivedi and Kazmi, 1979; Guevara *et al.*, 1994)

จากรายงานของ Voravuthikunchai และคณะ (2004c) โดยศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 38 ชนิด พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ดี ดังนั้นจึงนำเปลือกผลทับทิมมาวิเคราะห์หาสารที่มีประสิทธิภาพและศึกษาต่อในรายละเอียดสำหรับสารส่วนที่ออกฤทธิ์ โดยนำมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำเปลือกผลทับทิมมาพัฒนาเป็นยาแทนที่การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค

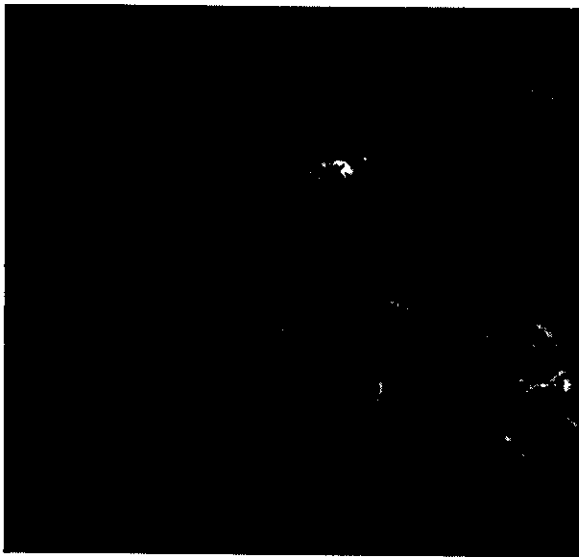
การตรวจเอกสาร

1. พืชสมุนไพร : ทับทิม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Punica granatum* Linn.

วงศ์ Punicaceae

ชื่อสามัญ pomegranate, granade, granats, carthaginian apple, punica apple



รูปที่ 1 ทับทิม

ที่มา : <http://club.pep.ne.jp/~yumosei.553/kiyoshi/plant/zakuro.jpg>

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ทับทิมเป็นไม้พุ่มถึงไม้ยืนต้นขนาดเล็ก เปลือกต้นมีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนของลำต้นที่ผลิออกใหม่มีสีแดง ใบเป็นใบเดี่ยว แตกจากกิ่งเป็นคู่ ๆ แต่อาจจะพบออกเดี่ยว ๆ สลับข้างกันบ้าง รูปใบยาวรีเว้า ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ใบหนาและเป็นมัน ดอกมีขนาดใหญ่และเป็นดอกเดี่ยว มีสีแดงสดหรือสีขาว กลีบเลี้ยงหนาเหนียวติดกัน ผลค่อนข้างกลม เมื่อแก่มีสีเหลืองปนน้ำตาลและมีสีแดงฉาบบาง ๆ เป็นตอน ๆ (รูปที่ 1) เนื้อหุ้มเมล็ดมีลักษณะโปร่งแสง สีชมพูใส ๆ และมีรสเปรี้ยวอมหวาน เปลือกหนา

ขอบขึ้นบนที่ดินที่มีกรวดและทรายปน เป็นพืชของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบขึ้นอยู่ทั่วไป (นิจศิริและพยอม, 2534; วิทย์, 2536; พเยาว์, 2537)

สารสำคัญ

เปลือกต้นและเปลือกกรามมีแอลคาลอยด์ pelletierine และ isopelletierine เป็นอัลคาลอยด์ที่มีลักษณะเป็นของเหลว พบในส่วนของเปลือกต้น 0.35 ถึง 0.6% ในเปลือกกราก 0.3% เป็นอัลคาลอยด์ออกฤทธิ์ฆ่าพยาธิได้ เปลือกผลมีรสฝาด มีแทนนิน ประมาณ 22 ถึง 25% และกรด galloannic ยังพบสารสีเขียวอมเหลืองในเปลือกเนื้อของผลที่แก่จัดมีรสหวานอมเปรี้ยว รสเปรี้ยวเนื่องจากมีกรด malic และ ascorbic (อรุณพร, 2532; นิจศิริและพยอม, 2534; พร้อมจิต, 2535; วิทย์, 2536; พเยาว์, 2537; วันดี, 2539)

ส่วนที่ใช้เป็นยา

สรรพคุณตามตำรายาโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534; พร้อมจิต, 2535; ภูมิพิชญ์, 2536; มาโนชและเพ็ญนภา, 2537 และวันดี, 2539)

ใบสด : ใช้ล้างแผลหนองเรื้อรังบนหัว ใช้พอกแผลถลอก

ดอก : โรยบาดแผลที่มีเลือดออก แก้หูชั้นในอักเสบ

เปลือกต้น : ยาถ่ายพยาธิตัวตืดและตัวกลม

เปลือกผล : ใช้แก้ท้องเสีย ถ่ายเป็นมูกเลือด ถ่ายพยาธิ ตกขาว กลากเกลื่อน

เปลือกกราก : ยาถ่ายพยาธิตัวตืด แก้ระดูขาว ตกเลือด ท้องเสีย โรคบิด

เมล็ด : แก้จุกแน่น แก้ท้องร่วง ทำให้เจริญอาหาร

เนื้อหุ้มเมล็ด : แก้โรคลักปิดลักเปิด

ฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์

มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากทับทิมมาก่อนแล้ว อาทิเช่น

Trivedi และ Kazmi (1979) พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ด้านเชื้อ *B. anthracis*, *B. subtilis*, *Salmonella paratyphi* และ *Vibrio cholerae*

Segura และคณะ (1990) ได้รายงานเกี่ยวกับ tannins จากรากของทับทิม มีฤทธิ์ต่อ *Entamoeba histolytica* และ *Entamoeba invadens*

Anesini และ Perez (1993) รายงานว่าสารสกัดจากเปลือกของผลทับทิมด้วยน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E. coli* และ *Aspergillus niger* ได้ และนอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกกราก เปลือกผลและผลด้วยแอลกอฮอล์จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่างๆ หลายประเภท เช่น *P. aeruginosa*, *Shigella paradysenteriae* B.H., *S. aureus*, *E. coli* น้ำที่สกัดหรือคั้นจากรากและใบมีฤทธิ์ช่วยในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* และมีฤทธิ์ใช้ฆ่าเชื้อไวรัสในยาสูบได้อีกด้วย (วิทย, 2536)

Guevara และคณะ (1994) พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *V. cholerae*

Zhang และคณะ (1995) พบว่าสารแทนนินจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้าน herpes virus

Navarro และคณะ (1996) รายงานว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย methanol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Candida albicans* โดยเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 0.62 mg/ml และเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* มีค่า MIC เท่ากับ 10 mg/ml

Ahmad และคณะ (1998) พบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิม (ความเข้มข้น 200 mg/ml) มีฤทธิ์ต่อ *B. subtilis*, *E. coli* และ *S. aureus* มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 10 ถึง 19 mm ส่วน *P. vulgaris*, *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa* มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 5 ถึง 9 mm ส่วนสารสกัดด้วย alcohol ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง มากกว่า 20 mm ส่วนเชื้อ *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa* มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 10 ถึง 19 mm

Prashanth และคณะ (2001) พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย petroleum ether, chloroform, methanol และ น้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. vulgaris*, *B. subtilis* และ *S. typhi* โดยมีค่า MIC อยู่ใน

ช่วง 0.0025 ถึง 50 mg/ml ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำจะไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae*

Holetz และคณะ (2002) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากผลทับทิม ด้วย ethanol-water (90 : 10) ต่อเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดยพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ดี มีค่า MIC เท่ากับ 62.5 µg/ml และไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาใช้ทดสอบ โดยมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 1000 µg/ml

Machado และคณะ (2002) พบว่าสาร ellagitannin punicalagin ที่แยกได้จากเปลือก ผลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 61.5 µg/ml

Machado และคณะ (2003) พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol และ fraction มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* โดยมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 0.25 mg/ml และสารผสมของ ellagitannins (hydrolysable tanin) มีค่า MIC เท่ากับ 0.06 mg/ml

2. แบคทีเรีย

2.1 *Escherichia coli*

ลักษณะทั่วไปของ *E. coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาด 1.1 ถึง 1.5 x 2.0 ถึง 6.0 µm ดิคสิกรัมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ บางสายพันธุ์อาจสร้าง แคปซูลบาง ๆ ห่อหุ้ม สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลาที่มีอยู่รอบตัว แต่ บางสายพันธุ์เคลื่อนที่ไม่ได้ เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C และที่ pH 6 ถึง 8 ทั้งใน สภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน เชื้อสามารถทนสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี โดยปกติจะพบ เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น โดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่ บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคได้จากการสร้างสารพิษพวก enterotoxin ซึ่งทำให้เกิดอาการ ท้องเสียได้ ดังนั้นเชื้อ *E. coli* จึงมีความสำคัญทั้งด้านของการเป็นเชื้อก่อโรคและเป็น

ตัวบ่งชี้ถึงความสกปรกที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระในการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำและอาหาร (ทิลพรหม, 2531; นงลักษณ์และปรีชา, 2541)

ชนิดของแอนติเจน

เชื้อ *E. coli* มีแอนติเจน 3 ชนิด คือ

1. Somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบพวก lipopolysaccharide พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนร้อนที่อุณหภูมิ 100 ถึง 121°C สามารถทนกรดอ่อนและแอลกอฮอล์ได้ (อรอนงค์, 2541)

2. Capsular antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบพวก polysaccharide พบเป็นส่วนประกอบที่ห่อหุ้มเซลล์ เช่น แคปซูล, envelope หรือ fimbriae โดยห่อหุ้มรอบ O-antigen อีกทีหนึ่ง บางครั้งไปป้องกันการเกิด agglutination ของ O-antigen K-antigen มี 3 ชนิด คือ L, A และ B-antigen (Lior, 1994)

3. Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของแฟลเจลลาประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า flagellin ทำให้เชื้อเกิดการเคลื่อนไหวได้ สายพันธุ์ที่เคลื่อนไหวไม่ได้จะไม่พบ H-antigen สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 100°C (Lior, 1994)

การทำให้เกิดโรค

E. coli บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะบางอย่างได้ ส่วนใหญ่จะเกิดกับระบบทางเดินปัสสาวะและสามารถทำให้เกิดโรคได้หลายแบบขึ้นกับตำแหน่งที่ติดเชื้อ

1. โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ พบว่า *E. coli* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ กรวยไตอักเสบ นิ่วในไต เป็นต้น การเกิดโรคมักมีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของผู้ป่วยเอง ส่วนใหญ่พบในผู้หญิงประมาณ 90% มีอาการปัสสาวะบ่อย ปัสสาวะลำบาก ปัสสาวะมีเลือดปนและปัสสาวะมีหนองปน เป็นต้น สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคนี้เป็นสายพันธุ์ที่สร้าง haemolysin และมี pili จับกับผิวของ host cell (Alcano, 1997)

2. โรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น โลหิตติดเชื้อ แผลติดเชื้อ ไส้ติ่งอักเสบ ฝีในตับ เยื่อปอดอักเสบและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น

3. Neonatal meningitis *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุดว่าเป็นสาเหตุของโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบในทารก โดยเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบประมาณ 80% จะมี K1 capsular polysaccharide โดยอาจติดเชื้อจากแม่ระหว่างการคลอด (Brooks *et al.*, 1998)

4. Opportunistic infection เชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ในผู้ป่วยที่เป็น immunocompromised โดยทำให้เกิด bacteremia ติดเชื้อบริเวณแผลที่ผ่าตัดและติดเชื้อบริเวณทางเดินหายใจส่วนล่าง

5. โรคอุจจาระร่วง เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบบ่อยในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น แต่มีเชื้อ *E. coli* บาง serotype ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ในคนและสัตว์ โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร น้ำดื่ม นำนม เชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคอุจจาระร่วงหรือ diarrhoeagenic *E. coli* แบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มตามกลไกการก่อโรคนี้ ได้แก่

5.1 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ แต่จะพบบ่อยในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี และในนักท่องเที่ยวที่เดินทางไปท่องเที่ยวในประเทศที่กำลังพัฒนา ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่า Traveller's diarrhoea

ปัจจัยที่ทำให้เชื้อสามารถก่อโรค คือ เชื้อจะใช้ colonization factor antigen (CFA) ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ CFA/I, CFA และ E8775 (Lior, 1994) ที่อยู่บนผิวของ fimbriae หรือ pili (ขนสั้น ๆ ที่อยู่รอบตัว) ยึดเกาะ (colonize) กับที่รับจำเพาะบนผิวเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนต้นและสร้างสารพิษ (enterotoxin) ออกมาทำให้เกิดอาการท้องร่วง โดย ETEC ที่มีเฉพาะ CFA แต่ไม่สร้าง toxin จะทำให้เกิดท้องร่วงอย่างอ่อน ๆ

ETEC สามารถผลิต enterotoxin ออกมาได้ 1 หรือ 2 ชนิด โดยชนิดหนึ่งควบคุมการสร้าง CFA แต่อีกชนิดหนึ่งควบคุมการสร้าง enterotoxin ซึ่งยีนที่ควบคุมการสร้าง enterotoxin ทั้งสองชนิดนี้แยกกันอยู่บน พลาสมิด (Lior, 1994) enterotoxin ที่สำคัญต่อการก่อโรคมียี่ 2 ชนิด คือ

5.1.1 Heat-labile enterotoxin (LT) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ขนาด

ประมาณ 84 KDa มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน LT จะเสื่อมสภาพ (inactive) ที่อุณหภูมิ 65 °C (อรอนงค์, 2541) โครงสร้างของ LT ประกอบด้วย subunit A (active subunit) 1 หน่วยเป็นส่วนแสดงความเป็นพิษ และ subunit B (binding subunit) 5 หน่วย ทำหน้าที่จับกับ GMI ganglioside receptors ของผนังเซลล์ (Honda, 1992) LT แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้สองกลุ่ม คือ

5.1.1.1 LT-1 จะมีโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวภาพเหมือนสารพิษของเชื้ออหิวาต์ (Cholera toxin: CT) และจะถูก neutralize ได้ด้วยแอนติบอดีต่อ CT ซึ่ง LT-1 สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกสองกลุ่ม คือ LT-h ทำให้เกิดอุจจาระร่วงในคน และ LT-p ทำให้เกิดอุจจาระร่วงในหมู

5.1.1.2 LT-2 มีคุณสมบัติทางชีวภาพเหมือนกับ LT-1 แต่ไม่ถูก neutralize ด้วยแอนติบอดีต่อ CT และ LT-1 โดย subunit A ของ LT-2 บางส่วนจะคล้ายกับ subunit A ของ LT-1 และ CT (เหมือนกันประมาณ 55-57%) แต่มี subunit B ที่แตกต่างจาก LT-1 และ CT ซึ่ง LT-1 พบในสัตว์ เช่น วัว ควาย แต่ยังไม่พบว่าสัมพันธ์กับการเกิดโรคในคน

5.1.2 Heat-stable enterotoxin (ST) เป็นโปรตีนโมเลกุลเล็ก ขนาดประมาณ 5,000 Da ประกอบด้วย กรดอะมิโน 18 ถึง 19 ชนิด (Honda, 1992) ไม่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน จะมี disulfide bond จำนวนมาก ทำให้ทนต่อความร้อน (heat resistance) ST แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้สองกลุ่ม คือ

5.1.2.1 ST-1 ละลายได้ในเมทานอล สารพิษออกฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ guanylate cyclase ในเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็ก ทำให้เกิดการกั่งของ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) มีผลยับยั้งการดูดซึมน้ำและโซเดียมคลอไรด์ของลำไส้ ทำให้เกิดการหลั่งน้ำและคลอไรด์ไอออนออกจากลำไส้เป็นจำนวนมาก สามารถทดสอบฤทธิ์ของสารพิษได้ใน suckling mouse intestine ซึ่ง ST-1 สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ คือ ST-1 a หรือ STp พบครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากหมูที่เป็นโรคอุจจาระร่วง ต่อมาพบในเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากวัวและผู้ป่วย และ ST-1b หรือ STb พบในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

5.1.2.2 ST-2 ไม่ละลายในเมทานอล มีขึ้นและชนิดของกรดอะมิโนแตกต่างจาก ST-1 ซึ่ง ST-2 ทำให้เกิดโรคในสัตว์ เช่น หมู กลไกการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด พบ ST-2 ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากคน แต่ไม่มีรายงานว่าทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในคน

ETEC บางสายพันธุ์ สร้างสารพิษชนิด LT หรือ ST เพียงชนิดเดียว แต่บางสายพันธุ์สร้างสารพิษได้ทั้งสองชนิด ETEC บางสายพันธุ์ที่สร้างทั้ง LT และ ST มักทำให้เกิดอาการรุนแรงกว่าสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษเพียงชนิดเดียว

การทำให้เกิดโรค

การเกิดโรคจะเกิดโดยการรับประทานอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป อาการพบตั้งแต่ไม่สบายเพียงเล็กน้อยจนถึงท้องร่วงอย่างแรงคล้ายอหิวาตกโรค ผู้ป่วยจะถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ ไม่มีมูกหรือเลือดปน ทำให้สูญเสียน้ำเป็นจำนวนมาก บางรายอาจมีไข้ และคลื่นเหียนอาเจียน หรืออาจมีอาการท้องร่วงไม่รุนแรงและหายเองได้ (อรอนงค์, 2541)

การรักษา

รักษาโดยการดื่มน้ำและเกลือแร่ทดแทนส่วนที่สูญเสียไป

5.2 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในทารกแรกเกิดถึงอายุต่ำกว่า 2 ปี โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา พบการระบาดของเชื้อ EPEC ในห้องเลี้ยงเด็กของโรงพยาบาลและในสถานรับเลี้ยงเด็ก EPEC ไม่สร้าง enterotoxin และไม่มี invasive virulence factor กลไกการก่อโรคยังไม่ทราบแน่ชัด

การทำให้เกิดโรค

การติดต่อส่วนใหญ่เป็นแบบ fecal-oral transmission โดยการปนเปื้อนเชื้อจากมือผู้เตรียมอาหารหรือนม หรือเชื้ออาจปนเปื้อนในผ้าอ้อม ของเด็กเล่น อาการของโรค เช่น ผู้ป่วยจะมีไข้ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และอุจจาระเหลวเป็นน้ำ อาการคล้ายกับโรค salmonellosis ผู้ป่วยบางรายอาจพบเม็ดเลือดขาวในอุจจาระ (อรอนงค์, 2541)

การรักษา

การรักษาทำได้โดยการให้น้ำและเกลือแร่ทดแทนส่วนที่ต้องสูญเสียไป

5.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ก่อโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ ไม่สร้าง enterotoxin (LT, ST) ผู้ป่วยมีอาการและกลไกการเกิดโรคคล้ายกับโรคบิดที่เกิดจากเชื้อ *Shigella* เนื่องจาก EIEC มีพลาสมิดลักษณะคล้ายกับที่พบใน *Shigella* แต่ไม่เหมือนเลยทีเดียว โดยเชื้อมี invasive virulence factor ถูกควบคุมด้วยยีนที่อยู่บนพลาสมิด (Harris *et al.*, 1982) ทำให้เชื้อสามารถสังเคราะห์โปรตีน ช่วยให้สามารถแทรกตัวเข้าไปใน epithelial cell ของลำไส้เล็กส่วนปลายและลำไส้ใหญ่ของสัตว์เลี้ยง ลูกด้วยนม เชื้อแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้เซลล์แตก และเชื้อจะลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงเกิดการทำลายเซลล์บริเวณนั้นมากขึ้น ทำให้ลำไส้เป็นแผลและเกิด inflammatory response ที่บริเวณนั้น เชื้อมักจะไม่เข้าสู่กระแสเลือด (DuPont *et al.*, 1971)

การทำให้เกิดโรค

นอกจากเชื้อจะปนเปื้อนในอาหารแล้ว เชื้ออาจติดต่อกันได้โดยตรงจากผู้ป่วยไปยังผู้อื่นในห้องปฏิบัติการ ผู้ป่วยมีอาการปวดบิดอย่างแรง เป็นแผลมีหนอง ถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือด มีไข้สูง และตรวจพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมากในอุจจาระ (อรอนงค์, 2541)

5.4 Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) ทำให้เกิดอาการของโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่า haemorrhagic colitis Serotype ที่สำคัญคือ O157:H7 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ EHEC เป็นครั้งแรก และมีการระบาดอย่างต่อเนื่องของเชื้อในหลายประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรปและในประเทศญี่ปุ่น

ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* O157:H7 มีดังนี้

1. Haemorrhagic colitis ลักษณะอาการ คือ ปวดท้องอย่างรุนแรง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำในระยะแรก 2 ถึง 3 วัน ต่อมาถ่ายอุจจาระมีเลือดปนหรือถ่ายเป็นเลือดสด บางรายไม่ถ่ายเป็นเลือด อาจมีอาเจียน ไม่มีไข้หรือมีไข้เล็กน้อย อาการต่างจากท้องร่วงที่ถ่ายเป็นเลือดจากเชื้ออื่น เช่น shigellosis, amebiasis, *Campylobacter enteritis* หรือ

invasive *E. coli* อื่น ๆ คือ ไม่มีอาการไข้ และถ่ายเป็นเลือดไม่มีมูกปน ระยะฟักตัวของโรค 3 ถึง 9 วัน จากการทำ Barium radiography ลำไส้ของผู้ป่วยพบ submucosal edema มีการหดตัวอย่างรุนแรง ลำไส้ขดงอและมีเลือดคั่ง

2. Haemolytic uremic syndrome (HUS) ผู้ป่วยบางรายโดยเฉพาะเด็กเล็กและถ่ายเป็นเลือดจะมีอาการของ HUS ตามมา ผู้ป่วยจะมีอาการ 3 แบบ คือ microangiopathic haemolytic anemia คือ มีการจับตัวของเม็ดเลือดแดง ทำให้ถูกทำลายเมื่อผ่านช่อง แคบ ๆ thrombocytopenia คือ มีจำนวน platelets น้อย และ acute nephropathy คือการทำงานของไตผิดปกติ การรักษาทำได้โดยการล้างไตและถ่ายเลือด บางรายผู้ป่วยจะมีอาการทางประสาทโคม่า และในที่สุดอาจเสียชีวิตได้

3. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) ผู้ป่วยสูงอายุบางรายเกิดอาการของ TTP ซึ่งลักษณะอาการคล้าย HUS แต่ที่แตกต่างออกไปคือ จะมีอาการทางประสาทเข้ามาเกี่ยวข้องมากกว่า และมีไข้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีเลือดคั่งในสมองและตายในที่สุด

การรักษา

โดยการให้น้ำและเกลือแร่ทดแทนสิ่งที่ร่างกายสูญเสียและรักษาตามอาการ การให้ยาปฏิชีวนะไม่ได้ช่วยให้อาการดีขึ้น ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมีอาการดีขึ้นภายใน 2 สัปดาห์และหายได้เองในที่สุด ยกเว้นผู้ป่วยเด็กและผู้สูงอายุที่เกิดอาการไตวายอาการจะรุนแรงและถึงตายได้

5.5 Enteroaggregative *E. coli* (EAaggEc) เป็นเชื้อกลุ่มใหม่ล่าสุดทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเรื้อรัง (persistent diarrhoea) ในเด็กเล็ก โดยเฉพาะอายุต่ำกว่า 1 ปี ในประเทศกำลังพัฒนา พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 จากผู้ป่วยอุจจาระร่วง เดิมมีชื่อว่า enteroadherent *E. coli* (EAEC) เพราะมี aggregative adherence กับ HEp-2 cell (Honda, 1992) ซึ่งควบคุมโดยพลาสมิดที่มีขนาด 55 ถึง 56 Mda (Vial *et al.*, 1988)

การทำให้เกิดโรค

กลไกการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด เชื้อสามารถเกาะติดกับเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก แต่จะไม่ invade เข้าในเซลล์จะเจริญเติบโตและเกาะกลุ่มที่บริเวณนั้น การแพร่กระจายของเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหารหรือคั้นน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ (Fecal-oral

transmission) ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ บางครั้งถ่ายเป็นเลือดและมีไข้ต่ำ ๆ (อรอนงค์, 2541)

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

จัดอยู่ใน Family Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่ง กว้าง 0.1 ถึง 1 μm ยาว 1.5 ถึง 3 μm อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ เจริญได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลเจลลา มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี มีกลิ่นเฉพาะของเชื้อคล้ายกลิ่นอุนุ่น และสามารถทำลายเม็ดเลือดแดงในอาหารได้

P. aeruginosa พบได้ทั่วไปในบริเวณที่ชื้น บางครั้งพบเป็น normal microbiota ในลำไส้หรือบนผิวหนัง ในโรงพยาบาลอาจพบเชื้อได้ตามอ่างล้างหน้า เครื่องช่วยหายใจ เครื่องทำความชื้น เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้สารอินทรีย์ได้หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (พิไลพรธม, 2531)

การทำให้เกิดโรค

P. aeruginosa จัดเป็น opportunistic pathogen คือไม่ทำให้เกิดโรคในผู้ที่มีร่างกายแข็งแรง แต่ทำให้เกิดโรคในผู้ที่เป็ immunocompromised เกิดโรคได้เกือบทุกเนื้อเยื่อของร่างกาย โดยเกิดการติดเชื้อที่แผลบริเวณผิวหนังและแผลไฟไหม้ เกิดเชื้อหุ้มสมองอักเสบ ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ร้อยละ 10 ถึง 20 ผู้ป่วยมะเร็งระยะสุดท้าย และ cystic fibrosis (Kingsbury and Wagner, 1990; Prescott *et al.*, 1993)

การรักษา

P. aeruginosa ส่วนใหญ่คือต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้เพราะยาซึมผ่าน periplasmic space เข้าไปใน cytoplasm ได้ยาก และเชื้อมีกลไกการคือยาหลายอย่างโดยเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ β -lactamase, aminoglycoside inactivating enzyme การ acetylation ของคลอแรมฟินิโคล และการคือต่อยา tetracycline ซึ่งควบคุมโดย plasmid และโครโมโซมของแบคทีเรีย การถ่ายทอด plasmid นอกจากเกิดภายในสกุลเดียวกันแล้วยังถ่ายทอดไปยังกรัมลบตัวอื่น ๆ ได้อีก

การรักษาจึงไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะเพียงตัวเดียวเพราะได้ผลน้อยและแบคทีเรียสามารถดื้อยาได้รวดเร็ว ยาที่นิยมใช้รักษาร่วมกัน เช่น ยาในกลุ่ม β -lactam โดยใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycoside ซึ่งมักใช้ gentamicin หรือ amikacin ยาอื่น ๆ ที่ใช้ได้ผลดี ได้แก่ ยาในกลุ่ม quinolone (ciprofloxacin, enoxacin) (พิไลพรธณ, 2531)

2.3 *Salmonella* spp.

จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้รวดเร็ว ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ก่อโรคในลำไส้สัตว์เลือดอุ่นได้หลายชนิดรวมทั้งมนุษย์ด้วย บางสายพันธุ์ที่แยกเชื้อได้ใหม่ ๆ จะมีแคปซูลทำให้โคโลนิมีลักษณะเป็นมูก เชื้อสร้างสารพิษชนิด endotoxin ซึ่งจะปล่อยสารพิษออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ host ได้ต่อเมื่อเซลล์ตายหรือถูกทำลาย โดยปกติแล้วเชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย host ได้ทางปากจากการกินอาหารหรือดื่มน้ำ

การทำให้เกิดโรค

เชื้อก่อโรคได้ 3 แบบด้วยกัน ส่วนใหญ่แล้วจะพบอาการใน 3 แบบนี้ผสมผสานกัน

1. Enteric fevers ได้แก่ ไข้ทัยฟอยด์ (*S. typhi*) และไข้พาราทัยฟอยด์ (*S. paratyphi*, *S. schottmulleri*, etc.) เชื้อเข้าสู่ร่างกายทางปากโดยติดไปกับอาหารหรือน้ำดื่ม ผ่านกระเพาะอาหารเข้าไปถึงลำไส้เล็ก แล้วเข้าสู่ท่อน้ำเหลือง จากนั้นจะเข้าสู่ thoracic duct แล้วเข้าสู่กระแสเลือดไปสิ้นสุดที่อวัยวะต่าง ๆ รวมทั้งลำไส้ด้วย เชื้อจะแบ่งตัวใน lymphoid tissue และจะถูกขับออกทางอุจจาระ

2. Septicemia พบมากจากเชื้อ *S. choleraesuis* เชื้อจะไปทางกระแสเลือด ทำให้เกิดการเป็นหนอง ฝี ตามอวัยวะภายใน เช่น ทำให้เกิดเชื้อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกพรุน อักเสบ ปอดบวม เชื้อหุ้มหัวใจอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน host ที่มีสุขภาพไม่แข็งแรง ความต้านทานต่ำ

3. Gastroenteritis ได้แก่ กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยมักจะเรียกว่าอาหารเป็นพิษ (food poisoning) เกิดเนื่องจากเชื้อ *S. typhimurium*, *S. enteritidis* หรือ *S. derby* เชื้อมีระยะฟักตัว 1 ถึง 3 วัน อาการจะมีการรบกวนที่เชื้อเมือกในลำไส้ เชื้อจะไม่เข้าสู่กระแสเลือดและไม่เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะภายใน (พิไลพรธณ, 2531)

2.4 *Shigella* spp.

Shigella พบครั้งแรกในปี 1898 ที่ประเทศญี่ปุ่น โดย Shiga เป็นผู้แยกเชื้อได้ เชื้อนี้ก่อโรคเฉพาะในคน และบาง serotype พบในลิง

จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่ง ขนาด กว้าง 0.5 ถึง 0.7 μm ยาว 2 ถึง 3 μm ไม่เคลื่อนที่ เป็นพวก facultative anaerobe เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C *Shigella* แบ่งได้เป็น 4 สปีชีส์ ตามลักษณะทางชีวเคมีและ แอนติเจน O แต่ละสปีชีส์สามารถแบ่งย่อยออกได้หลาย ๆ ซีโรทัยป์ ดังนี้ ยกเว้น *S. sonnei* (Varnam and Evans, 1996)

1. *S. dysenteriae* จัดอยู่ในกลุ่ม A ประกอบด้วย 10 ซีโรทัยป์ (1 ถึง 10)

2. *S. flexneri* จัดอยู่ในกลุ่ม B ประกอบด้วย 6 ซีโรทัยป์ (1 ถึง 6) และแบ่งย่อยเป็นซีโรทัยป์ย่อย ๆ ได้แก่ 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b และ 3c

3. *S. boydii* จัดอยู่ในกลุ่ม C ประกอบด้วย 15 ซีโรทัยป์ (1 ถึง 15)

4. *S. sonnei* จัดอยู่ในกลุ่ม D ประกอบด้วย 1 ซีโรทัยป์

ทุกสปีชีส์ไม่สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน ในการใช้น้ำตาลจะผลิตกรดแต่ไม่มีแก๊สเกิดขึ้น ไม่สลายน้ำตาลแล็กโทสทั้งนี้เพราะไม่มีเอนไซม์ β -galactosidase ยกเว้น *S. sonnei* ซึ่งสลายแล็กโทสได้ แต่ช้าประมาณ 7 ถึง 10 วัน

การทำให้เกิดโรค

Shigella ทุกสปีชีส์ทำให้เกิดโรคมืดไม่มีตัว (bacillary dysentery หรือ shigellosis) มีอาการท้องเดิน ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำมีมูกเลือดปนออกมาและมีเม็ดเลือดขาวพวก polymorphonuclear ปนออกมามาก และอาการที่จะเกิดโรคได้จะต้องมีเชื้ออย่างน้อย 200 เซลล์ ตำแหน่งที่เชื้อก่อพยาธิสภาพ คือ ลำไส้ใหญ่ การก่อโรคจะเป็นแบบ invasiveness มีอาการอักเสบของมิวโคซ่า เป็นการอักเสบแบบเฉียบพลัน เชื้อ *Shigella* รุกเข้าไปในเซลล์เยื่อที่ผิว ๆ ทำให้เกิด superficial ulceration ในผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดี อาการจะดีขึ้นเองใน 2 ถึง 7 วัน แต่ในเด็กและผู้สูงอายุรวมทั้งผู้ที่ขาดสารอาหาร อาการของโรคจะเกิดอยู่นานและอาจถึงตายได้ เนื่องจากร่างกายขาดน้ำและเสียดุลย์ของ electrolyte (พิไลพรรณ, 2531)

การรักษา

การรักษาผู้ป่วยโรค shigellosis จะรักษาตามอาการ เช่น ถ้าในภาวะที่ขาดน้ำ ซึ่งมีผลเนื่องจากการสูญเสียน้ำจากการถ่ายอุจจาระและการอาเจียน โดยเฉพาะในผู้ป่วยเด็กและผู้สูงอายุ โดยในรายที่มีภาวะที่ขาดน้ำระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง ควรให้น้ำเกลือดื่มตั้งแต่เริ่มมีอาการถ่ายอุจจาระเหลว ในรายที่มีภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง ควรให้น้ำเกลือทางหลอดเลือดดำเข้าไปทดแทนทันที ถ้ามีอาการปวดเกร็งในช่องท้อง ก็ให้ยาคลายการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ ในรายที่มีไข้ก็ให้ยาลดไข้ (นิภาและคณะ, 2534; นวลจิรา, 2538) การให้ยาต้านจุลินทรีย์ในการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงเพื่อลดระยะเวลาของการเกิดโรคให้สั้นลงและจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อให้ลดลง ยาต้านจุลินทรีย์ที่ใช้รักษาได้แก่ ciprofloxacin, ampicillin, co-trimoxazole, erythromycin, tetracycline และ chloramphenicol แต่ถ้าติดเชื้อที่คือยาหลายชนิดพร้อมกัน ยาที่ใช้ได้แก่ nalidixic acid และ norfloxacin (Lolekha *et al.*, 1991; Jawetz *et al.*, 1998)

วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกผลทับทิม
2. ทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม Gram-negative rods
3. ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อ cell surface hydrophobicity ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม Gram-negative rods
4. ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อการผลิต Verocytotoxin ของเชื้อ *Escherichia coli* O157: H7
5. ศึกษาต่อในรายละเอียดสำหรับสารส่วนที่มีฤทธิ์