

## บทที่ 4

### อภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Vibrio hollisae*

*V. hollisae* เป็นหนึ่งใน 12 สปีชีส์ของเชื้อจลินัส *Vibrio* ที่ก่อโรคในคน โดยมีปัจจัยในการก่อโรคคือ thermostable direct hemolysin (tdh) ซึ่งพบได้ในเชื้อ *V. hollisae* ทุกสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม แต่ในปัจจุบันมีรายงานการแยกเชื้อดังกล่าวจากผู้ป่วยไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่เชื้อเจริญได้ไม่ดี บนอาหาร TCBS ซึ่งเป็น selective medium ที่ใช้ในการแยกเชื้อ *Vibrio* species จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย อาหารดังกล่าวมี thiosulfate และ bile salt ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจลินัสที่ประจำถิ่นในลำไส้ เช่น *E. coli* รวมทั้ง *Vibrio* บางสปีชีส์ เช่น *V. hollisae* ดังนั้น TCBS จึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็นอาหารในการแยกเชื้อ *V. hollisae* ในการศึกษา นี้ ดังนั้นการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถในการคัดแยกเชื้อดังกล่าวได้ จะเป็นแนวทางที่ช่วยให้สามารถทราบข้อมูลการปนเปื้อนของเชื้อนี้ได้มากขึ้น ในการวิจัยขั้นแรกผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยปกติเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* เป็นแบคทีเรีย ที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophilic) อาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปจะต้องเติมเกลือลงไปอย่างน้อย 1% เสมอ และค่า pH ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงที่เป็นกลางจนถึงเป็นด่างเล็กน้อย จากการทดสอบครั้งนี้ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 2% และที่ระดับ pH 8.2 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุด นอกจากนี้ได้ทำการศึกษา สารยับยั้ง เช่น taurocholic acid potassium tellurite deoxycholic acid lauryl sulfate (SDS) malachite green และ sodium azide เพื่อต้องการพัฒนา selective medium ในการแยกเชื้อ *V. hollisae* โดยสารเหล่านี้มีรายงานการนำมาใช้เป็นสารยับยั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดเช่น taurocholic acid พบว่ามีการนำมาใช้ในอาหาร Taurocholic-tellurite-gelatin agar (TTGA) แยกเชื้อ *V. cholerae* จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย เนื่องจาก taurocholic acid มีฤทธิ์ยับยั้งจลินัสที่ประจำถิ่นในลำไส้ (O'Brien and Cowell, 1985) potassium tellurite พบว่ามีการนำมาใช้เป็นสารยับยั้งในอาหาร เพื่อแยกเชื้อ

*V. cholerae* *E. coli* *P. vulgaris* และเชื้อ *Vibrio* ที่ก่อโรคอื่นๆ (Danikina *et al.*, 1995) สำหรับ deoxycholate ได้ถูกนำมาใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Deoxycholate lactose agar เป็น selective medium ใช้แยกเชื้อ แบคทีเรีย coliform จากอาหารและน้ำ โดย deoxycholate จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (Lichstein and Synder, 1941) สำหรับ lauryl sulfate หรือ sodium dodecyl sulfate ได้ถูกนำมาใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate broth เพื่อเป็น selective medium ในการตรวจหาแบคทีเรีย coliform จากน้ำดีและน้ำเสีย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *M. luteus* (American Public Health Association, 1981) ขณะเดียวกันก็ส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาล lactose นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ lauryl sulfate ใน Lauryl sulphate-aniline blue agar แยกเชื้อ *E. coli* และ coliform จากน้ำอาหาร และอุจจาระ ให้ผลดีกว่าการใช้ bile salts เป็นสารยับยั้ง (Wright, 1984) และ การใช้ Lauryl sulfate tryptose (LST) broth เพื่อแยกเชื้อ fecal coliform จากอาหาร จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ tryptone water (Cakir *et al.*, 2001) ส่วน malachite green ถูกนำมาใช้ในอาหาร Malachite-green broth และ Lowenstein Jensen medium เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่นในการแยกเชื้อ *P. aeruginosa* จากน้ำและแยกเชื้อ *M. tuberculosis* จากเสมหะ ตามลำดับ (Van Schothorst and Renaud, 1985) สดุดท้าย sodium azide มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *P. aeruginosa* จึงถูกนำมาใช้ในอาหาร Azide blood agar เพื่อแยกเชื้อ enterococci ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไม่สามารถนำสารยับยั้งที่กล่าวมาทั้งหมดมาใช้ในการพัฒนา selective medium เพื่อแยกเชื้อ *V. hollisae* เนื่องจากสารยับยั้งดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. hollisae* อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3.3) ดังนั้นการพัฒนาอาหารเพื่อแยกเชื้อ *V. hollisae* จึงได้ใช้ส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร Sporosarcina halophilla agar และอาหาร Mannitol maltose agar ได้แก่ peptone beef extract yeast extract NaCl MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O cresol red และ agar โดยให้ชื่อว่า H agar โดย peptone จะเป็นแหล่งของไนโตรเจนเพื่อสร้างพลังงาน และนำไปสร้างส่วนประกอบของเซลล์ beef extract เป็นแหล่งของวิตามินและเกลือแร่ ส่วน yeast extract จะมีวิตามินบีรวม ที่ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ต่างๆหลายชนิดที่มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึม electron transport การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ การสังเคราะห์ purine และ pyrimidine ส่วน MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O มีความสำคัญสำหรับการ

สังเคราะห์โปรตีนโดยทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในเอนไซม์บางชนิด นอกจากนี้ NaCl จะเป็นตัวรักษาระดับความเข้มข้นของไอออนภายในเซลล์ให้เหมาะสม รวมทั้งเป็นแหล่งของเกลือแร่อีกด้วย ส่วนการใช้ cresol red หรือ *o*-cresolsulfonaphthalein ก็เพื่อเป็น indicator ในการตรวจสอบค่าความเป็นกรดที่เชื้อสร้างขึ้น ถ้า pH ต่ำกว่า 7.2 นอกจากนี้ยังเติม sodium pyruvate เสริมเข้าไปใน H agar เนื่องจาก มีรายงานว่าสามารถช่วยเหลือเซลล์แบคทีเรียที่บาดเจ็บจากการแช่แข็ง หรือผ่านความร้อนอุณหภูมิสูงๆ ให้มีการซ่อมแซมตัว โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.1% (Mizunoe, 1999) นอกจากนี้ได้เติมน้ำตาล arabinose เพื่อใช้เป็น differential medium ในการแยกเชื้อที่สามารถหมักน้ำตาล arabinose เช่น *V. hollisae* กับพวกที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล arabinose จากนั้นจึงทำการแยกเชื้อ *V. hollisae* ออกจากเชื้อในกลุ่มที่หมักน้ำตาล arabinose โดยใช้ Maltose agar อีกครั้ง เพราะ *V. hollisae* เป็นเชื้อเพียงสปีชีส์เดียวที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล maltose ขณะที่เชื้อ *Vibrio* อีก 10 สปีชีส์ ที่ก่อโรคในคนสามารถหมักน้ำตาล maltose ได้ เหตุที่ไม่ใช้ maltose เป็นน้ำตาลเริ่มต้นในการแยกเชื้อแทน arabinose เนื่องจากเชื้อเกือบทั้งหมดหมักน้ำตาล maltose (ยกเว้น *V. hollisae*) และจะเปลี่ยนสีของ indicator คือ cresol red เป็นสีเหลืองหมด ทำให้โอกาสที่จะเห็นเชื้อที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล maltose เป็นไปได้ยากมาก

#### 4.2 การใช้อาหาร H agar ตรวจหาเชื้อ *V. hollisae* จากอาหารทะเล

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นอาหารทะเลเช่น ปลา หอย กุ้ง และกั้ง โดยตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาเป็นหอย เนื่องจากมีรายงานการตรวจพบเชื้อจากผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะรับประทานอาหารทะเลจำพวกหอย เช่น หอยนางรม และ หอยกาบ มาก่อนที่จะเกิดอาการ (Morris *et al.*, 1982; Carnahan *et al.*, 1994; Abbot and Janda, 1994; Hlady, 1997; Rouzet *et al.*, 1996) และมีรายงานเพียงไม่กี่ฉบับที่ตรวจพบเชื้อ *V. hollisae* จากปลา (Lowry *et al.*, 1986; Nishibuchi *et al.*, 1988) ในการตรวจหาเชื้อจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างที่มีความสด และใช้เวลาในการผ่านกระบวนการต่างๆ ให้น้อยที่สุด จากการตรวจหาเชื้อทั้งหมดไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *V. hollisae* จากตัวอย่างโดยตรง แต่พบผลบวก PCR จากตัวอย่างที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อใน alkaline peptone water 1 ตัวอย่างในปลาหัวอ่อน อย่างไรก็ตามได้พยายามทำการแยกเชื้อจาก alkaline peptone water จากตัว

อย่างปลาหัวอ่อนที่ยังคงเก็บไว้ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเวลาผ่านไปนานกว่า 24 ชั่วโมง ทำให้มีเชื้อแบคทีเรียอื่นใน alkaline peptone water เจริญทับ (overgrowth) ส่วนปลาหัวอ่อนที่เก็บไว้ในตู้เย็น (-20 °C) เชื้อ *V. hollisae* อาจตายได้ เพราะโดยปกติเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* มีผนังเซลล์ที่เปราะ ถ้าผ่านการแช่แข็งและละลาย เซลล์จะแตกหมด อีกสาเหตุหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงคือปริมาณเชื้อมีน้อยเกินไป จำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อ เช่น immunomagnetic technique มีรายงานการใช้วิธีนี้เพิ่มปริมาณเชื้อ *E. coli* O157 (Vuddhakul *et al.*, 2000)

*V. parahaemolyticus* (Varaporn *et al.*, 2000) ในการแยกเชื้อจากอาหารทำให้สามารถตรวจพบได้ ซึ่งยืนยันได้จากการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่กำลังระบาดทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยพบว่า ในปี ค.ศ. 1998 ผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 87% เมื่อทำการตรวจอาหารทะเลโดยใช้วิธีเพิ่มปริมาณเชื้อ immunomagnetic technique พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 เพียง 6.9% แสดงว่าถ้าไม่มีการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณเชื้อ โอกาสที่จะพบเชื้อมีน้อยมากถึงแม้จะมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการตรวจไม่พบเชื้อ

*V. hollisae* ไม่สามารถยืนยันได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย จำเป็นที่จะต้องมีการนำเทคนิคที่จำเพาะ และสามารถเพิ่มปริมาณตัวเชื้อมาทดสอบเพิ่มเติม

#### 4.3 การตรวจหาจिन *tdh* จิน bacteriophage Vf1 และ Vf2 บนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ และพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae*

สามารถตรวจพบจिन *tdh* บนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *V. hollisae* 11 สายพันธุ์ แต่ไม่พบบนพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae* ที่นำมาทดสอบ 4 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nishibuchi และคณะ ที่ได้ตรวจหาจिन *tdh* จากเชื้อ *V. hollisae*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1 และ *V. mimicus* โดยการทำ nucleic acid hybridization และ PCR สามารถตรวจพบจिन *tdh* ใน *V. hollisae* ทุกสายพันธุ์ แต่จะพบจिन *tdh* ใน *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1 และ *V. mimicus* เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น (Nishibuchi *et al.*, 1996) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ตรวจจिन *tdh* บนพลาสมิดทุกสายพันธุ์ของ *V. hollisae* เนื่องจากไม่เคยมีรายงานว่าพบจिन *tdh* บนพลาสมิดของ

*V. hollisae* เลยคั้งนั้นจึงเลือกนำมาทดสอบเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้น และในการศึกษาครั้งนี้ พบสิ่งที่น่าสนใจก็คือ เป็นการพบครั้งแรกว่าตำแหน่งของจีน *tdh* บนโครโมโซม *V. hollisae* ทุกตัวอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งแตกต่างจาก *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ที่พบอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันบนโครโมโซม (Nishibuchi and Kaper, 1995) ทำให้ยืนยันสมมติฐานที่ว่า ต้นกำเนิดของจีน *tdh* น่าจะอยู่บนโครโมโซมของ *V. hollisae* การพบจีน *tdh* ในบางสายพันธุ์ของ *Vibrio* species อื่น อาจเกิดจากการถ่ายทอดโดย bacteriophage อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจหาจีนของ bacteriophage Vf1 และ Vf2 บนโครโมโซมและพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae* ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า phage ที่สามารถถ่ายทอดจีน *tdh* นั้น เป็น phage ต่างชนิดกับ Vf phage ซึ่งแยกได้จาก *V. parahaemolyticus* การแยก phage จาก *V. hollisae* โดยตรงและตรวจหาจีนที่จำเพาะของ phage นั้นบนโครโมโซมของ *V. hollisae* อาจจะช่วยอธิบายสมมติฐานการถ่ายทอดจีน *tdh* ของ *V. hollisae* โดยผ่านทาง bacteriophage ได้ สุดท้ายอาจมีความเป็นไปได้ที่กลไกการถ่ายทอดจีน *tdh* เกิดจากขบวนการอื่น เช่น การเกิด transposition ของ transposon (Tn) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดระหว่าง 0.7-40 kb ที่ถูกขนานข้างด้วยดีเอ็นเอขนาดเล็กเรียกว่า insertion sequence (IS) Tn สามารถโยกย้ายจากตำแหน่งหนึ่งไปยังอีกตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมเดียวกัน หรือแทรกเข้าไปในพลาสมิด โดยไม่จำเป็นต้องมีลำดับเบสเหมือนกันกับดีเอ็นเอตัวรับ ถ้า Tn แทรกตัวเข้าไปในตำแหน่งที่เป็นจีนในโครโมโซม ก็จะทำให้จีนนั้นไม่ต่อเนื่อง และทำให้หน้าที่ของจีนนั้นเสียไป ขณะเดียวกันจีนที่สอดแทรกเข้าไปจะเกิดการแสดงออกขึ้น (วัฒนาลัย และ สรวง, 2536) ในอนาคต การตรวจหา IS ว่ามีขนาดอยู่สองข้างจีน *tdh* ของ *V. hollisae* หรือไม่จะช่วยตอบคำถามนี้ได้