

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

อหิวตตกโรคยังคงเป็นปัญหา ในประเทศที่กำลังพัฒนาหลายประเทศ เชื้อที่เป็นสาเหตุ คือ *Vibrio cholerae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มีแหล่งที่อยู่ในน้ำทะเล น้ำกร่อยและน้ำจืด การติดเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหาร หรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ้าร่างกายสูญเสียน้ำและเกลือแร่มากผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ ในปัจจุบัน *V. cholerae* มีมากกว่า 200 serogroups (Rivera *et al.*, 2001) แต่แบ่งออกเป็น 3 serogroup ใหญ่ๆ คือ O1, O139 และ non-O1/non-O139 เชื้อที่แยกจากผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็น serogroup O1 และ O139 และเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เป็น non-O1/non-O139 *V. cholerae* serogroup O1 แบ่งได้เป็น 2 biotypes คือ Classical และ El Tor แต่ละ biotypes แบ่งได้เป็น 3 serotypes คือ Ogawa, Inaba และ Hikojima (พบน้อยมาก) (Sakajaki, 1970) ในอดีตการระบาดของอหิวตตกโรค พบว่าเกิดจาก *V. cholerae* O1 biotype Classical แต่ตั้งแต่ปี พ.ศ.2504 จนถึงปัจจุบัน พบว่าเป็น *V. cholerae* O1 biotype El Tor และในปี พ.ศ.2535 มีการระบาดของ *V. cholerae* O139 แทรกเข้ามา อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อ serogroup นี้น้อยมาก การก่อโรคของ *V. cholerae* O1 และ O139 เกิดจากความสามารถในการเกาะติดลำไส้เล็กและสร้างสารพิษ ปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค (virulence factor) พบอยู่บนจีน 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ pathogenicity island of *V. cholerae* (VPI) ประกอบด้วยจีนที่สำคัญ คือ *tcp* ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ช่วยในการเกาะติดกับผนังลำไส้และเป็นที่ยึดของ bacteriophage (Herrington *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังมีจีน *acf*, *toxT* ฯลฯ (Karaolis *et al.*, 1995) กลุ่มที่ 2 คือ cholera toxin (CTX) genetic element (Kaper *et al.*, 1994; Waldor and Mekalanos, 1996a) ประกอบด้วยจีน *ctx* ควบคุมการสร้าง cholera toxin ทำให้เกิดอาการท้องร่วง นอกจากนี้ยังมีจีน *zot*, *ace* ฯลฯ กลุ่มสุดท้ายคือจีน RTX toxin (Lin *et al.*, 1999) ซึ่งกลไกการก่อโรคนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด จาก

การศึกษาพบ VPI และ CTX genetic element เฉพาะใน *V. cholerae* O1 และ O139 สายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic strain) เท่านั้นและยังพบอยู่บนโครโมโซมของ bacteriophage ทำให้เชื่อได้ว่า bacteriophage เป็นพาหะถ่ายทอดจिनเหล่านี้จาก *V. cholerae* สายพันธุ์ก่อโรค ไปยังสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain)

เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 (Sharma *et al.*, 1998a) โดยที่กลไกในการก่อโรคยังไม่แน่ชัด แต่พบว่าเชื้อสามารถสร้าง El Tor like hemolysin (hlyA) (Yamamoto *et al.*, 1984), heat stable enterotoxin (stn/sto) (Arita *et al.*, 1986; Guglielmetti *et al.*, 1994) และ hemagglutinin (Dutta-Roy *et al.*, 1986) และมีรายงานว่า *V. cholerae* non-O1/non-O139 สามารถเปลี่ยนเป็น serogroup O1 โดยการเกิด spontaneous mutation ของจिनที่กำหนดการสร้าง O antigen โดยมีปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวเสริม (Karaolis *et al.*, 1995) หลังจากนั้นทำให้เชื่อสามารถรับการถ่ายทอด VPI และ CTX genetic element จาก bacteriophage และก่อให้เกิดโรคได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *V. cholerae* O139 เกิดจากการถ่ายทอดจिन (horizontal transfer) ระหว่าง *V. cholerae* serogroup O1 และ non-O1 (Bik *et al.*, 1995) และยังพบว่าเชื้อ *V. cholerae* O1 ที่แยกจากผู้ป่วยมีการเปลี่ยนแปลง serotype จาก Ogawa เป็น Inaba สลับกันไปเป็นช่วงๆ (Kondo *et al.*, 2001) ซึ่งพบว่าสาเหตุเกิดจากเชื้อหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่แยกในช่วงเวลาที่ต่างกัน มีความไวของยาต่างกัน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาระบาดวิทยาของ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม เพื่อให้ทราบถึงกลไกการก่อโรค และเพื่อหาความสัมพันธ์ ระหว่าง serogroup, serotype และความไวต่อยาต่อยาปฏิชีวนะ

## 1.2 บทตรวจเอกสาร

### 1.2.1 Vibrionaceae

ลักษณะทั่วไปของเชื้อในวงศ์ (family) Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งตรงหรือแท่งโค้ง (straight or curved rod) เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ขั้ว (polar) ไม่สร้างสปอร์ เจริญเติบโตได้ทั้งในบรรยากาศที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วโลกในธรรมชาติทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เชื้อในวงศ์มีสกุล (genus) ที่สำคัญ ได้แก่ *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium* และ *Vibrio* คุณสมบัติหลายประการของ Vibrionaceae จะคล้ายกับ Enterobacteriaceae แต่ต่างกันที่เชื้อในวงศ์ Vibrionaceae ให้ปฏิกิริยา oxidase เป็นบวก เชื้อในสกุล *Vibrio* สามารถสลายไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ ทนความเป็นด่างได้สูงถึง pH 9.5 ทนกรดได้น้อย ถ้า pH ต่ำกว่า 6.0 เชื้อจะตาย สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสเกิดกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ (ยกเว้น *V. furnissii* และ *V. damsela* บางสายพันธุ์) ไวต่อสาร 2,4-diamino-6,7-di-isopropylteridine (O/129) ซึ่งเป็น Vibriostatic agent โขเคียมไอออนกระตุ้นการเจริญเติบโตในทุกสายพันธุ์ พบได้ในน้ำที่มีความเค็มในระดับต่างๆ พบได้ง่ายในทะเล ในสิ่งแวดล้อมบริเวณปากน้ำ นอกจากนี้ยังพบที่ผิวและในลำไส้ของสัตว์ทะเล บางสปีชีส์พบได้ในน้ำจืด เชื้อสกุล *Vibrio* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ หลายสปีชีส์มีความสำคัญทางการแพทย์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งภายในลำไส้ (intestinal tract) และ/หรือ ภายนอกลำไส้ (extraintestinal tract) สปีชีส์ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V. cincinnatiensis*, *V. carchariae*, *V. metschnikovii* และ *V. damsela* (Farmer, 1991)

### 1.2.2 *Vibrio cholerae*

#### 1.2.2.1 ลักษณะทั่วไป

*Vibrio cholerae* เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่งสั้น ปลายโค้งเล็กน้อย ขนาดยาว 1.5 – 3.0 ไมโครเมตร กว้าง 0.4 – 0.6 ไมโครเมตร (Wolin, 1973) ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลัม 1 เส้น ที่อยู่ตรงปลาย (polar flagellum) มีความยาว 1.5 – 2.0

ไมโครเมตร หนา 24-30 นาโนเมตร (Lee, 1990) ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิ 16-42 องศาเซลเซียส แต่ที่ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุด เจริญได้ดีในสถานะค่า pH 6.4–9.6 (Wolin, 1973) ให้ผลบวกต่อการทดสอบ oxidase, gelatin, indole, lysine และ ornithine decarboxylase ส่วน arginine dihydrolase ให้ผลเป็นลบ (Benenson, 1991) เชื้อสามารถหมักย่อย carbohydrate ได้หลายชนิด ได้แก่ dextrose, galactose, maltose, sucrose และ mannitol เกิดกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ สามารถทนต่อ bile salt, bismuth-sulfide และ tellurite เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ neuraminidase ซึ่งไฮโดรไลซ์ N-acetylneuraminic acid, sialic acid และ mucin สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้โคโลนีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar

### 1.2.2.2 การจัดจำแนก

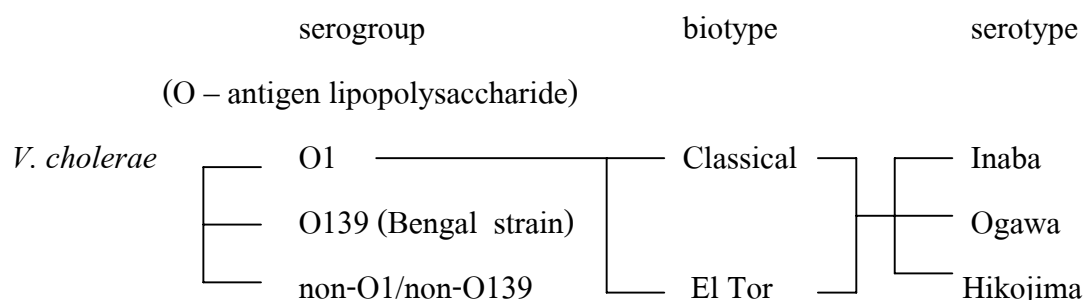
การแบ่งชนิดของ *V. cholerae* อาศัยโครงสร้างของแอนติเจน (antigenic structure) ที่มีทั้ง O- และ H- antigen (Ag) ซึ่ง O-Ag คือ somatic antigen เป็นพวก lipopolysaccharide และ polysaccharide สามารถทนต่อความร้อนได้ดี ส่วน H-Ag หรือ flagella antigen ไม่ทนความร้อน จากความแตกต่างของโครงสร้าง O-Ag สามารถจัดแบ่ง *V. cholerae* ได้มากกว่า 200 serogroup (Rivera *et al.*, 2001) แต่โดยทั่วไปมักแบ่งเป็น 3 serogroup ใหญ่ๆ ได้แก่ O1, O139 และ non-O1/non-O139 สำหรับ serogroup O1 แบ่งย่อยได้ 2 biotype คือ Classical และ El Tor โดยอาศัยคุณสมบัติการทดสอบทางชีววิทยา (ตาราง 1.1) สำหรับ biotype Classical และ El Tor ยังแบ่งย่อยเป็น serotype คือ Ogawa, Inaba และ Hikojima (แผนภูมิ 1.1) ทั้ง 3 serotype จะมี antigenic determinant หรือตำแหน่งย่อยของแอนติเจนร่วมกัน คือ A แอนติเจน แต่มีแอนติเจนที่จำเพาะอีก 2 ชนิด ได้แก่ B และ C โดย Inaba จะมีแอนติเจน C ส่วน Ogawa มีทั้งแอนติเจน B และ C แต่สัดส่วนของแอนติเจน B มีมากกว่า C และ Hikojima จะพบแอนติเจนทั้งสามชนิด (Kaper *et al.*, 1995) จากการศึกษา *V. cholerae* serogroup O139 พบว่าคุณสมบัติส่วนใหญ่มีความคล้ายกับ serogroup O1 biotype El Tor ยกเว้น O139 สามารถสร้างแคปซูลได้ (Albert *et al.*, 1997)

**ตาราง 1.1** ความแตกต่างระหว่าง biotype Classical และ El Tor (Lee, 1990)

การทดสอบ	Classical	El Tor
การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่	-	+
การสลายของเม็ดเลือดแดงเกาะในหลอดทดลอง	-	+
การทดสอบ Voges-Proskauer	-	+
ความไวต่อโพลีเมกซิน บี (50 ยูนิต)	S	R
ความไวต่อไวรัสของแบคทีเรีย (phage IV)	S	R

S = ไวต่อการทดสอบ R = คีต่อการทดสอบ

**แผนภูมิ 1.1** การจำแนก *V. cholerae*



### 1.2.2.3 แหล่งที่อยู่อาศัย

*V. cholerae* พบแพร่กระจายทั่วไปในแหล่งน้ำ ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย บริเวณปากแม่น้ำ (Colwell *et al.*, 1981; Singleton *et al.*, 1982; Caldini *et al.*, 1997) หรือ แถบชายฝั่งทะเล (Colwell *et al.*, 1977) ส่วนใหญ่มักพบ *V. cholerae* non-O1/non-O139 (Kaper *et al.*, 1979; Morris, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบในอาหารทะเล หรือสัตว์ทะเลที่มีเปลือกหุ้ม (Twedt *et al.*, 1981; DePaola *et al.*, 1983; Dalsgaard *et al.*, 1995a) หรือแม้แต่ในไข่เต่า (Lin *et al.*, 2001) *V. cholerae* non-O1 มีโอกาสมีชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า *V. cholerae* O1 (Chaudhuri *et al.*, 1992) แต่ในบริเวณพื้นที่เขตระบาดของอหิวาตกโรค มีโอกาสพบ *V. cholerae* O1 หรือ O139 ได้สูง เนื่องจากอาจเกิด

การปนเปื้อนเชื้อจากอุจจาระผู้ป่วยลงสู่แหล่งน้ำ (Ghosh *et al.*, 1994) โดยเฉพาะในแถบประเทศกำลังพัฒนาที่มีประชากรอาศัยอยู่หนาแน่น และมีระบบทางด้านสาธารณสุขไม่ดีพอ แต่ในสภาวะปกติโอกาสการตรวจพบ *V. cholerae* O1 หรือ O139 ในสิ่งแวดล้อมเป็นไปได้ยาก ทั้งนี้เพราะบางสภาวะอาจไม่เหมาะต่อการดำรงชีวิตอยู่ของเชื้อ โดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระดับความเป็นกรด ค่า อุณหภูมิ ความเค็ม ความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหาร เป็นต้น (DePaola *et al.*, 1983; Huq *et al.*, 1984; Roszak and Colwell, 1987) อย่างไรก็ตามมีรายงานหลายฉบับบ่งชี้ว่า เชื้อมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด โดยปรับลดขนาดของเซลล์ เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ลดการทำงานภายในเซลล์ เรียกสภาวะดังกล่าวว่าระยะ viable but nonculturable (VBNC) (Xu *et al.*, 1982; Brayton and Colwell, 1987a; Colwell and Huq, 1994) อีกทั้งยังทำให้ยากต่อการตรวจพบโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อธรรมดา แต่สามารถตรวจหาเชื้อโดยตรงด้วยวิธี direct viable count fluorescent antibody (Brayton *et al.*, 1987b) จากการศึกษาโดยนำเชื้อ *V. cholerae* ไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอาหารค่อนข้างจำกัด พบว่าเชื้อมีจำนวนลดลง เพราะการปรับตัวเข้าสู่ระยะ VBNC แต่เมื่อปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 30 องศาเซลเซียส เชื้อกลับเจริญเติบโตมีจำนวนเพิ่มขึ้น (Ravel *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ *V. cholerae* ยังเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในแหล่งน้ำ ได้แก่ พืชน้ำ (Islam *et al.*, 1990) แพลงก์ตอนทั้งชนิด แพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) และแพลงก์ตอนสัตว์ (zooplankton) (Huq *et al.*, 1983; Venkateswaran *et al.*, 1989; Tamplin *et al.*, 1990) มีรายงานว่า copepod ซึ่งเป็นแพลงก์ตอนสัตว์เป็นแหล่งสะสม *V. cholerae* มากที่สุด สามารถพบเชื้อได้บริเวณปาก (oval) และรังไข่ (egg sac) (Huq *et al.*, 1983) จากการมองผ่านด้วยกล้อง electron microscope พบว่า copepod 1 ตัวมีปริมาณเชื้อสูงถึง  $10^4$ - $10^5$  ตัว (Cowell and Huq, 1994) นอกจากนี้อาจพบได้ในส่วนของทางเดินอาหาร (Sochard *et al.*, 1979) *V. cholerae* สามารถแทรกเข้าไปอยู่ใต้ไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสัตว์ทะเล ไคตินยังช่วยป้องกันเชื้อในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด เช่นในระบบทางเดินอาหารของคน และ *V. cholerae* สามารถสร้าง chitinase ช่วยย่อยสลายไคตินเพื่อเกาะติดกับระบบทางเดินอาหาร (Nalin *et al.*, 1979) นอกจากนี้พบว่า copepod ช่วยป้องกัน *V. cholerae* ไม่ให้ถูกฆ่าด้วยสารประเภทคลอรีน (Chowdhury *et al.*, 1997a) มีรายงานว่าใน

ช่วงฤดูร้อนแต่ละปีแถบประเทศบังคลาเทศ มักมีปรากฏการณ์การเพิ่มจำนวน (boom) ของแพลงก์ตอนพืช ตามด้วยการเพิ่มปริมาณของแพลงก์ตอนสัตว์ และนำไปสู่การระบาดของอหิวาตกโรคเสมอ (Huq *et al.*, 1984; Huq *et al.*, 1995)

#### 1.2.2.4 อหิวาตกโรค (Cholera)

*V. cholerae* เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรคซึ่งส่วนใหญ่เกิดจาก serogroup O1 และ O139 การติดต่อเกิดจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำ ที่ปนเปื้อนเชื้อ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง

##### 1.2.2.4.1 ประวัติ

*V. cholerae* ถูกรายงานครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1854 ที่เมืองฟลอเรนซ์ (Florence) ประเทศอิตาลี โดย Pacini ได้ตรวจพบแบคทีเรีย รูปร่างโค้งงอจำนวนมากในลำไส้ผู้ป่วย แล้วให้ชื่อว่า *Vibrio cholerae* (Lee, 1990) แต่การค้นพบครั้งนั้นยังไม่เป็นที่ยอมรับจนกระทั่ง Robert Koch ได้ศึกษาผู้ป่วยชาวอียิปต์ ในปี ค.ศ. 1883 และตรวจพบเชื้อแบคทีเรียรูปร่างคล้ายตัวอักษร comma และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ จึงตั้งชื่อว่า Kommabazillen แต่ต่อมาเปลี่ยนเป็น *Vibrio comma* และใช้ชื่อดังกล่าวมาหลายสิบปี จนกระทั่งขณะทำงานในกลุ่มของ Pacini ได้เปลี่ยนชื่ออีกครั้งเป็น *Vibrio cholerae* (Kaper *et al.*, 1995) จากประวัติดั้งเดิม พบว่าโรคนี้นี้มีมาตั้งแต่ก่อนปี ค.ศ. 1800 หรือก่อนศตวรรษที่ 19 (Farmer, 1991) สันนิษฐานว่าจุดเริ่มต้นมาจากแม่น้ำคงคา (Ganges river) และแม่น้ำพรหมบุตร (Brahmaputra river) ในประเทศอินเดีย (Attridge and Rowley, 1990) ส่วนความหมายของ cholera ได้รับอิทธิพลมาจากภาษากรีก หมายถึง ‘bilious’ แปลว่า เกี่ยวกับน้ำดี ขณะที่ Hebrew ให้ความหมายว่า ‘bad disease’ (Kaper *et al.*, 1995) การระบาดใหญ่ทั่วโลกพบครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1817 จนกระทั่ง ค.ศ. 1923 รวม 6 ครั้ง มีสาเหตุจาก *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotype Classical (Benenson, 1991) ในปี ค.ศ. 1906 Gotschlich ได้แยกเชื้อ *V. cholerae* จากนักแสวงบุญ บริเวณค่ายกักกันเมือง El Tor แหลมไซไน ประเทศอียิปต์ เชื่อดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ antiserum O1 และมีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ซึ่งต่างจาก biotype Classical จึงเรียกเชื้อที่แยกได้ว่า ‘*V. eltor*’ (Lee, 1990) ในปี ค.ศ. 1961 เกิดโรคระบาดคล้ายอหิวาตกโรค ที่เกาะซีลีบี (Celebes) ซึ่งเป็นชื่อดั้งเดิมของเกาะซูลาเวซี (Sulawesi) ประเทศอินโดนีเซียแล้วเรียกชื่อ

โรคในขณะนั้นว่า ‘El Tor disease’ หรือ ‘paracholera’ เพราะมีสาเหตุจาก *V. cholerae* serogroup O1 biotype El Tor การระบาดได้แพร่กระจายไปยังพื้นที่ข้างเคียงอย่างรวดเร็ว จึงจัดให้เป็นการระบาดใหญ่ทั่วโลกครั้งที่ 7 ของอหิวาตกโรค (Benenson, 1991) ปลายปี ค.ศ.1992 เกิดโรครระบาดใหญ่คล้ายอหิวาตกโรคอีกครั้งในทางตอนใต้และตะวันออกของ อินเดีย รวมทั้งบังกลาเทศ (Albert *et al.*, 1993; Ramamurthy *et al.*, 1993a; Shimada *et al.*, 1993; Swerdlow and Ries, 1993) ลักษณะเชื้อคล้ายกับ *V. cholerae* serogroup O1 biotype El Tor (Hall *et al.*, 1993) แต่ไม่ตกตะกอนกับ antiserum ทั้ง 138 serogroup ที่มีอยู่เดิม จึงจัดให้เป็น *V. cholerae* สายพันธุ์ใหม่ serogroup O139 หรือ *V. cholerae* Bengal และถือ เป็นสาเหตุการระบาดใหญ่ของอหิวาตกโรค ครั้งที่ 8 จำนวนครั้งและระยะเวลาของการ ระบาดใหญ่ทั่วโลก (pandemic) แสดงในตารางที่ 1.2

ตาราง 1.2 การระบาดใหญ่ทั่วโลกของอหิวาตกโรค (Kaper *et al.*, 1995)

Pandemic	Pollitzer, 1959	Wilson, 1984	Recent
1	1817-1823	1817-1823	
2	1829-1851	1826-1837	
3	1852-1859	1846-1862	
4	1863-1879	1864-1875	
5	1881-1896	1883-1896	
6	1899-1923/5	1899-1923	
7			1961-present
8			1992-present



สำหรับประเทศไทยตามหลักฐาน พบว่า เริ่มมีรายงานการระบาดของอหิวาตกโรคตั้งแต่ก่อนปี พ.ศ. 2360 และมีรายงานเรื่อยมาทุกปี จนถึง พ.ศ. 2492 โดยมีเชื้อ *V. cholerae* biotype Classical เป็นสาเหตุ (อรษา สุตเชียรกุล, 2541) จากบันทึกหลักฐานทางสถิติจำนวนป่วย-ตาย ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2461 พบว่าระหว่างปี พ.ศ. 2461-2463 พบอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 71.69 (ประเสริฐ ทองเจริญ, 2516) แต่ในช่วงปี พ.ศ. 2493 – 2500 ไม่มีรายงานอหิวาตกโรคในประเทศไทย และเริ่มมีการระบาดอีกครั้งในปี พ.ศ. 2501-2502 สำหรับ *V. cholerae* biotype El Tor พบครั้งแรกใน พ.ศ. 2503 ที่จังหวัดอุบลราชธานี โดย Dr. Felsenfeld ต่อมาในปี พ.ศ. 2506 *V. cholerae* biotype El Tor เป็นสาเหตุการระบาดที่จังหวัดนครศรีธรรมราช และปี พ.ศ. 2516 พบได้ในเขตกรุงเทพฯ แล้วแพร่ไปยังพื้นที่ต่างๆ รวม 44 จังหวัด ซึ่งจัดเป็นการระบาดของ *V. cholerae* biotype El Tor อย่างเป็นทางการในประเทศไทย และเริ่มรายงานในองค์การอนามัยโลกทราบ (อรษา สุตเชียรกุล, 2541) แต่ในปี พ.ศ. 2532 กองระบาดวิทยากระทรวงสาธารณสุขได้มีนโยบายยกเลิกการรายงานอหิวาตกโรคต่อองค์การอนามัยโลก และเปลี่ยนชื่อเรียกอหิวาตกโรค เป็นโรคอุจจาระร่วงอย่างแรง (severe diarrhea) เนื่องจากเกรงว่าจะมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจอุตสาหกรรมอาหารส่งออก และการท่องเที่ยวของประเทศ (วิชัย โชควิวัฒน์, 2541; ธวัช จายนียโยธิน และคณะ, 2542)

#### 1.2.2.4.2 ระบาดวิทยา

จากการรวบรวมข้อมูลการระบาดของ *V. cholerae* โดย Benenson (1991) พบว่าการระบาดใหญ่ของอหิวาตกโรคทุกครั้งเริ่มในประเทศอินเดีย ยกเว้นการระบาดใหญ่ครั้งที่ 7 โดยครั้งแรกโรคได้แพร่ระบาดไปยังประเทศอื่นๆ ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น ประเทศแถบชายฝั่งเมดิเตอร์เรเนียน และเกาะแซนชิบาร์ นอกชายฝั่งด้านตะวันออกของแอฟริกา ปี ค.ศ. 1829 พบการระบาดใหญ่ครั้งที่ 2 โดยโรคได้แพร่มายัง เปอร์เซีย รัสเซีย โปแลนด์ ออสเตรีย รัสเซีย และไอร์แลนด์ ในปี ค.ศ. 1832 พบรายงานในแคนาดา ซึ่งครั้งนั้นการระบาดเกิดจากผู้อพยพที่เดินทางมาจากไอร์แลนด์ และยังพบ ผู้ป่วยได้ในฟิลาเดเฟีย ซึ่งเป็นเมืองท่าที่สำคัญทางด้านตะวันออกเฉียงใต้ของรัฐเพนซิลเวเนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา นอกจากนี้ยังปรากฏในเม็กซิโก คิวบา นิการากัว และกัวเตมาลา ซึ่งเป็นประเทศในแถบทวีปอเมริกากลาง ปี ค.ศ. 1840 พบได้ในจีน รวมทั้ง

ประเทศแถบตะวันตกของทวีปเอเชีย และยุโรป แล้วมายังสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1848 ทั้งในนครนิวยอร์ก และนิวยอร์กลีตันส์ และระหว่างปี ค.ศ. 1849-1850 พบการระบาดทั่วประเทศสหรัฐอเมริกา

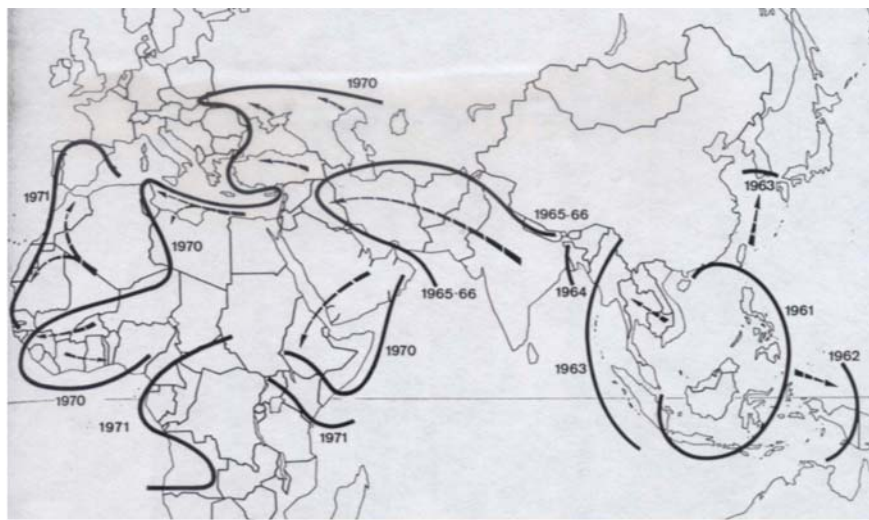
การระบาดใหญ่ครั้งที่ 3 เริ่มในปี ค.ศ. 1852 โรคได้ระบาดไปยังประเทศเปอร์เซีย และเมโสโปเตเมีย ขณะนั้นเป็นอาณาจักรโบราณในเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ ปัจจุบันเป็นส่วนหนึ่งของสาธารณรัฐอิรัก รวมทั้งทางตอนเหนือของทวีปยุโรปทั้งหมด โดยเฉพาะอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1854 พบได้ในสหรัฐอเมริกา แล้ววนกลับมายังจีนและญี่ปุ่นอีกครั้ง

การระบาดใหญ่ครั้งที่ 4 พบในปี ค.ศ. 1863 จนกระทั่ง ค.ศ. 1873 และ 1875 โรคแพร่มาทางตอนใต้ของฝรั่งเศส อิตาลี คาบสมุทรอาราเบีย ในเอเชียตะวันตก และอียิปต์ และปี ค.ศ. 1865 – 1867 พบรายงานโรคจากสหรัฐอเมริกาเพราะการเคลื่อนพลของเหล่าทหารในสงครามกลางเมือง (Civil War) อย่างไรก็ตามอัตราการตายของผู้ป่วยพบต่ำกว่าร้อยละ 5 ซึ่งต่างจากปี ค.ศ. 1833 มีรายงานอัตราการตายร้อยละ 5-15 หรือปี ค.ศ. 1849 พบร้อยละ 10 ซึ่งประมาณว่า ในปี ค.ศ. 1866 พบผู้ป่วยตายด้วยอหิวาตกโรคในสหรัฐอเมริกา ไม่ต่ำกว่า 50,000 คน

การระบาดใหญ่ครั้งที่ 5 เริ่มในปี ค.ศ. 1881 ซึ่งในปี ค.ศ. 1883 Robert Koch ได้รายงานการค้นพบเชื้อสาเหตุของอหิวาตกโรค ถึงแม้จะพบผู้ป่วยในนครนิวยอร์ก แต่ครั้งนั้นไม่ปรากฏการระบาดมากนัก เพราะเริ่มมีการเรียนรู้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย และควบคุมโรคได้ อย่างไรก็ตามยังมีผลกระทบต่อประเทศในแถบอเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียง สำหรับการระบาดใหญ่ครั้งที่ 6 โรคได้แพร่ระบาดมายังประเทศแถบยุโรปตะวันออกจนกระทั่ง ปี ค.ศ. 1923

การระบาดใหญ่ครั้งที่ 7 เริ่มในปี ค.ศ. 1961 มีจุดกำเนิดจากเกาะซูลาเวซี (Sulawesi) ในอินโดนีเซีย โรคแพร่มายังแคว้นซาราวัก ของมาเลเซีย มาเก๊าของฮ่องกง และฟิลิปปินส์ ในปี ค.ศ. 1963 พบในทางตอนเหนือของเกาหลี ประเทศแถบตะวันออกกลาง อิหร่าน ในปี ค.ศ. 1964 และอิรัก ในปี ค.ศ. 1965 และพบการระบาดไปยังแถบตะวันตกและตะวันออกของยุโรป ระหว่างปี ค.ศ. 1970-1971 พบแพร่ในรัสเซีย และทางเหนือของแอฟริกา จากประเทศเคนยา ไปยังชายฝั่งตะวันตกของแอฟริกาเหนือ

ทางใต้ของไนจีเรีย และคาเมรูน ปี ค.ศ. 1971 พบได้ในสเปน และโปรตุเกส (Wolin, 1973) ในปี ค.ศ. 1991 – 1993 เกิดการระบาดอย่างหนักในแถบประเทศลาตินอเมริกา ได้แก่ เปรู เม็กซิโก เอกวาดอร์ บราซิล โคลัมเบีย โบลิเวีย และปานามา เป็นต้น (Tauxe *et al.*, 1994)

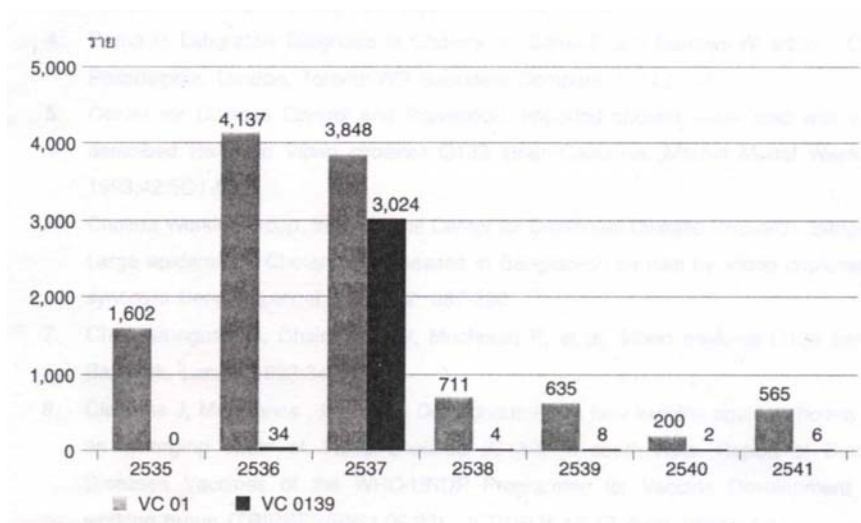


รูปที่ 1.1 การระบาดทั่วโลกครั้งที่ 7 ของ *V. cholerae* (Wolin, 1973)

การระบาดใหญ่ครั้งที่ 8 ในปลายปี ค.ศ. 1992 พบรายงานการระบาดของ อหิวาตกโรคที่เกิดจาก serogroup O139 ในเมืองมาทราส (Madras) และส่วนอื่นๆ ของ อินเดียและบังกลาเทศ (Albert *et al.*, 1993; Ramamurthy *et al.*, 1993a) การระบาดต่อเนื่องมายังปี ค.ศ. 1993 แล้วแพร่ไปยังประเทศใกล้เคียง ได้แก่ ปากีสถาน เนปาล จีน ไทย คาซัคสถาน อาฟกานิสถาน และมาเลเซีย (Chongsanguan *et al.*, 1993; Swerdlow and Ries, 1993) และที่สำคัญมีรายงานการระบาดในอังกฤษและรัฐเด็ว (Faruque *et al.*, 1998a) และจากการเฝ้าระวังโรคในระหว่างปี ค.ศ. 1996-1997 ในอินเดียและบังกลาเทศ สามารถพบการระบาดทั้ง *V. cholerae* O1 El Tor และ O139 ร่วมกัน (Mitra *et al.*, 1996; Faruque *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 1998)

ปี ค.ศ. 2000 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้รับรายงานการระบาดของ อหิวาตกโรค ในพื้นที่ต่างๆ รวม 56 ประเทศ พบผู้ป่วย 137,071 ราย เสียชีวิต 4,908 ราย

และร้อยละ 87 เป็น ผู้ป่วยในประเทศแถบแอฟริกา สำหรับประเทศในเอเชียพบผู้ป่วย 11,246 ราย ซึ่งลดลง 3 เท่า เมื่อเทียบกับ ปี ค.ศ. 1999 (World Health Organization, 2001) แต่ไม่พบการรายงานอหิวาตกโรคจากประเทศไทย ทั้งที่สามารถตรวจพบผู้ป่วยได้เช่นกัน ทั้งนี้เพราะทางกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุขได้เปลี่ยนชื่ออหิวาตกโรคในประเทศไทย เป็นโรคอุจจาระร่วงอย่างแรง (severe diarrhea) ซึ่งงดการรายงานอหิวาตกโรคมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และจากสรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ปี พ.ศ. 2531 พบผู้ป่วยรวมทั้งสิ้น 2,248 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 4.1 ต่อประชากรแสนคน ลดลงจากปี พ.ศ. 2530 ซึ่งอัตราป่วยสูงถึง 9.9 ต่อประชากรแสนคน มีผู้เสียชีวิต 25 ราย อัตราการเกิดโรครายภาค พบว่า ภาคกลางมีอัตราป่วยสูงที่สุด คิดเป็น 5.8 ต่อประชากรแสนคน รองลงมาเป็นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และภาคเหนือ ตามลำดับ (กองระบาดวิทยา, 2531) การตรวจยืนยันเชื้อ *V. cholerae* O1 และ O139 จากพื้นที่ต่างๆ โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2535-2541 (รูปที่ 1.2) แสดงให้เห็นว่ายังสามารถพบเชื้อได้ทุกปี โดยเฉพาะในปี พ.ศ. 2536 พบผู้ป่วยสูงถึง 4,137 ราย และในปี พ.ศ. 2537 พบ 3,848 ราย และในปีเดียวกันยังตรวจพบ *V. cholerae* O139 3,024 ราย สถานการณ์ของ *V. cholerae* O139 ทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ดำเนินการเฝ้าระวังมาตั้งแต่เดือน พฤษภาคม – ธันวาคม พ.ศ. 2536 พบ *V. cholerae* non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยอุจจาระร่วง จำนวน 801 ราย เป็นเชื้อ *V. cholerae* O139 143 ราย หรือร้อยละ 16.85 ผู้ป่วยรายแรกถูกรายงานในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2536 และในปี พ.ศ. 2537 มีผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 43.3 (กรองแก้ว สุภวัฒน์ และคณะ, 2540ก) โดยพบมากที่สุด ในภาคกลาง อัตราป่วยสูงสุดอยู่ที่จังหวัดสมุทรสงคราม ซึ่งเป็นจังหวัดชายฝั่งทะเล ที่มีการระบาดของอหิวาตกโรคเกือบทุกปี (ศิริศักดิ์ ชาติดิถิกรัตน์, 2542)



รูปที่ 1.2 จำนวนผู้ป่วยจากเชื้อ *V. cholerae* O1 และ O139 ที่ตรวจยืนยันโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำแนกรายปี พ.ศ. 2535-2541

#### 1.2.2.4.3 กลไกการก่อโรค

เมื่อคนรับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อน *V. cholerae* เชื้อบางส่วนอาจหลุดรอดจากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารผ่านมายังลำไส้เล็กแล้วใช้แฟลกเจลลาว่ายแทรกผ่านเยื่อเมือก (mucosa) มายึดเกาะกับ microvilli ของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) ลำไส้เล็ก โดยเฉพาะบริเวณเจจูนัม (jejunum) การยึดเกาะดังกล่าวช่วยให้ตัวเชื้อไม่ถูกขับลงสู่ลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีแบคทีเรียประจำถิ่น (normal microbiota) อยู่เป็นจำนวนมาก หลังจากนั้นเชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน พร้อมทั้งสร้างสารพิษ ที่เรียกว่า cholera toxin (CT) ซึ่งมีผลทำให้ การดูดซึมน้ำ และอิเล็กโทรไลต์เข้าสู่ภายในเซลล์ถูกยับยั้ง แต่ไปเพิ่มการหลั่งน้ำและอิเล็กโทรไลต์ออกจากเซลล์ไปสู่โพรงลำไส้ (lumen) ทำให้เกิดอาการถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ (อรุษา สุตเธียรกุล, 2541)

#### 1.2.2.4.4 อาการของโรค

ผู้ที่ติดเชื้อแต่ละคน อาจแสดงอาการไม่เท่ากัน ขึ้นกับปริมาณเชื้อที่ได้รับและความต้านทานของแต่ละบุคคล (Bennish, 1994) ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 1-5 วัน อาการที่เห็นได้ชัด ได้แก่ อุจจาระร่วง ลักษณะอุจจาระในระยะแรกมักมีเศษอาหารปนอยู่ ต่อมามีอาการถ่ายเป็นน้ำคล้ายน้ำขาวขุ่น มีกลิ่นคาว ถ้าถ่ายนานๆ

อาจมีน้ำดีปนออกมาด้วย อุจจาระไม่มีมูกเลือด ผู้ป่วยอาจมีอาการร่วมด้วย ส่วนอาการปวดท้องและมีไข้ไม่ค่อยพบ ในรายที่อาการไม่รุนแรงมักมีอาการคล้ายกับอาการของโรคติดเชื้อในลำไส้จากเชื้อต่างๆ ได้แก่ *Salmonella*, *Shigella* และ *Escherichia coli* เป็นต้น ในรายที่อาการรุนแรง จะพบสภาวะร่างกายขาดสารน้ำและแร่ธาตุ ทำให้อ่อนเพลีย กระจายน้ำ เป็นตะคริว เสียงแหบ แก้มตบ เบ้าตาลึก ผิวหนังและเยื่อเมือกต่างๆ แห้งมือและนิ้วเหี่ยวยุบ ตัวเย็น ซิพจรเบาจนกระทั่งจับไม่ได้ เลือดข้น มีความเป็นกรดในเลือดสูง ความดันโลหิตต่ำ ลักษณะนี้ถ้าให้การรักษาไม่ถูกต้องและทันที่ ผู้ป่วยอาจช็อก ไตวายอย่างเฉียบพลัน เป็นสาเหตุให้เสียชีวิตได้รวดเร็ว อาการอุจจาระร่วงและอาเจียนอาจทำให้ผู้ป่วยสูญเสียน้ำไปมากกว่า 1 ลิตรต่อชั่วโมง หรือ 10-15 ลิตรต่อวัน (ร่างกายของมนุษย์มีน้ำประมาณ 20-40 ลิตร) อุจจาระของผู้ป่วยจะประกอบด้วย epithelial cell, mucosa cell, อีเล็กโตรไลต์และเชื้อ *V. cholerae* ประมาณ  $10^7$ - $10^9$  ต่อมิลลิลิตร สัดส่วน ผู้ติดเชื้อ biotype Classical และ biotype El Tor ที่แสดงอาการชนิดรุนแรงต่อชนิดไม่รุนแรงเท่ากับ 1:5 – 1:10 และ 1:25-1:100 ตามลำดับ (อรษา สุตเชียรกุล, 2541)

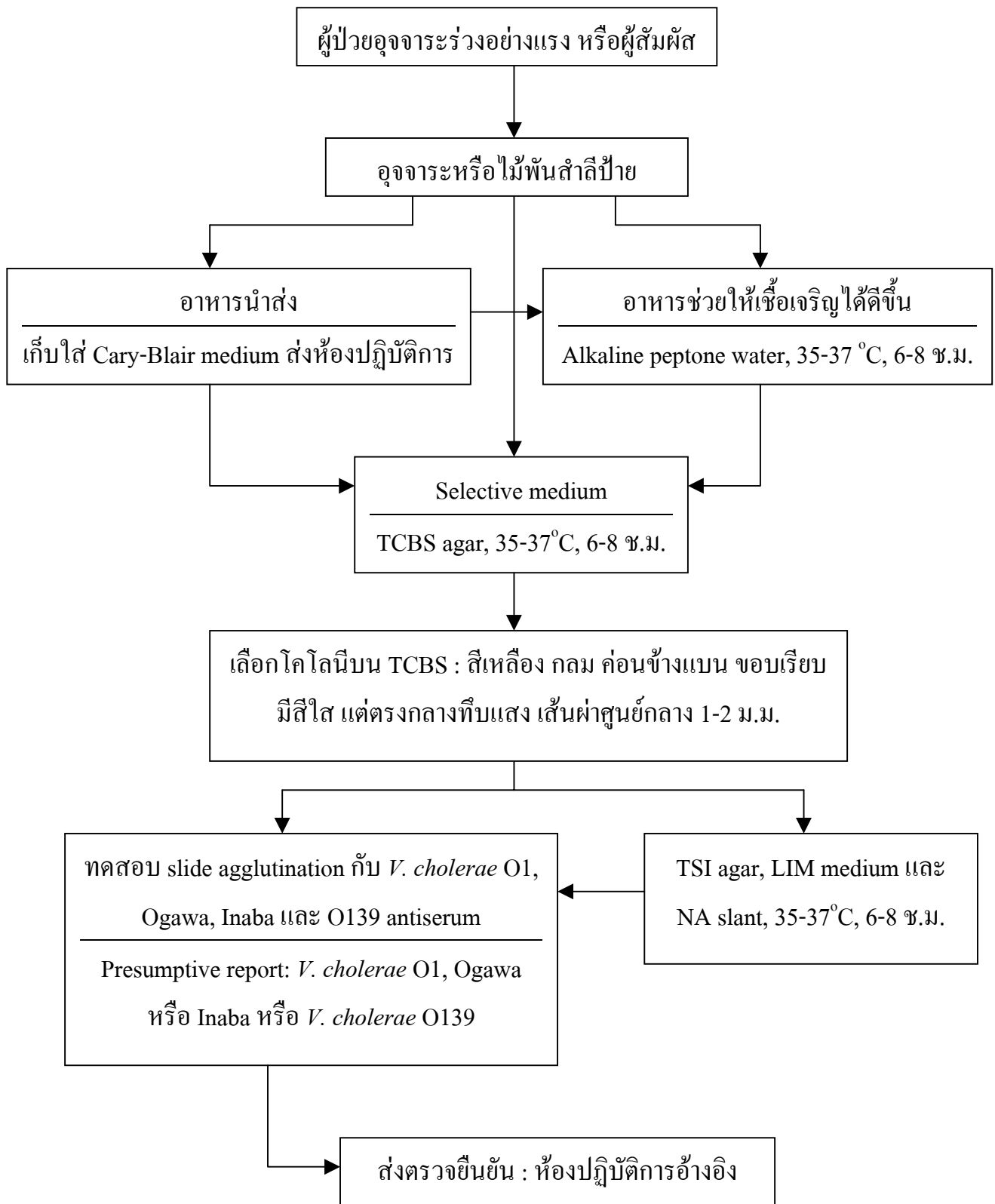
#### 1.2.2.4.5 การติดต่อ

การติดต่อและแพร่กระจายของ *V. cholerae* มีน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเป็นสื่อ โดยที่ผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อทั้งทางตรงและทางอ้อม น้ำจัดเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในการแพร่เชื้ออหิวตศโรคน ส่วนอาหารมักเป็นอาหารทะเลซึ่งอยู่ในลักษณะกึ่งสุกกึ่งดิบ นอกจากนี้อาจพบเชื้อได้ในผักสด ถ้านำน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อมาใช้ในการรดน้ำผัก แหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญสู่สิ่งแวดล้อมคือ อุจจาระของผู้ป่วย สามารถพบเชื้อได้ประมาณ  $10^7$ - $10^9$  ตัวต่อมิลลิลิตร ผู้ที่เป็นพาหะและไม่มีอาการของโรค สามารถเดินทางไปยังที่ต่างๆ ทำให้โอกาสแพร่เชื้อมีมากกว่าผู้ป่วย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการแพร่กระจายเชื้ออย่างรวดเร็ว ได้แก่ เศรษฐกิจ ฐานะ และสุขอนามัยของประชาชน นอกจากนี้การอพยพเคลื่อนย้ายหรือการคมนาคมที่สะดวก ทำให้เชื้อกระจายไปได้ไกล และรวดเร็ว (อรษา สุตเชียรกุล, 2541)

#### 1.2.2.4.6 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

แม้ว่าการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการของอหิวาตกโรค จะสามารถดำเนินการได้ทันที แต่การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการยังมีความสำคัญมาก เนื่องจากลักษณะอาการทางคลินิกไม่สามารถแยกผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *V. cholerae* O1 ออกจาก O139 และอาจทำให้ได้ข้อมูลเท็จ ซึ่งการวางแผนเฝ้าระวัง ควบคุม ตั้งแต่เริ่มแรกจะช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ นอกจากนี้ยังต้องทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์ จะได้เลือกใช้ยาได้อย่างถูกต้อง ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ อุจจาระ อาเจียน น้ำและอาหาร เป็นต้น อุจจาระควรเก็บในระยะที่เพิ่งมีอาการและก่อนได้รับยาปฏิชีวนะ การเก็บอาจใส่ในหลอดแก้วหรือ เก็บแบบ rectal swab โดยใช้ไม้พันสำลี แล้วเก็บไว้ใน alkaline peptone water เพื่อกันไม่ให้ swab แห้ง แต่ถ้าตัวอย่างต้องเสียเวลาในการเดินทางก่อนถึงห้องปฏิบัติการควรใช้ transport medium ที่นิยมใช้คือ Cary Blair ในห้องปฏิบัติการอาจนำตัวอย่างอุจจาระป้ายลงบนสไลด์ นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์แบบ dark field ดูการเคลื่อนไหวของเชื้อ ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้รวดเร็วแบบพุ่งไปมา และถ้าใส่แอนติบอดีจำเพาะจะหยุดการเคลื่อนที่ วิธีนี้สามารถวินิจฉัยได้รวดเร็ว จากนั้นนำตัวอย่างมาเพาะแยกเชื้อโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนด้วย alkaline peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 6-8 ชั่วโมง แล้ว streak บน TCBS agar บ่มนาน 18-24 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีสีเหลือง กลม ก่อนข้างแบน ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร มาทดสอบทางชีวเคมี เมื่อให้ผลเป็น *V. cholerae* นำเชื้อมาทดสอบ โดยวิธี slide agglutination กับ polyvalent O1 และ O139 antiserum ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มกับ antiserum เชื้อที่ให้ผลบวกต่อ polyvalent O1 antiserum ให้นำมาตรวจหาซีโรทัยป์ด้วยวิธี slide agglutination กับ Ogawa และ Inaba antiserum (แผนภูมิที่ 1.2) ส่วนการแยก biotype ใช้วิธีทดสอบ ในตารางที่ 1.1 เมื่อตรวจพบว่าเป็น *V. cholerae* O1 หรือ O139 ต้องรายงานผลการตรวจให้นายแพทย์ผู้ส่งตรวจทราบภายในเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อที่จะดำเนินการควบคุมและป้องกันโรคโดยเร็ว

**แผนภูมิ 1.2** การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อแยกวินิจฉัยเบื้องต้นสำหรับเชื้อ *V. cholerae* O1 หรือ O139 (ธวัช จายนียโยธิน และคณะ, 2542)





การตรวจหาปริมาณ *V. cholerae* ในตัวอย่างอาหารหรือน้ำ อาจใช้วิธี Most Probable Number (MPN) ส่วนการเพาะเชื้อ ทำเช่นเดียวกับการตรวจตัวอย่างอุจจาระ สำหรับการตรวจหาтокซิน มีหลายวิธี เช่น tissue culture การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ โดยใช้ Y1 mouse adrenal cells (Donta, 1974) Chinese hamster ovary (CHO) cells (Guerrant *et al.*, 1974) หรือทำในสัตว์ทดลอง เช่น rabbit ligated ileal loop (ดูการสะสมน้ำ) (Koley *et al.*, 1999) วิธีทางอิมมูโนวิทยา เช่น reverse passive latex agglutination test (Almeida *et al.*, 1990) และ ELISA (Osawa *et al.*, 1997) เป็นต้น ปัจจุบันนิยมใช้วิธี DNA hybridization และ PCR มาตรวจสอบหาтокซินซึ่งพบว่าให้ผลแม่นยำและรวดเร็วกว่า (Shirai *et al.*, 1991; Fields *et al.*, 1992; Olsvik *et al.*, 1993)

#### 1.2.2.4.7 การรักษา

การรักษาผู้ป่วยอหิวาตกโรคที่ถูกต้องและได้ผลคือ การทดแทนน้ำและเกลือแร่ที่สูญเสียไปกับอุจจาระ และอาเจียน ด้วยปริมาณที่เหมาะสมและทันเวลา ในกรณีที่ผู้ป่วยยังดื่มได้ควรให้ดื่มทางปาก แต่ถ้าไม่ได้ควรให้ทางเส้นเลือด ซึ่งทางองค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ Ringer's lactate solution ในเด็กให้เป็นสารละลาย 2 ชนิดผสมกันในอัตราส่วน 2:1 คือ isotonic saline : isotonic sodium lactate (1/6 โมลาร์) หรือ isotonic sodium bicarbonate ส่วนน้ำตาลเกลือแร่ที่ดื่มนั้น ปัจจุบันทางองค์การอนามัยโลกให้ใช้สารละลายที่เรียกว่า oral rehydration solution (ORS) ซึ่งในส่วนผสมของ ORS จะให้ปริมาณของอิเลคโตรไลต์ครบตามที่ร่างกายต้องการ คือ Na 90, K 20, Cl 80 และ HCO<sub>3</sub> 30 mEq/L (อรษา สุตเชียรกุล, 2541) ในประเทศไทย องค์การเภสัชกรรม ได้ผลิตน้ำตาลเกลือแร่ที่ออกจำหน่ายแล้วเช่นกัน อย่างไรก็ตามการกำจัดเชื้อให้หมดจากอุจจาระนั้นควรให้ยาปฏิชีวนะในการรักษาเพื่อลดระยะเวลาการป่วยให้สั้นลงและเป็นการลดแหล่งแพร่เชื้อด้วย โดยใช้ยา tetracycline เป็นยาปฏิชีวนะอันดับแรก ยกเว้นในพื้นที่ที่มีหลักฐานว่ามีการดื้อยา ให้พิจารณาเลือกใช้อื่นตามความไวต่อเชื้อในท้องถิ่นนั้นๆ เนื่องจากในระยะหลังได้มีรายงานผลการดื้อยาของ *V. cholerae* O1 ในอัตราที่เพิ่มสูงขึ้นผิดปกติ โดยเฉพาะ co-trimoxazole, tetracycline และ chloramphenicol และมีการดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกันด้วย ดังนั้นควรมีการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาและติดตามผลการรักษา จากผลการตรวจอุจจาระเพื่อให้มีการเลือกใช้อื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการ

จำหน่ายผู้ป่วยออกจากโรงพยาบาลนั้น ควรทำเมื่อตรวจไม่พบเชื้อในอุจจาระเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน

#### 1.2.2.4.8 การป้องกันและควบคุม

อหิวาตกโรคนั้นเกิดจากผู้ป่วย รับประทานอาหารและน้ำที่มี เชื้อปนเปื้อน ดังนั้นควรระมัดระวังเรื่องอาหารและน้ำดื่ม ตลอดจนรักษาความสะอาดตาม หลักสุขอนามัย ควรรับประทานแต่อาหารที่ปรุงสุกอย่างทั่วถึงและร้อน ดื่มน้ำที่สะอาด ปราศจากเชื้อ ล้างมือทุกครั้งหลังถ่ายอุจจาระและก่อนรับประทานอาหาร ควรมีการปรับ ปรุงระบบสุขาภิบาลให้ถูกสุขลักษณะ มีห้องส้วมที่สะอาดมิดชิด นอกจากนี้ควรควบคุม ผู้ป่วย ผู้สัมผัสโรคและพาหะ ให้การรักษาอย่างถูกต้องตลอดจนให้ศึกษา มาตรการ เหล่านี้ถ้าทำได้จะสามารถป้องกันและควบคุมอหิวาตกโรคได้

วัคซีนป้องกันโรคนั้นมีหลายชนิด ทั้งที่อยู่ระหว่างการศึกษา และนำมาใช้แล้ว แต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพต่างๆ กัน เช่น *V. cholerae* ElTor Inaba JBK70 (A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>) (Levine *et al.*, 1988), *V. cholerae* Classical Inaba CVD 101(A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>) (Levine *et al.*, 1988), Ty21a- *V. cholerae* hybrids (Attridge *et al.*, 1991) และ CVD103-HgR (Ketley *et al.*, 1993) เป็นต้น ส่วนการป้องกันผู้ที่สัมผัสโรค อาจทำได้โดยให้ยา ปฏิชีวนะ เช่น tetracycline และ chloramphenicol อย่างไรก็ตามอหิวาตกโรคสามารถกำจัด ได้ถ้ายกฐานะภาพความเป็นอยู่ การสาธารณสุข และการสุขาภิบาลให้ดีขึ้น

#### 1.2.2.5 การก่อโรคอื่นๆ

นอกจากการก่อให้เกิดอหิวาตกโรค ยังมีรายงานการติดเชื้อ *V. cholerae* O1 นอกกระบบทางเดินอาหาร โดยตรวจพบ *V. cholerae* O1 ในกระแสเลือดของเด็กผู้หญิง อายุ 8 เดือน (Jamil *et al.*, 1992) และในผู้ใหญ่ 2 ราย เด็กทารก 1 ราย (Gordon *et al.*, 2001) ในปี ค.ศ. 1993 มีรายงานการติดเชื้อ *V. cholerae* serogroup O139 ในกระแสเลือด ได้เช่นกัน (Jesudason *et al.*, 1993) โดยทั่วไปการติดเชื้อในกระแสเลือดของ *V. cholerae* O1 และ O139 พบได้น้อยมาก มักพบในผู้ป่วยที่มีสภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ (immunosuppression) อันเนื่องมาจากการได้รับ chemotherapy, เกิด autoimmune disease, achlorhydria นอกจากนี้ยังพบในผู้สูงอายุ (elderly) และเด็กแรกเกิด (neonates)

สำหรับ *V. cholerae* non-O1/non-O139 หรือเดิมเรียกว่า non-agglutinable (NAG) หรือ non-cholera vibrio (Kaper *et al.*, 1995) ส่วนใหญ่จะพบในสิ่งแวดล้อม และไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ในระยะหลังเริ่มมีรายงานการเกิดโรคจาก non-O1/non-O139 (Dalsgaard *et al.*, 1995b; Tsutsumi *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1998b) พบว่าบางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) (Abbott *et al.*, 1992) หรืออุจจาระร่วง ขณะเดียวกันมีรายงานการตรวจพบ *ctxA* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้าง cholera toxin ในเชื้อกลุ่มนี้ได้เช่นกัน (Ghosh *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังพบการสร้างสารพิษอื่นๆ ได้แก่ cholera toxin-like enterotoxin (Yamamoto *et al.*, 1983), Shiga-like toxin (O'Brien *et al.*, 1984; Kaper *et al.*, 1994) hemolysin ซึ่งคล้ายกับ thermostable direct hemolysin (TDH) ของ *V. parahaemolyticus* (NAG-TDH) (Honda *et al.*, 1986) hemagglutinins และ heat-stable enterotoxin (ST) ซึ่งคล้ายกับ heat-stable enterotoxin ที่สร้างจาก enterotoxigenic *Escherichia coli* (Hoge *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 1990) ทำให้พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 สามารถแสดงพยาธิสภาพและอาการทางคลินิกได้หลายแบบแตกต่างกัน เช่น อุจจาระร่วง ร่างกายขาดน้ำคล้ายกับอาการของอหิวาตกโรค มีอาการคล้ายโรคบิด หรือทำให้เกิดโรคนอกระบบทางเดินอาหาร เช่น โลหิตเป็นพิษ เยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังอักเสบ และมีการติดเชื้อทางบาดแผล เป็นต้น (Morris, 1994) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการระบาดของเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ในกลุ่มผู้อพยพ แถบชายแดนเขมร จ. อนุรักษ์ประเทศ พบผู้ป่วยมีอาการคล้ายกับอหิวาตกโรค และเชื่อกันว่าสามารถสร้าง heat-stable toxin (Bagchi *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วยซึ่งเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศิริราช ในช่วงปี ค.ศ. 1983-1988 ติดเชื้อ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ในกระแสเลือดถึง 13 ราย (Thamlikitkul, 1990)

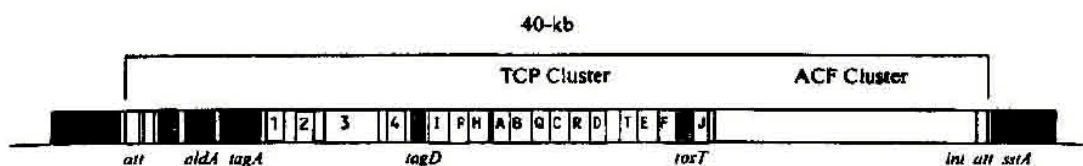
#### 1.2.2.6 ปัจจัยก่อความรุนแรง (Virulence factors)

การก่อให้เกิดโรคของ *V. cholerae* O1 และ O139 มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อกับบริเวณเยื่อลำไส้ เพื่อการดำรงชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน รวมทั้งสร้างสารพิษชนิดต่างๆ ปัจจัยเหล่านี้ถูกควบคุม

โดยจีน ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 ตำแหน่ง (region) ได้แก่ VPI, CTX genetic element และ RTX toxin

### 1.2.2.6.1 Pathogenicity island of *Vibrio cholerae* (VPI)

กลุ่มของจีนก่อโรคที่พบอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย เรียกว่า pathogenicity islands (PAIs) แต่อาจพบได้ในส่วนของพลาสมิด และแบคทีเรียโอ ฟาจ พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรค แต่ไม่พบในสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค มีรายงาน PAIs ในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Clostridium difficile* และ *V. cholerae* เป็นต้น พบ PAIs อยู่ร่วมกับ tRNA ซึ่งเป็น จุดที่ DNA แลกเปลี่ยนสอดแทรกเข้ามาใน host DNA นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ G+C ของ PAIs ยังแตกต่างจาก host DNA จึงทำให้เชื่อว่า PAIs เป็นจีนที่ host รับมาจาก สิ่งมีชีวิตอื่น (Dorindt and Reidl, 2000) PAIs ของ *V. cholerae* มีชื่อเรียกเฉพาะว่า *V. cholerae* pathogenicity island (VPI) มีความยาวเบสประมาณ 39.5 กิโลเบส มีปริมาณ G+C 35 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย TCP cluster (toxin co-regulated pilus), ACF cluster (accessory colonization factor), จีน *int* (integrase gene), *aldA*, *tagA*, *tagD* และ *toxT* ขนาบข้างด้วย *att* site (รูปที่ 1.3) (Faruque *et al.*, 1998a)



รูปที่ 1.3 *Vibrio cholerae* pathogenicity island (VPI) (Faruque *et al.*, 1998a)

**TCP cluster** ประกอบด้วยจีนสำคัญ คือ *tcpA* เป็นจีนหลักที่ควบคุมการสร้าง toxin co-regulated pilus (TCP) (Taylor *et al.*, 1987) มีลักษณะเป็นระยางค์สั้นๆ คล้าย pilus ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 นาโนเมตร อยู่ที่ผิวเซลล์ของ *V. cholerae* เป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้เชื้อเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก TcpA เป็นโปรตีน ขนาด 20 kDa นอกจากนี้การสร้าง TCP ยังถูกควบคุมโดยจีน *tcpH* และ *tcpI* โดยพบว่าหากยับยั้งไม่ให้เกิดการ

แสดงออกของจีน *tcpH* จะมีผลทำให้การสังเคราะห์ TCP ลดลง ขณะที่เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ *tcpI* พบว่ามีการแสดงออกของ TCP เพิ่มขึ้น (Faruque *et al.*, 1998a) จากการศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับ *V. cholerae* O1 biotype Classical Ogawa สายพันธุ์ 395 ซึ่งผ่านการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของจีน *tcpA* ผลพบว่าเชื่อดังกล่าวไม่สามารถเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในบริเวณลำไส้เล็ก และไม่ปรากฏอาการอุจจาระร่วงในกลุ่มอาสาสมัคร (Herrington *et al.*, 1998)

TCP พบได้ทั้งใน *V. cholerae* O1 biotype Classical และ El Tor ซึ่งจีน *tcpA* ของทั้งสองจะให้โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ (Iredell and Manning, 1994; Rhine and Taylor, 1994) แต่สภาวะการแสดงออกของ TCP ของทั้งสอง biotype จะแตกต่างกัน (Voss and Attridge, 1993) ถึงแม้เลี้ยงในสภาวะเดียวกัน biotype Classical จะมีการแสดงออกของ TCP ได้ดีกว่า El Tor (Jonson *et al.*, 1992) สำหรับ *V. cholerae* serogroup O139 สามารถตรวจพบจีน *tcpA* ได้เช่นกัน และพบว่ามีลำดับเบส และสภาวะการแสดงออกของจีน *tcpA* คล้ายกับ El Tor (Rhine and Taylor, 1994; Said *et al.*, 1995) โดยทั่วไปจะไม่พบจีน *tcpA* ใน serogroup non-O1/non-O139 รวมทั้ง serogroup O1 ที่ไม่สร้างสารพิษ (Kaper *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1998) แต่ในปี ค.ศ. 1995 มีรายงานการตรวจพบจีน *tcpA* ใน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (Said *et al.*, 1995; Ghosh *et al.*, 1997) และเมื่อหาลำดับเบส พบว่ามีความเหมือนกับ serogroup O1 biotype Classical ถึง 97.7 เปอร์เซ็นต์ (Chakraborty *et al.*, 2000) บทบาทที่สำคัญของ TCP อีกประการหนึ่ง คือ TCP เป็น receptor ของแบคทีเรียโอฟาจ (CTX $\phi$ ) (Lee, 1999)

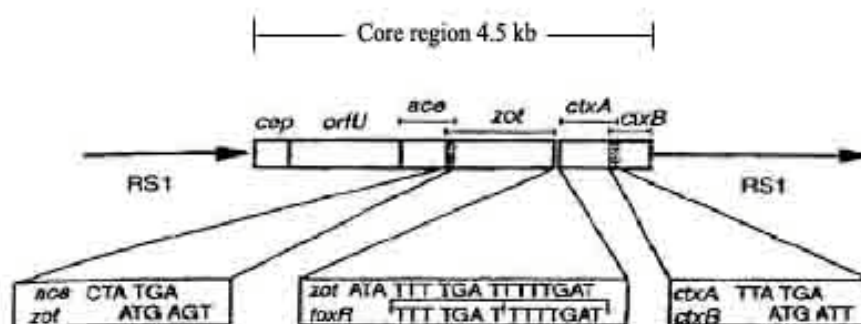
**ACF cluster** มีจีน *acf* ควบคุมการสร้าง Accessory colonization factor (ACF) เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ *V. cholerae* (Peterson and Mekalanos, 1988) เชื่อที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของจีน *acf* จะทำให้ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อลดลง 10-50 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ตำแหน่งจีน *acf* จะอยู่ทางด้าน downstream ของกลุ่มจีน *tcp* บน VPI (รูปที่ 1.3) (Kaper *et al.*, 1995) กลไกการทำงานของ ACF ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ 1 ใน 4 ของ ORF (*acf*ABCD) จะ มีจีน *acfD* เป็นตัวควบคุมการสร้าง lipoprotein (Parsot *et al.*, 1991)

*toxT* ควบคุมการสร้างโปรตีน ToxT ทำหน้าที่เป็น transcriptional activator ให้กับหลายๆยีนที่ก่อโรค *toxT* มีตำแหน่งอยู่บน VPI ทางด้าน upstream ของ *acf* อย่างไรก็ตามการทำงานของยีน *toxT* ขึ้นอยู่กับยีน *toxR* (Higgins and DiRita, 1996)

*aldA* และ *tagA* เป็นยีนที่มีรายงานว่าพบได้เฉพาะ pathogenic *V. cholerae* เท่านั้น และการแสดงออกของยีนอยู่ภายใต้การควบคุมของ ToxR แต่พบว่ายีนดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับขบวนการเผาผลาญพลังงานมากกว่าก่อโรค โดยที่ *aldA* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase และ *tagA* ควบคุมการสร้าง lipoprotein (Karaolis *et al.*, 1998)

#### 1.2.2.6.2 CTX genetic element

เป็นกลุ่มยีนสำคัญ ในการควบคุมการสร้างสารพิษหรือปัจจัยที่ช่วยในการก่อให้เกิดโรค พบใน *V. cholerae* O1 และ O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วย CTX genetic element ประกอบด้วย core region มีขนาดความยาวเบส 4.5 kb มีตำแหน่งยีนต่างๆ ได้แก่ *ctxAB*, *zot*, *ace*, *orfU* และ *cep* นอกจากนี้ยังขนานข้างด้วย repetitive sequence หรือ RS1 จำนวน 1 หรือ 2 ชุด (Pearson *et al.*, 1993) (รูปที่ 1.4) โดยส่วนใหญ่ *V. cholerae* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม จะไม่พบ CTX genetic element แต่อาจพบลำดับเบสขนาด 1.8 bp ของ *attRS1* ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นส่วนที่ CTX genetic element ถูกสอดแทรกเข้ามาได้โดยผ่านทางแบคทีริโอเฟจ ที่ชื่อ CTX phage (Faruque *et al.*, 1998a)

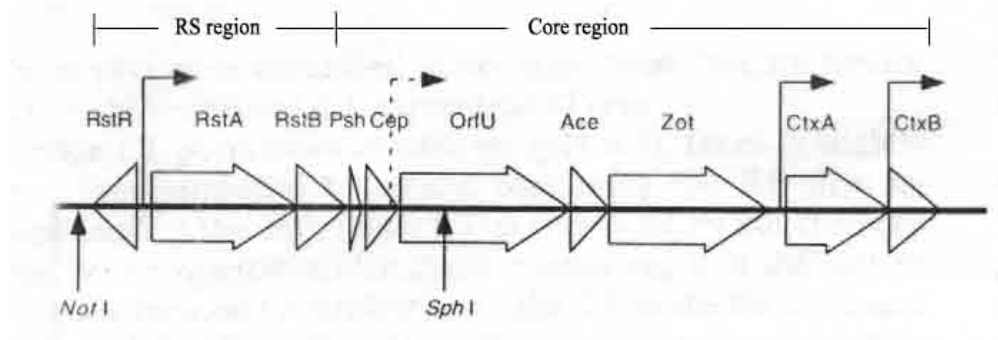


รูปที่ 1.4 แผนภาพ CTX genetic element ของ *V. cholerae* (Kaper *et al.*, 1994)

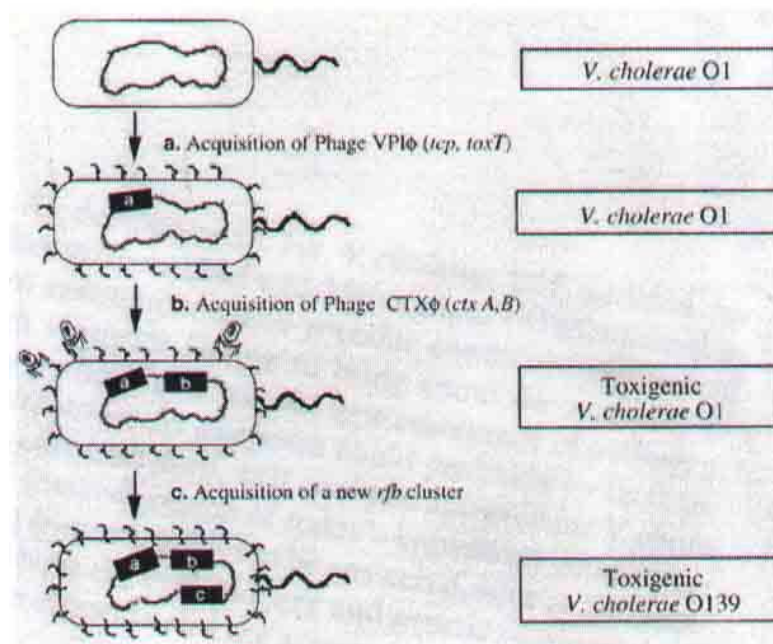
### 1.2.2.6.3 Bacteriophage

มีรายงานการค้นพบ CTX genetic element ในจีโนมของ lysogenic filamentous bacteriophage เรียกว่า CTX phage (CTX $\phi$ ) (Waldor and Mekalanos, 1996a) ภายในจีโนมของฟาจ ประกอบด้วย core region ขนาด 4.6 kb และ repeated sequence (RS) region ขนาด 2.4 kb (รูปที่ 1.5) ส่วนของ core region ประกอบด้วยยีน *psh*, *cep*, *orfU*, *ace*, *zot* และ *ctxAB* ยีน *zot* และ ยีน *orfU* มีความสำคัญในการประกอบเป็นตัวฟาจ ส่วน RS region ประกอบด้วยยีน *rstR*, *rstA* และ *rstB* มีหน้าที่ควบคุม repression replication และ site-specific integration ของ CTX $\phi$  (Waldor *et al.*, 1997) ฟาจสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของ *V. cholerae* โดยอาศัย TCP เป็นตัวรับ จีโนมของฟาจจะสอดแทรกลงในจีโนมของเชื้อ ในตำแหน่ง attachment site (attRS) แฝงตัวเป็น stable lysogen หรืออาจพบฟาจอยู่ในรูปพลาสมิด หรือ replicative form (RF) (Pearson *et al.*, 1993; Waldor and Mekalanos, 1996a; Waldor *et al.*, 1997) *V. cholerae* ที่ไม่มี TCP ฟาจจะไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของเชื้อได้ ดังนั้นจึงสรุปว่า CTX $\phi$  เป็นพาหะในการถ่ายทอด CTX genetic element จาก pathogenic *V. cholerae* ไปยัง non-pathogenic *V. cholerae* และทำให้ก่อโรคได้ (Waldor and Mekalanos, 1996a) อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่า ฟาจสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ *V. cholerae* ได้ถึงแม้จะไม่มี TCP (Faruque *et al.*, 1998b; Heilpern and Waldor, 2000) และในปี ค.ศ. 1999 พบว่าฟาจ CP-T1ts (*V. cholerae* generalized transducing phage) สามารถสอดแทรกจีโนมของฟาจลงในจีโนมของ *V. cholerae* สายพันธุ์ 468-83 ทั้งๆ ที่สายพันธุ์ดังกล่าวไม่มีทั้ง TCP และ attRS (Boyd *et al.*, 1999) จึงอาจจะเป็นไปได้ว่า นอกจาก TCP แล้วยังมีที่รับของฟาจอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป กลไกการถ่ายทอดยีนของฟาจเริ่มจาก VPI $\phi$  บุกกรุกเข้าสู่เซลล์ ของ non-pathogenic *V. cholerae* (รูปที่ 1.6) และสอดแทรกจีโนมซึ่งมีส่วน VPI ซึ่งมีกลุ่มยีน *tcp* ลงบนโครโมโซมของเชื้อ ต่อมาฟาจอีกตัวหนึ่ง คือ CTX $\phi$  จะจับกับ TCP ซึ่งเป็น receptor แล้วสอดแทรกจีโนมส่วนของ CTX genetic element เข้าไป ทำให้ได้ pathogenic *V. cholerae* ที่สร้างสารพิษได้ สำหรับการเปลี่ยนแปลง O-antigen ซึ่งเป็น lipopolysaccharide (LPS) จะมียีน *rfb* เป็นตัวควบคุม ทำให้เกิด serogroup ใหม่ (Bik *et*

al., 1995; Dobrindt and Reidl, 2002) เช่น serogroup O139 ที่ระบาดครั้งแรกเมื่อปลายปี ค.ศ. 1992 ในประเทศบังกลาเทศ และอินเดีย



รูปที่ 1.5 แผนภาพจีโนมของ CTX $\phi$  (Lazar and Waldor, 1998)



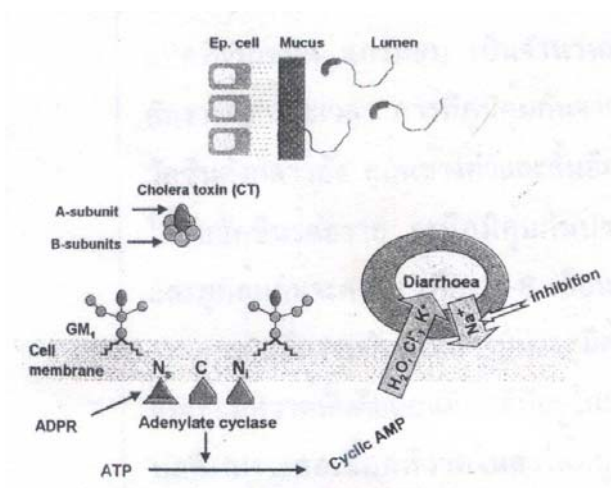
รูปที่ 1.6 กลไกการเปลี่ยน non-pathogenic *V. cholerae* เป็น pathogenic *V. cholerae* โดยแบคทีริโอฟาจ และการเปลี่ยนแปลง serogroup (Dobrindt and Reidl, 2002)



#### 1.2.2.6.4 Virulence genes

การก่อโรคของ *V. cholerae* มีขบวนการที่ซับซ้อน สารพิษต่างๆ ที่สร้างขึ้นมาต่างถูกควบคุมผ่านจีนหลายชนิด ได้แก่

จีน *ctx* มีความสำคัญในการควบคุมการสร้าง cholera toxin (CT) ในปี ค.ศ. 1884 Robert Koch ได้ตั้งข้อสังเกตว่าสาเหตุการเกิดอหิวาตกโรค อาจเกิดจากสารพิษของ *V. cholerae* ซึ่งมีผลต่อ intestinal epithelium ต่อมาในปี ค.ศ. 1959 คณะทำงานของ De และ Dutta ได้ทดลองนำน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ผ่านขั้นตอนการกรองให้ปราศจากตัวเชื้อ ฉีดเข้าสู่ลำไส้ของกระต่าย พบว่าภายในลำไส้เกิดมีของเหลวสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ในเวลา 10 ปีต่อมา Finkelstein และ LoSpalluto สามารถแยกสารพิษ ซึ่งเรียกว่า cholera toxin ให้บริสุทธิ์แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่าโครงสร้าง (structure) ของ cholera toxin (CT) หรือ cholera toxin (CT) จัดเป็น exotoxin ซึ่งเป็นโปรตีนไม่ทนความร้อน มีน้ำหนักโมเลกุล 84,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ส่วน คือ A และ B หน่วยย่อย A มีน้ำหนักโมเลกุล 28,000 ดาลตัน ซึ่งแบ่งเป็น A<sub>1</sub> (น้ำหนักโมเลกุล 23,000 ดาลตัน) และ A<sub>2</sub> (น้ำหนักโมเลกุล 5000 ดาลตัน) A<sub>1</sub> เป็นส่วนที่ออกฤทธิ์เข้าไปกระตุ้น adenylyl cyclase สำหรับหน่วยย่อย B มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 56,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 5 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 11,500 ดาลตัน เป็นส่วนที่ CT ใช้จับกับที่รับจำเพาะ ที่เรียกว่า GM<sub>1</sub> ganglioside บนผิวเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ของ CT เกิดขึ้นโดย หน่วยย่อย B จะไปเกาะที่ GM<sub>1</sub> ganglioside ของเซลล์เยื่อลำไส้ จากนั้นหน่วยย่อย A จะเข้าสู่เซลล์โดยผ่านพลาสมาเมมเบรน ไปเร่ง ADP-ribosylation ของ G-protein (ซึ่งตามปกติจะทำหน้าที่จับและสลาย GTP) ทำให้มีการกระตุ้นเอนไซม์ adenylyl cyclase ซึ่งจะเปลี่ยน adenosine triphosphate (ATP) ให้เป็น cyclic 3', 5' adenosine monophosphate (cAMP) มีผลทำให้ภายในเซลล์มีพลังงานเพิ่มขึ้น มีการขับน้ำและอิเล็กโทรไลต์ออกจากเซลล์เข้าไปในโพรงของลำไส้มาก ในขณะที่อัตราการดูดกลับของอิเล็กโทรไลต์ลดน้อยลงหรือถูกยับยั้ง เป็นผลให้ผู้ติดเชื้อเกิดการถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ (Kaper *et al.*, 1995)



รูปที่ 1.7 กลไกการออกฤทธิ์ของ cholera toxin

การศึกษา cholera toxin ในระดับโมเลกุลพบว่า การสร้างหน่วยย่อย A และ B ถูกควบคุมโดยจีน *ctxA* และ *ctxB* ตามลำดับ จีนทั้งสองมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมใน ส่วน *ctx* operon ของ CTX genetic element ซึ่งมี open reading frames(ORF) เหลือมัลล้ากัน โดยลำดับเบสสุดท้ายของ *ctxA* คือ TGA แต่ ATG จัดเป็นลำดับเบสเริ่มต้นของ *ctxB* (รูปที่ 1.4) ส่วนตำแหน่งที่ ribosome เข้าจับเพื่อเริ่มขบวนการถอดรหัสจะอยู่ทางด้าน upstream ของ จีนทั้งสอง นั่นคือตำแหน่งจับของ ribosome ของ *ctxB* จะอยู่ทางด้านปลาย 3' ของลำดับจีน *ctxA* สำหรับการแสดงออกของจีน *ctxA* และ *ctxB* จะมีอัตราส่วน 1:5 (Kaper *et al.*, 1994) การถอดรหัสของ *ctxAB* ยังถูกควบคุมโดยจีนอีกชนิดหนึ่งคือ *toxR* (Miller *et al.*, 1987) *V. cholerae* O1 biotype Classical พบว่ามี *ctx* operon 2 ชุด ส่วน El Tor ส่วนใหญ่พบ 1 ชุด มีเพียง 30 เบสที่พบ 2 ชุดหรือมากกว่า และจากการศึกษาในระดับโมเลกุลของ *V. cholerae* O139 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *V. cholerae* O1 El Tor พบว่ามี *ctx* operon ได้หลายชุด (Waldor and Mekalanos, 1994) บน *ctx* operon นอกจากจีน *ctx* แล้วทางด้าน upstream ยังประกอบด้วยจีน *zot* ซึ่งจัดเป็น toxin ลำดับที่สองที่ค้นพบใน *V. cholerae*

จีน *zot* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง Zonula occludens toxin (Zot) จากการศึกษา *V. cholerae* สายพันธุ์ที่พัฒนาสำหรับนำมาผลิตเป็นวัคซีนป้องกันอหิวาตกโรค โดยใช้วิธีการตัดจีนส่วนควบคุมการสร้าง cholera toxin แต่สายพันธุ์ดังกล่าวยังสามารถก่อให้เกิดอาการอุจจาระร่วง เล็กน้อย ถึงปานกลาง ในกลุ่มอาสาสมัคร จึงได้ทำการศึกษาต่อโดยนำ

น้ำเลี้ยงเชื่อมมาทดสอบใน Ussing chamber พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารพิษซึ่งมีศักยภาพเพิ่ม permeability ภายในลำไส้เล็ก และมีผลกระทบต่อโครงสร้างของ intercellular tight junction หรือ zonula occludens คุณสมบัติของสารพิษ ไม่เสถียร ไม่ทนความร้อน ถูกย่อยได้ง่ายด้วย protease และพบได้ในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) จึงเรียกสารพิษดังกล่าวว่า zonula occludens toxin หรือ Zot (Fasano *et al.*, 1991) ตำแหน่งของจีน *zot* อยู่ทางด้าน upstream ของ *ctx* operon เป็นตัวควบคุมการสร้าง polypeptide ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 44.8 kDa ประกอบด้วย ORF ขนาด 1.3 kb (Baudry *et al.*, 1992) จากการศึกษาใน *V. cholerae* O1 biotype Classical serotype Ogawa สายพันธุ์ 569B พบว่าตำแหน่งส่วนปลายของจีน *zot* จะเหลื่อมล้ำกับตำแหน่งลำดับเบสเริ่มต้นของ *ctx* promotor คือ TTTTGAT (รูปที่ 1.4) ซึ่งเป็นตำแหน่งจับของ ToxR (Miller *et al.*, 1987) พบจีน *zot* ใน *V. cholerae* O1, O139 และ non-O1/non-O139 ที่แยกจากผู้ป่วย (Karasawa *et al.*, 1993; Ramamurthy *et al.*, 1993b; Kurazono *et al.*, 1995; Aidara *et al.*, 1998; Pourshafie *et al.*, 2000) *V. cholerae* สายพันธุ์ที่มีจีน *ctx* มักพบจีน *zot* ด้วยเสมอ (Kaper *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังพบจีน *zot* ได้ในบางสายพันธุ์ของ *V. alginolyticus* (Sechi *et al.*, 2000; Raja *et al.*, 2001) และ *V. mimicus* (Chowdhury *et al.*, 1997b; Shi *et al.*, 1998; Sechi *et al.*, 2000)

จีน *ace* ควบคุมการสร้าง Accessory cholera enterotoxin (Ace) ซึ่งเป็น toxin ที่มีบทบาทในการเพิ่ม short-circuit current ใน Ussing chamber และเป็นสาเหตุไปเพิ่มการสะสมของเหลวในลำไส้กระต่าย (Trucksis *et al.*, 1993) ลำดับเบส TGA ที่อยู่ตำแหน่งสุดท้ายทางด้าน 5' ของจีน *ace* จะเหลื่อมล้ำกับลำดับเบสส่วนต้นของจีน *zot* โปรตีน Ace มีขนาด peptide 96 residue มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 11,300 ดาลตัน (Kaper *et al.*, 1995)

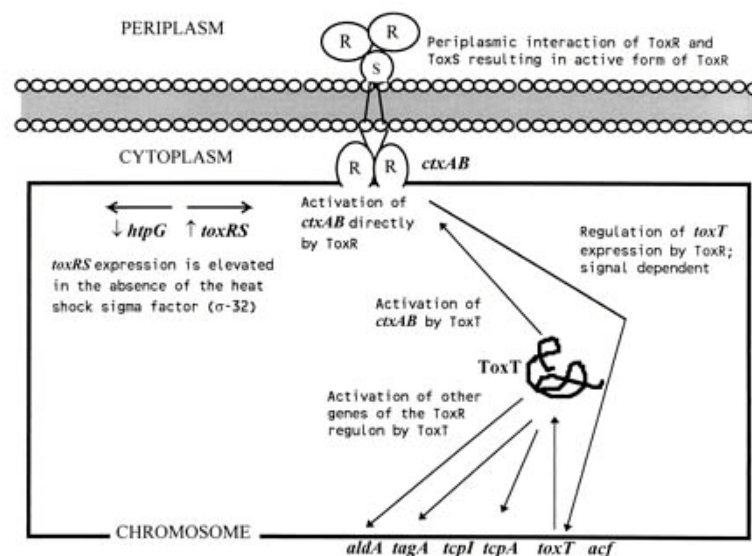
จีน *cep* ควบคุมการสร้าง Core-encode pilus (Cep) ซึ่งเป็นโปรตีน (Pearson *et al.*, 1993) จีนนี้เป็นส่วนหนึ่งใน *ctx* operon (รูปที่ 1.4) หาก *V. cholerae* เกิดการ กลายพันธุ์ในตำแหน่งจีนดังกล่าว พบว่าความสามารถในการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อในลำไส้เล็กของหนูทดลองจะลดลง 13-21 เท่า

#### 1.2.2.6.5 Regulation of virulence

กลไกการก่อโรคของ *V. cholerae* ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยและ

ถูกควบคุมโดยจีนที่ทำงานอย่างเป็นระบบ การแสดงออกของจีนดังกล่าวส่วนใหญ่ เกี่ยวข้องกับ ToxR ซึ่งเป็น transmembrane DNA-binding protein ที่มีขนาด 32 kDa (Miller *et al.*, 1987; DiRita *et al.*, 1992) พบได้ใน inner membrane ส่วนที่เป็น cytoplasmic amino-terminal domain และ periplasmic carboxy-terminal domain โดยที่ส่วน cytoplasmic amino-terminal domain (รูปที่ 1.8) จะทำหน้าที่เป็น DNA-binding และช่วยกระตุ้นให้มีการถอดรหัสของจีนที่เกี่ยวข้อง ส่วน periplasmic carboxy-terminal domain มีหน้าที่จับกับ transmembrane protein อีกชนิดหนึ่งที่มีขนาด 19 kDa คือ ToxS (Miller *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989; DiRita and Mekalanos, 1991a) ToxS ช่วยให้ ToxR มีความเสถียรสามารถทำงานได้โดยอยู่ในรูป dimer form (DiRita and Mekalanos, 1991a; Ottemann and Mekalanos, 1996) มีจีนมากกว่า 20 ชนิดที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของ ToxR (Skorupski and Taylor, 1997) เรียกกลุ่มจีนดังกล่าวว่า ToxR regulon (Peterson and Mekalanos, 1988) ToxR ควบคุมการทำงานของ จีน *ctxAB* (Miller *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1987; DiRita *et al.*, 1991b) โดยจับกับเบสขนาด 7 bp (TTTTGAT) ที่เรียงตัวซ้ำๆ ประมาณ 3–8 copy ในบริเวณ upstream ของ *ctx* promotor ส่งผลให้เกิดการถอดรหัสของจีน *ctxAB* และหลัง cholera toxin (Miller and Mekalanos, 1984; Miller *et al.*, 1987; DiRita *et al.*, 1991b) นอกจากนี้ยังควบคุมการแสดงออกของจีน *tcp* (Taylor *et al.*, 1987) *acf* (Peterson and Mekalanos, 1988) จีน outer membrane ทั้ง *ompT* และ *ompU* (Miller and Mekalanos, 1988) และ lipoprotein อีก 3 ชนิด คือ TagA, AcfD และ TcpC (Parsot *et al.*, 1991) จีนบางชนิดใน ToxR regulon ยังถูกควบคุมการทำงานผ่านทาง ToxT ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 32-kDa โดยที่การทำงานของจีน *toxT* อยู่ภายใต้การควบคุมของ ToxR อีกลำดับหนึ่ง (Higgins and DiRita, 1994; Higgins and DiRita, 1996) จีนที่ถูกควบคุมผ่านทาง ToxT โดยตรงเรียกว่า ToxT-dependent branch และ จีนที่ถูกควบคุมผ่านทาง ToxR เรียก ToxT-independent branch (Brown and Taylor, 1995; Champion *et al.*, 1997) ดังนั้น ToxR คือตัวควบคุมหลักของ ToxR regulon ToxR จัดเป็น virulence factor เนื่องจาก ถ้าให้อาสาสมัคร ได้รับเชื้อ *V. cholerae* O1 Classical สายพันธุ์ 395 ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ในส่วน ของจีน *toxR* ปรากฏว่า ไม่มีอาสาสมัครคนใด มีอาการอุจจาระร่วง และยังคงตรวจไม่พบตัวเชื้อจากอุจจาระอีกด้วย (Herrington *et al.*, 1988) การทำงานของ ToxR ขึ้นกับสถานะสิ่ง

แวดล้อมภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง osmolarity และองค์ประกอบอาหารที่เชื้อได้รับ (Skorupski and Taylor, 1997) จากการศึกษากลไกการตอบสนองของ ToxR ต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดย Parsot and Mekalanos (1990) พบว่าลำดับเบสตำแหน่งทางด้าน upstream ของจีน *toxR* มีจีน *htpG* ที่ควบคุมการสร้าง heat shock protein จีน *toxR* และ *htpG* มีทิศทางการถอดรหัสตรงกันข้ามดังนั้น promoter ทั้งสองจึงมีตำแหน่งใกล้เคียงกัน (รูปที่ 1.8) ทำให้มี RNA polymerase เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่จะเข้าจับกับ promoter ได้ นั่นคือในสภาวะที่อุณหภูมิในสิ่งแวดล้อม ลดต่ำลง  $\sigma^{70}$  RNA polymerase จะเริ่มทำงานและเข้าจับในตำแหน่ง promoter ของ *toxR* เกิดการแสดงออกของ ToxR แต่ในกรณีที่อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น  $\sigma^{32}$  RNA polymerase จะเข้าจับในส่วนของ *htpG* promoter ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีน ToxR มีรายงานสนับสนุนข้อมูลนี้ โดยพบว่า จากการศึกษาในหลอดทดลอง *V. cholerae* biotype Classical มีการสร้าง CT และ TCP มากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียส การสร้างจะลดลง (DiRita, 1992) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากร่างกายคนมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นอาจมีปัจจัยอื่นมาช่วยการทำงานของ ToxR



รูปที่ 1.8 รูปแบบการควบคุมเป็นลำดับขั้นของ ToxR/ToxT ใน *V. cholerae*  
(Faruque *et al.*, 1998a)

### 1.2.2.6.6 virulence factor อื่นๆ

นอกจากการสร้างสารพิษต่างๆ ที่ก่อให้เกิดอาการของ อหิวาตกโรค ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลทำให้ *V. cholerae* มีศักยภาพในการก่อโรค ได้แก่

#### Hemolysin

*V. cholerae* บางสายพันธุ์สามารถสร้าง hemolysin ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสลายเม็ดเลือดแดงและในหลอดทดลอง ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถใช้จัดจำแนก biotype Classical และ El Tor อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยพบว่า biotype El Tor บางสายพันธุ์สร้าง hemolysin ได้น้อย (Barrett and Blake, 1981) hemolysin ที่แยกให้บริสุทธิ์มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เพาะเลี้ยง อีกทั้งยังสามารถทำให้หนูทดลองตายได้อย่างรวดเร็ว (Honda and Finkelstein, 1979) นอกจากนี้ยังพบว่า *V. cholerae* non-O1 หลายสายพันธุ์สามารถสร้าง hemolysin ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ hemolysin ของ El Tor อีกด้วย (Yamamoto *et al.*, 1986; Ichinose *et al.*, 1987; Lyer *et al.*, 2000) hemolysin จึงถือเป็นปัจจัยหนึ่งในการก่อโรคของ *V. cholerae* มีจีน *hlyA* เป็นตัวควบคุมการสร้าง (Brown and Manning, 1985)

#### Shiga-like toxin

ในปี ค.ศ. 1984 มีรายงานการค้นพบ การสร้าง shiga-like toxin จาก *V. cholerae* O1 และ non-O1 (O'Brien *et al.*, 1984) โดยพบว่า toxin ดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อ HeLa cell และความเป็นพิษจะหมดไปเมื่อนำไปผสมกับแอนติบอดีต่อ shiga toxin ที่ได้จาก *Shigella dysenteriae* 1 อย่างไรก็ตามยังไม่มีที่ยืนยันอย่างชัดเจนเกี่ยวกับ toxin ชนิดนี้

#### Heat stable enterotoxin (ST)

*V. cholerae* non-O1 บางสายพันธุ์ สามารถสร้างสารพิษ NAG-ST ซึ่งมีความคล้ายกับ ST ของ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ถึง 50% (Ogawa *et al.*, 1990) และก่อให้เกิดอาการระว่งในกลุ่มอาสาสมัคร (Morris *et al.*, 1990) จากการสำรวจ *V. cholerae* non-O1 ซึ่งแยกได้จากสิ่งแวดล้อมแถบอินเดียจำนวน 521 สายพันธุ์ พบจีนควบคุมการสร้าง ST ร้อยละ 2.3 (Pal *et al.*, 1992) และในค่ายอพยพของไทยแถบจังหวัดอุตรดิตถ์ มีรายงานพบ *V. cholerae* non-O1 ที่สามารถสร้าง ST (Bagchi *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ NAG-ST จากเชื้อ *V. cholerae* non-O1 ที่แยกได้จากตัวอย่างกึ่งจาก

ประเทศไทย (Dalsgaard *et al.*, 1995) และจากผู้ป่วยซึ่งเป็นนักท่องเที่ยวชาวญี่ปุ่น ที่เดินทางกลับจากต่างประเทศ รวมทั้งประเทศไทย (Tsutsumi *et al.*, 1995) มีรายงานการพบ ST อยู่น้อยใน serogroup O1 โดยพบเพียง 1 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 197 สายพันธุ์ (Takeda *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบ ST ในบางสายพันธุ์ของ *V. mimicus* (Vicente *et al.*, 1997) จินซึ่งควบคุมการสร้าง ST enterotoxin ใน *V. cholerae* O1 และ non-O1 จะขนานบ้างด้วย direct repeats ขนาด 123-bp (Ogawa and Takeda, 1993) ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จिनนี้จะถูกถ่ายทอดโดยวิธี transposon

### **Lipopolysaccharide (LPS)**

มีส่วนช่วยให้เชื้อเกาะติดกับลำไส้เล็ก เนื่องจากการศึกษาในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าแอนติบอดีต่อ LPS ที่ได้จาก *V. cholerae* O1 serotype Ogawa หรือ Inaba สามารถขัดขวางการเกาะติดของเชื้อกับเยื่อลำไส้เล็กได้ (Chitnis *et al.*, 1982)

### **OmpU**

จัดเป็น Outer membrane protein ชนิดหนึ่ง ขนาด 38 kDa จากการศึกษพบว่ามีบทบาทช่วยส่งเสริมการเกาะติดของเชื้อกับ epithelial cell ในลำไส้เล็กของสัตว์ทดลอง ทำให้เชื้อเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Sperandio *et al.*, 1995; Chakrabarti *et al.*, 1996) สามารถพบได้ใน *V. cholerae* O1 และ O139 ทั้งที่สร้าง CT และไม่สร้าง CT (Sperandio *et al.*, 1996) การสร้าง OmpU อยู่ภายใต้การควบคุมของ ToxR (Miller and Mekalanos, 1988)

### **1.2.3 จีโนมของ *V. cholerae***

จากการศึกษา *V. cholerae* ในระดับโมเลกุล ในปี ค.ศ. 1998 พบว่าเมื่อนำโครโมโซมของ *V. cholerae* O1 biotype Classical serotype Ogawa สายพันธุ์ 395 ที่ยังไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่นับวัน 2 แถบ และเมื่อศึกษาต่อโดยใช้วิธี pulsed – field gel electrophoresis (PFGE) พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าว ประกอบด้วยโครโมโซม 2 ชุด และลักษณะเช่นเดียวกันนี้สามารถพบได้ใน *V. cholerae* O1 biotype El Tor สายพันธุ์ E7946, *V. cholerae* O139 สายพันธุ์ AI1837 และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 สายพันธุ์ 392 และ S-21 (Trucksis *et al.*, 1998) ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 มีการศึกษาใน *V. cholerae* O1 biotype El Tor สาย

พันธุ์ N16961 และสามารถหาลำดับเบสในจีโนมของเชื้อได้ทั้งหมด 4,033,460 bp ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซม 2 ชุด ขนาด 2,961,146 bp และ 1,072,314 bp มี open reading frame (ORF) ทั้งหมด 3,885 โดยมีจีนที่ควบคุมการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ (DNA replication, transcription, translation และ cell-wall biosynthesis) และจีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (toxin, surface antigen, toxin co-regulated pilus และ adhesion) อยู่บนโครโมโซมชุดใหญ่ ส่วนโครโมโซมชุดเล็ก ประกอบด้วยจีน capture system (the integron island) เหมือนที่พบบนพลาสมิด ดังนั้นจึงเชื่อว่าโครโมโซมขนาดเล็กอาจกำเนิดจากพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ ความแตกต่างของโครโมโซมทั้งสองชุดของ *V. cholerae* แสดงในตารางที่ 1.3 (Heidelberg *et al.*, 2000)

จะเห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่าง เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. cholerae* โดยปัจจัยบางอย่างมีผลโดยตรงต่อการก่อโรค เช่น จีน *ctx* แต่ปัจจัยบางอย่างก็เป็นตัวควบคุมการแสดงออกอีกทีหนึ่ง เช่น จีน *toxR* และอาจจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยการก่อโรค (virulence factor) ของ *V. cholerae* ที่แยกจากผู้ป่วยและในสิ่งแวดล้อม



ตารางที่ 1.3 ลักษณะทั่วไปของจีโนม *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000)

	Chromosome 1	Chromosome 2
Size(bp)	2,961,151	1,072,914
Total number of sequences	36,797	14,367
G+C percentage	47.7	46.9
Total number of ORFs	2,770	1,115
ORF size(bp)	952	918
Percentage coding	88.6	86.3
Number of rRNA operons(16S-23S-5S)	8	0
Number of tRNA	94	4
Number similar to known proteins	1,614(58%)	465(42%)
Number similar to proteins of unknown function*	163(6%)	66(6%)
Number of conserved hypothetical proteins**	178(17%)	165(15%)
Number of hypothetical proteins***	515(19%)	419(38%)
Number of Rho-independent terminators	599	193

bp = base pairs, ORFs = open reading frames

\* Proteins of unknown function significant sequence similarity (homology) to a named protein for which there is currently no known function.

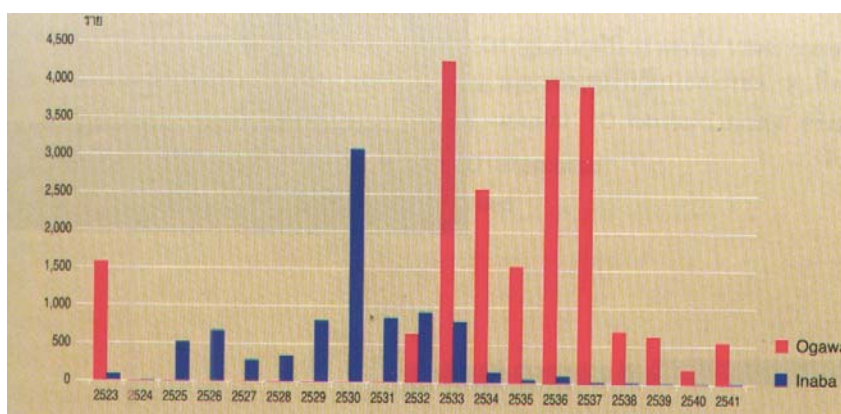
\*\* Conserved hypothetical protein, sequence similarity to a translation of another ORF, but there is currently no experimental evidence a protein is expressed.

\*\*\* Hypothetical protein, no significant sequence similarity to another protein.

### 1.2.4 การเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ (serotype conversion)

*V. cholerae* O1 ทั้ง biotype Classical และ El Tor สามารถแบ่งย่อยได้ 3 ซีโรทัยป์ ได้แก่ Ogawa, Inaba และ Hikojima ซีโรทัยป์ของ *V. cholerae* O1 สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ โดยความถี่ของ Ogawa เปลี่ยนเป็น Inaba มีประมาณ  $10^{-5}$  ขณะที่การเปลี่ยนจาก Inaba เป็น Ogawa จะพบได้น้อยมาก ข้อสันนิษฐานของการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ดังกล่าว เกิดจากการคัดลอกสายพันธุ์ เพื่อหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ มีข้อยืนยันได้จากการศึกษา การเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ โดยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) ในการระบาดของ *V. cholerae* O1 แถบประเทศลาตินอเมริกาปี ค.ศ. 1991 พบว่าในช่วงเดือนที่ 7 ของการระบาด *V. cholerae* O1 El Tor Inaba เปลี่ยนเป็น *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa และคุณสมบัติ คล้ายกับตัวเดิม (Manning *et al.*, 1994) และยังมีรายงานว่า *V. cholerae* O1 El Tor Inaba ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศอินเดียเมื่อปี ค.ศ.1989 มีความต่างจากเชื้อ *V. cholerae* O1 El Tor Inaba ที่แยกในปี ค.ศ. 1998 และ 1999 แต่เชื้อที่แยกในปี ค.ศ. 1998 และ 1999 กลับมีความเหมือนกันกับ *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa ที่ระบาดก่อนหน้านี้ (Garg *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า LPS ส่วนที่จำเพาะต่อ *V. cholerae* O1 ซีโรทัยป์ Ogawa จะมี จิน *rfb* อยู่บนโครโมโซม ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้าง แอนติเจน B ของ Ogawa การที่ Ogawa เปลี่ยนไปเป็น Inaba นั้นเกิดจากการขาดหายไปของเบสเพียงหนึ่งคู่ ในจิน *rfb* ทำให้รหัสภายในจินเปลี่ยนเป็นโคดอนยุติ (TGA) มีผลให้หยุดการสร้างแอนติเจน B เกิดการแสดงออกของ แอนติเจน C กลายเป็นซีโรทัยป์ Inaba (Strocher *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1993) แต่กรณีที่ Inaba จะเปลี่ยนเป็น Ogawa ได้นั้นต้องมีการแทนที่ของเบสที่ขาดหายไป (กรองแก้ว สุภวัฒน์ และศรีวรรณ ทัศนายนนท์, 2540) เหตุผลอีกประการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์นั้น คือการเกิด horizontal gene transfer (Yamasaki *et al.*, 1999) หรือจากแบคทีเรียโอฟาจ (Ogg *et al.*, 1978; Ogg *et al.*, 1979) เมื่อแบคทีเรียโอฟาจ เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย แล้วเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างดีเอ็นเอ ประกอบเป็นตัวฟาจ อาจเกิดการผิดพลาด โดยที่ฟาจอาจนำเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียเข้าไปในตัวฟาจ เมื่อไปเกาะติดกับแบคทีเรียอีกตัวหนึ่งมีโอกาที่จะแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอ เกิด recombination ทำให้แบคทีเรียมีการแสดงออกของจินเปลี่ยนไป (Ogg *et al.*, 1981)

ในประเทศไทย *V. cholerae* O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากภาคต่างๆ ในระยะเวลา 17 ปี ระหว่างปี พ.ศ. 2523-2539 รวม 31,783 ราย พบว่าซีโรทัยป์ของ *V. cholerae* O1 biotype El Tor เกิดการเปลี่ยนกลับไปมาระหว่าง Ogawa และ Inaba ซึ่งแบ่งได้ 3 ระยะ ดังนี้ ระยะแรกระหว่าง พ.ศ. 2523-2524 พบซีโรทัยป์ Ogawa มาก ระยะที่สอง พ.ศ. 2525-2532 พบซีโรทัยป์ Inaba และระยะสุดท้าย พ.ศ. 2533-2539 พบซีโรทัยป์ Ogawa มากที่สุด (กรองแก้ว สุภวัฒน์ และศรีวรรณ หัตยานานนท์, 2540) และในปี พ.ศ. 2543 พบซีโรทัยป์ Ogawa เริ่มลดลง ในเขตพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย ตั้งแต่เดือน มกราคม – 31 ตุลาคม พ.ศ. 2543 โดยพบซีโรทัยป์ Ogawa เพียง ร้อยละ 17.07 ขณะที่พบซีโรทัยป์ Inaba ถึงร้อยละ 82.93 (ศิริชัย วงศ์วัฒน์ไพบุลย์และสมาน สุขุมภูจินนท์, 2544) เป็นที่ทราบกันดีว่า มักจะเกิดการระบาดใหญ่ของอหิวตตกโรค ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะติดตามช่วงระยะเวลาของการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ เพื่อดูว่าการปรากฏตัวของแต่ละซีโรทัยป์ กินเวลานานเท่าไร และแต่ละซีโรทัยป์มีความแตกต่างกันในระดับโมเลกุลอย่างไร



รูปที่ 1.9 ซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. cholerae* O1 ที่ตรวจพบ พ.ศ. 2532-2541  
(ธวัช จายนีโยธินและคณะ, 2542)

### 1.2.5 ความไวต่อยาต้านจุลชีพ

การดื้อยาของเชื้อ *V. cholerae* ในอดีตพบได้ค่อนข้างน้อย สามารถใช้ยาต้านจุลชีพที่ใช้ทั่วไปได้ แต่ในปี ค.ศ.1979 พบว่า *V. cholerae* O1 ที่ระบาดในเมือง Matlab ประเทศบังคลาเทศ ร้อยละ 16.7 เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 5 ชนิด ได้แก่ tetracycline, ampicillin, kanamycin, streptomycin และ trimethoprim-sulfamethoxazole (Glass *et al.*, 1980; Glass *et al.*, 1983) ในปี ค.ศ. 1986 พบ *V. cholerae* O1 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในเมือง Dhaka ประเทศอินเดียมีความไวต่อ tetracycline, streptomycin, chloramphenicol, amoxicillin หรือ nalidixic acid (Nakasone *et al.*, 1987) และในระหว่างปี ค.ศ. 1988-1989 biotype Classical ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากบังคลาเทศ จะดื้อต่อ tetracycline ยกเว้น biotype El Tor (Siddique *et al.*, 1989) แต่ในปี ค.ศ. 1991 เริ่มพบ biotype El Tor ดื้อต่อ tetracycline (Siddique *et al.*, 1992) และในปี ค.ศ. 1995 พื้นที่ทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย มีรายงานการพบ *V. cholerae* O1 ที่ดื้อต่อ nalidixic acid (Jesudason and Saaya, 1997) ในประเทศแอฟริกา ช่วงปี ค.ศ. 1994-1996 ร้อยละ 80-100 ของเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้จากประเทศเคนยา และ ซูดาน และ ร้อยละ 65-90 ของเชื้อที่แยกได้ในประเทศโซมาเลีย จะมีความไวต่อ tetracycline ขณะที่ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จาก แทนซาเนีย และ รวันดา จะดื้อต่อยาชนิดนี้ นอกจากนี้ในแถบเคนยา และ โซมาเลีย ยังพบเชื้อที่ดื้อต่อ chloramphenicol และ co-trimoxazole เพิ่มจากร้อยละ 15 ในปี ค.ศ. 1994 จนมากกว่า ร้อยละ 90 ในปี ค.ศ. 1996 (Materu *et al.*, 1997) ส่วน *V. cholerae* O139 ที่เริ่มระบาดระหว่างปี ค.ศ. 1992-1993 ในพื้นที่แถบบังคลาเทศ พบว่ายังไวต่อ tetracycline ถึงแม้ว่ามีแนวโน้มที่จะดื้อต่อ trimethoprim-sulfamethoxazole แต่เชื้อยังมีความไวต่อ ampicillin และ tetracycline มากกว่า *V. cholerae* O1 (Albert *et al.*, 1993; Sciortina *et al.*, 1996) จากการศึกษาพบว่ารูปแบบการดื้อยาของเชื้อที่ต่างกันนั้นขึ้นกับช่วงระยะเวลาและพื้นที่การระบาด ((Faruque *et al.*, 1998a)

ในประเทศไทยความไวของ *V. cholerae* O1 ต่อยาต้านจุลชีพตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 ถึง พ.ศ. 2534 พบว่าเชื้อดื้อต่อยาหลายชนิด ได้แก่ trimethoprim-sulfametroxazole, tetracycline, chloramphenicol, kanamycin, penicillin และ streptomycin และอัตราการดื้อยารูปแบบนี้เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2 ในปี พ.ศ. 2522 เป็นร้อยละ 9.6 ในปี พ.ศ. 2525 และ

ลดลงเหลือร้อยละ 1.3 ในปี พ.ศ. 2534 *V. cholerae* O1 ที่คือต่อ trimethoprim-sulfamethoxazole เพียงชนิดเดียวพบร้อยละ 0.1 ในปี พ.ศ. 2533 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 52 ในปี 2535 จากนั้นลดลงเรื่อยๆ ถึงร้อยละ 0.6 ในปี พ.ศ. 2537 (กองพยาธิวิทยาคลินิก, 2538) การศึกษา *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa ที่แยกจากหอผู้ป่วยกุมารเวชกรรมโรงพยาบาลสมุทรสงคราม ในปี พ.ศ. 2525 พบเชื้อคือต่อยาหลายชนิด ได้แก่ tetracycline, ampicillin, colistin, neomycin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, travomyacin และ kanamycin (สมศักดิ์ วัฒนาศรี, 2525) ส่วนทางภาคใต้ของประเทศไทย *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa ที่แยกได้จากผู้ป่วย ระหว่างปี พ.ศ. 2539-2540 ทุกสายพันธุ์คือต่อยา tetracycline (Kondo *et al.*, 2001) สำหรับ *V. cholerae* O139 จากการศึกษาเชื้อที่แยกได้ 143 และ 753 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2536 และ 2537 ตามลำดับ พบเชื้อที่คือต่อ co-trimoxazole ในอัตราที่เท่ากันคือ ร้อยละ 98 ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศอินเดียและบังกลาเทศ นอกจากนี้ยังพบ *V. cholerae* O139 มีอัตราการคือต่อยา ampicillin, chloramphenicol, doxycycline, erythromycin และ tetracycline ร้อยละ 2.8, 5.8, 1.2, 0.7 และ 0.13 ตามลำดับ (มยุรา กุสุมภ์, 2538) การศึกษาเปรียบเทียบความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *V. cholerae* O139 และ *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa จากเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2537 พบว่าทุกสายพันธุ์ของเชื้อทั้งสองกลุ่มมีความไวต่อ chloramphenicol, nalidixic acid, tetracycline, doxycycline และ cefoxitin ร้อยละ 100 ขณะที่ *V. cholerae* O139 ร้อยละ 3 และ *V. cholerae* O1 ร้อยละ 1 จะคือต่อ ampicillin และทั้งสองกลุ่มยังพบว่าคือต่อ erythromycin ร้อยละ 1 เท่ากันด้วย (ปริศนา และคณะ, 2540)

ปัจจุบันพบเชื้อ *V. cholerae* คือต่อยาด้านจุลชีพหลายชนิดเพิ่มมากขึ้นในแต่ละพื้นที่ทั่วโลก มีรายงานการค้นพบ transposon ขนาด 62 กิโลเบส ซึ่งคล้ายกับ SXT element ที่มีจีนคือต่อ sulfamethoxazole, trimethoprim และ streptomycin ใน *V. cholerae* O139 (Waldor *et al.*, 1996b) และ SXT element สามารถถ่ายทอดมายัง *V. cholerae* O1 และ *E. coli* ได้ โดยการสอดแทรกลงในตำแหน่งจำเพาะที่เรียกว่า *recA* independent manner นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบพลาสมิด ขนาด 100 เมกะดาลต์ล จาก *V. cholerae* O1 El Tor ซึ่งแยกได้จากประเทศไทย พลาสมิดดังกล่าวมีจีนคือต่อยาหลายชนิด ได้แก่

ampicillin, chloramphenicol, colistin, neomycin, kanamycin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole และ tetracycline (Tabtieng *et al.*, 1989) และเชื้อจากแพนชานีเย มีการค้นพบพลาสมิดใน *V. cholerae* O1 El Tor 2 สายพันธุ์ ที่คือต่อ sulphamethoxazole, ampicillin, streptomycin, chloramphenicol, tetracycline และ trimethoprim (Young and Amyes, 1986) นอกจากนี้ยังพบจีนคือยابนพลาสมิดที่แยกได้จาก *V. cholerae* O139 ในประเทศอินเดีย (Yamamoto *et al.*, 1995) และมีการพบ Class 1 integron ซึ่งเป็นกลุ่มของจีนคือยาซึ่ง ได้แก่ gentamicin, kanamycin, tobramycin, streptomycin, spectinomycin, B-lactams และ trimethoprim ใน *V. cholerae* ที่แยกได้จากประเทศไทย (Dalsgaard *et al.*, 2000a) เวียตนาม (Dalsgaard *et al.*, 1999a) กินี-บิสเซา (Guinea-Bissau) (Dalsgaard *et al.*, 2000b) อิตาลี และ แอลเบเนีย (Falbo *et al.*, 1999) กลุ่มจีนดังกล่าวสามารถถ่ายทอดจาก *V. cholerae* ตัวหนึ่ง ไปยัง *V. cholerae* อีกตัวหนึ่งได้ พบจีนนี้ได้ทั้งใน *V. cholerae* O1 และ non-O1/non-O139 แต่ยังไม่มียางานว่าพบใน *V. cholerae* O139 (Dalsgaard *et al.*, 2000a) จะเห็นว่าแบบแผนการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะของ *V. cholerae* มีความแตกต่างกันในแต่ละของช่วงเวลาของการระบาด จึงน่าจะมีการศึกษาหาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงนี้ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและเฝ้าระวังไม่ให้มีการคือยาของเชื้อเพิ่มมากขึ้น

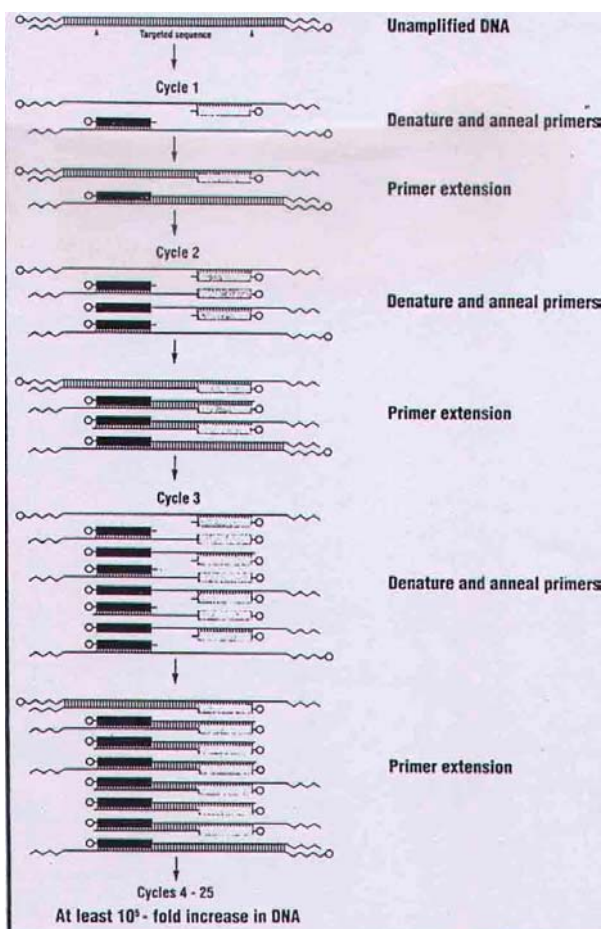
### 1.2.6 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR)

ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ In vitro enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณจีน (gene) หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี ค.ศ. 1983 โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติ ของกระบวนการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ในหลอดทดลอง อาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น โดยอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ หรือ primer จับเข้ากับดีเอ็นเอต้นแบบ และมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยต่อสายดีเอ็นเอ โดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น เมื่อทำเช่นนี้หลายๆ

รอบ จะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นองค์ประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา, primer ซึ่งเป็น oligonucleotide ท่อนสั้นๆขนาดประมาณ 18-30, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), Thermostable DNA polymerase และ Buffer ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ ออกเป็นเส้นเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่มีเบสคู่สม โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำกว่าค่าอุณหภูมิแยกตัว (temperature melting;  $T_m$ ) ของ primer ประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส
3. Extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับเบสเข้าที่ปลาย 3' ของ primer และมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase ซึ่งอุณหภูมิปกติประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ โดยจำนวนผลผลิต (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ  $2^n$  ( $n$ =จำนวนรอบ) (รูปที่ 1.10) จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตโดย นำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกตามขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน จากนั้นย้อมยีนดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุตราไวโอเลต (วัชร อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ, 2536)



รูปที่ 1.10 ไคอะแกรมแสดงปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

(Polymeras chain reaction; PCR)

(วัชร อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ, 2536)

### 1.2.7 Multiplex PCR

multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากเทคนิค PCR พื้นฐาน โดยให้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอหลายๆ ตำแหน่ง ด้วย primer หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่ง primer แต่ละคู่ต้องออกแบบให้มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สม (complementary) กัน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ต้องมีขนาดความยาวแตกต่างกัน เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เหล่านั้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis ได้ ข้อสำคัญสำหรับเทคนิค multiplex PCR ก็คือต้องปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ให้สามารถเพิ่มขยาย



ทุกๆ ตำแหน่งที่ต้องการบนดีเอ็นเอต้นแบบ วิธีนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหา DNA deletion, ตรวจหา mutant alleles หรือใช้ศึกษา DNA polymorphism

### 1.2.8 Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)

Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) หรือ Random Amplified Polymorphic of DNA (RAPD) เป็นเทคนิคการศึกษาความผันแปรดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR เพื่อให้ได้ genome fingerprints โดยการใช้ primer ขนาดสั้นๆ ประมาณ 10 bp และเป็นชนิดสุ่ม (random primers หรือ universal primers) ซึ่งการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ต้องทำให้สภาวะ low stringency คือ มีอุณหภูมิ annealing ต่ำอยู่ในช่วง 36-45 องศาเซลเซียส และมีปริมาณของ  $MgCl_2$  มากกว่าหรือเท่ากับ 2 mM ซึ่งทำให้ primer สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งสองสายได้หลายตำแหน่ง และถ้าสิ่งมีชีวิตนั้นมีการเรียงตัวของเบสในจีโนมที่ต่างกัน รูปแบบของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นส่วนได้ก็จะแตกต่างกันด้วย คล้าย fingerprints ซึ่งผลผลิตที่ได้สามารถตรวจสอบได้โดยการทำ electrophoresis

ข้อดีของ AP-PCR คือ ทำได้ง่าย ได้ผลรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อหรือสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน และไม่จำเป็นต้องนำเอาผลผลิต PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถดูผลจากรูปแบบของดีเอ็นเอได้ด้วยวิธี electrophoresis แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดในด้านความไวในการตรวจหา และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา และการแยก electrophoresis อาจไม่แน่นอน แปรผันตามการทดลองแต่ละครั้ง และแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้บางครั้งแปลผลได้ยาก โดยเฉพาะเมื่อต้องการเปรียบเทียบในแต่ละสายพันธุ์ ที่ต่างการทดสอบ ดังนั้นในแต่ละขั้นตอนการทดสอบควรทำโดยบุคคลเดียวกัน รวมทั้งสภาวะการทดสอบแต่ละครั้งต้องใกล้เคียงกันที่สุด

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม และผู้ป่วย
2. เพื่อศึกษาจีนที่สำคัญในการก่อโรคของ *V. cholerae* ด้วยวิธี PCR และ multiplex PCR
3. เพื่อศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *V. cholerae* ทั้งที่แยกจากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย โดยวิธี AP-PCR
4. เพื่อเปรียบเทียบความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *V. cholerae* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย