4. วิจารณ์ผลการทดลอง

V. parahaemolyticus ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากโรงพยาบาลหาดใหญ่เป็นเวลา 6 ปี ต่อเนื่องกัน (พ.ศ. 2543-2548) แยกเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ 4 กลุ่ม คือ tdh^+trh^- tdh^-trh^+ tdh^+trh^+ และ tdh^-trh^- พบว่าการลดลงของสายพันธุ์ระบาดทั่วโลก (tdh^+trh^- GS-PCR positive) มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสายพันธุ์ tdh^+trh^+ ในช่วงเวลาเดียวกัน และซีโรทัยป์ของสายพันธุ์ tdh^+trh^+ ก็แตกต่างจากซีโรทัยป์ของสายพันธุ์ระบาดทั่วโลก จากการศึกษาภายใน 6 ปี (ตารางที่ 3.1) โดยพบว่า 61.8% ของ K ซีโรทัยป์สายพันธุ์ tdh^+trh^+ เป็น KUT ซึ่งสูงกว่าที่พบในสายพันธุ์ระบาดทั่วโลก 57.2%

การลดลงของสายพันธุ์ระบาดทั่วโลกและการเพิ่มขึ้นของสายพันธุ์ tdh^+trh^+ น่าจะมีสาเหตุจากระบบภูมิต้านทานของร่างกาย ประชากรในแหล่งระบาดอาจเกิดภูมิต้านทานต่อสายพันธุ์ระบาดทั่วโลกทำให้ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์กลุ่มอื่นแทน มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *V. cholerae* O1 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการติดเชื้อซีโรทัยป์ Ogawa สลับกับซีโรทัยป์ Inaba ในประเทศไทยพบว่าทุกๆ 7-8 ปี *V. cholerae* จะมีการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ Ogawa และ Inaba (Supuwat and Huttayananont, 1997) ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาในคนและสัตว์พบว่า การเปลี่ยนแปลงนี้เนื่องมาจากระบบภูมิต้านทานของร่างกายต่อไลโพโพลีแซคคาไรด์ของ O antigen (Sheehy *et al.*, 1966; Gangarosa *et al.*, 1967; Sack and Miller, 1969)

ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของ *V. parahaemolyticus* น่าจะคล้ายกัน เนื่องจากในปี พ.ศ. 2542 ได้มีการตรวจพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ tdh^+trh^+ จากโรงพยาบาลหาดใหญ่จำนวน 8 ไอโซเลต (2.5%) จากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 317 ไอโซเลต (Laohaprertthisan *et al.*, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปี พ.ศ. 2543 ตรวจไม่พบเชื้อสายพันธุ์นี้และตรวจพบอีกในปี พ.ศ. 2544 จำนวน 5 ไอโซเลต (4.1%) จากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด 123 ไอโซเลต จากนั้นปริมาณเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 8 (5.6%), 7 (5.5%), 18 (8.8%) และ 17 (8.2%) ในปี พ.ศ. 2545-2548 ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปี พ.ศ. 2543-2546 เทียบกับปี พ.ศ. 2547 และปี พ.ศ. 2548 มีค่า p-value = 0.031 และ 0.038 ตามลำดับ

ลักษณะของ *V. parahaemolyticus* tdh^+trh^+ ทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ urease ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าตำแหน่งจีน *trh* และจีน *ure* ซึ่งกำหนดการสร้าง

เอนไซม์ urease อยู่ในตำแหน่งติดกันบนโครโมโซม (Suthienkul *et al.*, 1995; Okitsu *et al.*, 1997; Ghosh and Sehgal, 1998) การศึกษาผลซีโรทัยป์และการสร้างเอนไซม์ urease ของ 50 ไอโซเลต กลุ่ม tdh^+trh^+ พบว่ามีซีโรทัยป์ O1 มากที่สุด (30%) รองลงมาคือซีโรทัยป์ O3 (18%) และ O11 (16%) ใกล้เคียงงานวิจัยของอรษา สุตเธียรกุล (พ.ศ. 2538) ที่แยก *V. parahaemolyticus* ในประเทศไทยระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ. 2533 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2534 พบซีโรทัยป์ O1 มากที่สุด (77.8%) รองลงมาคือซีโรทัยป์ O3 (11.1%) แต่ผลของ K ซีโรทัยป์ในการศึกษาครั้งนี้พบมากที่สุดได้แก่ KUT คือ O1:KUT พบ 20% และ O11:KUT พบ 16% แต่การศึกษาของอรษา สุตเธียรกุล พบ O1:K1 (40.7%) O1:K69 (29.6%) และพบ O1:KUT เพียง 3.7% แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ K antigen ซึ่งอยู่ส่วนนอกสุดของเชื้อและน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงง่ายที่สุด

V. parahaemolyticus อยู่ในกลุ่ม halophile การทดสอบความทนเกลือของเชื้อทุกกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน เชื้อสามารถเจริญได้ในที่มีเกลือตั้งแต่ 0.5-8% แต่ไม่สามารถเจริญได้ในที่มีเกลือ 10% เนื่องจากความเข้มข้นมากจะมีผลต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ outer membrane proteins (OMPs) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของเชื้อที่ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และควบคุมการผ่านเข้าออกของสารเพราะเป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์ ในภาวะปกติ OMPs จะอยู่ในรูป large-channel porin แต่จะอยู่ในรูป smaller-chanel porin เพื่อลดการผ่านเข้าออกของสารเมื่ออยู่ในภาวะที่ไม่ปกติ (Xu *et al.*, 2004) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ osmolarity และ ion exchange ซึ่งมีผลต่อ metabolism ของเซลล์ ดังนั้นในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 10% เชื้อจึงไม่สามารถเจริญได้

จากการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่เพื่อยึดเกาะ (swarming activity) ของ *V. parahaemolyticus* ทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างอาจเนื่องจาก *V. parahaemolyticus* ทุกกลุ่มแยกได้จากผู้ป่วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบของ Hackney และคณะในปี ค.ศ. 1980 ที่พบว่าความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อเซลล์ HFI (human fetal intestine) มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่ทำให้เกิด food poisoning มากกว่าที่จะขึ้นกับ KP^+ หรือ KP^- หรือซีโรทัยป์

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโต แพร่กระจายและก่อให้เกิดโรค การดื้อต่อยาปฏิชีวนะจะพบได้น้อยในเชื้อสกุล *Vibrio* เมื่อเทียบกับ Enterobacteriaceae โดยทั่วไปเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin และ carbenicillin แต่ไวต่อ colistin ซึ่งจะคล้ายกับเชื้อ *V. alginolyticus* แต่ *V. vulnificus* จะให้ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลินทรีย์ตรงกันข้าม (Bonner *et al.*, 1983) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าแบบแผนความไวต่อยาของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ tdh^+trh^+ แตกต่าง

จากสายพันธุ์ *tdh*$^{+}$ *trh*$^{-}$ แต่กลับพบว่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *tdh*$^{-}$*trh*$^{+}$ และ *tdh*$^{-}$*trh*$^{-}$ คือ ส่วนใหญ่จะไวต่อยา ciprofloxacin และ co-trimoxazole ในขณะที่สายพันธุ์ *tdh*$^{+}$*trh*$^{-}$ ส่วนใหญ่จะดื้อต่อยา ciprofloxacin และดื้อต่อยา co-trimoxazole มากกว่าอีกสามกลุ่ม

จากแบบแผนความไวต่อยาของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^{+}$ *trh*$^{+}$ ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *tdh*$^{-}$*trh*$^{+}$ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่สายพันธุ์ *tdh*$^{+}$*trh*$^{+}$ และสายพันธุ์ *tdh*$^{-}$*trh*$^{+}$ จะมาจากแหล่งเดียวกัน แต่จากการทดสอบจีน *trh* โดยวิธีเซาเทอร์น บลอตติง และ hybridization พบว่า *trh1* จะพบมากในสายพันธุ์ *tdh*$^{+}$*trh*$^{+}$ ส่วน *trh2* จะพบมากในสายพันธุ์ *tdh*$^{-}$*trh*$^{+}$ ดังนั้น *V. parahaemolyticus* ทั้งสองกลุ่มจึงไม่ได้มีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน จากการศึกษาของ Okuda และคณะในปี ค.ศ. 1997 พบว่า 95% ของ *trh2* ที่พบแถบทวีปเอเชียจะไม่พบจีน *tdh* (*tdh*$^{-}$*trh*$^{+}$) และลำดับนิวคลีโอไทด์ *trh2* ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่พบแถบทวีปเอเชียจะเหมือนกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่พบบริเวณ West Coast ของสหรัฐอเมริกา ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ *trh1* จากสองแห่งจะต่างกัน

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^{+}$*trh*$^{+}$ และ *tdh*$^{-}$*trh*$^{+}$ ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2548 พบว่าสายพันธุ์ *tdh*$^{-}$*trh*$^{+}$ ทั้ง 12 ไอโซเลตให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน แต่สายพันธุ์ *tdh*$^{+}$*trh*$^{+}$ ที่มีซีโรทัยป์ O1:KUT มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เนื่องจากซีโรทัยป์ต่างกันให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน แสดงว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* บาง clone มีความสามารถที่จะคงอยู่ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งน่าสนใจว่ามีปัจจัยอะไรที่ทำให้ clone นี้คงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น host ฤดูกาล เกี่ยวข้องหรือไม่ในการติดเชื้อซ้ำๆ ซึ่งน่าสนใจทำการศึกษาในประเด็นนี้ต่อไป (รูป 3.4 และ 3.5) การนำวิธี arbitrarily primed มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ได้ผลรวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย รวมทั้งไม่ต้องการเครื่องมือหรืออุปกรณ์พิเศษใดๆ แต่มีข้อจำกัดว่าในแต่ละขั้นตอนการทดสอบควรทำโดยบุคคลเดียวกัน รวมทั้งสภาวะการทดสอบแต่ละครั้งต้องใกล้เคียงกันที่สุด แต่เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) และ amplified fragment length polymorphism (AFLP) แม้ทั้งสองวิธีนี้จะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า แต่มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เครื่องมือราคาแพง และค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงอีกทั้งต้องอาศัยความชำนาญในการทำ

การศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ปี แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มก่อความรุนแรงของโรคและซีโรทัยป์ในพื้นที่ที่ทำการศึกษา การเปลี่ยนแปลงน่าจะเกิดจากระบบภูมิต้านทานของร่างกายที่มีการพัฒนา เพื่อกำจัดกลุ่มก่อความรุนแรงของโรคที่พบได้บ่อย ในขณะเดียวกันก็เป็นโอกาสให้เชื้อก่อความรุนแรงกลุ่มอื่นขยายเพิ่มขึ้นและเป็นสาเหตุให้เกิดโรค การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังเชื้อนี้

ในอนาคต ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยาประเทศไทยพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ.2540-2545 ตามลำดับ ผลการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ระหว่างปี พ.ศ. 2543 - มิ.ย. 2547 เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวนรวมทั้งสิ้น 629 ไอโซเลต จากผู้ป่วย 543 ไอโซเลต อาหารทะเล 78 ไอโซเลต และ น้ำ 8 ไอโซเลต ดังนั้นจึงน่าสนใจและทำการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อให้การเฝ้าระวังโรคได้ผลดียิ่งขึ้น