

1 บทนำ

1.1 บทนำสั้นเรื่อง

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophile) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคลำไส้อักเสบในประเทศต่างๆทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่นิยมรับประทานอาหารดิบหรือปรุงแบบสุกๆดิบๆ

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ก่อโรคสามารถสร้าง thermostable direct hemolysin (TDH) ทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (β -hemolysis) บนอาหารชนิดพิเศษที่เติมเลือดชื่อ Wagatsuma agar เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Kanagawa phenomenon (KP) การสร้าง TDH ถูกควบคุมโดยยีน *tdh* ซึ่งส่วนใหญ่พบในสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย แต่พบเพียงส่วนน้อยในสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (Miyamoto *et al.*, 1969) นอกจากนี้ยังมี *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์บน Wagatsuma agar ได้ จากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้าง thermostable direct hemolysin – related hemolysin (TRH) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคเช่นกัน (Honda *et al.*, 1988) จากการศึกษาพบว่า การสร้าง TRH ถูกควบคุมโดยยีน *trh* (Nishibuchi *et al.*, 1989)

V. parahaemolyticus แบ่งเป็นซีโรทัยป์ตามชนิดของ O และ K antigen โดยแบ่งเป็น 13 O antigen และ 71 K antigen ในอดีตที่ผ่านมาการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* เกิดจากซีโรทัยป์ที่หลากหลาย (Suthienkul *et al.*, 1995 ; Okuda *et al.*, 1997b) แต่ในปีค.ศ. 1996 เป็นต้นมามีรายงานการระบาดของ O3:K6 ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย (Okuda *et al.*, 1997a ; CDC, 1999 ; Chiou *et al.*, 2000 ; Vuddhakul *et al.*, 2000a) นอกจากนี้ในปีค.ศ. 1998 ยังพบซีโรทัยป์ O4:K68 O1:KUT (untypeable) ระบาดร่วมกับ O3:K6 ด้วย จากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ดังกล่าวมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน (Okuda *et al.*, 1997a; Wong *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000) โดยมี

ส่วนของยีน *toxRS* ที่เหมือนกันแต่ต่างจากยีน *toxRS* ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 (Matsumoto *et al.*, 2000) ดังนั้นการเปรียบเทียบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยจึงมีความสำคัญในการอธิบายถึงแหล่งกำเนิดของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ระบาดไปทั่วโลกได้

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 จีโนส *Vibrio*

จีโนส *Vibrio* จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งประกอบด้วย 4 จีโนส คือ *Aeromonas* *Photobacterium* *Plesiomonas* และ *Vibrio* เชื้อในจีโนส *Vibrio* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคนมี 12 สปีชีส์ คือ *V. cholerae* *V. mimicus* *V. fluvialis* *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* *V. vulnificus* *V. furnissii* *V. damsela* *V. metschnikovii* *V. hollisae* *V. cincinnatiensis* และ *V. carchariae* (Farmer, 1992a)

Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้ง หลายสปีชีส์เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagellum ในอาหารเหลว แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella ได้ เชื้อในจีโนส *Vibrio* ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบทั่วไปทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคนเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส สามารถเผาผลาญอาหารได้โดยใช้ขบวนการหายใจและขบวนการหมัก เชื้อสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (halophile) โดยสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคในคนต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1-3 % *Vibrio* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแต่ไม่ให้เกิดแก๊ส โดยทั่วไปสามารถสร้าง indole catalase และ oxidase สามารถย่อยในเตรทเป็นไนไตรท์ได้ สามารถสร้างเอนไซม์หลั่งออกภายนอกเซลล์ (exoenzyme) ได้แก่ protease amylase lipase lecitinase DNAase และ chitinase เชื้อในจีโนส *Vibrio* มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งให้ผล oxidase เป็นลบ จากการศึกษาด้านชีวโมเลกุลพบว่า *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีปริมาณ Guanine รวมกับ cytosine (ค่า G+C content) ของดีเอ็นเอ เท่ากับ 39-51 mol % (Lee , 1990)

1.2.1.1 การเพาะแยกเชื้อ

เชื้อในจีโนส *Vibrio* สามารถเจริญบน nutrient agar ที่มีเกลือ 0.5% โดยทั่วไปโคโลนีมีลักษณะ กลมมน ขอบเรียบ สีครีม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5

มิลลิเมตร แต่บางสปีชีส์ เช่น *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โคลิโคนีมีลักษณะแพะ (swarm) *Vibrio* ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดีและ pH สูงได้ มีความสามารถในการใช้ tellurite thiosulphate และ citrate จึงมีการนำสารต่างๆเหล่านี้ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเป็น selective media นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลซูโครส แมนโนส หรือ คาร์โบไฮเดรต เป็นดัชนีบ่งชี้ในการแยกความแตกต่างของเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดมีการใส่ polymyxin B ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือแยกเชื้อ *V. cholerae* El Tor ออกจาก *V. cholerae* Classical เนื่องจาก *V. cholerae* Classical มีความไวต่อ polymyxin B อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจิ้นัส *Vibrio* ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ thiosulphate citrate bile-salt sucrose (TCBS) agar ซึ่งสามารถแยกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักน้ำตาลซูโครสได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส โคลิโคนีจะมีสีเหลือง ได้แก่ *V. cincinnatiensis* *V. cholerae* *V. alginolyticus* *V. fluvialis* *V. furnissii* *V. metschnikovii* และ *V. carchariae* ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส โคลิโคนีจะมีสีเขียว ได้แก่ *V. parahaemolyticus* *V. mimicus* *V. damsela* และ *V. vulnificus* เชื้อในจิ้นัส *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้บน MacConkey's bile-salt agar และสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นที่ใช้ในการแยกเชื้อก่อโรคในลำไส้ แต่ *V. hollisae* เป็นสปีชีส์เดียวที่ไม่สามารถเจริญบน TCBS หรือ selective media อื่น แต่สามารถแยกเชื้อ *V. hollisae* จากอุจจาระบน blood agar หรือ marine agar เท่านั้น (Hickman *et al.*, 1982)

1.2.1.2 การก่อโรค

Vibrio ที่แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติส่วนใหญ่ออกให้เกิดการติดเชื้อภายในลำไส้ (intestinal infection) โดยมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อ ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ผู้ป่วยมีอาการ ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อุจจาระอาจมีมูกเลือดปน การติดเชื้อภายในลำไส้ที่รู้จักกันดีคือการติดเชื้อจาก *V. cholerae* เนื่องจากมีความรุนแรงสูงทำให้ผู้ติดเชื้อถ่ายเหลวเป็นน้ำขาวขุ่น (rice water stool) *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบชนิดรุนแรงแต่ผู้ป่วยสามารถหายได้เอง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *V. fluvialis* *V. hollisae* *V. mimicus* และ *V. vulnificus* ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ นอกจากนี้

บางสปีชีส์ ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อภายนอกลำไส้ (extraintestinal infection) เช่น การติดเชื้อทางบาดแผล การติดเชื้อในหู และการติดเชื้อในกระแสโลหิต ยกตัวอย่างได้แก่ *V. cholerae* *V. mimicus* *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* *V. vulnificus* *V. damsela* *V. metschnikovii* *V. hollisae* *V. cincinnatiensis* และ *V. carchariae* (ตารางที่ 1.1) ปัจจัยก่อโรค ของเชื้อ *Vibrio* มีหลายชนิด ได้แก่ protease siderophore adhesion factor haemagglutinin enterotoxin cytotoxin และ hemolysin โดย haemolysin เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญใน *Vibrio* หลายสปีชีส์ได้แก่ *V. cholerae* *V. mimicus* *V. parahaemolyticus* *V. hollisae* *V. vulnificus* *V. damsela* (Alouf and Freer, 1999)

ตารางที่ 1.1 อาการทางคลินิกที่เกิดจากการติดเชื้อในจีส *Vibrio*

สปีชีส์	อาการทางคลินิก			
	ลำไส้อักเสบ	ติดเชื้อทางบาดแผล	ติดเชื้อในหู	ติดเชื้อในกระแสโลหิต
<i>V. cholerae</i> O1	+++	+		+
<i>V. cholerae</i> non-O1	+++	++	+	+
<i>V. mimicus</i>	++		+	
<i>V. fluvialis</i>	++			
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+
<i>V. cincinnatiensis</i>				+
<i>V. hollisae</i>	++			+
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++
<i>V. furnissii</i>	(+)			
<i>V. damsela</i>		++		
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)
<i>V. carchariae</i>		+		

+++ = มีการรายงานบ่อยครั้ง ++ = มีการรายงานน้อยครั้ง (6-100 ครั้ง)

+ = มีการรายงานน้อยมาก (1-5 ครั้ง) (+) = มีอาการทางคลินิกไม่ชัดเจน

(ที่มา : [http:// Seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt20.htm](http://Seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt20.htm))

Vibrio สามารถพบได้ในน้ำทะเลทั่วโลก และปนเปื้อนในสัตว์ทะเล ในประเทศไต้หวัน ได้มีการศึกษาการแยกเชื้อ *Vibrio* จากอาหารทะเลพบ *V. alginolyticus* *V. cholerae* *V. parahaemolyticus* *V. fluvialis* *V. mimicus* *Aeromonas caviae* *A. hydrophila* และ *A. sobria* (Wong *et al.*, 1992) ในประเทศฮ่องกง ได้มีการศึกษาแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* อื่นๆ จากอาหารทะเลที่จำหน่ายในตลาด พบว่าสามารถแยกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* *V. harveyi* *V. fluvialis* *V. vulnificus* *V. pelagius* *V. campbellii* *V. splendidus* และ *V. marinus* ตามลำดับ (Chan *et al.*, 1989) ในประเทศอิตาลี Baffone และคณะ (2000) ได้ตรวจแยกเชื้อ *Vibrio* ในอาหารทะเลจากทะเล Adriatic พบเชื้อ *V. alginolyticus* (81.48%) มากที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* (14.8%) และ *V. cholerae* non-O1 (3.7%) และได้ทำการศึกษา กุ้งทะเลสดแช่แข็ง พบว่า 30 % ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 129 ตัวอย่าง มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* *V. vulnificus* *V. metschnikovii* *V. cholerae* non-O1 และ *V. fluvialis* จากการศึกษาของ Lowy และคณะ (1989) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า 100 % ของจำนวนหอยนางรมดิบปนเปื้อนด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ 67% ปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* และจากการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Vibrio* ในหอยนางรมจากชายฝั่งทะเลประเทศบราซิล พบเชื้อ *V. alginolyticus* (81%) *V. parahaemolyticus* (77%) *V. cholerae* non-O1 (37%) *V. fluvialis* (27%) *V. furnissii* (19%) *V. vulnificus* (12%) และ *V. mimicus* (12%) (Oliver and Kaper, 1997) การก่อโรคลำไส้อักเสบของ *Vibrio* เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือปรุงแบบสุกๆดิบๆ นอกจากนี้ น้ำที่ปนเปื้อนยังเป็นสาเหตุสำคัญในการติดเชื้อ *V. cholerae* (Lee, 1990) จากการศึกษา *Vibrio* ในหอยและน้ำทะเลในประเทศฝรั่งเศส ระหว่างเดือน กรกฎาคม-กันยายน ปีค.ศ. 1999 จำนวน 189 ตัวอย่าง พบ *V. alginolyticus* มากที่สุด 99 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* 41 ตัวอย่าง *V. vulnificus* 20 ตัวอย่าง และ *V. cholerae* non-O1/non-O139 3 ตัวอย่าง (Hervio-Health *et al.*, 2002) และจากการศึกษา *Vibrio* ในประเทศออสเตรเลีย สามารถแยกเชื้อ *Vibrio* ได้จาก น้ำ ตะกอน ฟีช และอุจจาระ จากแถบชายฝั่งแม่น้ำ 8 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของรัฐควีนแลนด์พบเชื้อส่วนใหญ่เป็น *V. cholerae*

V. fluvialis และ *Aeromonas* spp. (Myatt and Davis, 1989) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1981-1994 มีรายงานการติดเชื้อ *Vibrio* ในรัฐฟลอริดาสูงมาก ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* รองลงมาคือ *V. vulnificus* *V. cholerae* non-O1 *V. hollisae* *V. alginolyticus* *V. fluvialis* และ *V. mimicus* (Hlady, 1997) การติดเชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ โดยปี ค.ศ. 1988-1997 ในรัฐแถบชายฝั่งทะเลจำนวน 4 รัฐคือ Alabama, Florida, Louisiana และ Texas มีผู้ป่วยลำไส้อักเสบอันเนื่องมาจากเชื้อ *Vibrio* จำนวน 236 คน (53%) จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 445 คน โดยมีสาเหตุมาจากการรับประทานหอยนางรมดิบ (Altekruse *et al.*, 2000)

ในประเทศไทยระหว่างปีค.ศ. 1980-1981 พบผู้ป่วย 660 ราย มีอาการท้องร่วง ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Shigella* 27 % *V. parahaemolyticus* 19% *E. coli* 5% *Salmonella* spp. 3% *V. cholerae* non-O1 3% *Campylobacter jejuni* 1% และ *Vibrio* อื่นๆ น้อยกว่า 1% (Echeverria *et al.*, 1983) และได้มีการศึกษาแยกเชื้อ *Vibrio* จากเลือดของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลศิริราชระหว่างเดือน มกราคม ค.ศ. 1983 – มีนาคม ค.ศ. 1988 พบ *V. cholerae* non-O1 13 สายพันธุ์ *V. vulnificus* 3 สายพันธุ์ และ *Vibrio* สปีชีส์อื่น อีก 10 สายพันธุ์ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชายมีประวัติการเป็นโรคตับแข็ง ผู้ป่วยมีอาการ ปวดเกร็งในช่องท้อง ท้องเสีย เชื้อบูท้องอักเสบ ซีด และมึนเมาที่ผิวหนัง ผู้ป่วยบางรายมีประวัติการรับประทานอาหารทะเลหรือสัมผัสกับน้ำทะเลก่อนที่จะเกิดอาการดังกล่าว 50 % ของผู้ป่วยเสียชีวิตถึงแม้จะได้รับการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ (Thamlikitkul, 1990) ในปี ค.ศ. 1999 มีรายงานการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลส่งออกจำนวน 686 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และเวียดนาม พบ *V. parahaemolyticus* สูงถึง 45.9% โดยส่วนใหญ่พบเชื้อในตัวอย่างที่มาจากฮ่องกงและประเทศไทยสูงกว่าตัวอย่างที่มาจากอินโดนีเซีย และเวียดนามมาก ซึ่งตัวอย่างที่พบส่วนใหญ่เป็น กุ้ง ปู ปลา และหอย (Wong *et al.*, 1999) และในเดือนมิถุนายนปี ค.ศ. 1998 ได้มีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในโรงเรียนกบินทอนในประเทศไทย จากการตรวจแยกเชื้อในลูกชิ้นปลา น้ำ และอุปกรณ์การปรุงอาหารเพื่อหาสาเหตุของโรค พบ *V. parahaemolyticus* จากลูกชิ้นปลาเป็น

สาเหตุของการระบาดดังกล่าว (Tangkanakul *et al*, 2000) นอกจากนี้ในเดือนธันวาคม ปี 1998 ถึง มกราคม ปี ค.ศ. 1999 ได้มีการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในตลาดสดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 114 ตัวอย่าง แบ่งเป็น หอย 54 ตัวอย่าง กุ้ง 30 ตัวอย่างและปลา 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากหอย 51 ตัวอย่าง (94%) กุ้ง 25 ตัวอย่าง (83%) และปลา 22 ตัวอย่าง (73%) โดยพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียื่นสร้างสารพิษในตัวอย่างหอย 1 ตัวอย่าง (Vuddhakul *et al.*, 2000a)

1.2.2 *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus ถูกพบครั้งแรกโดย Fujino และ คณะ ในปี ค.ศ. 1950 โดยขณะนั้นเชื่อดังกล่าวเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในเมือง โอซากา ประเทศญี่ปุ่น มีผู้ป่วยที่แสดงอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง จำนวน 272 ราย และเสียชีวิต 20 ราย เนื่องจากการรับประทานชิราสุ ซึ่งเป็นปลา ซาร์ดีน (*Engraulis japonica* Hottuyn) ตัวเล็กกึ่งตากแห้ง โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีระยะ ฟักตัวของโรค 2-6 ชั่วโมง อาการโดยทั่วไปประกอบด้วย ปวดเกร็งในช่องท้อง อาเจียน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ แต่บางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน ปวดศีรษะ หนาวสั่น Fujino ตั้งชื่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุว่า *Pasteurella parahaemolytica* ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 ได้มีการศึกษาลักษณะของเชื้อพบว่า เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนปลายมน ยาว 1-3 μm หมักน้ำตาล glucose ให้กรดแต่ไม่ให้เกิด ก๊าซ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ single polar flagellum ให้ผลบวกในการทดสอบ indole และในปี ค.ศ. 1955 Takikawa พบว่า *P. parahaemolytica* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophile) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3% ในปี ค.ศ. 1963 Sakazaki และคณะ ได้ศึกษาลักษณะรูปร่าง การเพาะเลี้ยงเชื้อ และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *P. parahaemolyticus* จึงเปลี่ยนจากจีแนส *Pasteurella* เป็นจีแนส *Vibrio* (Miwatani and Takeda, 1976)

ในประเทศญี่ปุ่นพบ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ ในปี ค.ศ. 1961-1974 มีผู้ป่วยจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ประมาณ 50-70%

ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย (Miwatani and Takeda, 1976) และเช่นเดียวกันในปี ค.ศ. 1987-1996 พบผู้ป่วยจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ประมาณ 70% ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย ([http:// www.fao.org/DOOREP/003/XO465E00.HTM](http://www.fao.org/DOOREP/003/XO465E00.HTM)) ซึ่งสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อจากอาหารทะเลโดยตรงและโดยอ้อม การติดเชื้อโดยตรงเกิดจากวัฒนธรรมการรับประทานอาหารแบบดิบ ส่วนการติดเชื้อโดยอ้อมเกิดจากการปนเปื้อนของอาหารภายหลังการปรุง (Farmer *et al.*, 1985)

ในสหรัฐอเมริกา การระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ครั้งสำคัญครั้งแรกเกิดในรัฐ Maryland ปี ค.ศ. 1971 ทำให้มีผู้ป่วย 320 ราย ซึ่งสาเหตุเกิดจากการรับประทานปูหนึ่ง และต่อมาเกิดการระบาดขึ้นตลอดชายฝั่งของสหรัฐอเมริกาและเกาะฮาวาย การระบาดครั้งใหญ่ที่สุดเกิดในช่วงหน้าร้อนปี ค.ศ. 1978 มีผู้ป่วย 1,133 ราย จากทั้งหมด 1,700 ราย ที่รับประทานกุ้งต้มเป็นอาหารเย็นใน Port Allen La. จากการตรวจแยกเชื้อจากอุจจาระของผู้ป่วยพบว่าเป็น *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP⁺ (Oliver and Kaper, 1997) และในปี ค.ศ. 1988-1997 พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคลำไส้อักเสบ 59% การติดเชื้อในบาดแผล 34% ติดเชื้อในกระแสโลหิต 5% และติดเชื้อบริเวณอื่น 2% ซึ่งสาเหตุหลักในการติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานหอยนางรมดิบ โดยพบว่า 88% ของผู้ป่วยที่มีอาการลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ 91% ของผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อในกระแสโลหิต มีประวัติการรับประทานหอยนางรมดิบก่อนเกิดอาการ (Daniels *et al.*, 2000) และจากการศึกษาพบว่าปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่ก่อให้เกิดโรค (infective dose) เท่ากับ 10^5 - 10^7 เซลล์ (Sanyal *et al.*, 1974)

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ครั้งแรกในปีค.ศ. 1970 ครั้งนั้น *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงสูงถึงร้อยละ 25 ของสาเหตุทั้งหมด ซึ่งสูงกว่า Salmonella และ Shigella (อรษา สุตเชียรกุล, 2541) และจากรายงานการสำรวจ *V. parahaemolyticus* ในผู้ป่วยโรงพยาบาลโรคติดต่อ กรมควบคุมโรคติดต่อ ระหว่างเดือน พฤศจิกายน ค.ศ. 1970 - มิถุนายน ค.ศ. 1973 มีผู้ป่วย 2.9 - 22.6% และในปีค.ศ. 1978 Maruyama และคณะ

พบว่าสาเหตุของการเกิดโรคอุจจาระร่วงในจังหวัดจันทบุรี มีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* 39.9% จากการศึกษาอุบัติการณ์ของโรคร่วมกับชนิดของอาหารที่รับประทานพบว่า สาเหตุเกิดจากการรับประทานปูแสม (ปูเค็ม) ปลาทะเล กุ้งทะเล ลูกชิ้นปลาทะเล และหอยแมลงภู่ (บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ และคณะ, 2527) อย่างไรก็ตามการศึกษาระบาดของ *V. parahaemolyticus* ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล บำราศนราคร จังหวัดจันทบุรี ระหว่างปี ค.ศ. 1990-1991 พบว่าอัตราการป่วยซึ่งมีสาเหตุจาก *V. parahaemolyticus* ลดลงเหลือไม่ถึงร้อยละ 10 แต่จากรายงานการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในลำไส้ผู้ป่วยจังหวัดอุบลราชธานี เดือนเมษายน ค.ศ. 2000 - มีนาคม ค.ศ. 2001 พบการระบาดของโรคในลำไส้อักเสบในจังหวัดอุบลราชธานีมีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* สูงถึง 49% การเกิดโรคพบในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ พบมากในเดือนกรกฎาคม และกระจายในทุกเดือน (<http://www.moph.go.th/ops/epi/known/lab.html>) จากการสำรวจผู้ที่มีสุขภาพสมบูรณ์จำนวน 450 คน พบ 3.8% (17 คน) เป็นพาหะของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และมีผู้ป่วย 3 รายที่มีอาการท้องเดินไม่รุนแรง (บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ และคณะ, 2527) ดังนั้นถ้าบุคคลเหล่านี้เป็นผู้ประกอบอาหารอาจเป็นพาหะทำให้เกิดการระบาดของเชื้อได้

1.2.2.1 ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยขนาด 0.5-0.8x1.4-2.6 μm สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่ด้วย single polar flagellum แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (chemoorganotroph) *V. parahaemolyticus* สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ ไม่สามารถหมักน้ำตาล sucrose แต่หมักน้ำตาล glucose ให้กรดแต่ไม่ให้เกิดแก๊ส ดังนั้นลักษณะโคโลนิบนอาหาร TCBS จึงมีสีเขียวอมน้ำเงินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร *V. parahaemolyticus* สามารถหมักน้ำตาล mannitol และ mannose แต่ไม่สามารถหมัก salicin และ cellubiose สามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส (mesophile) อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 44 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ที่ pH ค่อนข้างกว้างคือ 4.8-11 แต่ pH ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 7.6-8.6 นอกจากนี้ โซเดียมคลอไรด์ ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.5-8% ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2-3% เมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone water ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะมี generation time สั้นประมาณ 11 นาที (Lee, 1990)

ในธรรมชาติพบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญได้ มีการศึกษาเลี้ยงเชื้อในน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ heart infusion agar และ TCBS แต่เชื้อยังมีขบวนการ metabolism และ เซลล์เมมเบรนยังมีสภาพสมบูรณ์ แต่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากรูปแท่งเป็นรูปกลม แต่เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้หากมีการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำทะเลก่อนการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Johnston and Brown, 2002) ส่วนการอยู่รอดในอาหารต่างๆ พบว่า เมื่อนำกุ้งทั้งตัวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3, 7, 10 หรือ -18 องศาเซลเซียส ปริมาณ *V. parahaemolyticus* จะลดลงแต่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 8 วัน ในหอยนางรมที่วางบนชั้นจำหน่ายอาหารอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ อย่างน้อย 3 อาทิตย์ และสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน และเช่นเดียวกัน *V. parahaemolyticus* ในซูริมิ (surimi) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อลดลงแต่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีกเมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Wong et al., 1994) สำหรับผลของความร้อนต่อการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* พบว่าที่อุณหภูมิ 60 80 และ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที สามารถทำลายเชื้อจำนวน 5×10^2 เซลล์ ได้ แต่หากเชื้อมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จำเป็นต้องใช้เวลาในการทำลายเชื้อเพิ่มมากขึ้น เช่น ปริมาณเชื้อ 2×10^5 เซลล์ ถูกทำลายด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หรือ 80

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเชื้อสามารถถูกทำลายได้ในน้ำเดือดที่เวลา 1 นาที (Vanderzant and Nickelson, 1972)

1.2.2.2 แหล่งที่อยู่

V. parahaemolyticus พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งทะเลในน้ำทะเล ทั่วโลก ในตะกอนดิน อนุภาคแขวนลอย สัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู ปลา แพลงก์ตอน และสาหร่าย การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นกับฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนพบเชื้อมากกว่าฤดูหนาว จากการศึกษาปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่จำหน่ายในร้านค้า ปลีกช่วงปี ค.ศ. 1998-1999 ในสหรัฐอเมริกาโดยวิธี Most Probable Number พบว่า ปริมาณของ *V. parahaemolyticus* เพิ่มขึ้นสูงมากในช่วงฤดูร้อน (Cook, et al., 2002) ในช่วงฤดูหนาวเชื้อจะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้น้ำ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและปนเปื้อนในน้ำทะเลมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ในแพลงก์ตอนสัตว์ โดยเชื้อติดซับสารไคตินบนแพลงก์ตอน เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะย่อยผนังเซลล์ของแพลงก์ตอน และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในน้ำทะเล จากการศึกษาพบว่า ไม่สามารถแยกเชื้อในน้ำทะเลที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส แต่สามารถแยกเชื้อจากตะกอนดินได้แม้ว่าอุณหภูมิของตะกอนดินจะต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (Kaneko and Colwell, 1973)

ประเทศไทยมีอุณหภูมิตลอดปีไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นการระบาดของเชื้อจึงพบได้ทุกเดือน แต่พบผู้ป่วยมากที่สุดในเดือนมิถุนายน และพบน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม จากการศึกษาวิจัยบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน และอ่าวไทย โดยเก็บตัวอย่างน้ำทะเลทั้งหมด 234 ตัวอย่าง จากระดับผิวน้ำ ระดับกลาง และระดับผิวดิน จากตะกอนดิน 78 ตัวอย่าง พบว่าบริเวณฝั่งอ่าวไทยตอนบนมีเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน (เกรียงศักดิ์ สายธนู และคณะ, 2524) โดยบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีเชื้อในน้ำทะเล 54% ตะกอนดิน 72% ฝั่งทะเลอันดามันมีเชื้อในน้ำทะเล 8% ตะกอนดิน 44% ผลดังกล่าวอาจเกิดจากบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระจายของเชื้อกล่าวคือเป็นบริเวณที่ประชากรหนาแน่น มีสารอินทรีย์และสิ่งปฏิกูลจากคนและสัตว์ไหลจากพื้นดินสู่อ่าว

ไทยจำนวนมาก จึงทำให้สภาวะเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนและการกระจายของเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน (บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ และคณะ, 2527)

1.2.2.3 ปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค

1.2.2.3.1 Thermostable direct hemolysin

แม้ว่า *V. parahaemolyticus* มีแหล่งที่อยู่ในน้ำทะเลและชายฝั่งทะเลทั่วโลก แต่มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในมนุษย์ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้าง hemolysin ซึ่งทำให้เกิดปรากฏการณ์เม็ดเลือดแดงของคนหรือกระต่ายแตกแบบสมบูรณ์ (β -hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษที่เติมเลือดชื่อ Wagatsuma agar ปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่า Kanagawa phenomenon (KP^+) ซึ่งพบได้ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย ประมาณ 88-96 % ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมพบ KP^+ เพียง 1-2 % เท่านั้น ดังนั้น hemolysin ดังกล่าวจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรค ซึ่งต่อมาเรียกว่า thermostable direct hemolysin (TDH) (Miyamoto *et. al.*, 1969) TDH จัดเป็น pore-forming toxin ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำให้เซลล์แตกในเวลาต่อมา ซึ่งกลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ TDH สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด phosphorylation ของโปรตีนขนาด 25 kDa และ 22.5 kDa บนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง TDH เป็นพิษต่อเซลล์หลายชนิดยกเว้นเซลล์ของม้า มีผลต่อ human anionic membrane cell (FL cell) โดยไปลดจำนวน microvilli ที่ผิวเซลล์ ทำให้ไซโทพลาสซึมเสื่อมและนิวเคลียสแตก (Sakurai *et al.*, 1976) เมื่อทดสอบกับ human embryonic cell (Int 407) พบว่าทำให้เกิด independent cytotoxicity ไปทำลายส่วนของเยื่อหุ้มพลาสมา ไกลโซโซม และทำให้เซลล์เสื่อม เมื่อทดสอบกับ rat crypt small intestinal cell monolayer (IEC-6) และ human colonic epithelial cell (CaCo-2) พบว่า TDH มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ Ca^{2+} เข้าเซลล์ ทำให้เกิดการหลั่งของ Cl^- ไปลดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์และทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนไป (Fabbri *et al.*, 1999; Raimondi *et al.*, 2000 ; Takahashi *et al.*, 2000) และยังสามารถเหนี่ยวนำให้อิออนอื่นๆ เช่น Mn^{2+} และ Na^+ เข้าเซลล์ได้เช่นกัน นอกจากนี้ TDH ยังมีบทบาทเป็น enterotoxin เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือดออกจากหลอดเลือดที่ผิวหนัง (vascular permeability)

(Alouf and Freer, 1999) จากการศึกษาใน rabbit ileal loop พบว่า TDH ทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ (fluid accumulation) เกิดอาการอุจจาระร่วง โดยใช้ปริมาณ TDH 100-500 μg ต่อ loop ซึ่งสูงกว่า toxin ของแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น Cholera toxin 0.2 μg สามารถทำให้เกิด fluid accumulation ได้ (Miyamoto *et al.*, 1980; Honda and Iida, 1993)

TDH เป็น homodimer protein ซึ่งไม่มีฟอสโฟไลปิด และคาร์โบไฮเดรต มีน้ำหนักโมเลกุล 42 kDa ประกอบด้วยโปรตีน 2 ยูนิตที่เหมือนกัน โดยแต่ละยูนิตมีขนาด 21 kDa แต่ละสายของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 165 ตัว TDH มีคุณสมบัติทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ที่ pH 6.0 และไวต่อ trypsin (Miyamoto *et al.*, 1980) และควบคุมการสร้างโดยยีน *tdh* จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่างๆ พบ *tdh1-tdh5* *tdhA* *tdhS* *tdhX* *tdh/I* และ *tdh/II* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากกว่า 97% ดังนั้นยีน *tdh* ทั้งหมดจึงน่าจะเป็นยีนกลุ่มเดียวกัน (Iida and Yamamoto, 1990; Yoh *et al.*, 1991; Nagayama *et al.*, 1995; Nishibuchi and Kaper, 1995;) ซึ่งยีน *tdh* ส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซม ยกเว้น *tdh4* อยู่บนพลาสมิด (Nishibuchi and Kaper, 1990) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KP^+ มียีน *tdh* 2 ชุด จากการศึกษาพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 81% มียีน *tdh* 2 ชุด (Iida *et al.*, 1998) ส่วนสายพันธุ์ KP^- มียีน *tdh* เพียงชุดเดียว ทำให้มีการแสดงออกของยีนต่ำจึงไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน Wagatsuma agar หรือเกิดการย่อยสลายแบบ weak hemolysis ยีนที่มีความสำคัญในการทำให้เกิดปรากฏการณ์ Kanagawa phenomenon คือ *tdh2* (Nishibuchi and Kaper, 1990; Nishibuchi, *et al.*, 1991) จากการศึกษาการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยทำให้ยีน *tdh1* หรือ *tdh2* บกพร่อง พบว่า *tdh1* สามารถผลิต TDH ได้เพียง 0.5-9.4% ในขณะที่ *tdh2* ผลิต TDH ได้มากกว่า 90% ของปริมาณ TDH ทั้งหมดที่ผลิตจาก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีทั้ง 2 ยีน (Nishibuchi, *et al.*, 1991) นอกจากนี้ *V. parahaemolyticus* ยังมีผลทำให้สัตว์ทดลองตาย (lethal activity) Honda และคณะ (1976a) พบว่า เมื่อฉีด TDH ให้หนูจะทำให้หนูเคลื่อนที่ช้าลง เป็นตะคริว และมีผลต่อหัวใจทำให้หนูตาย จากการฉีด TDH ปริมาณ 5 กรัมเข้าใต้ผิวหนังทำให้หนูตายภายใน 1 นาที เมื่อฉีดปริมาณ 1

ไมโครกรัมจะทำให้หนูตายภายใน 20 นาที และเมื่อฉีดเข้าช่องท้องของหนู ผลของ TDH จะดีกว่าการฉีดเข้าใต้ผิวหนังแต่สามารถทำให้หนูตายได้เช่นกัน (Honda *et al.*, 1976b)

นอกจากพบยีน *tdh* ใน *V. parahaemolyticus* แล้วยังพบใน *V. hollisae* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม (Nishibuchi *et al.*, 1986; Nishibuchi *et al.*, 1988) และพบใน *V. mimicus* และ *V. cholerae* non-O1 บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Nishibuchi and Kaper, 1995) โดยมีความคล้ายคลึงกับยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* จากการศึกษโดยใช้ DNA probe ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ตรวจจับ DNA ของ *V. hollisae* โดยการทำให้ DNA colony hybridization พบว่าให้ผลบวก (Nishibuchi *et al.*, 1986; Nishibuchi *et al.*, 1988) ต่อมา มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* คล้ายกับยีน *tdh* ของ *V. hollisae*, *V. cholerae* non-O1 และ *V. mimicus* 93.3% 97.0% และ 98.6% ตามลำดับ (Baba *et al.*, 1991; Yamasaki *et al.*, 1991; Nishibuchi and Kaper, 1995) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ามีการถ่ายทอดยีน *tdh* ระหว่างกลุ่มของ *Vibrio* ด้วยกัน ซึ่งการถ่ายทอดยีน *tdh* อาจจะผ่านทาง transposition หรือ transduction เนื่องจากตรวจพบโครงสร้าง insertion sequence-like element ขนานข้างยีน *tdh* (Terai *et al.*, 1991) และยีนของ bacteriophage บนโครโมโซมของ *V. parahaemolyticus* (Taniguchi *et al.*, 1984)

1.2.2.3.2 Thermostable direct hemolysin-related hemolysin

ปี ค.ศ. 1985 พบการระบาดของโรคลำไส้อักเสบเนื่องจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเกาะ Maldives จากการแยกเชื้อในผู้ป่วย 51 ราย พบว่า เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 12 ราย (24%) เป็นสายพันธุ์ KP⁻ และให้ผลลบจากการทำ colony hybridization โดยใช้ยีน *tdh* probe เป็นตัวตรวจจับ (Honda *et al.*, 1987) จากการศึกษต่อมาพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิต hemolysin ชนิดใหม่ชื่อว่า thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) เมื่อศึกษาฤทธิ์ของ TRH พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ TDH โดยสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดแตก ทำให้สัตว์ทดลองตาย (Honda *et al.*, 1988) มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด

บริเวณผิวหนัง และทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ (Honda *et al.*, 1990; Ming *et al.*, 1994)

TRH เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 189 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 48 kDa ประกอบด้วย 2 ยูนิตที่เหมือนกัน แต่ละยูนิตมีขนาด 23 kDa ไม่ทนความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที ควบคุมการสร้างโดยยีน *trh* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *tdh1* 68.4% และ *tdh2* 68.6% (Nishibuchi *et al.*, 1989) ยีน *trh* แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ *trh1* และ *trh2* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 84% hemolysin ซึ่งควบคุมการสร้างโดยยีน *trh1* มีแอนติเจนบางส่วนร่วมกับ hemolysin ที่ควบคุมการสร้างโดยยีน *trh2* แต่ไม่เหมือนกัน *trh1* ทำให้เม็ดเลือดแดงของคน กระจาย แทะ และฉีกแตก ในขณะที่ *trh2* ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและกระจายแตกเท่านั้น และแตกในระดับที่ต่ำกว่า *trh1* (Kishishita *et al.*, 1992) ได้มีการศึกษาการกระจายของยีน *tdh trh1* และ *trh2* ใน *V. parahaemolyticus* 285 สายพันธุ์ ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม โดยวิธี colony hybridization พบว่า สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย 112 สายพันธุ์ มี *tdh* อย่างเดียว 17 สายพันธุ์มี *trh1* อย่างเดียว 35 สายพันธุ์มี *trh2* อย่างเดียว 22 สายพันธุ์มีทั้ง *tdh* และ *trh1* 2 สายพันธุ์มีทั้ง *tdh1* และ *trh2* และ 26 สายพันธุ์ตรวจไม่พบ ทั้ง 3 ยีน ส่วนสายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม 5 สายพันธุ์ตรวจพบ *trh2* ทำให้สรุปได้ว่ายีน *tdh trh1* และ *trh2* เป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* (Kishishita *et al.*, 1992)

ความสัมพันธ์ระหว่างการมียีน *trh* และการสร้างเอนไซม์ urease ใน *V. parahaemolyticus* จากการศึกษาพบว่าโดยทั่วไป *V. parahaemolyticus* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้แต่มีการตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมใน Pacific North West และ Willapa Bay, Washington สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้แต่ให้ผล KP เป็นลบ (Kelly and Stroh, 1989; Kaysner *et al.*, 1990) ซึ่งภายหลังพบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีน *trh* สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ จากการศึกษา *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 489 สายพันธุ์ จากโรงพยาบาลบาราคนราคร ในปีค.ศ. 1990-1991 พบว่า *V. parahaemolyticus* จำนวน 8% สามารถสร้างเอนไซม์ urease และทุกสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ urease จะมียีน *trh* ในทางกลับกันสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ urease จะไม่มียีน *trh* (Suthienkul *et*

al., 1995) ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในน้ำทะเลอันดามัน ให้ผลเช่นเดียวกันคือ เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ urease จะมียีน *trh* ส่วนเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ urease จะไม่มียีน *trh* (Ghosh and Sehgal, 1998) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Okuda และคณะ (1997b) ได้ทำการศึกษาดูหา ยีน *tdh* และ *trh* ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ urease จำนวน 60 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคพบกว่า 98% มียีน *trh* และ 54% มียีน *tdh* จากงานวิจัยทั้งหมดดังกล่าวจึงเป็นที่ยอมรับว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ urease และการมียีน *trh* ใน *V. parahaemolyticus* โดยสายพันธุ์ที่มียีน *trh* สามารถสร้างเอนไซม์ urease เสมอ แต่สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *trh* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการสร้างเอนไซม์ urease เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ถึงความรุนแรงในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้าง TRH ได้ เช่นกัน ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *ure* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ urease และยีน *trh* ใน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี colony hybridization ใช้ *ure* probe และ *trh* probe เป็นตัวตรวจจับ พบว่า *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ urease จะสามารถสร้าง TRH แสดงว่า สายพันธุ์ที่มียีน *ure* จะมียีน *trh* อยู่ด้วยกัน และเมื่อนำโครโมโซมของสายพันธุ์ดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และทำ pulse field gel electrophoresis และ hybridize ด้วย *ure* และ *trh* probe พบดีเอ็นเอเพียง 1 band แสดงว่า ยีน *trh* และ *ure* อยู่ในชิ้นส่วนเดียวกัน (Iida et al., 1997) และเมื่อนำ *V. parahaemolyticus* 115 สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วย ซึ่ง 81% มียีน *tdh* 2 ชุด แต่ไม่พบยีน *trh* และ *ure* 7% มียีน *tdh* *trh* และ *ure* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* แล้วทำ pulse field gel electrophoresis และทำ Southern blot hybridization ด้วย *tdh* probe *trh* probe และ *ure* probe เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของยีนทั้งสามบนโครโมโซม พบว่ายีน *tdh* ทั้ง 2 ชุด อยู่บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเดียวกัน และสายพันธุ์ที่มียีน *tdh* *trh* และ *ure* ก็มียีนทั้งสามอยู่บนชิ้นส่วนเดียวกัน โดยมีขนาด 40 Kb และยีน *trh* และ *ure* อยู่ห่างกัน 8.5 Kb ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของยีน *tdh* *trh* และ *ure* อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันบนโครโมโซมของ *V. parahaemolyticus* (Iida et al., 1998)

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ที่มียีน *tdh* และ *trh* อยู่ด้วยกัน จะมีการสร้าง TDH ต่ำกว่าสายพันธุ์ที่มีเฉพาะยีน *tdh* อย่างเดียว (Okitsu *et al.*, 1997)

1.2.2.4 ยีน *toxR*

toxR เป็นยีนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved sequence) ในวงศ์ Vibrionaceae พบครั้งแรกใน *V. cholerae* โดยทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ cholera toxin และต่อมาพบว่าสามารถควบคุมการทำงานของยีนอื่นๆอีกหลายชนิด เช่น *tcpA* gene, *OmpT* gene และ *OmpU* gene (Dirita, 1992 ; Miller *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังพบยีน *toxR* ใน *V. mimicus* *V. alginolyticus* *V. fisheri* *V. parahaemolyticus* *V. hollisae* *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* และ *P. damsela* subsp. *piscicida* (Lin *et al.*, 1993; Reich and Schoolnik, 1994; Kim *et al.*, 1999; Osorio and Klose, 2000) โดยยีน *toxR* ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนก่อความรุนแรงของโรค โดยสร้างโปรตีน ToxR ไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง upstream ของ promoter ของยีนก่อความรุนแรงของโรค (Miller *et al.*, 1987 ; Lin *et al.*, 1993) จากการศึกษพบว่า ToxR เป็น integral membrane protein ที่มีขนาด 32 kDa ประกอบด้วย 3 domain คือ N-terminal cytoplasmic DNA-binding domain central transmembrane domain และ C-terminal periplasmic domain (Miller *et al.*, 1987) ต่อมามีการพบยีน *toxS* บริเวณ *toxR* operon ทำงานร่วมกับ *toxR* ในการกระตุ้นการถอดรหัสของยีนก่อความรุนแรงของโรค ของ *V. cholerae* (Miller *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังพบ *toxR* และ *toxS* ใน *V. parahaemolyticus* ทำงานร่วมกันเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน *tdh2* สามารถพบยีนทั้งสองใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ทั้งในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมโดยยีน *toxR* และ *toxS* ใน *V. parahaemolyticus* เหมือนกับยีน *toxR* และ *toxS* ใน *V. cholerae* 52% และ 62% ตามลำดับ (Lin *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังพบยีน *toxR* และ *toxS* ใน *Vibrio* อื่นๆอีกโดย *toxR* และ *toxS* ของ *V. fisheri* เหมือนกับ *toxR* และ *toxS* ใน *V. cholerae* 43% และ 42% ตามลำดับ (Reich and Schoolnik, 1994) *toxR* และ *toxS* ของ *V. vulnificus* เหมือนกับ *toxR* และ *toxS* ใน *V. cholerae* 55% และ 71.5% ตามลำดับ (Lee *et al.*, 2000) *toxR* ของ *V. alginolyticus*

และ *V. hollisae* เหมือนกับยีน *toxR* ใน *V. cholerae* 59% และ 61.7% ตามลำดับ (Reich and Schoolnik, 1994) ดังนั้นจึงมีการใช้ *toxR* เป็นยีนเป้าหมายในการบ่งชี้เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. hollisae* โดยวิธี PCR ซึ่งพบว่าให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ (Kim *et al.*, 1999 ; Vuddhakul *et al.*, 2000b)

1.2.2.5 พยาธิสภาพ

V. parahaemolyticus ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ผู้ป่วยแสดงอาการ อุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน อาจมีไข้ ผู้ป่วยบางรายมีอาการอาเจียน มีมูกเลือดปน โดยพบว่าผู้ป่วยมากกว่า 90% มีอาการอุจจาระร่วง (ตารางที่ 1.2) (Barker and Gangarosa, 1974) อาการของโรคลำไส้อักเสบเกิดขึ้นหลังได้รับเชื้อ 10^6 - 10^9 โดยมีระยะฟักตัวประมาณ 4-9 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ระยะเวลาดำเนินการป่วยประมาณ 2-3 วัน ในรายที่รุนแรงอาจป่วยนาน 1-2 อาทิตย์ โดยปกติมักหายเอง สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรือปรุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ

ตารางที่ 1.2 พยาธิสภาพของผู้ป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus*

อาการ	จำนวนผู้ป่วยที่เกิดอาการ(%)
อุจจาระร่วง	98
ปวดท้อง	82
คลื่นไส้	71
อาเจียน	52
ปวดหัว	42
ไข้	27
หนาวสั่น	24

ที่มา : Barker and Gangarosa, 1974

1.2.2.6 ระบาดวิทยา

ในอดีตการก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบเนื่องจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* เกิดจากซีโรทัยป์ที่หลากหลาย (Suthienkul *et al.*, 1995; Okuda *et al.*, 1997a) แต่ในปี ค.ศ. 1996 ตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ถึงสิงหาคม ที่เมือง Calcutta ประเทศอินเดีย พบผู้ป่วยติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 จำนวนมาก ประมาณ 50-80% ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ไม่เคยพบมาก่อน ซึ่งซีโรทัยป์ O3:K6 ดังกล่าวมียีนสร้างสารพิษ *tdh* เพียงชนิดเดียว (Okuda *et al.*, 1997a) จากการศึกษาในระดับโมเลกุลโดยวิธี Arbitrarily primed - polymerase chain reaction (AP-PCR) พบว่า ซีโรทัยป์ O3:K6 ที่พบในปี ค.ศ. 1996 เป็นสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งกำเนิด (clone) เดียวกัน แต่ต่างจากซีโรทัยป์ O3:K6 ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 หลังการระบาดที่เมือง Calcutta ประเทศอินเดียแล้ว *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 ได้แพร่ระบาดไปสู่ประเทศอื่นๆในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ ลาว ใต้หวัน ญี่ปุ่น บังกลาเทศ เกาหลี และประเทศไทย (Chiou *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000) ในประเทศใต้หวันพบซีโรทัยป์ O3:K6 ครั้งแรกในเดือนตุลาคม ค.ศ.1995 เพียง 0.6% ของการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด แต่ในปี ค.ศ. 1996 ปริมาณการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 เพิ่มขึ้นเป็น 50% อย่างทันทีทันใด และเพิ่มสูงสุดในปี ค.ศ. 1997 เป็น 83.3% ต่อจากนั้นได้ลดลงในปี ค.ศ. 1998 และ 1999 แต่ยังคงมีปริมาณสูงคือ 71.5% และ 61.3% ตามลำดับ (Chiou *et al.*, 2000) สำหรับในประเทศไทยจากการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ในปี ค.ศ. 1998 ระหว่างเดือนกันยายนถึงตุลาคม จำนวน 23 สายพันธุ์ พบ ซีโรทัยป์ O3:K6 จำนวน 20 สายพันธุ์ (Vuddhakul *et al.*, 2000a) นอกจากประเทศในแถบทวีปเอเชียแล้ว *V. parahaemolyticus* ในปี ค.ศ. 1998 ซีโรทัยป์ O3:K6 ยังได้แพร่ระบาดไปถึงประเทศสหรัฐอเมริกา ใน Long Island, Sound Connecticut, New Jersey และ New York (CDC, 1999) จากการศึกษาทางพันธุกรรมโดยวิธี AP-PCR, PFGE และ ribotyping พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 ที่ระบาดไปทั่วโลกมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน และมียีนสร้างสารพิษ *tdh* เพียงชนิดเดียว (Okuda *et al.*, 1997a; Chowdhury *et al.*, 2000a; Chowdhury *et al.*, 2000b; Matsumoto *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000a; Wong *et al.*, 2000)

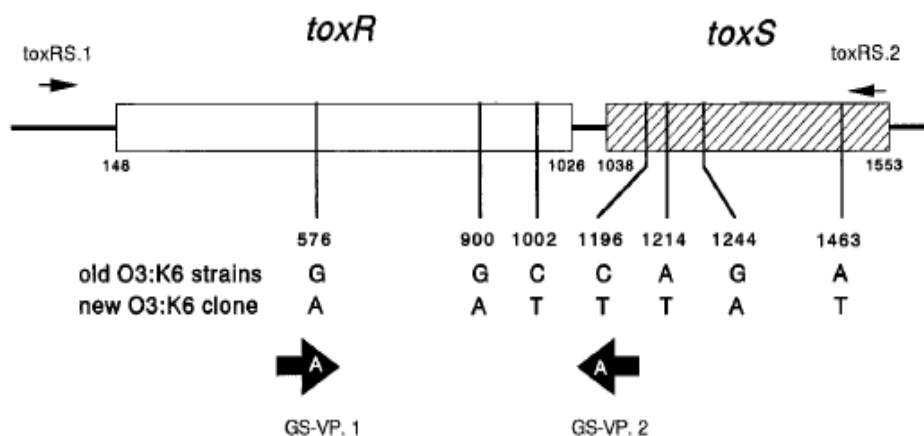
ต่อมาในปี ค.ศ. 1998 ในเมือง Catcutta ประเทศอินเดีย และบังกลาเทศ พบ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O4:K68 และ O1:KUT ระบาดร่วมกับซีโรทัยป์ O3:K6 เมื่อศึกษาลักษณะรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยวิธี AP-PCR PFGE และ Ribotyping พบว่าทั้งสามซีโรทัยป์มีลักษณะของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน แสดงว่าทั้ง 3 ซีโรทัยป์ มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน (Chowdhury *et al.*, 2000b; Matsumoto *et al.*, 2000) ในประเทศไทยมีการระบาดของซีโรทัยป์ O4:K68 ร่วมกับซีโรทัยป์ O3:K6 เช่นกันแต่ไม่มีรายงานการระบาดของ ซีโรทัยป์ O1:KUT ซึ่งซีโรทัยป์ O4:K68 และ O3:K6 ดังกล่าวแยกมาจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลบาราคนราดัวร์ (Chowdhury *et al.*, 2000a) จากการทำให้ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และ PFGE พบว่าทั้ง 2 ซีโรทัยป์มาจากแหล่งเดียวกับ O3:K6 ในประเทศอินเดีย

จากการศึกษาเพื่อแยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์ที่พบในปี ค.ศ. 1996 และ สายพันธุ์ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 โดยใช้วิธี AP-PCR, AFLP, PFGE และ ribotyping เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ต้องอาศัยความชำนาญ และใช้เวลานาน ไม่เหมาะต่อการศึกษานับร้อยปริมาณมากๆ ดังนั้น Matsumoto และคณะ(2000) จึงได้พัฒนาการตรวจสอบเพื่อหาความแตกต่างของยีนส่วน *toxRS* ทำให้แยกกลุ่มซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์ที่พบในปี ค.ศ. 1996 และซีโรทัยป์ อื่นๆที่มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน ออกจาก ซีโรทัยป์ O3:K6 ที่พบก่อนปี 1996 เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า Group Specific - Polymerase Chain Reaction (GS-PCR) ซึ่งจากการทำให้ GS-PCR ดังกล่าวพบว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6, O4:K68 และ O1:KUT ที่ระบาดในประเทศต่างๆ มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน (Matsumoto *et al.*, 2000)

1.2.3 วิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

1.2.3.1 Group Specific - Polymerase Chain Reaction (GS-PCR)

วิธี GS-PCR เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสวิธีที่ใช้ยีนส่วนของ *toxRS* เป็นยีนเป้าหมายซึ่ง *toxR* และ *toxS* อยู่ในตำแหน่งของ *toxRS* operon ควบคุมการสร้าง transmembrane proteins ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนก่อโรคในจีโนม *Vibrio* (Dirita, 1992; Lin *et al.*, 1993; Reich *et al.*, 1994) จากการศึกษาลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีน *toxR* และ *toxS* ซึ่งมีขนาด 1364 คู่เบส ของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์ที่พบในเมือง Calcutta ประเทศอินเดียปี ค.ศ. 1996 พบว่า ลำดับเบสของสายพันธุ์ดังกล่าว 7 ตำแหน่ง ต่างจากสายพันธุ์ที่พบก่อนปี ค.ศ. 1996 คือ ตำแหน่งที่ 576 900 1002 1196 1214 1244 และ 1463 จากลำดับเบสเดิมคือ G G C C A G และ A เปลี่ยนเป็นเบส A A T T T A และ T ตามลำดับ Matsumoto (2000) ได้ออกแบบ primer GS-VP1 ซึ่งมีลำดับเบส 5'-TAATGAGGTAGAAACA-3' ครอบคลุมลำดับเบสในตำแหน่งที่ 576 และ primer GS-VP2 ซึ่งมีลำดับเบส 5'-ACGTAACGGCCTACA-3' ครอบคลุมลำดับเบสในตำแหน่งที่ 1196 ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ GS-PCR มีขนาด 651 คู่เบส ทำให้แยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 และ ซีโรทัยป์อื่นที่มีเบสในส่วนของ *toxRS* เปลี่ยนไปจากเดิมได้ซึ่งถือว่าสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ใหม่



รูปที่ 1.1 ตำแหน่งของ primer (GS-VP1 และ GS-VP2) ที่อยู่ในส่วนของยีน *toxR* และ *toxS* ในการทำ GS-PCR และลำดับเบสที่เปลี่ยนไปของ *V. parahaemolyticus* ซีโรทัยป์ O3:K6 สายพันธุ์เก่าและสายพันธุ์ใหม่ (ที่มา : Matsumoto *et al.*, 2000)

นอกจากวิธี GS-PCR ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นในการแยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ใหม่ที่กำลังระบาดและมีขึ้นในส่วนของ *toxRS* เปลี่ยนไปจาก ซีโรทัยป์ O3:K6 เดิม ยังต้องอาศัยวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการยืนยันความแตกต่างและความคล้ายคลึงกันของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศต่างๆ โดยการใช้เทคนิค AFLP, ribotyping, AP-PCR และ PFGE ซึ่งวิธี AP-PCR และ PFGE เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* อย่างแพร่หลาย (Wong *et al.*, 1996; Chowdhury *et al.*, 2000a; Chowdhury *et al.*, 2000b; Matsumoto *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000a)

1.2.3.2 Arbitrarily Primed Polymerase Chain reaction (AP-PCR)

(AP-PCR) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ถูกคิดขึ้นโดย John Welsh ในปีค.ศ. 1990 เป็นการนำเทคนิค PCR มาใช้

ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) จากดีเอ็นเอแม่แบบโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอแม่แบบ โดยทั่วไปการทำ PCR ต้องใช้ primer 1 คู่จับกับดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ แต่การทำ AP-PCR เป็นการใช้ primer ที่มีขนาดเพียง 9-10 คู่เบสเพียง primer เดียวเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและใช้อุณหภูมิต่ำในขั้นตอนที่ primer จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ทำให้เกิดการจับกันของคู่เบสอย่างไม่จำเพาะเจาะจงจึงเกิดการจับกันผิดของคู่เบส (mismatch) จำนวนและตำแหน่งที่ primer ไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบขึ้นกับความแตกต่างของเบสที่เรียแต่ละสายพันธุ (Olive and Bean, 1999) หลังจากได้ PCR product จึงนำไปดูรูปแบบแถบดีเอ็นเอโดยใช้วิธี electrophoresis บน agarose gel หรือ polyacrylamide gel ผู้วิจัยส่วนใหญ่มักใช้เทคนิค AP-PCR ในการศึกษาความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างสปีชีส์หรือภายในสปีชีส์เดียวกัน และใช้จำแนกจุลินทรีย์ออกเป็น type หรือ subtype แม้ว่าวิธี AP-PCR จะมีความสามารถในการแยกความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุได้ดี แต่ยังขาด reproducibility ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มข้นของแมกเนซียมไอออน สภาพการทำ PCR โดยเฉพาะอุณหภูมิที่ primer ไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ วิธีสกัดดีเอ็นเอ ความคงตัวของการสังเคราะห์ primer แต่ละครั้ง อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบและความเข้มข้นของ primer ผู้ผลิตและความเข้มข้นของ DNA polymerase และรุ่นของเครื่อง PCR ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นข้อควรระวังในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการและระหว่างการทดลอง (William *et al.*, 1990)

1.2.3.3 Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

วิธี Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) ถูกค้นพบโดย Schwartz และ Cantor (1984) ซึ่งต่างจาก gel electrophoresis โดยทั่วไปคือ วิธี gel electrophoresis โดยทั่วไปสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ถึง 50 kb แต่ในทางปฏิบัติดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 20 kb ให้ผลของลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากกระแสไฟฟ้าต่ำเกินไป แต่หากเตรียมเจลที่มีความเข้มข้นต่ำมากเพื่อให้ดีเอ็นเอขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ จะทำให้เกิดปัญหาเจลแตกได้ง่ายจนไม่สามารถใช้งานได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดวิธี PFGE ขึ้นโดยดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านเจลที่เข้มข้นภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า 2

สนาม มุมระหว่างสนามไฟฟ้าทั้งสองเกือบตั้งฉากกัน ความเข้มของสนามไฟฟ้าทั้งสองไม่สม่ำเสมอและสลับกันเปิด/ปิดเป็นจังหวะหรือ pulse เมื่อเจลมีความเข้มข้นสูงจะใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูง โมเลกุลดีเอ็นเอจะเหี่ยยดตัวออกไปในทิศทางของสนามไฟฟ้าเพื่อให้สามารถผ่านรูพรุนของเจลได้ การแยกจะเกิดขึ้นโดยการสลับทิศทางของสนามไฟฟ้าเพื่อให้โมเลกุลของดีเอ็นเอจัดทิศทางในเจลทำให้เคลื่อนที่ในทิศทางมุมที่ถูกต้องกับแกนของโมเลกุลที่เหี่ยยดตัวออก ยิ่งโมเลกุลยาวขึ้นเท่าไรเวลาที่ใช้ในการหาทิศทางยิ่งนานขึ้นซึ่งการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยวิธี PFGE แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนใหญ่คือ

1) การเตรียมดีเอ็นเอโดยใช้เซลล์แบคทีเรียทั้งเซลล์ผสมกับ agarose ชนิดพิเศษแทนการใช้วิธีสกัดเอาเฉพาะดีเอ็นเอเพื่อลดการสูญเสียดีเอ็นเอ ซึ่ง agarose ชนิดพิเศษที่ใช้เป็น low melting agarose ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ 62-65 องศาเซลเซียส และเมื่อละลายแล้วสามารถอยู่ในสถานะของเหลวที่ 37 องศาเซลเซียส ได้อีกนานหลายชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 25 องศา ประมาณ 10 นาที agarose ประเภทนี้เหมาะในการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้โดยตรง ในขณะที่ดีเอ็นเอผสมอยู่ในเจลที่แข็งตัว

2) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอแบบน้อยครั้ง (rare-cutting restriction endonuclease)

3) แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำ PFGE

ปัจจุบันมีการผลิตเครื่องมือสำหรับการแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่สำหรับงานนี้โดยเฉพาะซึ่งแบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ

- Field inversion electrophoresis (FIGE)

เป็นการทำ electrophoresis ใน 1% agarose gel โดยมักใช้ TBE เป็น buffer และทำการต่อเครื่อง programmable switching เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าเพื่อควบคุมการจ่ายกระแสไฟฟ้า (การจ่ายกระแสไฟฟ้ามักใช้อัตราส่วน forward:reverse = 3:1) และมีเครื่องควบคุมพัลส์ต่อกับอ่างบัฟเฟอร์ เพื่อทำให้บัฟเฟอร์เกิดการหมุนเวียน

- Contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis (CHEF)

เป็นวิธีที่สามารถแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ได้โดยการปรับเปลี่ยนทิศทางของกระแสไฟฟ้าให้ทำมุมกับแผ่นเจลหลายๆมุม ทั้งนี้อาศัยเครื่องมือพิเศษที่เรียกว่า CHEF electrophoresis voltage-divider circuitry ซึ่งประกอบด้วยอิเล็กทรอนิกส์ 24 ขั้วต่อกับเครื่อง programmable switching และใช้เครื่องควบคุมพัลส์เพื่อทำให้เกิดการหมุนเวียนของพัลส์เฟอ์ และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ระหว่างการทดลอง

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี PFGE

1) คุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

คุณสมบัติเด่นของวิธี PFGE คือ สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากแบคทีเรียทั้งเซลล์ผสมกับ low melting agarose หลังจากนั้นผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกและล้างเอาซากเซลล์ออกแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงได้ดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำขั้นตอน gel electrophoresis ซึ่งความเข้มข้นของดีเอ็นเอมีผลต่อการเคลื่อนที่และความคมชัดของแถบดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากกว่า 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ลดลงและลักษณะของแถบดีเอ็นเอไม่คมชัดแต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถกำหนดความเข้มข้นของดีเอ็นเอใน low melting agarose ได้ ดังนั้นจึงต้องควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ที่ผสมกับ low melting agarose เป็นสำคัญ

2) ความเข้มข้นของ agarose

Electrophoresis แบบธรรมดาใช้ agarose ชนิดธรรมดาสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่า 2 mb แต่หากต้องการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 mb ต้องใช้ agarose ชนิดพิเศษสำหรับ PFGE โดยเฉพาะ ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1.2-1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และต้องลดความเข้มข้นของ agarose ลงถ้าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดมากกว่า 3 mb เพื่อความชัดเจนของลักษณะแถบดีเอ็นเอ

3) ความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) และ เวลาสลับกันเปิด/ปิดระหว่างสนามไฟฟ้า 2 สนาม (Pulse times)

วิธี PFGE ส่วนใหญ่ใช้ความต่างศักย์ระหว่างขั้วอิเล็กโทรด 6 โวลต์/เซนติเมตร และปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่คือ เวลา

ที่ใช้เปิด/ปิดสลับกันระหว่างสนามไฟฟ้า 2 สนาม ถ้าเวลามากหรือน้อยเกินไปจะไม่สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ โดยทั่วไปถ้าดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่มักใช้เวลาสลับกันเปิด/ปิดระหว่างสนามไฟฟ้า 2 สนามมากขึ้น แต่ถ้าดีเอ็นเอมีขนาดเล็กมักใช้เวลาสลับกันเปิด/ปิดระหว่างสนามไฟฟ้า 2 สนามน้อยลง เวลาที่ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาด 250-600 kb คือ 30 วินาที และใช้เวลา 80 วินาทีในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

4) ความเข้มข้นและอุณหภูมิของบัฟเฟอร์

การเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้อุณหภูมิของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น หากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่จะยังมีผลต่ออุณหภูมิ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกินไป ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในการทำ PFGE คือ 10-14 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ก็มีส่วนสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ จึงมีการใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 เท่า แทน 1 เท่า เพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการทำ electrophoresis

การแปลผลลักษณะของแถบดีเอ็นเอ

การแปลผลของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี PFGE ที่ใช้ในการศึกษาทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ในทางระบาดวิทยาของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในโรงพยาบาลหรือชุมชน ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี PFGE มาจากปริมาณดีเอ็นเอ มากกว่า 80% ของปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ จึงถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่งการแปลผลด้วยสายตาอาจให้ผลคลาดเคลื่อนดังนั้นจึงมีการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปเข้ามาช่วยในการแปลผล ซึ่งได้แก่ GelComparTM (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), MVSP (Korvach Computing Services, Anglesey, UK), GelManagerTM (Biosystematica, Tavistock, Devon, UK), และ Dendron[®] (Solltech Inc., Oakdale, CA)

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่มีอินทรีย์สารพิษซึ่งแยกจากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2544
2. ศึกษาจีโนมของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย
3. ศึกษา *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มาจากกลุ่ม clone เดียวกันหรือไม่ด้วยวิธี Group Specific - PCR (GS-PCR)
4. ศึกษา *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ด้วยวิธี Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR) และ Pulse field gel electrophoresis (PFGE)