คุณลักษณะของ *Vibrio cholerae* ในสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยในประเทศไทย

Characteristics of *Vibrio cholerae* in Environmental and Clinical Sources of Thailand

วรรธนี สังข์หิรัญ

Watthanee Sunghirun

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Microbiology

Prince of Songkla University

2546

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณลักษณะของ *Vibrio cholerae* ในสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยในประเทศไทย
ผู้เขียน นางสาววรรธนี สังข์หิรัญ
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
……..……..ประธานกรรมการ	….……..……..ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)	(รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล)
…..……....กรรมการ	…..……..กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธินี ภูวนาถ)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธินี ภูวนาถ)
	……..……กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)
	…….กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จำนงค์ นพรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

…….
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณลักษณะของ *Vibrio cholerae* ในสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยในประเทศไทย
ผู้เขียน นางสาววรรธนี สังข์หิรัญ
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

ได้แยกเชื้อ *Vibrio cholerae* จากตัวอย่างอาหารทะล แพลงก์ตอน และน้ำ ในพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 280 ตัวอย่าง โดยเพิ่มปริมาณเชื้อใน alkaline peptone water pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เลือกโคโลนีสีเหลืองบน TCBS ทำการทดสอบทางชีวเคมีและตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้จีน *ompW* เป็นจีนเป้าหมาย พบ *V. cholerae* non-O1/non-O139 จำนวน 188 ตัวอย่าง รวม 405 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ซึ่งแยกจากผู้ป่วย 6 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อทั้งหมดตรวจไม่พบจีนก่อโรค *ctxA, tcpA-E, tcpA-C, zot, ace* และ *stn/sto* ยกเว้นเชื้อที่แยกจากแพลงก์ตอน 4 สายพันธุ์ ให้ผลบวกต่อ *tcpA-E* สำหรับ *V. cholerae* ที่แยกจากผู้ป่วย จากภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 82 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์เป็น serogroup O1 serotype Inaba ให้ผลบวกต่อจีน *ompW* และตรวจพบจีนก่อโรค *ctxA, tcpA-E, zot*, *ace* และ *toxR* จากการศึกษารูปแบบดีเอนเอโดยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 2 และ primer 4 พบว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม และจากผู้ป่วยทั้ง 6 สายพันธุ์ ให้รูปแบบดีเอนเอที่แตกต่างกัน ยกเว้น *V. cholerae* non-O1/non-O139 4 สายพันธุ์ ที่ให้ผลบวกต่อจีน *tcpA-E* ให้รูปแบบดีเอนเอที่เหมือนกัน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วย 5 สายพันธุ์ มีการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะคล้ายคลึงกัน สำหรับ *V. cholerae* O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในภาคต่างๆ พบดีเอนเอรูปแบบ A ในทุกภาคของประเทศไทย ส่วนรูปแบบ B พบได้เพียงในพื้นที่ภาคใต้เท่านั้น การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ให้รูปแบบตอบสนองต่อยาแบบที่ 3 คือไวต่อยา tetracycline, chloramphenicol, co-trimoxazole,

nalidixic acid, norfloxacin, gentamicin, ciprofloxacin แต่ให้ผลไวปานกลางต่อยา erythromycin และ ampicillin

Thesis Title	Characteristics of *Vibrio cholerae* in Environmental and Clinical Sources of Thailand
Author	Miss Watthanee Sunghirun
Major Program	Microbiology
Academic Year	2002

Abstract

V. cholerae were isolated from seafood, plankton and water in southern Thailand. Two hundred and eighty samples were enriched in alkaline peptone water pH 8.5 at 42 ^{o}C for 6 hrs and plated on TCBS agar. Sucrose fermenter colonies were selected and identified by biochemical tests and confirmed by PCR targeted to *ompW* gene. A total of 405 strains of *V. cholerae* non-O1/non-O139 were isolated from 188 environmental samples. They were compared to six strains of *V. cholerae* non-O1/non-O139 collected from patients in the same region. It was found that most of the environmental and clinical strains of *V. cholerae* non-O1/non-O139 lacked the *ctxA*, *tcpA-E, tcpA-C, zot, ace* and *stn/sto* genes. However 4 strains isolated from planktons carried *tcpA-E* gene. Eighty two strains of *V. cholerae* were isolated from clinical specimen of patients in 4 regions of Thailand. All of them were serogroup O1, serotype Inaba and *ompW* gene positive. They all carried virulence associated genes encoding the *ctxA, tcpA-E*, *zot, ace* and *toxR*. Molecular analysis by arbitrarily primed PCR (AP-PCR) was performed using RAPD analysis primer 2 and 4. The AP-PCR profiles of *V. cholerae* non-O1/non-O139 4 isolates from environment and clinical specimens were different except 4 environmental strains which harbour *tcpA-E.* It was found that 5 of 6 clinical strains of non-O1/non-O139 exhibited identical or similar antibiogram patterns. The AP-PCR profiles of *V. cholerae* O1 isolates from patients in all region exhibited 2 different pattern with primers 2 and 4, pattern A and pattern B. Pattern B was found only in clinical strain in the south

region. Most of them showed antibiogram pattern 3 which were susceptible to tetracycline, chloramphenicol, co-trimoxazole, nalidixic acid, norfloxacin, gentamicin, ciprofloxacin but were intermediate to erythromycin and ampicillin.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาจากเหล่าคณาจารย์หลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ.ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาตลอดในการทำวิจัย การค้นคว้า การเขียนและตรวจทานวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธินี ภูวนาถ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่อง ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร กรรมการผู้แทนภาคจุลชีววิทยา และ ผศ.ดร.จำนงค์ นพรัตน์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา และตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับการใช้สถานที่ และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการทำวิจัย ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จำนงค์ นพรัตน์ และพี่ๆ ห้องธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกสำหรับการใช้เครื่องมือในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พรศิลป์ ผลพันชิน ภาควิชาชีววิทยา ที่ให้คำแนะนำ และให้ยืมอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอน

ขอขอบพระคุณท่านผู้อำนวยการ เกริก รัตอาภา พี่เยาวมาลย์ สุติวิตร ที่สนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ ขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา ที่ให้การช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน น้อง นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาตรีทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจ

และท้ายสุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณพี่ น้อง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ห่วงใย และคอยเป็นกำลังใจเสมอมา

วรรธนี สังข์หิรัญ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 ตรวจเอกสาร	3
1.3 วัตถุประสงค์	42
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	43
2.1 วัสดุ	43
2.2 อุปกรณ์	45
2.3 วิธีการ	47
3 ผลการทดลอง	61
4 วิจารณ์	85
5 สรุป	93
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	128
ภาคผนวก ข	134
ประวัติผู้เขียน	137

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ความแตกต่างระหว่าง biotype Classical และ El Tor	5
1.2 การระบาดใหญ่ทั่วโลกของอหิวาตกโรค	8
1.3 ลักษณะทั่วไปของจีโนม *V. cholerae*	32
2.1 *V. cholerae* O1 ที่สุ่มเลือกศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยวิธี AP-PCR จากแต่ละจังหวัดในภูมิภาคของประเทศไทย	57
2.2 ลำดับเบสและขนาดผลผลิต PCR ของ primer	60
3.1 จำนวนตัวอย่างแพลงก์ตอนที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ ในเขต จ.สงขลา และจำนวนที่ให้ผลบวกต่อ *V. cholerae*	62
3.2 ชนิดและจำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่สุ่มเก็บจากตลาดสดเขต อ.หาดใหญ่ และ อ.เมือง จ.สงขลา	63
3.3 จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่พบ *V. cholerae*	63
3.4 ชนิดและจำนวน *V. cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ	64
3.5 จำนวน *V. cholerae* ที่ทดสอบและให้ผลบวกต่อจีน *ompW*	66
3.6 ผลการตรวจหาจีนก่อโรคใน *V. cholerae* ที่แยกจากแหล่งต่างๆ	69
3.7 รูปแบบดีเอนเอของ *V. cholerae* O1 ที่สุ่มเลือกศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยวิธี AP-PCR	72
3.8 ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วย จำนวน 6 isolates	82
3.9 รูปแบบยาต้านจุลชีพของ *V. cholerae* O1 ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย	84

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	การระบาดทั่วโลกครั้งที่ 7 ของ *V. cholerae*	11
1.2	จำนวนผู้ป่วยจากเชื้อ *V. cholerae* O1 และ O139 ที่ตรวจยืนยันโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำแนกรายปี พ.ศ. 2531-2541	13
1.3	*Vibrio cholerae* pathogenicity island (VPI)	20
1.4	แผนภาพ CTX genetic element ของ *V. cholerae*	22
1.5	แผนภาพจีโนมของ CTX ϕ	24
1.6	กลไกการเปลี่ยน non-pathogenic *V. cholerae* เป็น pathogenic *V. cholerae* โดยแบคเทอริโอฟาจ และการเปลี่ยนแปลง serogroup	24
1.7	กลไกการออกฤทธิ์ของ cholera toxin	26
1.8	รูปแบบการควบคุมเป็นลำดับขั้นของ ToxR/ToxT ใน *V. cholerae*	29
1.9	ซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. cholerae* O1 ที่ตรวจพบ พ.ศ. 2532-2541	35
1.10	ไดอะแกรมแสดงปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	40
3.1	ผลผลิต PCR จาก *V. cholerae* โดยใช้จีน *ompW* เป็นจีนเป้าหมาย	65
3.2	ผลผลิตจีน *tcpA-C, tcpA-E* และ *ctxA* โดยวิธี multiplex PCR	67
3.3	ผลผลิตจีน toxR และ zot โดยวิธี multiplex PCR และจีน ace โดยวิธี PCR	68
3.4	ผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วย (C) และสิ่งแวดล้อม (E) ด้วยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 2	70
3.5	การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคกลาง โดยใช้ primer 2 พบดีเอนเอรูปแบบ A	73
3.6	การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยใช้ primer 2 พบดีเอนเอรูปแบบ A	74

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.7	การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคใต้ โดยใช้ primer 2 พบดีเอนเอรูปแบบ A และ B	75
3.8	เปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 ที่แยกจากภาคต่างๆ ของประเทศไทย โดยใช้ primer 2	76
3.9	การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคกลางโดยใช้ primer 4 พบดีเอนเอรูปแบบ A	78
3.10	การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยใช้ primer 4 พบดีเอนเอรูปแบบ A	79
3.11	การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคใต้โดยใช้ primer 4 พบดีเอนเอรูปแบบ A และ B	80
3.12	เปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 ที่แยกจากภาคต่างๆ ของประเทศไทย โดยใช้ primer 4	81

ตัวย่อและสัญลักษณ์

µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
µg	=	microgram
mM	=	millimolar
ml	=	millilitre
bp	=	base pair
kb	=	kilobase
kDa	=	kilodalton
A	=	adenosine
C	=	cytosine
T	=	thymidine
G	=	guanine
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
Tris	=	Tris(hydroxyl methyl) aminomethane
PCR	=	polymerase chain reaction
°C	=	degree celcieus
OD	=	optical density
Taq	=	*Thermus aquaticus*
pH	=	hydrogen ion concentration
%	=	percentage
TCBS	=	thiosufate citrate bile salt sucrose agar

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

AP	=	ampicillin
C	=	chloramphenicol
CI	=	ciprofloxacin
SXT	=	co-trimoxazole
E	=	erythromycin
G	=	gentamicin
NA	=	nalidixic acid
NR	=	norfloxacin
TE	=	tetracycline
S	=	sensitive
I	=	Intermediate
R	=	resistance
ช.ม.	=	ชั่วโมง
ม.ม.	=	มิลลิเมตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววรรธนี สังข์หิรัญ

วัน เดือน ปีเกิด 8 ตุลาคม 2515

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2537

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา ต.พะวง อ.เมือง จ.สงขลา