

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อ *V. cholerae* จากแพลงก์ตอน

จากการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนในน้ำ บริเวณคลองอยู่ตะเภา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ จุดวัดระดับน้ำสถานีสำรวจอุทกวิทยา 6 ตัวอย่าง ทำน้ำวัด หาดใหญ่ใน 5 ตัวอย่าง สะพานแขวนวัดท่าแซะ 5 ตัวอย่าง สะพานบ้านคตยาง 5 ตัวอย่าง วัดคูเต่า 5 ตัวอย่าง และสะพานชุมชนคูเต่า 5 ตัวอย่าง รวมทั้งบริเวณรอบพื้นที่ เกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ ทำน้ำวัดแหลมพ้อ 4 ตัวอย่าง ทำน้ำวัดท้ายยอ 3 ตัวอย่าง ชุมชนบ้านสวนใหม่ 3 ตัวอย่าง ชุมชนบ้านอ่าวทรายจุดที่ 1 3 ตัวอย่าง ชุมชนบ้านอ่าวทรายจุดที่ 2 3 ตัวอย่าง และชุมชนบ้านนอก 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างแพลงก์ตอนมาเพิ่มจำนวนเชื้อ *V. cholerae* ที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 6-8 ชั่วโมง แล้วแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ บน TCBS เลือกโคโลนีสีเหลือง ขนาดโตปานกลาง ทดสอบทางชีวเคมี และทดสอบหา serogroup โดยใช้ antiserum (serotest, Biotech, Thailand) ผลพบเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. cholerae* serogroup non-O1/non-O139 จำนวน 29 ตัวอย่าง รวม 71 isolates หรือร้อยละ 58 ของจำนวนตัวอย่างแพลงก์ตอนทั้งหมด (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 จำนวนตัวอย่างแพลงก์ตอนที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ ในเขต จ.สงขลา และ
จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ *V. cholerae*

สถานที่	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน ผลบวก	จำนวน isolates
1. จุดวัดระดับน้ำสถานีตำรวจ อุทกวิทยา	6	4	8
2. ทำน้ำวัดหาดใหญ่ใน	5	4	8
3. สะพานแขวนวัดท่าแซะ	5	4	10
4. สะพานบ้านคดยาง	5	2	5
5. วัดคูเต่า	5	3	7
6. สะพานชุมชนคูเต่า	5	3	9
7. ทำน้ำวัดแหลมพ้อ	4	1	3
8. ทำน้ำวัดท้ายยอ	3	1	2
9. ชุมชนบ้านสวนใหม่	3	1	5
10. ชุมชนบ้านอ่าวทรายจุดที่ 1	3	2	4
11. ชุมชนบ้านอ่าวทรายจุดที่ 2	3	1	4
12. ชุมชนบ้านนอก	3	3	6
รวม	50	29	71

3.2 การแยกเชื้อ *V. cholerae* จากอาหารทะเล

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเลจากตลาดสด 5 แห่งใน เขต อ. หาดใหญ่ และ
อ. เมือง จ. สงขลา รวม 200 ตัวอย่าง ได้แก่ หอย 180 ตัวอย่าง กุ้ง 6 ตัวอย่าง ปลา 5 ตัว
อย่าง และปลา 9 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างดังกล่าวมาแยกเชื้อ *V. cholerae* บน TCBS
ทดสอบทางชีวเคมี และตรวจหา serogroup พบผลบวกที่คาดว่าจะเป็ *V. cholerae*
serogroup non-O1/non-O139 จำนวน 147 ตัวอย่าง รวม 324 isolates หรือ ร้อยละ 73.5
ของจำนวนตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด (ตารางที่ 3.2 และ 3.3)

ตารางที่ 3.2 ชนิดและจำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่สุ่มเก็บจากตลาดสดเขต อ.หาดใหญ่ และ อ.เมือง จ.สงขลา

อาหารทะเล	จำนวนตัวอย่าง					
	คลองเรียน	กิมหยง	ปลาซา	เกาะหมี่	เก้าเส้ง	รวม
หอย	52	14	61	26	27	180
กุ้ง	-	1	1	4	-	6
ปู	-	-	-	-	5	5
ปลา	-	-	-	7	2	9
รวม	52	15	62	37	34	200

ตารางที่ 3.3 จำนวนตัวอย่างอาหารทะเลที่พบ *V. cholerae*

ชนิดอาหารทะเล	จำนวนตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทางชีวเคมี (%)	จำนวน isolates
หอย	180	135 (75.0)	291
กุ้ง	6	4 (66.7)	10
ปู	5	4 (80.0)	10
ปลา	9	4 (44.4)	13
รวม	200	147 (73.5)	324

3.3 การแยกเชื้อ *V. cholerae* จากผู้ป่วย

เชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยระหว่าง เมษายน 2544 – มีนาคม 2545 จำนวน 98 isolates จากหน่วยงานต่างๆ ทางด้านสาธารณสุข ถูกนำมาทดสอบทางชีวเคมี ตรวจสอบ serogroup โดยใช้ antiserum อีกครั้ง พบว่าเป็น เชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 6 isolates และ *V. cholerae* O1 จำนวน 92 isolates (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ชนิดและจำนวน *V. cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ

สถานที่	จำนวน (isolates)	
	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	<i>V. cholerae</i> O1
- โรงพยาบาลวชิระภูเก็ต	6	4
- โรงพยาบาลปัตตานี	-	1
- โรงพยาบาลมหารชนครศรีธรรมราช	-	4
- โรงพยาบาลหาดใหญ่	-	5
- โรงพยาบาลจนะ *	-	11
- โรงพยาบาลเทพา *	-	36
- โรงพยาบาลนาทวี *	-	8
- โรงพยาบาลสะบ้าย้อย*	-	1
- โรงพยาบาลกาญจนบุรี **	-	2
- โรงพยาบาลราชบุรี **	-	1
- โรงพยาบาลสมุทรสาคร **	-	7
- โรงพยาบาลสุรินทร์	-	3
- โรงพยาบาลเชียงใหม่ ***	-	9
รวม	6	92

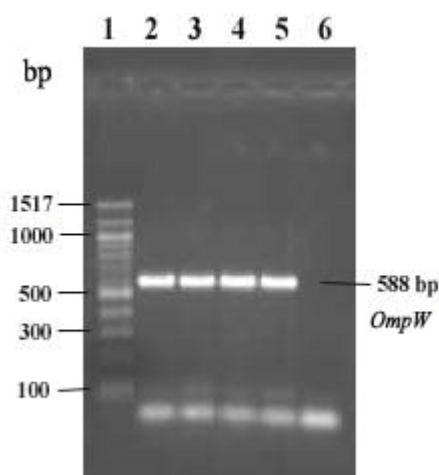
หมายเหตุ * จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา

** จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สมุทรสงคราม

*** จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่

3.4 การบ่งชี้ *V. cholerae* ด้วยวิธี PCR โดยใช้จิ้น *ompW* เป็นจิ้นเป้าหมาย

นำ *V. cholerae* ทุก isolates ที่แยกจากแพลงก์ตอน อาหารทะเล น้ำ (จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์) และผู้ป่วย ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบทางชีวเคมี มาตรฐาน ยืนยันโดยวิธี PCR โดยใช้จิ้น *ompW* เป็นจิ้นเป้าหมาย และได้ผลผลิต PCR ขนาด 588 bp (รูปที่ 3.1) จากการทดสอบพบ *V. cholerae* non-O1/non-O139 จากแพลงก์ตอน 71 isolates อาหารทะเล 324 isolates ให้ผลบวกต่อจิ้น *ompW* คิดเป็นร้อยละ 95.8 และ 98.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.5) ส่วน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากน้ำ 12 isolates ผู้ป่วย 6 isolates รวมทั้ง *V. cholerae* O1 จากผู้ป่วย 92 isolates ทั้งหมด (100%) ให้ผลบวกต่อจิ้น *ompW*



รูปที่ 3.1 แสดงผลผลิต PCR จาก *V. cholerae* โดยใช้จิ้น *ompW* เป็นจิ้นเป้าหมาย

แถวที่ 1	100 bp DNA ladder
แถวที่ 2	<i>V. cholerae</i> O1 biotype Classical
แถวที่ 3	<i>V. cholerae</i> O1 biotype El Tor
แถวที่ 4	<i>V. cholerae</i> O139
แถวที่ 5	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139
แถวที่ 6	<i>V. mimicus</i>

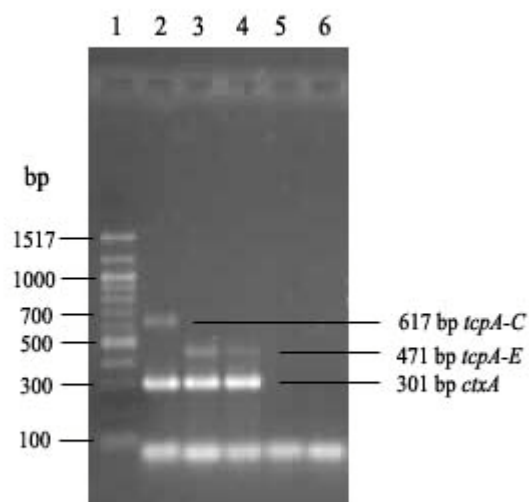
ตารางที่ 3.5 จำนวน *V. cholerae* ที่ทดสอบและให้ผลบวกต่อจिन *ompW*

แหล่งของ <i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139				<i>V. cholerae</i> O1	รวม
	แพลงก์ ตอน	อาหาร ทะเล	น้ำ	ผู้ป่วย	ผู้ป่วย	
จำนวน isolates ที่ตรวจยืนยัน	71	324	12	6	92	505
จำนวน isolates ที่ให้ ผลบวกต่อ <i>ompW</i> (ร้อยละ)	68 (95.8)	319 (98.5)	12 (100)	6 (100)	92 (100)	497 (98.4)

3.5 การตรวจหาจिनก่อโรคใน *V. cholerae*

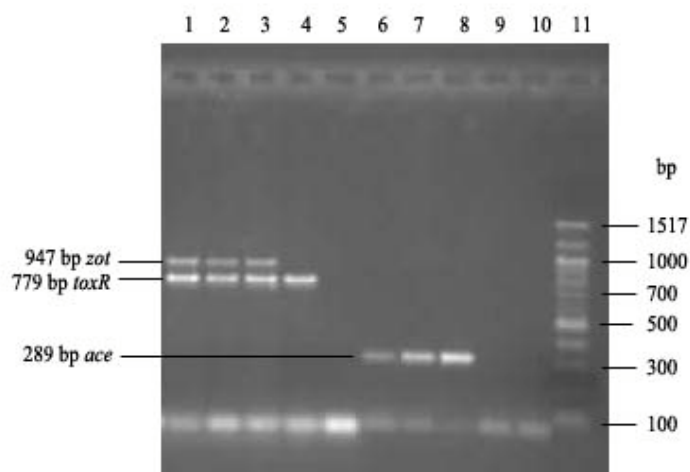
V. cholerae ทุกสายพันธุ์ ที่ให้ผลบวกต่อจिन *ompW* เมื่อนำมาทดสอบหาจिनที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค ได้แก่ *tcpA-C*, *tcpA-E* และ *ctxA* โดยวิธี multiplex PCR (รูปที่ 3.2) พบว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากแพลงก์ตอน อาหารทะเล น้ำ และผู้ป่วย รวม 405 isolates ให้ผลเป็นลบเกือบทั้งหมด ยกเว้น 4 isolates ที่แยกจากแพลงก์ตอน 2 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่เก็บบริเวณวัดคูเต่า และตัวอย่างที่เก็บจากสะพานชุมชนบ้านคูเต่า ให้ผลบวกต่อจिन *tcpA-E* ส่วน *V. cholerae* O1 จากผู้ป่วยให้ผลบวกต่อจिन *tcpA-E* และ *ctxA* ทุก isolates

สำหรับจिन *toxR*, *zot*, *ace* และ *stn/sto* (รูปที่ 3.3) พบว่า *V. cholerae* O1 ทุก isolates ให้ผลบวกต่อจिन *toxR*, *zot* และ *ace* แต่ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วยและจากแพลงก์ตอน ให้ผลบวกเฉพาะ *toxR* เท่านั้น ส่วน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่ให้ผลบวกต่อ *tcpA-E* และ *toxR* พบว่าให้ผลลบต่อ *stn/sto* (ตารางที่ 3.6)



รูปที่ 3.2 แสดงผลผลิตของจีน *tcpA-C*, *tcpA-E* และ *ctxA* โดยวิธี multiplex PCR

แถวที่ 1	100 bp DNA ladder
แถวที่ 2	<i>V. cholerae</i> O1 biotype Classical
แถวที่ 3	<i>V. cholerae</i> O1 biotype El Tor
แถวที่ 4	<i>V. cholerae</i> O139
แถวที่ 5	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139
แถวที่ 6	<i>V. mimicus</i>



รูปที่ 3.3 แสดงผลผลิตของจีน *toxR* และ *zot* โดยวิธี multiplex PCR (แถว 1-5) และ จีน *ace* โดยวิธี PCR (แถว 6-10)

แถวที่ 1 และ 6	<i>V. cholerae</i> O1 biotype Classical
แถวที่ 2 และ 7	<i>V. cholerae</i> O1 biotype El Tor
แถวที่ 3 และ 8	<i>V. cholerae</i> O139
แถวที่ 4 และ 9	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139
แถวที่ 5 และ 10	<i>V. mimicus</i>
แถวที่ 11	100 bp DNA ladder

ตารางที่ 3.6 ผลการตรวจหาจिनก่อโรคใน *V. cholerae* ที่แยกจากแหล่งต่างๆ

แหล่งของ <i>V. cholerae</i>	ผลบวกต่อ <i>ompW</i> (isolates)	ผลบวกต่อจिनก่อโรค (isolates)						
		<i>tcpA-C</i>	<i>tcpA-E</i>	<i>ctxA</i>	<i>toxR</i>	<i>zot</i>	<i>ace</i>	<i>stn/sto</i>
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139								
- แพลงก์ตอน	68	0	4	0	4*	0*	0*	0*
- อาหารทะเล	319	0	0	0	ND	ND	ND	ND
- น้ำ	12	0	0	0	ND	ND	ND	ND
- ผู้ป่วย	6	0	0	0	6	0	0	0
<i>V. cholerae</i> O1								
- ผู้ป่วย	92	0	92	92	92	92	92	0

หมายเหตุ * : ทดสอบเฉพาะ *V. cholerae* non-O1/non-O139 4 สายพันธุ์ ที่ให้ผลบวก

ต่อจिन *tcpA-E*

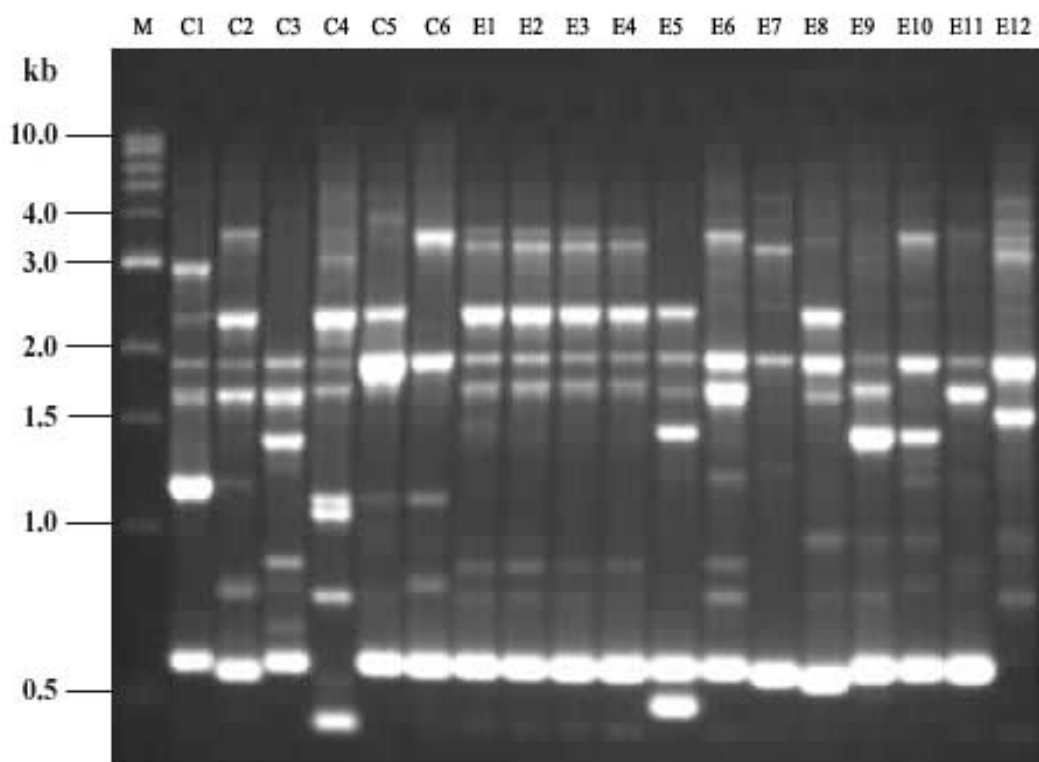
ND : ไม่ได้ทดสอบ

3.6 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* โดยวิธี AP-PCR

3.6.1 เปรียบเทียบ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

จากการสุ่ม *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วย 6 isolates

(C1-C6) จากแพลงก์ตอน 7 isolates (E1-E7) จากอาหารทะเล 3 isolates (E8-E10) และจากน้ำ 2 isolates (E11-E12) รวมทั้งหมด 18 isolates มาศึกษาความแตกต่างของดีเอ็นเอในระดับโมเลกุล โดยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 2 พบว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่สุ่มมาทั้งหมด มีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและมีความหลากหลาย มีเพียง *V. cholerae* non-O1/non-O139 4 isolates ที่แยกได้จากแพลงก์ตอน และให้ผลบวกต่อจिन *tcpA-E* (E1-E4) ที่ให้แบบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 ผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วย (C) และสิ่งแวดล้อม (E) ด้วยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 2

M	1 kb DNA ladder
C1-C6	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 จากผู้ป่วย
E1-E4	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 จากแพลงก์ตอน (<i>tcpA-E</i> บวก)
E5-E7	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 จากแพลงก์ตอน
E8-E10	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 จากอาหารทะเล
E11- E12	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 จากน้ำ

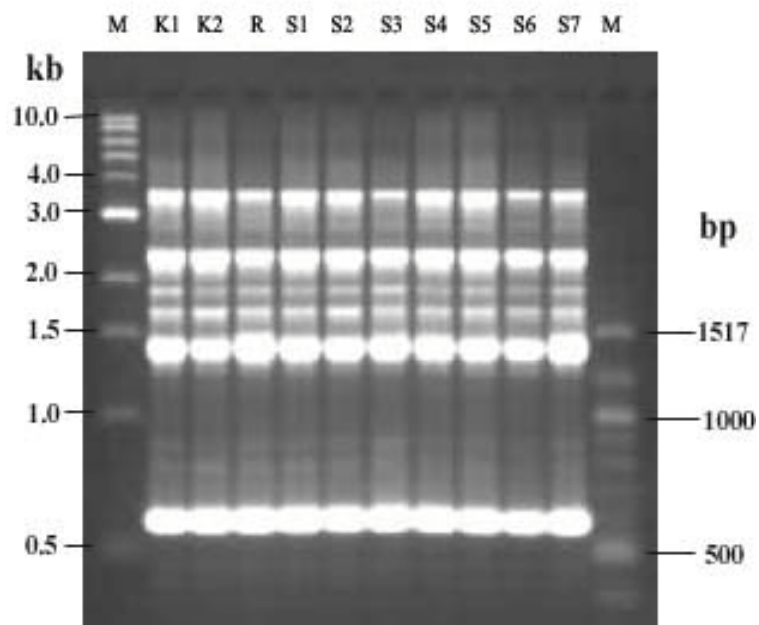
3.6.2 เปรียบเทียบความแตกต่างของ *V. cholerae* O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วย

ได้ทำการสุ่มเลือก *V. cholerae* O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วย ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้ ภาคกลาง 10 isolates ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 isolates ภาคเหนือ 9 isolates และภาคใต้ 36 isolates รวมทั้งหมด 58 isolates (ตารางที่ 2.1) เมื่อนำมาศึกษาความแตกต่างและเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้ AP-PCR พบว่า เมื่อทดสอบด้วย primer 2 สามารถพบรูปแบบของดีเอ็นเอ ที่เหมือนกัน คือรูปแบบ A ในภาคกลาง 10 isolates (รูปที่ 3.5) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 isolates ภาคเหนือ 9 isolates (รูปที่ 3.6) และภาคใต้ 25 isolates (แสดงตัวอย่างเพียง 15 isolates ในรูปที่ 3.7) และพบรูปแบบ B เป็นจำนวน 11 isolates (แสดงตัวอย่างเพียง 3 isolates ในรูปที่ 3.7) เฉพาะในพื้นที่ภาคใต้ จังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลเทพา 5 isolates โรงพยาบาลจะนะ 3 isolates และโรงพยาบาลนาทวี 3 isolates (แสดงเพียงแห่งละ 1 isolates ในรูปที่ 3.7) แต่ไม่พบในพื้นที่ภูมิภาคอื่น (ตารางที่ 3.7) เมื่อสุ่มเลือกสายพันธุ์จากทุกภาคมาเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอกับ *V. cholerae* O1 El Tor serotype Ogawa ที่แยกในปี พ.ศ. 2541 (Kondo *et al.*, 2001) พบว่า *V. cholerae* O1 El Tor serotype Ogawa ให้ดีเอ็นเอรูปแบบ A (รูปที่ 3.8)

ตารางที่ 3.7 รูปแบบดีเอ็นเอของ *V. cholerae* O1 ที่สุ่มเลือกศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยวิธี AP-PCR

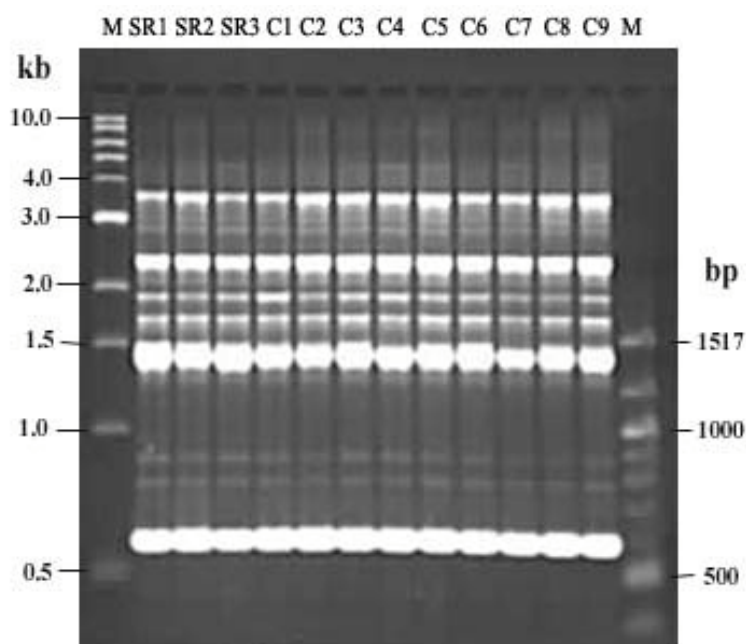
ภาค/จังหวัด	รูปแบบดีเอ็นเอ	
	Primer 2	Primer 4
<u>ใต้</u>		
- ภูเก็ต	A	A
- ปัตตานี	A	A
- นครศรีธรรมราช	A	A
- สงขลา	A และ B*	A และ B*
<u>กลาง</u>		
- กาญจนบุรี	A	A
- ราชบุรี	A	A
- สมุทรสงคราม	A	A
<u>ตะวันออกเฉียงเหนือ</u>		
- สุรินทร์	A	A
<u>เหนือ</u>		
- เชียงใหม่	A	A

หมายเหตุ * พบรูปแบบ B ทั้งใน primer 2 และ primer 4 เฉพาะในพื้นที่จังหวัดสงขลา เขต อ.เทพา 5 isolates อ.จะนะ 5 isolates และอ.นาทวี 3 isolates



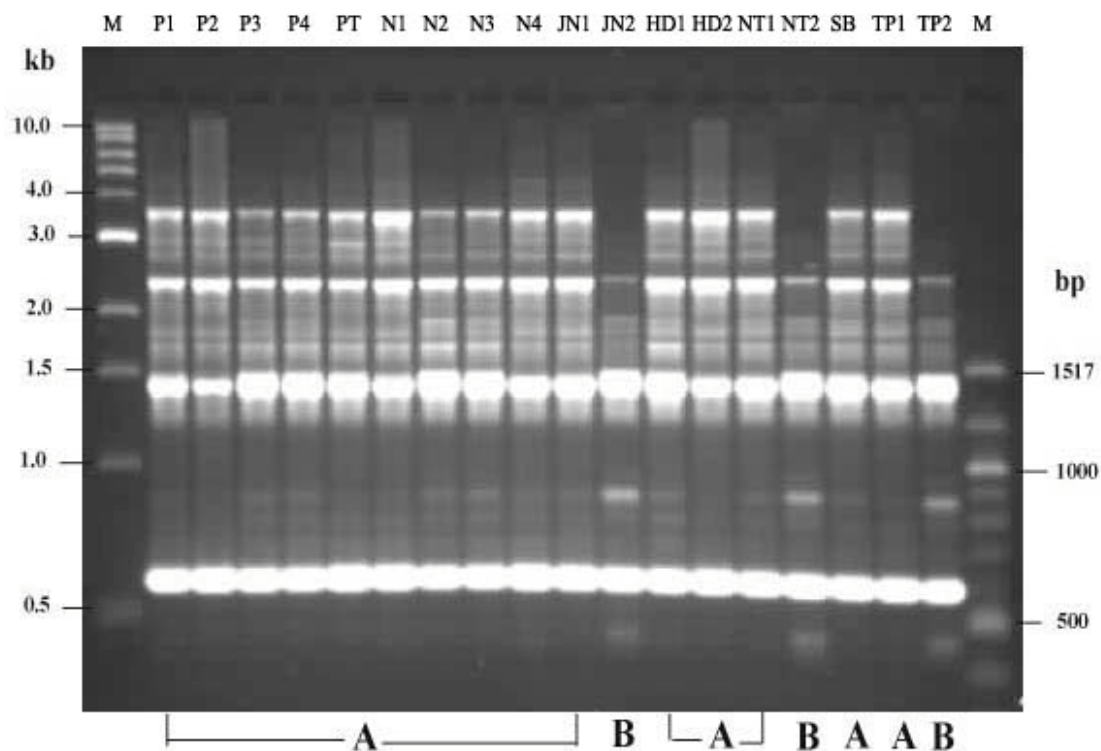
รูปที่ 3.5 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคกลาง โดยใช้ primer 2 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A

M	1 kb DNA ladder
K1-K2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลกาญจนบุรี
R	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชบุรี
S1-S7	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสมุทรสงคราม
M	100 bp DNA ladder



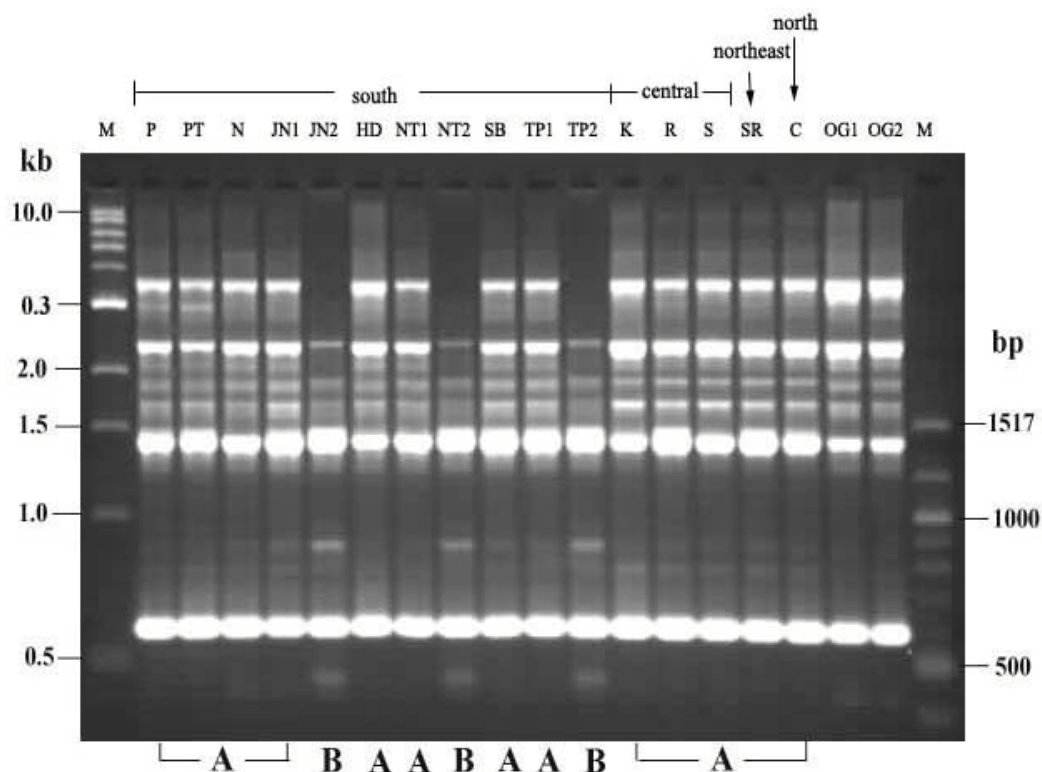
รูปที่ 3.6 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยใช้ primer 2 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A

M	1 kb DNA ladder
SR1–SR3	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสุรินทร์
C1–C9	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงใหม่
M	100 bp DNA ladder



รูปที่ 3.7 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคใต้ โดยใช้ primer 2 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A และ B

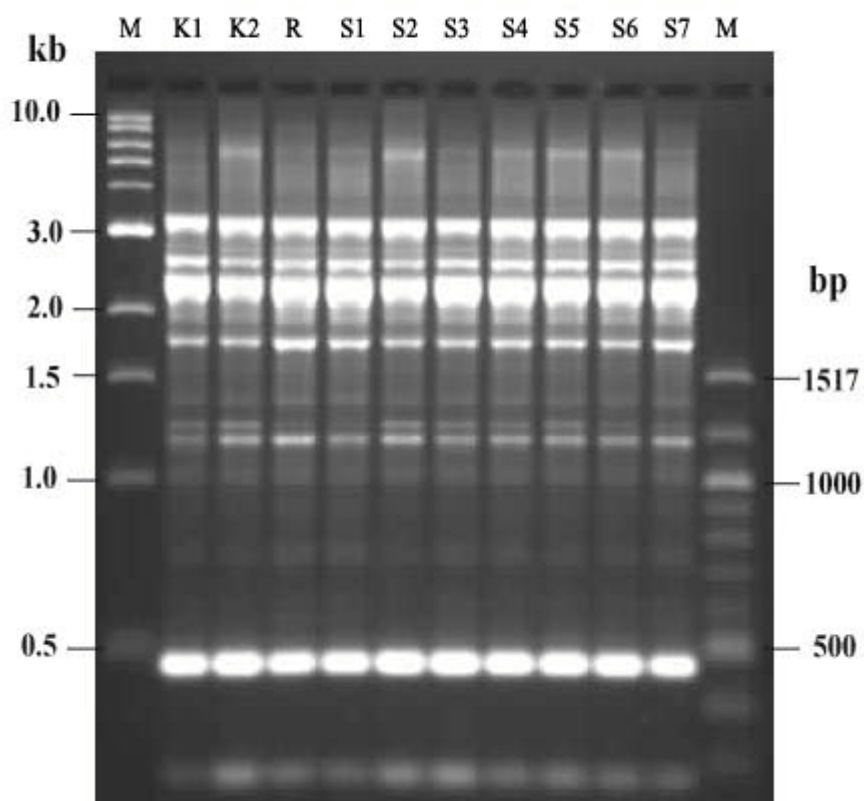
M	1 kb DNA ladder
P1-P4	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลภูเก็ต
PT	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลปัตตานี
N1-N4	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช
JN1-JN2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลจนะ
HD1-HD2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่
NT1-NT2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนาทวี
SB	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสะบ้าย้อย
TP1-TP2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเทพา
M	100 bp DNA ladder



รูปที่ 3.8 เปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 ที่แยกจากภาคต่างๆ ของประเทศไทย โดยใช้ primer 2

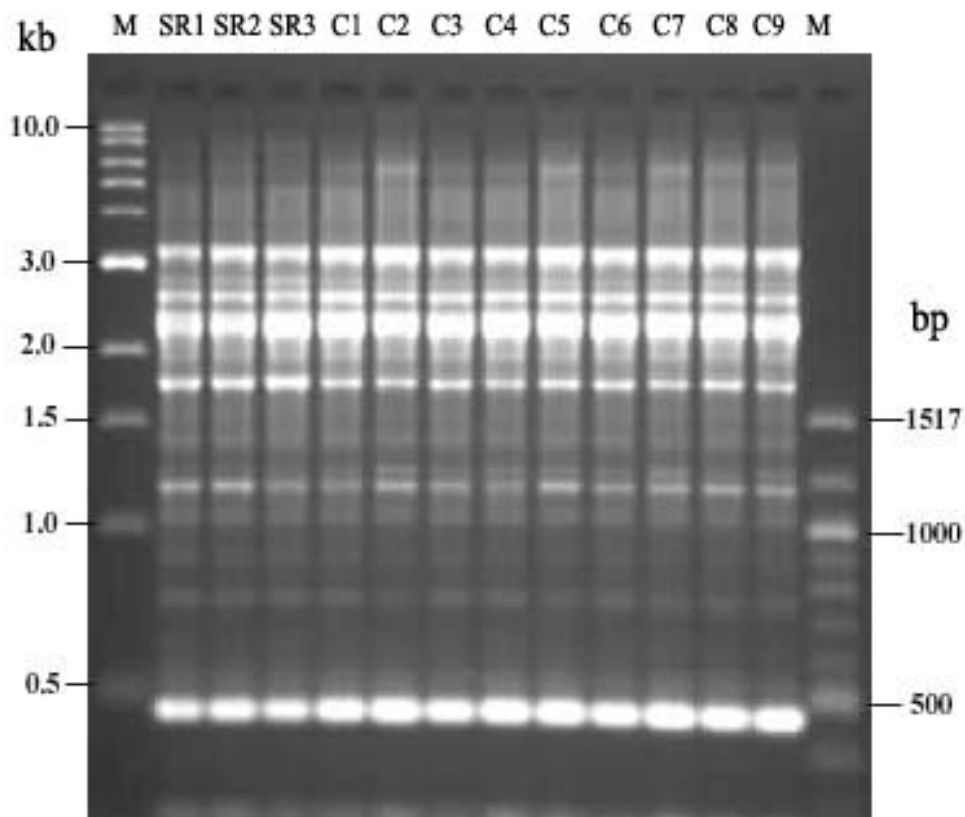
M	1 kb DNA ladder
P	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลภูเก็ต
PT	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลปัตตานี
N	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช
JN1-JN2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลจะนะ
HD	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่
NT1-NT2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนาทวี
SB	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสะบ้าย้อย
TP1-TP2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเทพา
K	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลกาญจนบุรี
R	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชบุรี
S	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสมุทรสงคราม
SR	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสุรินทร์
C	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงใหม่
OG1-OG2	<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa
M	100 bp DNA ladder

การยืนยันความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 ที่แยกจากภาคต่างๆ โดย เปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอ ด้วยวิธี AP-PCR โดยใช้ primer 4 พบว่า ให้ผลที่สอดคล้องกันกับ primer 2 นั่นคือ ได้รูปแบบของดีเอ็นเอ ที่เหมือนกันทั้งในภาคกลาง (รูปที่ 3.9) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ (รูปที่ 3.10) และภาคใต้บางส่วน (รูปที่ 3.11) ซึ่งจัดให้อยู่ในรูปแบบ A นอกจากนี้ยังพบรูปแบบ B จาก primer 4 ในเขตพื้นที่ภาคใต้ จังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลเทพา โรงพยาบาลจะนะ และโรงพยาบาลนาทวี แต่ไม่พบในพื้นที่ภูมิภาคอื่น (รูปที่ 3.12) (ตารางที่ 3.7) ในทำนองเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับ *V. cholerae* O1 El Tor serotype Ogawa พบว่าให้ดีเอ็นเอรูปแบบ A เช่นเดียวกับที่พบใน primer 2 (รูปที่ 3.12)



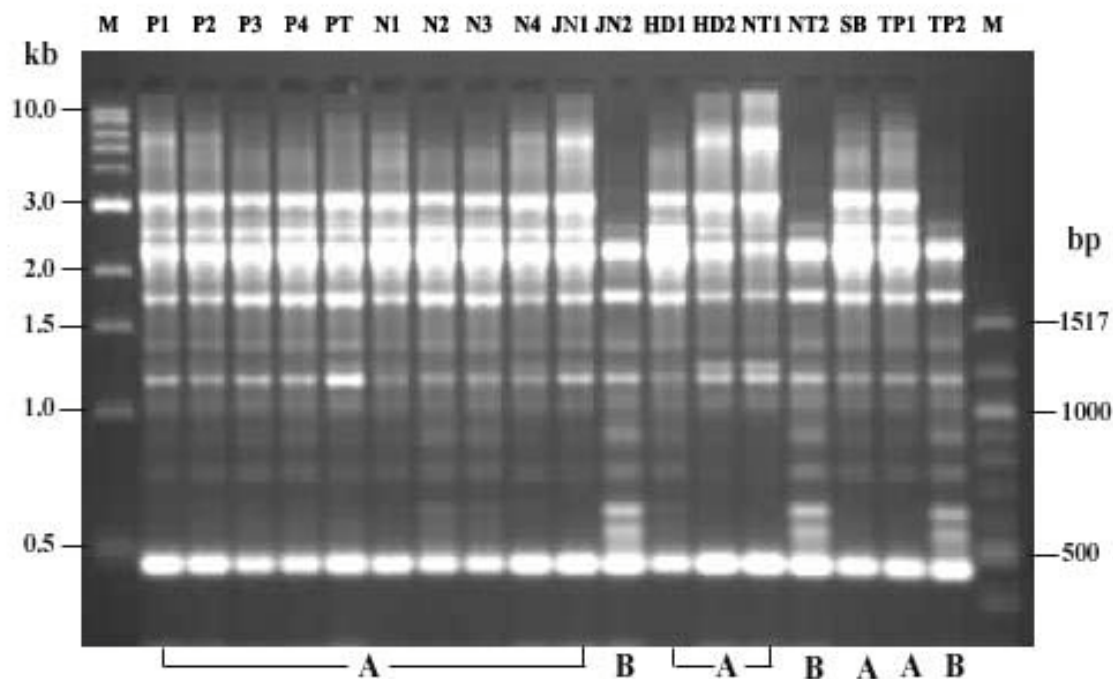
รูปที่ 3.9 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคกลางโดยใช้ primer 4 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A

M	1 kb DNA ladder
K1-K2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลกาญจนบุรี
R	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชบุรี
S1-S7	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสมุทรสงคราม
M	100 bp DNA ladder



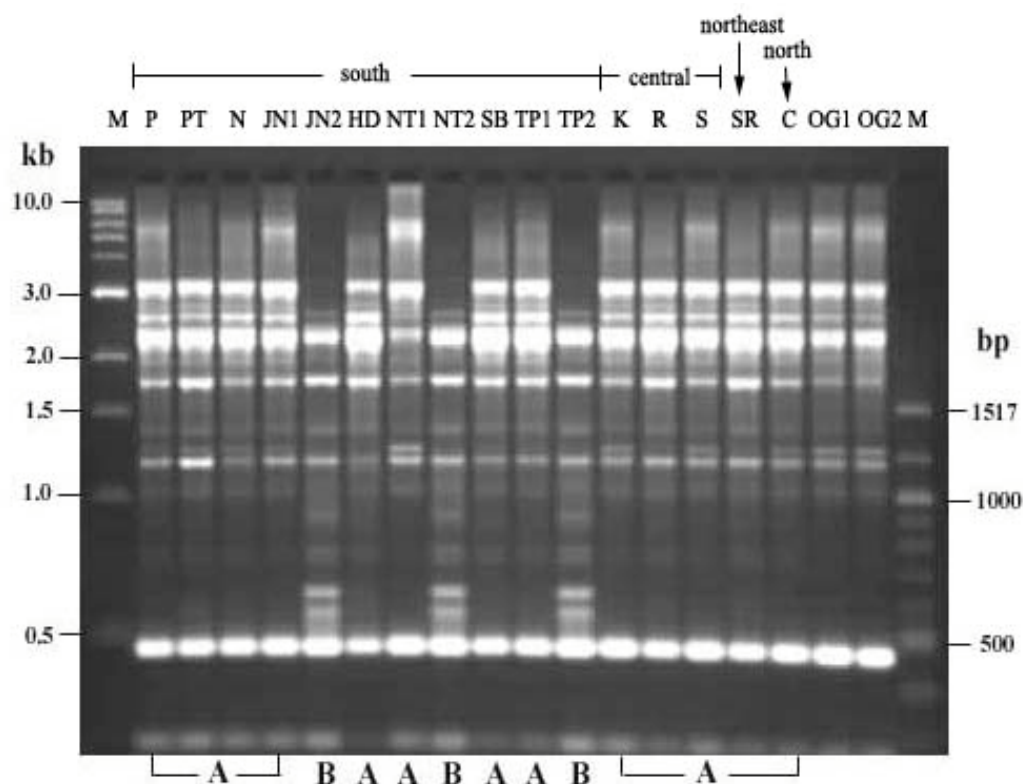
รูปที่ 3.10 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยใช้ primer 4 พบ ดีเอ็นเอรูปแบบ A

M	1 kb DNA ladder
SR1–SR3	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสุรินทร์
C1–C9	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงใหม่
M	100 bp DNA ladder



รูปที่ 3.11 การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 โดยวิธี AP-PCR ในพื้นที่ภาคใต้ โดยใช้ primer 4 พบดีเอ็นเอรูปแบบ A และ B

M	1 kb DNA ladder
P1-P4	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลภูเก็ต
PT	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลปัตตานี
N1-N4	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช
JN1-JN2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลจนะ
HD1-HD2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่
NT1-NT2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนาทวี
SB	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสะบ้าย้อย
TP1-TP2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเทพา
M	100 bp DNA ladder



รูปที่ 3.12 เปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 ที่แยกจากภาคต่างๆ ของประเทศไทย โดยใช้ primer 4

M	1 kb DNA ladder
P	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลภูเก็ต
PT	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลปัตตานี
N	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช
JN1–JN2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลจะนะ
HD	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่
NT1–NT2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนาทวี
SB	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสะบ้าย้อย
TP1–TP2	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเทพา
K	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลกาญจนบุรี
R	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชบุรี
S	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสมุทรสงคราม
SR	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสุรินทร์
C	<i>V. cholerae</i> O1 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงใหม่
OG1–OG2	<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa
M	100 bp DNA ladder

3.7 การทดสอบความไวของ *V. cholerae* ต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี disc diffusion

จากการนำ *V. cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 88 isolates แบ่งเป็น *V. cholerae* O1 82 isolates และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 6 isolates มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยใช้แผ่นยามาตรฐาน 9 ชนิด ได้แก่ ampicillin(AP), chloramphenicol(C), ciprofloxacin(CI), co-trimoxazole(SXT), erythromycin(E), gentamicin(G), nalidixic acid (NA), norfloxacin(NR) และ tetracycline(TE) พบว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 5 isolates (C1-C5) ให้รูปแบบความไวของยาค้ำยกัน ยกเว้น ampicillin ที่ให้ความไวเพียง 2 isolates (C4 และ C5) สำหรับ *V. cholerae* non-O1/non-O139 1 isolates (C6) ให้ผลคือ ต่อยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด ได้แก่ ampicillin, co-trimoxazole และ tetracycline (ตารางที่ 3.8)

ตารางที่ 3.8 ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วย จำนวน 6 isolates

<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	ความไวต่อยาต้านจุลชีพ								
	AP	C	CI	SXT	E	G	NA	NR	TE
C1	R	S	S	S	S	S	S	S	S
C2	R	S	S	S	S	S	S	S	S
C3	I	S	S	S	S	S	S	S	S
C4	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C5	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C6	R	S	S	R	S	S	S	S	R

สำหรับ *V. cholerae* O1 82 isolates ซึ่งแยกเป็น ภาคใต้ 60 isolates ภาคกลาง 10 isolates ภาคเหนือ 9 isolates และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 isolates พบว่าทั้งหมดมีความไวต่อยา chloramphenicol, ciprofloxacin, co-trimoxazole, gentamicin, nalidixic acid, norfloxacin และ tetracycline ส่วนความไว ampicillin และ erythromycin ของเชื้อสามารถแบ่งรูปแบบความไวต่อยาได้ 5 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 ไวต่อยาทั้ง ampicillin และ erythromycin (AP^SE^S) จากการศึกษานี้ไม่พบสายพันธุ์ใดให้ความไวใน แบบที่ 1 แบบที่ 2

พบเชื้อไวต่อยา ampicillin และไวปานกลางต่อ erythromycin (AP^{S^I}) คิดเป็นร้อยละ 39 แบบที่ 3 พบเชื้อไวปานกลางทั้ง ampicillin และ erythromycin (AP^{I^I}) คิดเป็นร้อยละ 50 แบบที่ 4 ให้ผลคือต่อ ampicillin ไวปานกลางต่อ erythromycin (AP^{R^I}) พบร้อยละ 8.5 และ แบบที่ 5 ให้ผลคือต่อ ampicillin และ erythromycin (AP^{R^R}) ร้อยละ 2.4 (ตารางที่ 3.9)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของดีเอ็นเอ ที่ได้จาก AP-PCR ร่วมกับรูปแบบการทดสอบความไวกับยาด้านจุลชีพ ของ *V. cholerae* O1 พบว่า รูปแบบ A สามารถพบแบบแผนความไวต่อยาด้านจุลชีพ แบบที่ 2, 3, 4 และ 5 แต่รูปแบบ B พบได้ในแบบที่ 2, 3 และ 4

ตารางที่ 3.9 รูปแบบยาด้านจุลชีพของ *V. cholerae* O1 ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย

รูปแบบ	แบบแผนความไวต่อยาด้านจุลชีพ									ภูมิภาค				
										ใต้	กลาง	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เหนือ	รวม (ร้อยละ)
1	C ^S	CI ^S	SXT ^S	G ^S	NA ^S	NR ^S	TE ^S	AP ^S	E ^S	0	0	0	0	0
2	"-----"							AP ^S	E ^I	19	6	2	5	32(39.0)
3	"-----"							AP ^I	E ^I	34	4	1	2	41(50.)
4	"-----"							AP ^R	E ^I	6	0	0	1	7(8.5)
5	"-----"							AP ^R	E ^R	1	0	0	1	2(2.4)
รวม									60	10	3	9	82	

