บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

Vibrio parahaemolyticus เป็นสาเหตุของโรคอาหารทะเลเป็นพิษ (seafood poisoning) หรือลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งในปัจจุบันพบว่ายังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศ การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อประโยชน์ทางด้านการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ ค้นหาแหล่งแพร่กระจาย รวมถึงการควบคุม เฝ้าระวังและป้องกันการติดเชื้อ การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนทัยป์ (phenotypic characterization) คือ การศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping) และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ (genotypic characterization) ได้แก่ วิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) โดยทำการจำแนก *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนมิถุนายน 2551 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2552 จำนวนทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท จากการจำแนกเชื้อด้วยวิธีการศึกษาแบบแผนการดื้อยาพบว่าจำแนกเชื้อได้เพียง 1 แบบแผน จัดเป็น 1 สายพันธุ์ (Ant-1) โดยเชื้อที่ศึกษาทั้งหมดดื้อ (resistant) ต่อยา ampicillin และไว (susceptible) ต่อยา ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxytetracycline, sulfisoxazole, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole ซึ่งแบบแผนการดื้อยาดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Serichantalergs และคณะที่รายงานว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างปี พ.ศ. 2544 ถึง พ.ศ. 2545 ทุกไอโซเลทไวต่อยา chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole และดื้อต่อยา ampicillin ร้อยละ 52 (Serichantalergs et al. 2007 : 608-613) อย่างไรก็ตามพบว่ามีความแตกต่างจากรายงานของ Wootipoom และคณะที่พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระหว่างปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2548 ทุกไอโซเลทไวต่อยา chloramphenicol, norfloxacin และ tetracycline และดื้อต่อยา ampicillin, ciprofloxacin และ trimethoprim/sulfamethoxazole คิดเป็นร้อยละ 98.9, 58.3 และ 11.8 ตามลำดับ (Wootipoom et al.

2007 : 1630-1638) นอกจากนี้จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand; NARST) ที่ได้รับรายงานจากโรงพยาบาลเครือข่าย 34 แห่งทั้งในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด ในปี พ.ศ. 2551 พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ ดังกล่าว ดื้อต่อยา gentamicin, norfloxacin, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole คิดเป็นร้อยละ 14.3, 0.4, 1.1 และ 0.4 ตามลำดับ (คณะกรรมการโครงการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ. 2552) หากเปรียบเทียบแบบแผนการดื้อยาของ *V. parahaemolyticus* ที่พบในประเทศแถบทวีปเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ เช่น อินโดนีเซียและมาเลเซีย พบว่ามีแบบแผนการดื้อยาที่แตกต่างกับที่พบในประเทศไทย โดยเชื้อสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดในประเทศอินโดนีเซียส่วนใหญ่ไวต่อยา norfloxacin และ trimethoprim/sulfamethoxazole ดื้อต่อยา ampicillin, ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin และ tetracycline คิดเป็นร้อยละ 100, 14, 94, 15, 11 และ 9 ตามลำดับ (Tjaniadi et al. 2003 : 666–667) ขณะที่เชื้อที่พบในประเทศมาเลเซียไวต่อยา norfloxacin และ chloramphenicol ดื้อต่อยา ampicillin, cephalothin, gentamicin และ tetracycline คิดเป็นร้อยละ 95.2, 28.6, 9.5 และ 14.3 ตามลำดับ (Tani et al. 2005 : 940-945) ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากความแตกต่างกันทางด้านภูมิศาสตร์ (geographical areas) และรูปแบบการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกัน ดังนั้นแต่ละพื้นที่จึงควรมีมาตรการในการควบคุมและป้องกันไม่ให้มีการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multiple drug resistant strain) เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามจากการวิจัยครั้งนี้พบว่ายา ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxytetracycline, sulfisoxazole, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole ยังคงเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม

จากการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 70 ไอโซเลทโดยอาศัยคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ พบว่าวิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) สามารถจำแนก *V. parahaemolyticus* เป็นสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ (AP-A ถึง AP-P) โดยสายพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่คือ AP-O, AP-L, AP-D และ AP-F พบจำนวน 12, 11, 10 และ 10 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 17.14 (12/70), 15.71 (11/70), 14.29 (10/70) และ 14.29 (10/70) ตามลำดับ ขณะที่วิธี enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) สามารถจำแนก

V. parahaemolyticus เป็นสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งสิ้น 24 สายพันธุ์ (ERIC-1 ถึง ERIC-24) โดยสายพันธุ์ที่มีอุบัติการณ์มากที่สุดคือ ERIC-3 พบจำนวน 13 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 18.57 (13/70) และเมื่อพิจารณาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ของเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้หลากหลายมากขึ้น โดยสามารถจำแนกเชื้อได้ทั้งสิ้น 48 สายพันธุ์ AP/ERIC-PCR patterns ส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ L/E3, D/E3, D/E4, D/E10, O/E8, B/E4, E/E11, F/E10, L/E4, M/E18, O/E1, O/E3, O/E5 และ O/E7 พบจำนวน 5, 4, 3, 3, 3, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2 และ 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 7.14, 5.71, 4.29, 4.29, 4.29, 2.86, 2.86, 2.86, 2.86, 2.86, 2.86, 2.86, 2.86 และ 2.86 ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีทางจีโนทัยป์นั้นสามารถจำแนก *V. parahaemolyticus* เป็นสายพันธุ์ต่างๆ ได้หลากหลายกว่าวิธีทางฟีโนทัยป์ โดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ (antibiotyping) เนื่องจากเชื้อที่นำมาศึกษาทุกไอโซเลทมีแบบแผนการดื้อยาที่เหมือนกันทำให้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ การวิจัยครั้งนี้ได้ประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) แต่ละวิธีโดยการคำนวณหาค่าดัชนีของความหลากหลายตามวิธีของ Hunter and Gaston (Hunter and Gaston. 1988 : 1903-1905 ; Hunter. 1990 : 2465-2466) พบว่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี antibiotyping, AP-PCR, ERIC-PCR และวิธี AP-PCR ร่วมกับ ERIC-PCR มีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.000, 0.901, 0.932 และ 0.986 ตามลำดับ ซึ่งโดยทั่วไปค่า discriminatory index จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 และค่าที่สูงมักจะอยู่ระหว่าง 0.6 ถึง 1 ดังนั้นการที่วิธี antibiotyping มีค่า discriminatory index เท่ากับ 0 แสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ โดยเฉพาะในกลุ่มประชากรของเชื้อที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ อย่างไรก็ตามการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยาเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่ต้องการอุปกรณ์ราคาแพง สามารถทำได้ง่ายในงานประจำ (routine) ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป จึงยังคงเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อดื้อยาและสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยได้ ดังนั้นหากต้องการนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้ออาจจำเป็นต้องแปลผลร่วมกับด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การทำ genotyping และการศึกษากลไกการดื้อยาในระดับโมเลกุลควบคู่กันไป เป็นต้น เมื่อพิจารณาความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธีทางจีโนทัยป์ (genotyping) ที่ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าวิธี

AP-PCR มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) ต่ำกว่าวิธี ERIC-PCR เล็กน้อย (มีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.901 และ 0.932 ตามลำดับ) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wong และ Lin ที่พบว่าวิธี ERIC-PCR เป็นวิธีมีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงกว่าวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) หรือ AP-PCR (Wong and Lin. 2001 : 4233-42) อย่างไรก็ตามวิธี AP-PCR ยังคงมีข้อดีคือ PCR product ที่ได้มีจำนวน 1 ถึง 4 แถบ (bands) โดยแต่ละแถบมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ในทางปฏิบัติทำให้ง่ายต่อการแปลผล ขณะที่ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี ERIC-PCR มีจำนวน 1 ถึง 10 แถบ และบางแถบมีขนาดที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งทำให้ยุ่งยากในการแปลผล แม้ว่าวิธี AP-PCR จะมีข้อจำกัดบ้างในการนำมาใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีการเพิ่มจำนวน DNA แบบสุ่ม ดั้งนั้น AP-PCR pattern ที่ได้จึงขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปของแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้วิธีนี้มี reproducibility ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการทำ genotyping วิธีอื่นๆ ดังนั้นหากนำมาประยุกต์ใช้ จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ในการทดสอบแต่ละครั้งให้ใกล้เคียงกันมากที่สุด และในขั้นตอนแต่ละขั้นตอนของการทดสอบควรทำโดยบุคคลเดียวกัน อย่างไรก็ตามปัจจุบันวิธี AP-PCR เป็นที่นิยมใช้กันในสากลสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใช้ในการจำแนกเชื้อสายพันธุ์ pandemic strain ออกจาก nonpandemic strain (Matsumoto et al. 2000 : 578-585 ; Vuddhakul et al. 2000 : 2685-2689 ; Okura et al. 2003 : 4676-4682 ; Gil et al. 2007 : 324-328 ; Wootipoom et al. 2007 : 1630-1638 ; Chao et al. 2009 : 907-912)

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่าวิธี ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) สูง โดยมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.932 ใกล้เคียงกับวิธี PFGE ซึ่งมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.960 (Wong and Lin. 2001 : 4233-4240) แม้ว่าวิธี PFGE จัดว่าเป็นวิธีที่มี reproducibility และ discriminatory power สูง เมื่อเปรียบเทียบกับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อวิธีทางอณูชีววิทยา (molecular methods) อื่นๆ อย่างไรก็ตาม PFGE เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน (4-6 วัน) และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูง จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญพิเศษในการอ่านผล (Wang et al. 2008 : 251-255) นอกจากนี้ยังคงประสบปัญหาที่ไม่สามารถจำแนกเชื้อบางสายพันธุ์ได้ (untypeable) เนื่องจากเกิดการทำลาย (degradation) ของ genomic DNA ของเชื้อ

ในขั้นตอนการเตรียมและขั้นตอนการตัดด้วย restriction enzyme (endonuclease digestion) ซึ่งมีรายงานการวิจัยของ Marshall และคณะพบว่า *V. parahaemolyticus* ที่นำมาศึกษาร้อยละ 23 ของทั้งหมดไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้โดยวิธี PFGE แต่สามารถถูกจำแนกได้โดยวิธี ERIC-PCR (Marshall et al. 1999 : 2473-2478) สอดคล้องกับการศึกษาของ Tanil และคณะที่พบว่าวิธี ERIC-PCR นำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยวิธี PFGE ได้ (Tanil et al. 2005 : 940-945) และจากข้อมูลการวิจัยครั้งนี้พบว่า การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ทำให้ประสิทธิภาพการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงขึ้น โดยมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.986

สรุป

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเป็นเครื่องมือสำคัญชนิดหนึ่งในการศึกษาด้านระบาดวิทยาเพื่อค้นหาแหล่งแพร่กระจายของเชื้อ ควบคุม และป้องกันการติดเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยวิธีศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping), AP-PCR และ ERIC-PCR ผลการวิจัยสรุปได้ว่าการจำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ ขณะที่การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค PCR พื้นฐาน เช่น AP-PCR และ ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในห้องห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ เนื่องจากเป็นวิธีมีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) สูง โดยเฉพาะเมื่อมีการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ทำให้ประสิทธิภาพการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงขึ้น นอกจากนี้วิธี AP-PCR และ ERIC-PCR ยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วในการทดสอบเชื้อคราวละมากๆ ราคาไม่แพง ใช้เทคนิคที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนมากนัก ซึ่งเหมาะสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านระบาดวิทยาได้ดี