บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือโค้งงอ (gram-negative curve rod) เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว 1 เส้น (single polar flagella) สามารถอาศัยอยู่ในเกลือที่มีความเค็ม 1-8 % (halophilic bacteria) ที่ pH 6-9 อุณหภูมิ 10-44 องศาเซลเซียส และพบว่าจำนวนของเชื้อจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำทะเลสูงขึ้น *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารทะเลเป็นพิษ (seafood poisoning) หรือโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โดยแยกเชื้อครั้งแรกจากประเทศญี่ปุ่นในผู้ป่วยที่รับประทานปลาซาร์ดีน สาเหตุการเกิดโรคเกิดจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงไม่สุก (undercooked seafood) เนื่องจากสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากอาหารทะเล ได้แก่ กุ้ง หอยนางรม ปู ปลา เช่น ปลาคอด ปลาซาร์ดีน ปลาทู เป็นต้น ระยะฟักตัวของเชื้ออยู่ระหว่าง 4-96 ชั่วโมง ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจะมีอาการอุจจาระร่วง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน และมีไข้ต่ำๆ ถึงแม้ว่าอาการส่วนใหญ่จะไม่รุนแรงและอาจหายเองได้ แต่ในกรณีของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) โรคตับแข็ง (cirrhosis) จะทำให้เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต (septicemia) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยได้ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic strain) ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากผู้ป่วยจะผลิตสารพิษชนิดทนร้อนที่เรียกว่า thermostable direct hemolysin (TDH) และ/หรือ TDH-related hemolysin (TRH) ซึ่งจัดเป็น virulence factors ที่สำคัญของเชื้อ นอกจากนี้ *V. parahaemolyticus* ยังสามารถสร้าง virulence factors ชนิดอื่นได้อีก เช่น heat-labile protein (serine protease) ซึ่งแยกได้จากสายพันธุ์ที่ไม่สร้างทั้ง TDH และ TRH (Lee, Cheng, Yu and Pan. 2002 : 31-37) และ capsular polysaccharide (CPS) ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกาะติดของเชื้อกับ epithelia cells ของผู้ป่วย (Hsieh et al. 2003 : 3329-3336) เป็นต้น

ปัจจุบันมีรายงานโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *V. parahaemolyticus* ในหลายประเทศทั่วโลกทั้งในแถบทวีปเอเชีย อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป (Bag et al. 1999 : 2354-2357 ; DePaola et al. 2000 : 4649-4654 ; Fuenzalida et al. 2007 : 270-275 ; Okuda et al. 1997 : 3150-3155 ; Su and Liu. 2007 : 549-558) โดยมีรายงานการพบ *V. parahaemolyticus* สูงถึงร้อยละ 68.4

ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมด ในระหว่างปี ค.ศ. 1981-2004 ที่ประเทศไต้หวัน (Anon. 2005) และร้อยละ 31.1 ในระหว่างปี ค.ศ. 1992-2001 ที่ประเทศจีน (Liu, Chen, Wang and Ji. 2004 : 725-727) สำหรับสถานการณ์การระบาดในประเทศไทย จากข้อมูลของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2539-2549 พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยพบสูงถึงร้อยละ 73.3 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมด ในปี พ.ศ. 2549 (สุชาดา จันทสิริยากร. 2550 : 271-274) และจากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand; NARST) ที่ได้รับรายงานจากโรงพยาบาลเครือข่าย 34 แห่งทั้งในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด พบ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งคิดเป็นร้อยละ 27 ในปี พ.ศ. 2550 และพบเป็นอันดับสองรองจาก *Salmonella* spp. โดยพบเชื้อร้อยละ 20 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ. 2551 (คณะกรรมการโครงการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ. 2552)

V. parahaemolyticus จัดแบ่งตามคุณสมบัติของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ (somatic [O] antigens) และแอนติเจนที่แคปซูล (capsular [K] antigens) ได้มากกว่า 75 สายพันธุ์ (serotypes) ในปี ค.ศ. 1996 เกิดการระบาดใหญ่ (pandemics) ของสายพันธุ์ใหม่ O3:K6 (pandemic strain) ที่ประเทศอินเดีย (Okuda et al. 1997 : 3150-3155) และเกิดการระบาดอย่างต่อเนื่องในหลายประเทศแถบภูมิภาคเอเชีย รวมทั้งในอเมริกา (Matsumoto et al. 2000 : 578-585) นอกจากนี้ในปัจจุบันพบการระบาดของ pandemic strains อื่นๆ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาพันธุกรรมมาจากสายพันธุ์ O3:K6 (clonal derivatives) เช่น O4:K68, O1:K25, O1:K untypable (O1:KUT), O1:K26, O6:K18, O1:K41, O4:K12, O1:K65, O3:K75, O4:K8, O4:KUT และ O5:KUT ได้ทั่วโลก (Chowdhury, Stine, Morris and Nair. 2004 : 1280-1282 ; Matsumoto et al. 2000 : 578-585 ; Nair et al. 2007 : 39-48) จากรายงานการระบาดของ *V. parahaemolyticus* ทางภาคใต้ของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2542 พบการระบาดของ pandemic strains ร้อยละ 76 โดยสายพันธุ์ที่พบ ได้แก่ O3:K6, O1:K25, O1:K41 และ O4:K12 (Laohaprertthisan et al. 2003 : 395-406) และในช่วงปี พ.ศ. 2543-2546 พบการระบาดร้อยละ 64.1, 67.5, 69.7 และ 67.7 ตามลำดับ และพบการระบาดลดลงเป็นร้อยละ 56.5 และ 55.5 ในปี พ.ศ. 2547 และ 2548 ตามลำดับ โดย pandemic strains ที่พบเป็นส่วนใหญ่คือสายพันธุ์ O3:K6, O1:K25 และ O4:K68 (Wootipoom et al. 2007 : 1630-1638)

โรคอาหารเป็นพิษจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปัจจุบันยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขโลก (Kam. 2008: 2766-2773) วิธีการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อประโยชน์ทางด้านการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ ค้นหาแหล่งแพร่กระจาย รวมถึงการควบคุม เฝ้าระวังและป้องกันการติดเชื้อ

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อมี 2 หลักการใหญ่คือ การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนทัยป์ (phenotypic characterization) และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ (genotypic characterization)

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนทัยป์

1. การศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping)

การจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping) เป็นวิธีที่ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่ต้องการอุปกรณ์ราคาแพง จึงสามารถทำได้ง่ายในงานประจำ (routine) โดยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ด้วยวิธี disc diffusion ตามมาตรฐานของ CLSI จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายาปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ได้ เช่น ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, cotrimoxazole, gentamicin, tetracycline เป็นต้น (Han, Walker, Janes, Prinyawiwatkul and Ge. 2007 : 7096-7098 ; Marlina et al. 2007 : 349-354 ; Okuda et al. 1997 : 3150-3155 ; Quintoil, Porteen and Pramanik. 2007 ; Tanil et al. 2005 : 940-945 ; Tjaniadi et al. 2003 : 666–667) และหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพของการจำแนกสายพันธุ์ ควรจะทำการเพิ่มชนิดของยาปฏิชีวนะให้มากขึ้น

2. การทดสอบทางซีโรทัยป์ (serotyping)

V. parahaemolyticus สามารถแบ่งตามซีโรทัยป์ (serotyping) โดยใช้คุณสมบัติของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ (somatic [O] antigens) และแอนติเจนที่แคปซูล (capsular [K] antigens) ซึ่งประกอบไปด้วย O-antigens 13 ชนิด และ K-antigens 71 ชนิด (Iguchi, Kondo and Hisatsune. 1995 : 287-292) ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยการทดสอบทางซีโรทัยป์ (serotyping) จำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบ antibody หลายชุดที่จำเพาะต่อทั้ง O-antigens และ K-antigens และจากการศึกษาพบว่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี serotyping เป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนก (discriminatory power) ต่ำ ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นเครื่องมือใน

การศึกษาทางระบาดวิทยา นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีนี้ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อบางสายพันธุ์ได้ (untypable) (Wong. 2003 : 100-107 ; Wong. 2007 : 280-287)

3. การทดสอบความไวของเชื้อต่อ bacteriophage (bacteriophage typing)

การจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี bacteriophage typing จะทำโดยการทดสอบความไวของเชื้อต่อ bacteriophage สายพันธุ์มาตรฐานหลายชนิด อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย เนื่องจาก bacteriophage สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะ (specificity) ต่ำ (Baross, Liston and Morita. 1978 : 500-505 ; Libinzon, Us, Galtseva, Degtiareva and Golkovskii. 1995 : 15-18 ; Smolikova et al. 2001 : 3-7)

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางจีโนทัยป์

1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

การจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ทำโดยการตัด genomic DNA ของเชื้อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi*I และ/หรือ *Not*I จากนั้นนำมาแยกชิ้น DNA ที่ได้โดยการทำ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ซึ่งมีหลักการทำให้สนามไฟฟ้าที่ผ่านเจลมีขนาดและทิศทางไม่คงที่ การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสายพันธุ์แต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน มี discriminatory power สูง อย่างไรก็ตาม PFGE เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูง จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญพิเศษในการอ่านผล นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียม genomic DNA ของเชื้อต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดการทำลาย (degradation) ของ DNA ซึ่งจะมีผลต่อการแปลผล (Kam et al. 2008 : 2766-2773 ; Lu et al. 2000 : 29-33 ; Wang et al. 2008 : 251-255 ; Wong. 2003 : 100-107 ; Wong et al. 2007 : 280-287)

2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) มาตัดสาย DNA ออกเป็นชิ้น เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของชิ้น DNA ที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่จำเพาะต่อเอนไซม์นั้นๆ และใช้เทคนิค nucleic acid probe-hybridization เป็นตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะต่อยีนที่สนใจศึกษา มีผู้สนใจทำการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี RFLP ของยีน rRNA (ribotyping)

พบว่าวิธีนี้มี discriminatory power สูงเทียบเท่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี PFGE (Wong, Kuo, Wang, Lee and Shih., 1999 : 631-636) อย่างไรก็ตาม ribotyping มีข้อเสียคือ เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน เนื่องจากมีขั้นตอนการทำ Southern hybridization นอกจากนี้ยังมีผู้สนใจศึกษาการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี RFLP ของยีนอื่นๆ เช่น virulent genes (*tdh*/*trh* genes) และ polar flagellum locus (Fla locus RFLP analysis) แต่พบว่าวิธีดังกล่าวมี discriminatory power ต่ำ เนื่องจากยีนที่ศึกษาไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (Orasa et al. 1996 : 1293-1295 ; Marshall et al. 1999 : 2473-2478)

3. Arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR)

Arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) หรือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (DNA fingerprints) โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มาก่อน อาศัยการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer เส้นเดียว ขนาด 8-10 เบส จับแบบสุ่มได้หลายตำแหน่งไปบนเส้น DNA โดยไม่คำนึงถึงทิศทางของ primer ที่จับกับ DNA ต้นแบบ (DNA template) ทำให้ได้ PCR product ที่มีขนาดหลากหลาย สามารถนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ ปัจจุบันมีนักวิจัยหลายกลุ่มได้ใช้เทคนิคนี้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* เพื่อศึกษาด้านระบาดวิทยา (epidemiology) และแหล่งพบเชื้อ (ecology) (Bhowmick, Khushiramani, Raghunath and Karunasagar. 2008 : 198-204 ; Chao et al. 2009 : 907-912 ; Mahmud et al. 2006 : 25-37 ; Maluping et al. 2005 : 383-391 ; Marlina et al. 2007 : 349-354 ; Sudheesh, Jie and Xu. 2002 : 11-17 ; Wong et al. 1999 : 1809-1812 ; Wootipoom et al. 2007 : 1630-1638) แม้ว่าวิธี AP-PCR จะมีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ (discriminatory power) ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PFGE และ ribotyping แต่วิธีนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก ใช้แรงงานน้อย ได้ผลรวดเร็ว

4. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR)

Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC) เป็น intergenic repetitive unit มีความยาว 127 bp พบการกระจายตัวบน genome ของเชื้อหลาย copies โดยจำนวน copies ในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อมีความแตกต่างกัน พบได้ในเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella*

typhimurium และเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* รวมทั้ง *Vibrio* spp. (Sharples and Lloyd. 1990 : 6503-6508 ; Hulton, Higgins and Sharp. 1991 : 825-834) จากคุณสมบัติดังกล่าวของ ERIC sequence ทำให้สามารถนำเอาลักษณะจำนวน copies ของ ERIC sequence นี้มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ได้ ปัจจุบันเทคนิค ERIC-PCR ถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (genotyping) หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ (Chaieb et al. 2005 : 309-314 ; De. 1992 : 2180-2187 ; Ye, Wu, Zhou, Dong and Zhang. 2008 : 392-397) ในปี ค.ศ. 1999 มีผู้สนใจศึกษาเปรียบเทียบวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี ERIC-PCR, ribotyping, PFGE และ Fla locus RFLP analysis พบว่าวิธี ERIC-PCR และ ribotyping มีสามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจนใกล้เคียงกับวิธี PFGE ขณะที่ Fla locus RFLP analysis เป็นวิธีที่มี discriminatory power ต่ำที่สุด (Marshall et al. 1999 : 2473-2478) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wong และคณะ ในปีค.ศ. 2001 ที่พบว่า ERIC-PCR เป็นวิธีที่ใช้หลักการ PCR ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์เทียบเคียงกับวิธี PFGE และ ribotyping (Wong and Lin. 2001 : 4233-4240) และในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิค ERIC-PCR ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* กันอย่างแพร่หลาย (Khan, McCarthy, Wang and Cerniglia. 2002 : 209-214 ; Maluping et al. 2005 : 383-391 ; Bhowmick et al. 2008 : 198-204)

การจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทำได้หลายวิธีดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนทัยป์ เช่น antibiotyping และ serotyping เป็นวิธีที่ใช้เป็นงานประจำในห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตรของโรงพยาบาลทั่วไป สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ เช่น PFGE, ribotyping, RFLP, AP-PCR, ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีความประสิทธิภาพสูง และบางวิธีเหมาะที่จะใช้สำหรับงานวิจัยเท่านั้น อย่างไรก็ตามวิธีที่ใช้หลักการการเพิ่มจำนวน DNA โดยเทคนิค PCR เป็นวิธีที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในห้องห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้เทคนิคที่ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนมากนัก