4 วิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเล

การบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคลำไส้อักเสบ ซึ่งเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้บริเวณชายฝั่งทะเล ในน้ำทะเล ตะกอนดิน และสัตว์ทะเล โดยเฉพาะ กุ้ง หอย ปู ปลา การศึกษาครั้งนี้ได้แยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลหลายชนิดได้แก่ กุ้ง หอย ปู และปลา จำนวน 200 ตัวอย่าง พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยมากที่สุด(93.3%) รองลงมาคือ กุ้ง (66.7%) ปลา (44.4%) และปู (40.0%) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hackney และคณะ(1980) พบ *V. parahaemolyticus* ในหอยมากที่สุด รองลงมาคือกุ้งและพบ *V. parahaemolyticus* ในปูและปลาใกล้เคียงกัน ซึ่งการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยมากที่สุดอาจจะเนื่องมาจากหอยเป็นสัตว์ที่กินอาหารโดยการกรอง (Barnes, 1974) ซึ่งจะแตกต่างจากกุ้ง ปู และ ปลา แบคทีเรียที่อยู่ในน้ำจึงมีโอกาสเข้าสู่ตัวหอยได้มาก คนไทยนิยมรับประทานหอยแบบกึ่งสุกกึ่งดิบอาจจะมีโอกาสเป็นโรคลำไส้อักเสบเนื่องจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้

การตรวจยืนยัน *Vibrio parahaemolyticus* โดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย

การตรวจยืนยันเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Vibrio ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยโดยทั่วไปมักใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งอาจให้ผลคลาดเคลื่อนได้บ้าง ดั้งนั้นจึงมีการพัฒนาใช้วิธี PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจหายีน *toxR* เพื่อยืนยันเชื้อในกลุ่ม Vibrio ได้แก่ *V. hollisae* *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* (Kim *et al.,* 1999 ; Singh *et al.,* 2001 ; Vuddhakul *et al.,* 2000b) ยีน *toxR* เป็นยีนที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของยีนก่อความรุนแรงของโรค ซึ่งยีน *toxR* ถูกอนุรักษ์(conserved sequence)ไว้ในวงศ์ Vibrionaceae แต่ละสปีชีส์จะมียีน *toxR* ที่มีความหลากหลายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจยืนยันเชื้อ

V. parahaemolyticus โดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งผ่านขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมีที่แยกได้จากอาหารทะเล จำนวน 704 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 198 สายพันธุ์ เมื่อตรวจยืนยันโดยวิธี PCR ซึ่งใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย ให้ผลบวก 666 สายพันธุ์(94.6%) และ 187 สายพันธุ์ (94.4%) ตามลำดับ การทดสอบทางชีวเคมีให้ผลคลาดเคลื่อนเท่ากับร้อยละ 5.4 และ 5.6 ตามลำดับ

การตรวจหาปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค

ปัจจัยก่อความรุนแรงที่สำคัญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* คือ ยีน *tdh* ซึ่งควบคุมการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin (TDH) ที่มีผลทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (β-hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษชื่อ Wagatsuma agar ซึ่งยีน *tdh* พบได้ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย ประมาณ 88-96 % ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมพบยีน *tdh* เพียง 1-2 % เท่านั้น (Miyamoto *et. al.,* 1969) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ โดยเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยตรวจพบยีน *tdh* 168 สายพันธุ์ (89.4%) ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ตรวจพบยีน *tdh* 14 สายพันธุ์ (2.1%) นอกจากยีน *tdh* แล้วปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่สำคัญอีกชนิดคือ ยีน *trh* ซึ่งควบคุมการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) แต่ไม่ทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (β-hemolysis) จากการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมียีน *trh* 10 สายพันธุ์ (5.3%) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sutheinkul และคณะ (1995) ซึ่งพบยีน *trh*ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย 7.6 % ใน ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมตรวจพบยีน *trh* 2 สายพันธุ์ (0.3%) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีทั้งยีน *tdh* และยีน *trh* จำนวน 5 สายพันธุ์ (2.7%) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Sutheinkul และคณะ (1995) ที่พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีทั้งยีน *tdh* และ *trh* 6%

สำหรับสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่มียีนควบคุมการสร้างสารพิษ *trh* จะเห็นได้ว่ามีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาชีวเคมีการสร้าง

เอนไซม์ urease โดยทุกสายพันธุ์ที่ตรวจพบยีน *trh* จะให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาการย่อยสลาย urea ไม่ว่าสายพันธุ์ดังกล่าวจะมียีน *tdh* ร่วมด้วยหรือไม่ก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suthienkul และคณะ (1995) Ghosh และ Sehgal (1998) และ Okitsu และคณะ (1997) ที่พบว่าตำแหน่งยีน *trh* และ ยีน *ure* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ urease อยู่บนตำแหน่งติดกันบนโครโมโซม และ การสร้างเอนไซม์ urease เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ถึงความรุนแรงในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *trh* ได้

การระบาดของ *V. parahaemolyticus*

นับตั้งแต่ปีค.ศ. 1996 เป็นต้นมาเกิดการระบาดของ *V. parahaemolyticus* O3:K6 ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ซึ่งไม่เคยปรากฏมาก่อน *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่ระบาดเป็น *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่มียีนในส่วนของ *toxRS* แตกต่างจาก *V. parahaemolyticus* O3:K6 เดิม ซึ่งวิธีที่ใช้แยกความแตกต่างของทั้ง 2 สายพันธุ์คือ GS-PCR (Group Specific-PCR) นอกจากนี้ยังพบซีโรทัยป์ O4:K68 และ O1:KUT ซึ่งมียีนส่วนของ *toxRS* เช่นเดียวกันกับ *toxRS* ของ *V. parahaemolyticus* ที่ระบาดด้วย จึงถือได้ว่าทั้งสองซีโรทัยป์น่าจะมาจาก clone เดียวกัน จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ให้ผล GS-PCR เป็นบวกในปีพ.ศ. 2543 เป็น *V. parahaemolyticus* O3:K6 (48%), O1:K25 (19%), O4:K68 (3.1%) และ O2:K3 (1.6%) และในปี พ.ศ. 2544 เป็น *V. parahaemolyticus* O3:K6 (52%), O1:K25 (8.9%), O4:K68(6.5%) และO1:KUT(0.8%) และพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลที่ให้ผล GS-PCR เป็นบวกเป็น *V. parahaemolyticus* O3:K6 (50%), O1:K25 (31%) และ O3:KUT(6%) แสดงว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ระบาดได้มีการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ จากสายพันธุ์ต้นกำเนิด O3:K6 เป็น O4:K68 และ O1:KUT และในการศึกษานี้พบซีโรทัยป์ใหม่คือ O1:K25 และ O2:K3 เชื้อที่ให้ผล GS-PCR เป็นบวกทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ที่มียีนสร้างสารพิษ *tdh* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น แต่สายพันธุ์ที่มียีนสร้างสารพิษทั้ง *tdh* และ *trh* หรือมีเฉพาะยีน *trh* หรือไม่มียีนสร้างสารพิษชนิดใดเลยจะให้ผล GS-PCR เป็นลบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Matsumoto และคณะ (2000) แต่อย่างไรก็ตามการวิจัยครั้งนี้พบ *V. parahaemolyticus* O3:K6 ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 1 สายพันธุ์ให้ผล GS-PCR เป็น

บวก แต่ไม่พบยีนสร้างพิษทั้ง *tdh* และ *trh* อาจจะเนื่องมาจากยีน *tdh* มีคุณสมบัติเป็น transposon เนื่องจากถูกขนาบข้างด้วย insertion sequence like element (Terai *et al.,* 1991) จึงทำให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหลุดหายไป หรืออาจเป็นไปได้ว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ดังกล่าวอาจได้รับผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในผู้ป่วย ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ไม่สามารถตรวจพบยีนสร้างสารพิษ

การศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี GS-PCR สามารถระบุได้ว่าสายพันธุ์ที่ทดสอบเบื้องต้นว่ามียีนส่วนของ *toxRS* ที่มีเหมือนกับสายพันธุ์ที่ระบาดหรือไม่ แต่หากต้องการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดของ *V. parahaemolyticus* ต้องอาศัยวิธีการยืนยันโดยการศึกษาในระดับโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ ribotyping (RT) (Chowdury *et al.,* 2000b) enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC) PCR (Marshall *et al.,* 1999) pulse-field gel electrophoresis (PFGE) (Yeung *et al.,* 2002; Chowdury *et al.,* 2000a ; Wong *et al.,* 1996 ; Bag *et al.,* 1999 ; Wong *et al.,* 2000) arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR)(Okuda *et al.,* 1997 ; Marshall *et al.,* 1999 ; Matsumoto *et al.,* 2000 ; Vuddhakul *et al.,* 2000b ; Chowdury *et al.,* 2000a) และ restriction fragment length polymorphisms (RFLP) (Marshall *et al.,* 1999) โดยวิธี AP-PCR เป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ primer 2 และ primer 4 ทดสอบ *V. parahaemolyticus* จากการสุ่มเลือกจำนวน 19 สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วย (ตารางที่3.7) ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2541 จนถึงปีพ.ศ. 2544 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผล GS-PCR เป็นบวกจำนวน 10 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ให้ผล GS-PCR เป็นลบ 9 สายพันธุ์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโดยวิธี AP-PCR พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่าง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ GS-PCR บวก ซึ่งเป็นซีโรทัยป์ O3:K6, O3:KUT และ O1:K25 ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วย แต่ทั้งหมดมีความแตกต่างกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ GS-PCR ลบ นั่นแสดงให้เห็นว่าซีโรทัยป์ O3:K6, O3:KUT และ O1:K25 ซึ่งแยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วยน่าจะมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน (รูปที่3.5 และ 3.6)

จากการยืนยันโดยวิธี PFGE ซึ่งยอมรับกันว่าเป็นวิธีที่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอได้ดีที่สุด(Marshall *et al.,* 1999) จากการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่สุ่มเลือกทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ทั้งสายพันธุ์ GS-PCR บวกและเป็นซีโรทัยป์ O3:K6 และ O3:KUT ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วยมีรูปแบบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันและน่าจะมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน (รูปที่ 3.9) แต่จะแตกต่างสายพันธุ์ GS-PCR ลบ นอกจากนี้ยังพบ 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ E5 และ C4 ซึ่งเป็น serotype O1:K25 และ GS-PCR บวก ซึ่งแยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วย มีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการ (รูปที่ 3.9) แสดงว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีต้นกำเนิดมาจาก clone เดียวกันและยืนยันว่าอาหารทะเลเป็นแหล่งแพร่ของ *V. parahaemolyticus*

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีการระบาดทั่วโลก พบอยู่ในอาหารทะเล ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญ ในการกระจายเชื้อจากสิ่งแวดล้อมไปยังคนและระบาดทั่วโลกขณะนี้ นอกจากนี้ยังเป็นการยืนยันว่า สายพันธุ์ที่มีการระบาดขณะนี้ (pandemic strains) เป็นสายพันธุ์ใหม่ และมีการเปลี่ยนแปลง serogroup (O4:K68, O1:KUT, O1:K25) โดยทุก serogroup ใหม่ ที่ตรวจพบมีต้นกำเนิดมาจากสายพันธุ์ระบาด (O3:K6) ตัวเดิม การศึกษาปัจจัยต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อสายพันธุ์นี้ในอนาคตจะช่วยให้ข้อมูลเกี่ยวกับต้นตอของสายพันธุ์นี้ว่ามีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศใดและมีปัจจัยใดส่งเสริมให้เชื้อมีความทนทานและเพิ่มจำนวนได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น