รายงานการวิจัย

เรื่อง

การตรวจหา *Vibrio Cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus*

ในบริเวณทะเลสาบสงขลา

Investigation of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*

from Songkhla Lake

โดย

ผศ.นวลจิรา ภัทรรังรอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผศ.ศิโรช จิตต์สุรงค์

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปี 2538

เลขหมู่ SK [illegible]

Bib Key 211134

[illegible] 2 ส.ค. 2544

บทคัดย่อ

การตรวจการหาเชื้อ *Vibrio cholerae* 01,*V.cholerae* 0139, *V.cholerae* non - 01 และ *V.parahaemolyticus* บริเวณทะเลสาบสงขลา ในเขตอำเภอเมือง, อำเภอหาดใหญ่ และอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา ในช่วงเดือน กรกฎาคม - พฤศจิกายน พ.ศ. 2538 โดยใช้วิธี Moore swab และวิธีเก็บตัวอย่างน้ำโดยการสุ่มเก็บตัวอย่าง จากจุดเก็บรวม 13 จุด จำนวน 64 ตัวอย่าง ปรากฏว่าน้ำในทะเลสาบมี pH อยู่ในช่วง 6.34-8.81 เปอร์เซ็นต์เกลืออยู่ในช่วง 0-3.4 ตรวจไม่พบเชื้อ *V.cholerae* 01 และ *V.cholerae* 0139 แต่ตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* non - 01 คิดเป็นร้อยละ 61.54 โดยวิธีเก็บตัวอย่างน้ำและร้อยละ 53.85 โดยใช้วิธี Moore swab ส่วน *V.parahaemolyticus* ตรวจพบร้อยละ 50 โดยใช้วิธี Moore swab การใช้ Alkaline Peptone Water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับปริมาตร 250 มิลลิลิตรเป็น enrichment broth มีโอกาสตรวจพบเชื้อไม่แตกต่าง และการบ่มเชื้อนาน 6 ชั่วโมงมีโอกาสในการตรวจพบเชื้อไม่แตกต่างกันกับการบ่มนาน 30 ชั่วโมง

Abstract

Vibrio cholerae O1, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* non O1 and *V. parahaemolyticus* were investigated at Songkhla lake from July to November 1995. 64 water samples from 13 locations were studied using Moore swab method compared with collecting water samples directly. Songkhla lake had pH range between 6.34-8.81 and percent salinity in the range of 0-3.4. *V. cholerae* O1 and *V. cholerae* O139 were not found in this studied, but *V. cholerae* non O1 was isolated 61.5% from collecting water and 53.85% by using Moore swab. And *V. parahaemolyticus* was isolated 50% by using Moore swab. Using 100 ml. and 250 ml. of alkaline peptone water as an enrichment broth for cultivation and the duration of incubation at 6 and 30 hours gave no difference in discovering of bacteria.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง รูป และแผนภูมิ	ก
บทนำ	ข
วัตถุประสงค์	ค
การตรวจเอกสาร	1
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	7
ผลการทดลอง	17
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก 1	26
ภาคผนวก 2	28

สารบัญตาราง รูป และแผนภูมิ

		หน้า
ตาราง		
ตารางที่ 1	แสดงการระบาดครั้งใหญ่ของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน	2
ตารางที่ 2	แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* non-O1 ในทะเลสาบสงขลา	18
ตารางที่ 3	แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในทะเลสาบสงขลา	19
รูป		
รูปที่ 1	แสดงแผนที่ทะเลสาบสงขลาและจุดที่เก็บตัวอย่าง	9
รูปที่ 2	แสดงลักษณะ Moore swab	10
แผนภูมิ		
แผนภูมิที่ 1	แสดงการแบ่งกลุ่มเชื้อ *Vibrio cholerae*	5
แผนภูมิที่ 2	แสดงขั้นตอนการตรวจหา *Vibrio cholerae* จากตัวอย่างที่เก็บโดยใช้ Moore swab	14
แผนภูมิที่ 3	แสดงขั้นตอนการตรวจหา *Vibrio cholerae* จากวิธีเก็บตัวอย่างน้ำ	15
แผนภูมิที่ 4	แสดงขั้นตอนการตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* จากตัวอย่างที่เก็บโดยใช้ Moore swab	16

บทนำ

โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน เดิมเรียกว่า "อหิวาตกโรค" มีการระบาดครั้งใหญ่มาแล้ว 7 ครั้ง เชื้อที่เป็นสาเหตุคือ *Vibrio cholerae* O1 biotype classical และ El-Tor[10] ปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันอย่างน้อย 98 ประเทศ[14] สำหรับประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันประปรายเกือบทุกจังหวัด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526-2531 พบผู้ป่วยในอัตรา 0.4-0.9 ต่อประชากร 100,000 คน[18] ในเดือนตุลาคม 2535 มีรายงานผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันเป็นจำนวนมาก ที่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ในเมือง Madras ตอนใต้ของประเทศอินเดีย และแพร่ระบาดเข้าสู่บังคลาเทศในเดือนธันวาคม 2535 อาการของผู้ป่วยเหมือนโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่เกิดจากเชื้อ *V.cholerae* O1 ทุกประการ [3,5,13,18,26,28] สำหรับประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกเมื่อเดือนเมษายน 2536[9] ปัจจุบันมีรายงานพบ *V.cholerae* สายพันธุ์ใหม่ชื่อ *V.cholerae* O139 หรือ Bengal strain ในหลายจังหวัดและในเดือนมีนาคม 2537 ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์พบ *V.cholerae* O139 จากผู้ป่วย 2 ราย [2] จะเห็นได้ว่า *V.cholerae* O139 มีความสำคัญมากขึ้น เพราะทำให้เกิดโรคระบาดรุนแรงเหมือนโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (อหิวาตกโรค) และสามารถแยก *V.cholerae* O139 ได้จากสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะบริเวณผิวน้ำได้ร้อยละ 12 ของตัวอย่างในขณะที่แยกเชื้อ *V.cholerae* O1 biotype El-Tor ได้เพียงร้อยละ 0.025[3,20] เป็นที่น่าวิตกว่า *V.cholerae* O139 อาจเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคท้องร่วงเฉียบพลันทั่วโลกครั้งที่ 8[10]

ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการกระจายของเชื้อ *V.cholerae* O139 ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากบริเวณปากทะเลสาบสงขลา เป็นแหล่งรวมน้ำเสียที่ปล่อยจากแหล่งชุมชนในจังหวัดสงขลา และจังหวัดพัทลุง จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาว่าบริเวณดังกล่าวจะเห็นแหล่งสะสมของเชื้อ *V.cholerae* หรือไม่ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการแพร่กระจายเชื้อ Vibrio ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ซึ่งได้แก่ *V.cholerae* O1,*V.cholerae* O139 *V.cholerae* non O1 และ *V.parahaemolyticus*

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139, *Vibrio cholerae* non - O1 และ *Vibrio parahaemolyticus* ในทะเลสาบสงขลา
2. เพื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ
3. เพื่อเปรียบเทียบปริมาตรของ Alkaline Peptone Water ที่ใช้
4. เพื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ตัวอย่างน้ำ และการใช้ Moore swab ในการเก็บตัวอย่างน้ำ
5. เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำเป็นแนวทางป้องกันโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่มีการระบาด

การตรวจเอกสาร

Vibrio เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนโค้งดูคล้ายสัญลักษณ์ comma ในภาษาอังกฤษ หรือท่อนตรง ติดสีแกรมลบ ไม่มีสปอร์ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ขั้ว 1 เส้น หรือมากกว่า ซึ่งมีปลอกหุ้มด้านนอก (sheath) แบคทีเรียสกุลนี้ ทุก species ให้ปฏิกิริยาออกซิเดสเป็นผลบวก ยกเว้นบางเชื้อที่ให้ผลลบ สามารถสลายไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ เชื้อ *Vibrio* ทนความเป็นด่างได้สูงถึง pH 9.5 ทนกรดได้น้อย ถ้า pH <6.0 เชื้อจะตาย สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสเกิดกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ (ยกเว้น *Vibrio furnissii* และบางสายพันธุ์ของเชื้อ *V.damsela*) เชื้อสกุล Vibrio นี้ไวต่อสาร 0/129 ซึ่งเป็น Vibriostatic agent โซเดียมอิออนกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ พบได้ในน้ำที่มีความเค็มระดับต่าง ๆ พบได้ง่ายในทะเล สิ่งแวดล้อมบริเวณปากน้ำ บนผิวและในลำไส้ของสัตว์ทะเล บางชนิดพบได้ในน้ำจืด แบคทีเรียสกุลนี้มีอยู่ 37 ชนิด ชนิดที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ได้แก่ *V. cholerae*, *V.alginolyticus*, *V.carchariae*, *V.cincinatiensis*, *V.damsela*, *V.fluvialis*, *V.furnissii*, *V.hollisae*, *V.metchnikovii*, *V.mimicus*, *V.vulnificus* และ *V.parahaemolyticus*[1,10]

เชื้อที่ก่อโรคในคนที่สำคัญที่สุดได้แก่ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (อหิวาตกโรค) *V.parahaemolyticus* เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อปนเปื้อนในอาหารทะเล จำพวก กุ้ง หอย ปู ปลา *V. vulnificus* ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีอัตราการตายสูง เชื้อสายพันธุ์อื่นๆ เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่บาดแผล โรคอุจจาระร่วงและโรคที่เกิดนอกระบบทางเดินอาหาร[10,33,34]

โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันเดิมเรียก "อหิวาตกโรค" เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากการเจริญแบ่งตัวของเชื้อ *V.cholerae* O1 ในลำไส้เล็ก และเชื้อสร้างสารพิษออกมาทำปฏิกิริยาต่อเซลล์บุผนังลำไส้เล็ก ทำให้เกิดอาการที่มีลักษณะจำเพาะคือท้องร่วงอย่างมากและอาเจียนเป็นสำคัญ มักไม่มีไข้หรือปวดท้องร่วมด้วย อาจมีอาการเล็กน้อยถึงรุนแรง ระยะฟักตัว 1-3 วัน อุจจาระคล้ายน้ำซาวข้าว ทำให้เสียน้ำและเกลือแร่จากร่างกายอย่างรวดเร็วและรุนแรง ถ้าไม่ได้รับการรักษาทันท่วงที ผู้ป่วยอาจช็อคและถึงแก่กรรมได้ ในรายที่เป็นไม่มากสามารถหายเองได้[1]

โรคอุจจาระร่างเฉียบพลันพบเป็นประจำในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งมีฐานะยากจนขาดแคลนน้ำดื่มที่สะอาด และมีสุขภาพอนามัยไม่ดี บริเวณที่เป็นแหล่งชุกชุมของโรคได้แก่ ภาคตะวันออกของประเทศอินเดียและประเทศบังคลาเทศ โดยเฉพาะเมืองใหญ่ ๆ ได้แก่ กัลกัตตา และธากา เท่าที่มีการบันทึกไว้โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันมีการระบาดครั้งใหญ่ทั่วโลกมาแล้ว 7 ครั้ง (ตารางที่ 1) โดยเริ่มจากปี พ.ศ. 2359 เป็นต้นมา ทำให้มีผู้ป่วยและเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก การระบาด 6 ครั้งแรกเกิดจากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ classical ส่วนการระบาดครั้งล่าสุดเกิดจากสายพันธุ์ El-Tor โดยเริ่มจากปี พ.ศ. 2504 จนถึงปัจจุบัน[10] เชื้อ *V.cholerae* สายพันธุ์ El-Tor ยังมีศักยภาพในการระบาดดังจะเห็นได้จากปี พ.ศ. 2535 ที่ผ่านมา สายพันธุ์ El-Tor ได้ระบาดในทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งมีรายงานจำนวนผู้ป่วยสูงถึง 420,000 รายและมีผู้เสียชีวิต 3,300 ราย ภายในระยะเวลา 15 เดือน[29]

ตารางที่ 1 การระบาดครั้งใหญ่ของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน[10]

ครั้งที่	ปีที่มีการระบาด	ชนิด Biotype	จุดเริ่มต้นของการระบาด
1	2360-2366	Classical	อินเดีย
2	2369-2380	Classical	อินเดีย
3	2389-2405	Classical	อินเดีย
4	2407-2418	Classical	อินเดีย
5	2426-2439	Classical	อินเดีย
6	2442-2466	Classical	อินเดีย
7	2480-2500	El-Tor endemic	หมู่เกาะ Cerebres
8	2504-ปัจจุบัน	El-Tor	อินโดนีเซีย
9	2535-?	O139 ?	อินเดีย

ปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันอย่างน้อย 98 ประเทศ[14] สำหรับประเทศไทย มีรายงานผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันประปรายเกือบทุกจังหวัด กระทรวงสาธารณสุขได้งดรายงานจำนวนผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 เป็นต้นมา อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526-2531 พบผู้ป่วยในอัตรา 0.4-0.9 ต่อประชากร 100,000 ราย[18]

V.cholerae [12,17,33] ทำให้เกิดท้องร่วงเฉียบพลันได้เพราะสร้างสารพิษ (cholera toxin) อย่างไรก็ดีสายพันธุ์ของ *V.cholerae* O1 ที่สร้างสารพิษ ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อมในที่ต่างๆ ของโลก[33] แต่การตรวจหา cholera toxin gene (CT gene) ต้องใช้วิธี gene probe ได้ทดลองใช้วิธีนี้เพื่อตรวจหา CT gene และใช้ศึกษาระบาดวิทยาของ *V.cholerae* O1 ไปพร้อม ๆ กันในประเทศสหรัฐอเมริกา[19] ,ฮ่องกง[35] และออสเตรเลีย[11] ผลจากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น ชี้ให้เห็นว่า สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *V.cholerae* O1 แยกได้จากน้ำ,ของเสีย และอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อสามารถสร้างสารพิษได้[21] มีรายงานการระบาดของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในส่วนต่าง ๆ ของโลก ได้แก่ ประเทศเปรู มีรายงานการระบาดเมื่อเดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2534 ซึ่งเป็นการระบาดครั้งแรกที่เกิดขึ้นในทวีปอเมริกาใต้ ในเวลามากกว่า 100 ปี[7,8,32] โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันได้แพร่กระจายไปยังประเทศอื่นอย่างรวดเร็วทางอาหารและน้ำที่ปนเปื้อน ระหว่างเดือนมกราคมถึงสิงหาคม 2534 มีรายงานคนป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ถึง 10,000 ราย[30] ซึ่งเป็นจำนวนที่สูง และแยกเชื้อ *V.cholerae* O1 ได้บ่อยจากตัวอย่าง น้ำทะเล, น้ำจากแม่น้ำ, ของเสียและแพลงตอน และในเดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2534 เกิดการระบาดของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ร่วมกับผลิตภัณฑ์นำเข้าในประเทศสหรัฐอเมริกา รัฐแมรี่แลนด์ ซึ่งเกิดขึ้นท่ามกลางกลุ่มคนที่จัดงานเลี้ยงส่วนตัว การสืบค้นการระบาดพบว่ามีการติดเชื้อ *V.cholerae* O1 ที่สร้างสารพิษ, biotype El-Tor, serotype Ogawa ใน 4 คน จาก 6 คนที่บริโภคน้ำกะทิที่นำเข้าจากประเทศไทย ซึ่งผลิตโดยบริษัทบางกอกเทรดดิ้ง และองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาได้ตรวจพบ *V.cholerae* O1 ที่สร้างสารพิษ, biotype El-Tor, serotype Ogawa จาก 1 ใน 6 ถุงของน้ำกะทิที่ผนึกเรียบร้อยแล้วยี่ห้อเดียวกัน จากการตรวจสอบขบวนการผลิตในประเทศไทย ที่นำมาซึ่งน้ำกะทิที่ผลิตเพื่อเป็นสินค้าส่งออกแสดงให้เห็นถึงสุขอนามัยที่ไม่ดีอย่างมาก ดังนั้นการปนเปื้อนจึงเกิดระหว่างขบวนการผลิต เป็นสาเหตุของการระบาด

ดังกล่าวในสหรัฐอเมริกา[31] ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2535 มีรายงานผู้ป่วย มีอาการท้องร่วงเฉียบพลัน เป็นจำนวนมาก ที่เกิดจากเชื้ออหิวาตกโรค สายพันธุ์ใหม่ในเมือง Madras ประเทศอินเดียตอนใต้ ซึ่งมีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว และแพร่กระจายเข้าสู่ประเทศบังคลาเทศ ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2535[3,5,13,18,26,28] และทำการแยกเชื้อจาก สระน้ำ, ทะเลสาบ, แม่น้ำในประเทศบังคลาเทศตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงสิ้นเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2536 เป็นจำนวน 92 ตัวอย่าง พบเชื้อ *V.cholerae* O139 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 12% และ พบ *V.cholerae* O1 biotype El-Tor, serotype Ogawa 1% ตัวอย่างน้ำทั้ง 11 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ *V.cholerae* O139 มีคุณสมบัติเหมือน *V.cholerae* O139 ที่แยกจากคนไข้ตามรายงานที่เคยมีมาก่อน[3] *V.cholerae* O1 ที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน เคยเป็นกลุ่มเด่นมาก่อนในโรคติดเชื้อที่มาจากน้ำในบังคลาเทศ *V.cholerae* O1 สามารถแยกได้ 0.025% จากผิวน้ำตัวอย่างที่เก็บมาจากบริเวณที่เป็นแหล่งชุกชุมของโรค[20] และมักแยกจากตัวอย่างน้ำได้น้อยกว่า 1% ระหว่างที่มีการระบาด[34] แต่ในทางตรงข้าม *V.cholerae* O139 ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำถึง 12% ให้ผลบวกสำหรับการสร้างสารพิษ 100% จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ *V.cholerae* O139 ในการทำให้เกิดการระบาด และสามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า *V.cholerae* O1 เนื่องมาจากการมีเชื้อ *V.cholerae* O1 เหลืออยู่ในจำนวนที่น้อยกว่าระหว่างการระบาด

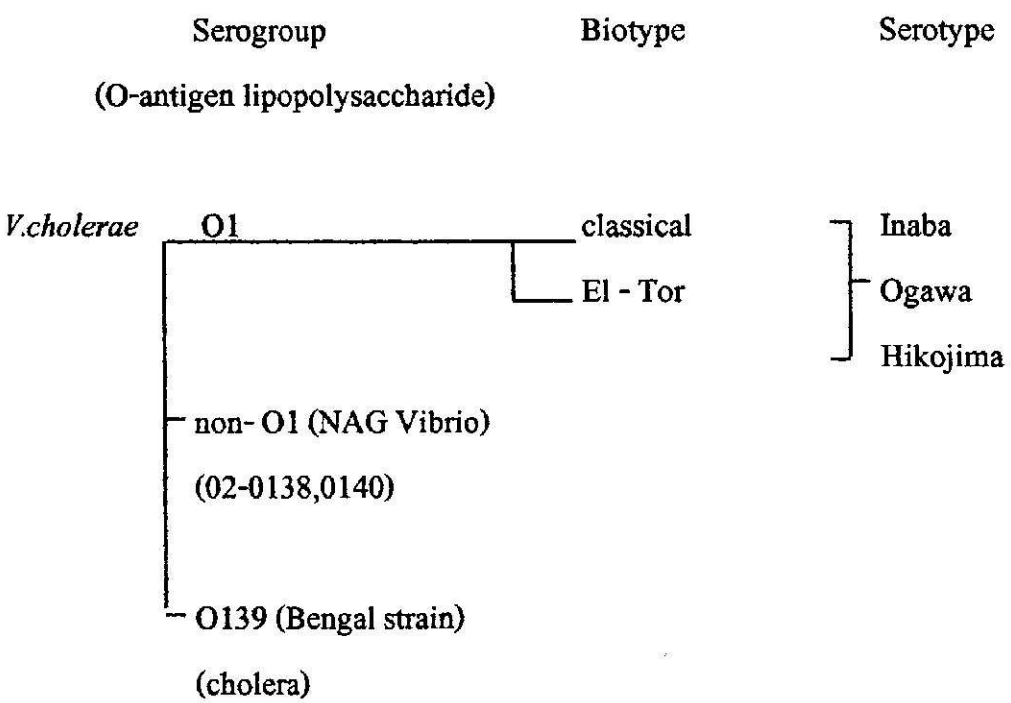
ในประเทศไทย มีรายงานการระบาดของ *V.cholerae* O139 เป็นครั้งแรกในเดือนเมษายน พ.ศ. 2536[9] ที่โรงพยาบาลในจังหวัดนนทบุรี ซึ่งเป็นเขตกรุงเทพมหานคร และทำการแยกเชื้อ *V.cholerae* non -O1 ตั้งแต่เดือนเมษายน ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2536 ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ มี 9 สายพันธุ์ที่มีการเกาะกลุ่มกับ O139 antiserum แสดงให้เห็นว่า *V.cholerae* O139 เป็นกลุ่มใหญ่ท่ามกลาง *V.cholerae* non-O1 ที่แยกจากโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และนี่คือรายงานครั้งแรกของการแพร่เชื้อ *V.cholerae* O139 นอกประเทศอินเดียและบังคลาเทศ การปรากฏของ *V.cholerae* O139 ในกรุงเทพมหานครในช่วงระยะเวลาไม่ถึง 1 ปี ตั้งแต่มีการบันทึกครั้งแรกของ *V.cholerae* O139 ระบาดใน Madras ประเทศอินเดียตอนใต้ ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2535[13] จากสถิติที่มีการระบาดในกรุงเทพมหานครเมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2536[9] เป็นแนวทางในการสำรวจหา *V. cholerae* สายพันธุ์ใหม่ได้เริ่มขึ้นที่ 3 โรงพยาบาล ได้แก่ โรงพยาบาลสมุทรสาครจ.สมุทรสาคร, โรงพยาบาลเด็กในกรุงเทพมหานคร

และโรงพยาบาลสวนผึ้ง บริเวณชายแดนไทย-พม่า ในช่วงปี พ.ศ. 2536-2537 พบว่ามีการติดเชื้อ *V.cholerae* O139 เพิ่มขึ้น[6] ปัจจุบันมีรายงานพบเชื้อนี้หลายจังหวัดของประเทศไทยและในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2537 ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จ.สงขลา พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่จำนวน 2 ราย เชื้อสายพันธุ์นี้เรียกว่า Bengal strain หรือ *Vibrio cholerae* O139[2]

ในอดีตที่ผ่านมา เชื้อ *V.cholerae* non -O1 ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *V.cholerae* O139 ไม่ได้รับความสนใจในทางการแพทย์ แต่ปัจจุบันพบว่า เชื้อ *V.cholerae* non - O1 มีการสร้างสารพิษ (cholera toxin) เหมือน *V.cholerae* O1 ทำให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรงพอๆกับ classical cholera และจากการนำเชื้อ *V.cholerae* non- O1 ที่แยกจากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงและจากสิ่งแวดล้อมในเอเชียและเปรู เชื้อ มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ อย่างน้อย 1 ชนิด และ 80% ของเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดหรือมากกว่า และสายพันธุ์ส่วนใหญ่จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดหรือมากกว่า[23] ดังนั้นวงการแพทย์ในปัจจุบันหันมาสนใจ *V.cholerae* non-O1 กันมากขึ้น

เชื้อ *V.cholerae* แบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของโครงสร้าง O antigen (lipopolysaccharide) ได้ประมาณ 140 serogroup[27] (แผนภูมิที่ 1)

แผนภูมิที่ 1 แสดงการแบ่งกลุ่มของเชื้อ *Vibrio cholerae*



เชื้อ serogroup O1 สามารถสร้างสารพิษ และแพร่ระบาดได้กว้างขวางส่วนเชื้อที่เหลือ เรียกว่า *V.cholerae* non- O1 หรือ non - agglutinated vibrio (NAG) สามารถแยกสายพันธุ์ non- O1 ได้ทั้งจากสิ่งส่งตรวจจากมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สายพันธุ์ที่มีรายงานการติดเชื้อในมนุษย์ ได้แก่ O7, O11, O14, O39 และ O97[22] เชื้อ *V.cholerae* O139 มีรูปร่าง และสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับเชื้อ O1 นอกจากนั้นยังตรวจพบ choleratoxin (CT) gene ใน *V.cholerae* O139 ซึ่งมีลำดับของ nucleotide เหมือนกับของเชื้อ *V.cholerae* O1 สายพันธุ์ El-Tor[15] ถึงแม้ว่าจะมี O antigen ที่ต่างกัน เชื้อ *V.cholerae* O139 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ El-Tor biotype มากกว่า classical โดยดูจากผลบวกปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของไก่และการดื้อต่อยา polymyxin B[25]

Vibrio parahaemolyticus

V. parahaemolyticus ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน พบระบาดครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2493 เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลแบบสุก ๆ ดิบ ๆ พบผู้ป่วยได้ทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2513 แหล่งที่อยู่ในธรรมชาติคือในน้ำทะเล สัตว์ทะเล ทรายริมทะเล

ลักษณะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* บน TCBS agar ให้โคโลนีสีเขียว กลม นูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (peptone water) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (3-8%) ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือ ซึ่งแตกต่างจาก *V.cholerae* การก่อโรคเกิดจาก เชื้อสร้างสารพิษ ระยะฟักตัวของโรคนาน 2-3 วัน พบระบาดทั่วไปในประเทศไทยพบผู้ป่วยจากเชื้อนี้ตลอดปี[1]

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (petridish)
2. หลอดทดลอง (test tube)
3. ฟลาสก์ขนาด 1000,500,250 มิลลิลิตร
4. ปิเปต ขนาด 1,5,10 มิลลิลิตร
5. หลอดฝาเกลียว
6. ตู้อบเชื้อ (incubator) ที่ 35°c
7. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot - air oven)
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
9. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
10. เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
11. ปีกเกอร์
12. ปากคีบและกรรไกร
13. แอลกอฮอล์ 70% และ 95%
14. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
15. Moore swab ขนาด 90x15 เซนติเมตร
16. กล่องโฟม
17. ถุงพลาสติกขนาด 5x8 นิ้ว และ 7x12 นิ้ว
18. ยางรัดของ
19. น้ำแข็ง
20. กระบอกตักน้ำ
21. คันเบ็ด
22. เชือกไนลอน

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)
2. Alkaline Peptone Water (APW)
3. Nutrient Agar (NA)
4. Nutrient Broth (NB)
5. Motility Indole Ornithine (MIO)
6. Kligler Iron Agar (KIA)

สารเคมีที่ใช้

- reagent ทดสอบ ออกซิเดส (1% tetramethyl-*p*-phenylenediaminedihydrochloride)
- Kovacs' reagent สำหรับทดสอบอินโดล

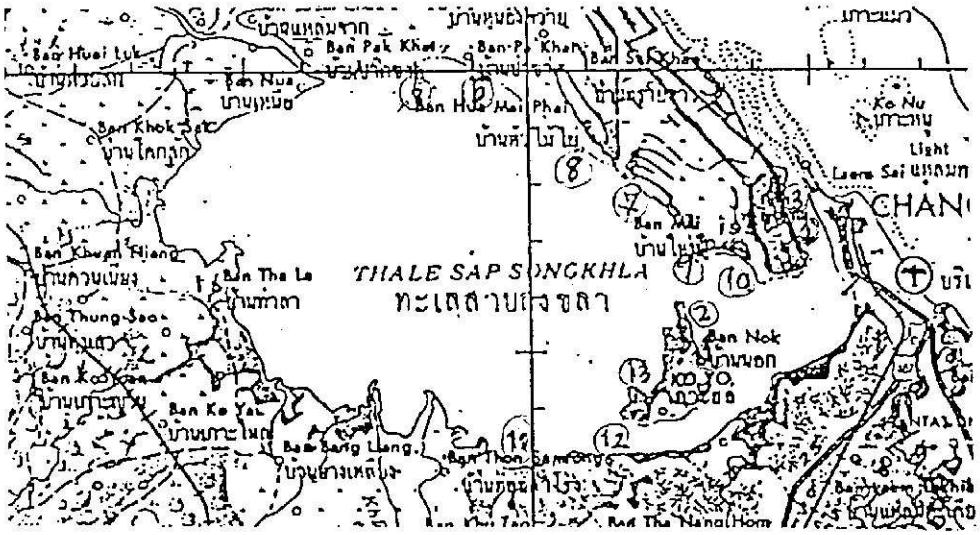
ซีรัมที่ใช้ทดสอบ serogroup และ serotype ของ *V.cholerae*

- antiserum : anti O1 antibody
  anti O139 antibody
  anti Ogawa antibody
  anti Inaba antibody

วิธีการทดลอง

สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณรอบ ๆ ทะเลสาบสงขลา ในเขตอำเภอเมืองสงขลา อำเภอหาดใหญ่ และอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา จุดสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 13 จุด รวม 64 ตัวอย่าง โดยเก็บตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงพฤศจิกายน 2538



รูปที่ 1 : แสดงแผนที่ทะเลสาบสงขลา และจุดเก็บตัวอย่าง

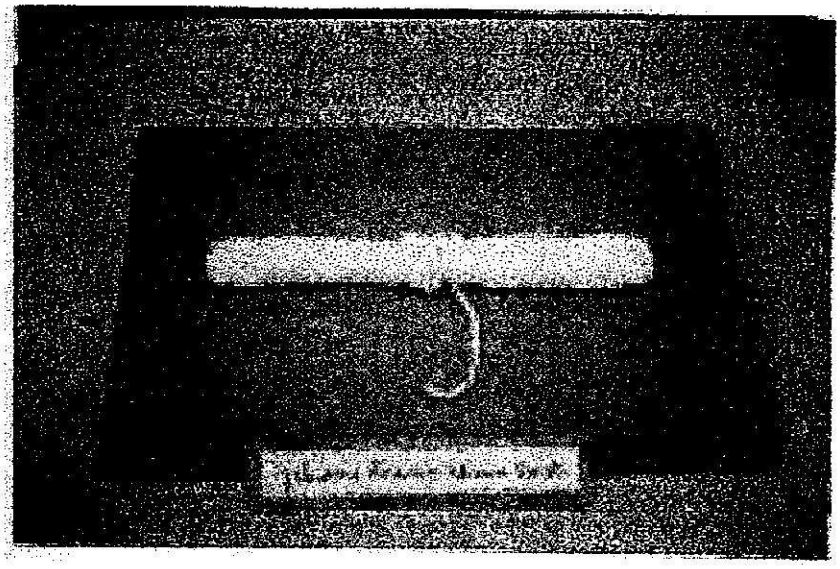
การเลือกจุดเก็บตัวอย่าง

ในการเลือกจุดเก็บตัวอย่าง บริเวณรอบ ๆ ทะเลสาบสงขลา จะเลือกสุ่มเก็บบริเวณที่เป็นแหล่งชุมชน มีผู้คนอาศัยอยู่หนาแน่น เพราะเป็นแหล่งที่มีโอกาสปนเปื้อนได้สูง และเลือกบริเวณปากทะเลสาบเพราะเป็นแหล่งสะสมของสิ่งสกปรกทั้งหลายจากบ้านเรือนและชุมชน ซึ่งการเก็บตัวอย่างน้ำทั้ง 2 วิธี คือ ใช้ Moore swab และการใช้การเก็บตัวอย่างน้ำ

อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง

- Moore swab

วิธีเตรียม : นำผ้าก๊อซ ขนาดกว้าง 15 เซนติเมตร ยาว 90 เซนติเมตร (15x90) (WHO) ม้วนให้แน่นเป็นรูปทรงกระบอก เสร็จแล้วนำมาผูกกับเชือกด้ายดิบแล้วนำไปห่อกระดาษสีน้ำตาล เพื่อนำเข้าอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นนำไปทำให้แห้งใน Hot-air oven ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง



รูปที่ 2 : แสดงลักษณะ Moore swab

ด้ามเบ็ดและเชือกไนลอน ยาวประมาณ 1 เมตร

ถุงพลาสติก ขนาด 5x8 นิ้ว สำหรับใส่ Moore swab ที่ซึมซับน้ำไว้แล้ว

ถุงพลาสติก ขนาด 7x12 นิ้ว สำหรับใส่ตัวอย่างน้ำปริมาตร 450 มิลลิลิตร

กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง สำหรับแช่ Moore swab และตัวอย่างน้ำ เพื่อส่งห้องปฏิบัติการ

การเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณทะเลสาบสงขลา

เก็บตัวอย่างน้ำ ณ จุดต่าง ๆ ที่กำหนดไว้ โดยนำ Moore swab ที่ผูกติดกับเชือกไนลอนที่คันเบ็ด ปักไว้ให้มั่นคง โดยกำหนดระยะห่างจากชายฝั่งทะเลประมาณ 1 เมตร แล้วหย่อนเชือกลงให้ Moore swab อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าผิวน้ำประมาณ 10 เซนติเมตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง[23] เก็บจุดละ 3 ตัวอย่าง เมื่อครบกำหนดเวลาที่กำหนดไว้ นำ Moore swab ที่ซึมซับน้ำไว้แล้วมาใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงด้วยยางรัดนำไปแช่ทันทีในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง

เก็บตัวอย่างน้ำโดยวิธีเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 450 มิลลิลิตรใส่ถุงพลาสติก แล้วใช้ยางรัดปากถุง นำไปแช่ทันทีในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง นำส่งห้องปฏิบัติการพร้อมกับ Moore swab

วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างที่เก็บโดยใช้ Moore swab 2 ตัวอย่าง ใส่ในฟลาสก์ที่มี Alkaline Peptone Water (APW) (ภาคผนวก) ปริมาตร 250 และ 100 มิลลิลิตร โดยวิธี Aseptic technique บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง นำมาแยกเชื้อโดยแบ่งเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ทำการ streak บน TCBS Agar (ภาคผนวก) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีเหลือง plate ละ 5 โคโลนี มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี สำหรับ *V.cholerae*

การทดลองที่ 2 ดูดส่วนผสม 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มี double strenght APW (ภาคผนวก) 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว streak บน TCBS Agar ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว ที่มีสีเหลือง plate ละ 5 โคโลนี มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี สำหรับ *V.cholerae*

2. Moore swab ที่เหลืออีก 1 ตัวอย่าง นำมาใส่ในถุงฟลาสก์ที่มี APW +4% NaCl (ภาคผนวก) โดยวิธี Aseptic technique บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง streak บน TCBS Agar ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เลือกโคโลนีเดียวที่มีสีเขียว plate ละ 5 โคโลนี มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี สำหรับ *V.parahaemolyticus*

3. ตัวอย่างน้ำที่เก็บโดยวิธีเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 450 มิลลิลิตร นำมาใส่ใน concentrated APW ความเข้มข้น 10 เท่า (ภาคผนวก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดูดส่วนผสม 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี APW ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ streak บน TCBS Agar ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีเหลือง plate ละ 5 โคโลนี มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีสำหรับ *V.cholerae*

4. การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test)

นำโคโลนีเดี่ยวที่มีสีเหลือง และสีเขียว มาทดสอบทางชีวเคมี ดังขั้นตอนต่อไปนี้

4.1 ทดสอบการหมักน้ำตาล บนอาหาร Kligler Iron Agar (KIA) (ภาคผนวก) ใช้วิธีการ streak บนผิวเอียง และแทงจนถึงก้นหลอด จากนั้นนำไปบ่มที่เชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่ง Genus *Vibrio* จะให้ผลดังนี้ คือ Alkaline slant, Acid butt, no gas, no H_2S (K/A)

4.2 ทดสอบออกซิเดส ใช้ reagent สำหรับทดสอบออกซิเดส (ภาคผนวก) หยดลงบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 2 หยด เขี่ยเชื้อจาก KIA ทดสอบบนกระดาษกรอง เชื้อส่วนใหญ่ใน Genus *Vibrio* จะให้ผลบวก คือ จะเปลี่ยนสีกระดาษกรองเป็นสีน้ำเงิน (Wursters'Blue)

4.3 ทดสอบการเคลื่อนที่, การเปลี่ยนทริปโตเฟนเป็นอินโดลและการมีเอนไซม์ ornithine decarboxylase บนอาหาร MIO medium (ภาคผนวก)

เขี่ยเชื้อจาก KIA แล้วใช้วิธีการ stab ลงไปในอาหาร MIO medium บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ผลบวกจะให้ผลดังนี้

- การเคลื่อนที่ ผลบวกคือ อาหารขุ่นทั้งหลอด

- การเปลี่ยนทริปโตเฟนเป็นอินโดล โดยหยด Kovacs'reagent 4-5 หยด ผลบวกจะให้วงแหวนสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

- การมีเอนไซม์ ornithine decarboxylase ผลบวกจะให้อาหารมีสีม่วงขุ่น

4.4 ทดสอบการเจริญใน Nutrient Broth (NB) เพื่อทดสอบการเจริญ บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ผลบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นทั้งหลอด

5. การทดสอบทางซีรัมวิทยา (serology) ของเชื้อ *V.cholerae*

นำเชื้อที่เทียบเคียงแล้วว่าเป็น *V.cholerae* มาทดสอบกับ anti O1 antibody บน slide แล้วดูการเกาะกลุ่ม (Agglutination) หากเชื้อเกิดการเกาะกลุ่ม กับ anti O1 antibody แสดงว่าเป็น *V.cholerae* O1 แต่ถ้าหากเชื้อไม่เกาะกลุ่ม กับ anti O1 antibody แสดงว่าเป็นเชื้อ *V.cholerae* non- O1 นำไปทดสอบกับ anti O139 antibody หากเชื้อเกาะกลุ่มแสดงว่าเป็นเชื้อ *V.cholerae* O139 แต่ถ้าไม่เกาะกลุ่ม จัดเป็น *V.cholerae* non- O1 ตัวอื่นที่ไม่ใช่ *V.cholerae* O139

6. การทดสอบการเจริญใน Nutrient Broth ที่มีเกลือที่เปอร์เซนต์ต่าง ๆ ของเชื้อ *V.parahaemolyticus*

ถ่ายเชื้อจาก KIA ลงในอาหาร NB ที่มีเกลือ 1%, 8%, 10% บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญของเชื้อที่เปอร์เซนต์เกลือต่าง ๆ ซึ่งผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น *V.parahaemolyticus* เจริญได้ดีที่มีเกลือ 1% เจริญได้ปานกลางที่มีเกลือ 8% และเจริญได้เล็กน้อยหรือไม่เจริญเลยที่มีเกลือ 10%

Moore swab 2 ชิ้นต่อจุดเก็บ 1 จุด

แช่น้ำไว้ 36-48 ชั่วโมง

↓ ดึงขึ้นมาใส่ถุงพลาสติก รัดปากถุง แล้วแช่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง

↓

นำมาใส่ใน flask ที่มี 100 ml และ 250 ml APW

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 6-8 ชั่วโมง

streak บน TCBS Agar ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 24 ชั่วโมง

เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีเหลือง plate ละ 5 โคโลนี

↓

ถ่ายเชื้อลง KIA

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

ดูผล Alkaline slant Acid butt noGas no H_2S(K/A)

↓

ทดสอบออกซิเดส ให้ผลบวก

NB ที่ไม่มีเกลือ และMIO

↓

บ่มเชื้อที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

↓

NB ขุ่น MIO ให้ผลบวก

↓+++

V.cholerae

↓

scrogrouping

ดูดส่วนผสม 10 ml ลงใน double strenght APW 10 ml

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 24 ชั่วโมง

streak บน TCBS ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 24 ชั่วโมง

เลือกโคโลนีเดี่ยวสีเหลือง plate ละ 5 โคโลนี

↓

ทดสอบทางชีวเคมี

แผนภูมิที่ 2 : แสดงขั้นตอนการตรวจหา *Vibrio cholerae* จากตัวอย่างที่เก็บโดยวิธี Moore swab

ตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 450 ml

↓ ตักมาใส่ถุงใช้ยางรัดปากถุง
แล้วนำไปแช่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง

นำไปใส่ในฟลาสก์ที่มี 50 ml ของ concentrated APW

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 6 ชั่วโมง

ดูดส่วนผสม 2 ml ใส่ลงในหลอดที่มี APW 15 ml

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 24 ชั่วโมง

streak บน TCBS Agar ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 24 ชั่วโมง

เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีเหลือง plate ละ 5 โคโลนี

↓

ทดสอบทางชีวเคมี

แผนภูมิที่ 3 : แสดงขั้นตอนการตรวจหา *V. cholerae* โดยวิธีเก็บตัวอย่างน้ำ

Moore swab 1 ชิ้น ต่อ จุดเก็บ 1 จุด

แช่น้ำไว้ 36-48 ชั่วโมง

↓ ดึงขึ้นมาใส่ถุงพลาสติก ใช้ยางรัดปากถุง แล้วแช่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง

↓

นำไปใส่ใน flask ที่มี 250 APW + 4% NaCl

↓ เขย่าให้เข้ากัน บ่มเชื้อ 35°C 24 ชั่วโมง

streak บน TCBS Agar ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 24 ชั่วโมง

เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีเขียว plate ละ 5 โคโลนี

↓

ถ่ายเชื้อลง KIA

↓ บ่มเชื้อที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

ผล Alkaline slant Acid butt noGas no H_2S (K/A)

↓

ทดสอบออกซิเดส ให้ผลบวก

MIO	และ NB ที่ไม่มีเกลือ	ทดสอบการเจริญใน NB ที่มีเกลือ 1%, 8%, 10%
+++	บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง เชื้อไม่เจริญ	บ่มเชื้อที่ 35°C 18-24 ชั่วโมงเชื้อเจริญ

แผนภูมิที่ 4 : แสดงขั้นตอนการตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* จากตัวอย่างที่เก็บโดยใช้ Moore swab

ผลการทดลอง

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหา *Vibrio cholerae* และ *V.parahaemolyticus* โดยวิธีเก็บตัวอย่างน้ำ และใช้ Moore swab 13 จุด 64 ตัวอย่าง บริเวณทะเลสาบสงขลา ในเขตอำเภอเมือง อำเภอหาดใหญ่ และอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา ระหว่างเดือนกรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2538 ได้ผลการทดลองดังนี้ น้ำในทะเลสาบมี pH อยู่ในช่วง 6.34-8.81 ส่วนเปอร์เซ็นต์เกลืออยู่ในช่วง 0-3.4 ตรวจไม่พบ *Vibrio cholerae* O1 และ *Vibrio cholerae* O139 พบเชื้อ *Vibrio cholerae* non- O1 คิดเป็นร้อยละ 61.54 โดยใช้วิธีเก็บตัวอย่างน้ำ และร้อยละ 53.85 โดยใช้ Moore swab (ตารางที่ 2) สำหรับการตรวจหา *V.parahaemolyticus* ซึ่งเก็บตัวอย่างด้วย Moore swab จำนวน 12 ตัวอย่าง ตรวจพบ *V.parahaemolyticus* คิดเป็นร้อยละ 50 (ตารางที่ 3)

เมื่อทำการเปรียบเทียบโอกาสในการตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* non-O1 ใน Alkaline Peptone Water (APW) ที่มีปริมาตร 100 และ 250 มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ผลปรากฏว่าร้อยละของเชื้อ *Vibrio cholerae* non- O1 ที่ตรวจพบในบริเวณทะเลสาบสงขลาตามจุดเก็บต่าง ๆไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ค่า t-test ($\alpha = 0.05$)

ดังนั้นการแยก *V.cholerae* จากสิ่งแวดล้อมทางน้ำ จึงสามารถใช้ Alkaline Peptone Water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แทน 250 มิลลิลิตร ตามที่องค์การอนามัยโลก (WHO) อนุญาตให้ใช้ทั้ง 2 ปริมาตร และเมื่อทำการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการบ่มเชื้อใน alkaline peptone water (APW) นาน 6 ชั่วโมง กับการบ่มใน alkaline peptone water นาน 6 ชั่วโมง แล้วดูดตัวอย่าง 10 มล. ใส่ใน APW ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 10 มล. แล้วบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมงใน APW เพื่อหาว่าช่วงเวลาในการบ่มนานเท่าใด จึงมีโอกาสตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* non- O1 มากกว่ากัน พบว่าทั้ง 2 วิธีมีโอกาสในการตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* non- O1 มากน้อยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ค่า t-test ($\alpha = 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจเชื้อ *Vibrio cholerae* non - O1 ในทะเลสาบสงขลา

จุดเก็บ	pH		%เกลือ		เก็บตัวอย่างน้ำ		Moore swab APW 100 ml (a)	Moore swab APW 100 ml (b)	Moore swab APW 250 ml (a)	Moore swab APW 250 ml (b)
	1	2	1	2	1	2				
1 เกาะยอ (ม.7)	8.29	7.83	1.2	1.2	+	-	-	-	-	-
2 เกาะยอ (ม.8)	8.03	7.92	1.2	1.2	-	-	-	+	-	-
3 ท่าแพ ชนานยนต์	8.38	8.15	3.4	3.0	-	-	-	-	-	-
4 เขาแดง	8.41	8.16	2.9	3.0	-	-	-	-	-	-
5 ป่าขาด	8.16	8.28	0.4	0.6	+	+	+	+	+	+
6 สทิงหม้อ	8.28	8.81	1.4	1.6	-	+	-	-	-	-
7หัวขี้เหล็ก	7.68	7.48	0.8	0.6	+	+	+	+	+	+
8 หัวไม้ไผ่	8.07	7.59	1.4	1.6	+	+	+	+	+	+
9 บ้านใหม่	7.27	7.66	0.4	0.2	+	+	+	+	+	-
10 ชายหิน	7.47	7.52	0.2	0.2	+	+	+	+	+	+
11 วัดแหลมโพธิ	7.06	7.06	0.2	0.2	+	+	+	+	+	+
12 ท่านางหอม	6.34	6.40	0	0	+	-	-	-	-	-
13 เกาะยอ (สะพาน)	6.58	6.58	0	0	+	-	+	-	+	+
จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ					9	7	7	7	7	6
จำนวนตัวอย่างที่เก็บ					26		13		13	
ร้อยละที่ตรวจพบ					61.54		53.85	53.85	53.85	46.15

1 แทน การเก็บตัวอย่างน้ำครั้งที่ 1

2 แทน การเก็บตัวอย่างน้ำครั้งที่ 2

\+ แทน การพบเชื้อ

\- แทน การไม่พบเชื้อ

a แทน การบ่มเชื้อนาน 6 ชั่วโมง

b แทน หลังจากการบ่มเชื้อนาน 6 ชั่วโมง แล้วบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในทะเลสาบสงขลา

จุดเก็บ	pH	% เกลือ	Moore swab APW (4%) 250 ml
1 เกาะยอ (ม.7)	7.83	1.2	-
2 เกาะยอ (ม.8)	7.92	1.2	-
3 ท่าแพขนานยนต์	8.15	3.0	+
4 เขาแดง	8.16	3.0	+
5 ป่าขาด	8.28	0.6	+
6 สทิงหม้อ	8.81	1.6	+
7 หัวขี้เหล็ก	7.48	0.6	+
8 หัวไม้ไผ่	7.59	1.6	+
9 บ้านใหม่	7.66	0.2	-
10 ชายหิน	7.52	0.2	-
11 วัดแหลมโพธิ	7.06	0.2	-
12 ท่านางหอม	6.40	0	-
จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ			6
จำนวนตัวอย่างที่เก็บ			12
ร้อยละที่ตรวจพบ			50

Central Library
Prince of Songkla Univer.

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ 13 จุด รวม 64 ตัวอย่างบริเวณทะเลสาบสงขลา ในเขตอำเภอเมืองสงขลา อำเภอหาดใหญ่ และอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา ระหว่างเดือนกรกฎาคม - พฤศจิกายน พ.ศ. 2538 ตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* non - O1 ร้อยละ 61.54 จากการใช้วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ และร้อยละ 53.85 โดยวิธี Moore swab ซึ่งแสดงว่าการใช้วิธีเก็บตัวอย่างน้ำมีโอกาสตรวจพบเชื้อมากกว่าวิธี Moore swab อย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ t - test ($\alpha = 0.05$) และจากการตรวจแยกเชื้อ *Vibrio cholerae* ในทะเลสาบสงขลาครั้งนี้ตรวจไม่พบ *V.cholerae* O1 และ *V.cholerae* O139 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ซึ่งก็สอดคล้องกับข้อมูลขณะนั้นเพราะช่วงนั้นไม่มีการระบาดของอหิวาตกโรคในเขตพื้นที่ดังกล่าว สำหรับเชื้อ *V.cholerae* non-O1 มีความสำคัญทางการแพทย์ เพราะเชื้อสามารถสร้าง cholera toxin เหมือนกับ *V.cholerae* O1 ซึ่งทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงคล้ายๆ กับ classical cholera และจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่แยกมาจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในเอเชียและเปรู ผลปรากฏว่า ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด และร้อยละ 80 ของเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด หรือมากกว่า[23] ดังนั้นวงการแพทย์ในปัจจุบันจึงหันมาสนใจ *V.cholerae* non-O1 กันมากขึ้น *V.cholerae* non- O1 สายพันธุ์ที่รายงานการติดเชื้อในมนุษย์ได้แก่ 07,011,014,039 และ 097[22] โดยทำให้เกิดอาการท้องร่วงและติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหาร เช่น บาดแผล

จากการเก็บตัวอย่างน้ำโดยวิธีเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหา *V.cholerae* O139 โดยเฉพาะเพราะเคยมีรายงานการระบาดของเชื้อ *V.cholerae* O139 ในประเทศอินเดีย และบังคลาเทศในพ.ศ. 2535[3,5,13,18,26,28] และในปี พ.ศ. 2536 สามารถแยกเชื้อ *V.cholerae* O139 จากบริเวณผิวน้ำในบริเวณที่เป็นแหล่งชุกชุมของโรคของประเทศบังคลาเทศ ได้ถึงร้อยละ 12 และให้ผลบวกสำหรับการสร้างสารพิษถึงร้อยละ 100[16] โดยใช้ตัวอย่างน้ำ 450 มิลลิลิตรเพาะเชื้อใน Alkaline Peptone Water ความเข้มข้น 10 เท่า และมีรายงานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้ในผู้ป่วยจำนวน 2 ราย ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2537[2] รวมถึงการติดเชื้อนี้ในจังหวัดอื่น ในประเทศไทย แต่ในภาคใต้ไม่มี

งานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้ ในจังหวัดอื่น ๆ นอกจากจังหวัดสงขลา ในปี พ.ศ. 2537 จนถึงปัจจุบัน ดังนั้นจึงมุ่งประเด็นการค้นหาไปที่บริเวณทะเลสาบสงขลา ซึ่งเป็นแหล่งผลิตสัตว์น้ำเพื่อบริโภค และเป็นแหล่งรวมน้ำเสียที่ปล่อยจากแหล่งชุมชนในจังหวัดสงขลาและจังหวัดพัทลุง ผลการตรวจสอบปรากฏว่า ตรวจไม่พบ *V.cholerae* O139 ในทะเลสาบสงขลา แสดงว่าบริเวณทะเลสาบสงขลาไม่ได้เป็น endemic area ของ *V.cholerae* O139 และ *V.cholerae* O1

V.parahaemolyticus เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ชนิดหนึ่งเพราะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ[1] จากการเก็บตัวอย่างโดยใช้ Moore swab ในบริเวณทะเลสาบสงขลา เพื่อตรวจหาเชื้อ *V.parahaemolyticus* เป็นจำนวน 12 ตัวอย่างในช่วงเดือน กรกฎาคม - พฤศจิกายน 2538 แล้วทำการเพาะเชื้อใน Alkaline Peptone Water (4% NaCl) บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส สามารถตรวจพบเชื้อ *V.parahaemolyticus* ร้อยละ 50

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่าเมื่อเก็บตัวอย่างโดยใช้วิธี Moore swab แล้วทำการเพาะเชื้อใน Alkaline Peptone Water (APW) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร พบว่าโอกาสในการตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* non - 01 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ t-test ($\alpha = 0.05$) ดังนั้นจึงสามารถใช้ APW 100 มิลลิลิตร แทน 250 มิลลิลิตร ในการตรวจหาเชื้อ *V.cholerae* เพื่อเป็นการประหยัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อ และผลการเปรียบเทียบการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการบ่มนาน 6 ชั่วโมง และบ่ม 6 ชั่วโมง แล้วบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง มีโอกาสตรวจพบเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ t-test ($\alpha = 0.05$) จึงเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในการแยกเชื้อ *V.cholerae* ในห้องปฏิบัติการต่อไปในอนาคต

จากผลการทดลองในครั้งนี้แม้ตรวจไม่พบ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 เลย แต่ก็ตรวจพบ *V. cholerae* non O1 ถึง 61.54% และตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ถึง 50% ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ก็มีความสำคัญทางการแพทย์เช่นกัน ดังนั้นผู้ที่ต้องการบริโภคอาหารทะเลที่ปรุงจากสัตว์น้ำที่เลี้ยงในทะเลสาบสงขลา จึงไม่ควรปรุงให้อาหารสุก ๆ ดิบ ๆ เพราะอาจทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้เช่นกัน

การตรวจไม่พบ *V.cholerae* O1 และ *V.cholerae* O139 อาจเป็นเพราะบริเวณทะเลสาบสงขลาไม่ได้เป็น endemic area หรืออาจเป็นเพราะ *V.cholerae* ทั้ง 2 serogroup เข้าไปอาศัยอยู่ในแพลงตอนในภาวะที่เรียกว่า viable but non culturable ซึ่งต้องใช้วิธีการ indirect fluorescent antibody ในการตรวจหาเชื้อในแพลงตอน ซึ่งเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจที่จะดำเนินการต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. กรองแก้ว ศุภวัฒน์.2538. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio* อื่น ๆ ฝ่ายบัคเตรีลำไส้ กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ : 1-15
2. ศิโรช จิตต์สุรงค์.2537. เชื้ออหิวาตกโรคสายพันธุ์ใหม่, เวชปฏิบัติปริทัศน์; 10(6):81-84
3. Albert JBM, Siddique AK, Islam MS, et al. 1993. A large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non - O1 in Bangladesh. Lancet ; 341-704.
4. Barva D. 1993. History of cholera. In : Baura D, Greenough WB, eds Cholera New York : Plenum ; 1-36.
5. Bhattacharya MK, Bhattacharya SK, GargS, et al. 1993. Outbreak of *Vibrio cholerae* non - O1 in India and Bangladesh, Lancet ; 341:1346-1347.
6. Bodhdatta L, Echeverria P, Hoge CW, et al. 1995. *Vibrio cholerae* O139 in Thailand in 1994, Epidemol Infect; 114:71-73.
7. Centers'for Disease Control. 1991. Cholera - Peru, MMWR; 40 : 108-110.
8. Centers'for Disease Control. 1991. Update : cholera outbreak - Peru,Ecuador and Colombia. MMWR; 40 : 225 - 227.
9. Chongsa-Nguan M, Chaicumpa W, Moolasaert P, et al. 1993. *Vibrio cholerae* O139 Bengal in Bangkok, Lancet ; 342 : 430-431.
10. Craig JP. 1985 The Vibrio diseases in 1982 : an overview. In : Takeda Y, Miwatani T, eds. Bacterial diarrheal disease, Tokyo : KTK Scientific Publishers : 11-23.
11. Desmarchelier PM, Senn CR. 1989. A molecular epidemiological study of *Vibrio cholerae* in Australia, Med. J. Aust ; 150:631-634.
12. Finkelstein RA. 1973. Cholera. Crit. Rev., Microbiol ; 2:553-623.
13. Garg S, Saha PK, Ramamurthy T, et al. 1993. Nationwide prevalence of the new epidemic strain of *V.cholerae* O139 Bengal in India, J. Infect Dis;27:108-109.

14. Guideline for cholera control. 1993. World health organization.

15. Hall RH, Khambaty FM, Kothary M, et al. 1993. Non- O1 *Vibrio cholerae*, Lancet ; 342 : 430.

16. Islam MS, Hasan MK, Miah MA, et al. 1993. Isolation of *Vibrio cholerae* O139 Bengal from water in Bangladesh, Lancet, Aug 14; 342(8868) : 430.

17. Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL. 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogensis of clinically significant *Vibrio* spp, Clin. Microbiol. Rev. ; 1 : 245-267.

18. Jesudason MV, John TJ. 1993. Major shift in prevalence of non- O1 and El-Tor *Vibrio cholerae*, Lancet ; 341 : 1090-1091.

19. Kaper JB, Bradford HB, Roberts NC, Falkow S. 1982. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the U.S. Gulf Coast, J.Clin. Microbiol.;16;129-134.

20. Khan MU, Shahidullah M, Haque M, et al. 1984. Presence of vibrios insurface water and their relation with cholera in a community. Trop Georg Med; 36:335-340.

21. Minami A, Hashimoto S, Abe H, et al. 1991. Cholera enterotoxin production in *V. cholerae* O1 strains isolated from the environment and from human in Japan, App. Environ. Microbiol. Aug ; 57(8); 2152-2157.

22. Morris JG Jr. 1990. Non- O1 group I *Vibrio cholerae* : a look at the epidemiology of an occasional pathogen, Epidemiol Rev; 12 : 173-191.

23. Mukhopadhyay AK, Saha PK, Garg S, et al. 1995. Distribution and virulence of *Vibrio cholerae* belonging to serogroup other than O1 and 0139, A nationwide survey. Epidemol Infect ; 114 : 65-70.

24. Pazzaglia G, Lesmana M, Tjania Pdi, 1993. Use of vaginal tampons in sewer suveys for non- O1 *V.cholerae*, appl Environ Microbiol, Aug ; 59(8): 2740-2742.

25. Rabbani GH, Mahalanabis D, 1993. New strains of *Vibrio cholerae* 0139 in India and Bangladesh : lessons from the recent epidemics, J Dirrhoeal Dis Rev; 11(2) : 63-66

26. Ramamurthy T, Garg S, Sharma R, et al. 1993. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India, Lancet ; 341 : 703-704.

27. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, et al. 1994. Extended serotyping sheme for *Vibrio cholerae*, Curr Microbiol; 24:1-4.

28. Shimada T, Nair GB, Deb BC. et al 1993. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-01 in India and Banglades. Lancet ; 1341-1347.

29. Spriggs DR, Guerrant RL.31993. Summary of the 27 th United States Japan joint conference on cholera and realted diarrheal disease, J Infect Dis; 167:1-6.

30. Tamplin ML, Parodi C. Carrillo. 1991. Environmental Spread of *V. cholerae* in Peru, Lancet. Nov 9; 338(8776) : 1216-1217.

31. Taylor JL, Tuttle J, Pramukul T, et al. 1993. An outbreak of cholera in Maryland associated with imported commercial frozen fresh coconut milk, J.Infect. Dis.,Jan ; 167(6) : 1330-1335.

32. Wachsmuth IK, Bopp CA, Fields PI, Carrillo C. 1991. Difference between toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from south America and US. gulf coast, Lancet ; 337 : 1097-1098.

33. World Health Organization Scientific Working Group. 1980. Cholera and other *Vibrio*-associated diarrhoeas. Bull. WHO. ; 58;353-374.

34. World Health Organization. 1984. Report of the third meeting of scientific working group on bacterial enteric infections, microbiol epidemiol, immunol and vacc devel, Geneva.

35. Yam WC, Lung ML, Ng KY, Ng MH. 1989. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in Hong Kong J.clin. Microbiol.; 27: 1900-1902.

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป และสูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป มีดังนี้

1.1 Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose ของบริษัท Difco

1.2 Kligler Iron Agar (KIA) ของบริษัท Difco

1.3 Motility Indole Ornithine (MIO) Medium ของบริษัท Difco

1.4 Nutrient Agar (NA) ของบริษัท Difco

1.5 Nutrient Broth (NB) ของบริษัท Difco

หมายเหตุ : อาหารเลี้ยงเชื้อ 1.3, 1.4 เติมเกลือ 1% อาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 เติมเกลือ 0%, 1%, 8% และ 10%

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียที่ต้องเตรียมเอง

2.1 Alkaline Peptone NaCl (APW)

Peptone	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมต่าง ๆ ผสมกัน ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 8.5-9.0 ด้วย 1 N NaOH ใส่ ฟลาสก์ ละ 100 และ 250 มิลลิลิตร อบฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.2 Double Strenght APW

Peptone	20	กรัม
NaCl	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม

นำส่วนผสมต่าง ๆ ผสมกัน ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 8.5-9.0 ด้วย 1 N NaOH ใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อบฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.3 APW (4% NaCl)

Peptone	10	กรัม
NaCl	40	กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมต่าง ๆ ผสมกัน ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 8.5-9.0 ด้วย 1 N NaOH ใส่ฟลาสก์ ละ 250 มิลลิลิตร อบฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.4 Concentreted APW ความเข้มข้น 10 เท่า

Peptone	100	กรัม
NaCl	100	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมต่าง ๆ มาผสมกัน ปรับ pH ให้ได้ 9.2 ด้วย 1N NaOH ใส่ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร อบฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

reagent สำหรับทดสอบออกซิเดส

1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำ% tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ละลายในน้ำกลั่นในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ภาคผนวก 2

1. วิธีการทดสอบออกซิเดส

   1.1 เตรียมกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

   1.2 หยด reagent สำหรับทดสอบออกซิเดส 2 หยดลงบนกระดาษกรอง

   1.3 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ลนไฟฆ่าเชื้อ ปล่อยให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก KIA มาทดสอบกระดาษกรอง

   การอ่านผล : ผลบวก กระดาษเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Wursters'blue) ภายใน 1 นาที

2. วิธีการทดสอบการเกาะกลุ่ม (Agglutination)

   2.1 เตรียมสไลด์ที่สะอาด

   2.2 หยด antiserum ลงบนสไลด์ 1 หยด

   2.3 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อลนไฟฆ่าเชื้อ ปล่อยให้เย็น เขี่ยเชื้อจาก KIA มาทดสอบการเกาะกลุ่มบนสไลด์

   การอ่านผล : ผลบวก เกิดการเกาะกลุ่มภายใน 1 นาที