Vibrio parahaemolyticus

I. บทนำ

เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ก่อโรคอาหารเป็นพิษหรือ กระเพาะและลำไส้อักเสบ พบระบาดครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น (ค.ศ. 1950 หรือ พ.ศ. 2493) Fujino และคณะ แยกเชื้อจากอุจจาระผู้ป่วยที่เมืองโอซากา สาเหตุอาหารเป็นพิษจากการรับประทาน “ชิราสุ (shirasu)” เดิมเรียกเชื้อนี้ว่า *Pasteurella parahaemolyticus* ประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อินเดีย และหลายๆ ประเทศทางเอเชียรวมทั้งอเมริกามีรายงานว่า มากกว่า 50% ของอาหารเป็นพิษมีสาเหตุจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* สำหรับประเทศไทยเชื้อนี้เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษเช่นกันคิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ. 2540-2545 ตามลำดับ ที่ Calcutta ประเทศอินเดียในปี พ.ศ. 2539 เกิดการระบาดใหญ่ (pandemic) ของสายพันธุ์ (serotype) O3:K6 และเกิดการระบาดอย่างต่อเนื่องในหลายๆ ประเทศทางทวีปเอเชียเช่น ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน รวมทั้งประเทศอเมริกา จัดได้ว่า O3:K6 นี้เป็น pandemic strain และเป็นสายพันธุ์ที่มาจากต้นตอเดียวกัน (same clone) แต่เป็น new clone เมื่อเปรียบเทียบกับ O3:K6 ที่พบก่อนปี พ.ศ.2539 และก่อโรคประปราย

ความทนทานของเชื้อ

1. ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60 °C ในเวลา 15 นาที
2. ถูกทำลายโดยกรด มีผู้ศึกษาพบว่าเชื้อนี้ถูกทำลายด้วยกรดมะนาว (Citric acid) pH 4.4 ในเวลาเพียง 30 นาที
3. ในฤดูหนาวเชื้อสามารถอาศัยในตะกอนใต้พื้นน้ำ
4. สามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำที่มี NaCl ตั้งแต่ 1-8% ถ้ามากกว่า 10% เชื้อจะตาย สามารถอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่นในเนื้อปู (1-15 °ซ) นาน 30 วัน กุ้งปอกเปลือก (3 - 18 °ซ) นาน 6 วัน, หอยนางรมแช่แข็งนาน 40 - 130 วัน

การเจริญเติบโต

เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 9.5-45 °C, ช่วง pH 5 -11 และสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCI 0.5 - 8%

การทำให้เกิดโรค

เกิดจากการกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปโดยเฉพาะอาหารทะเลพวก กุ้ง ปู ปลา หอย จำนวนเชื้อต้องมีมากพอที่ตั้งแต่ 10^6-10^9 ตัวต่อกรัม จึงสามารถทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ อาการมักปรากฏหลังจากกินเชื้อเข้าไป 10 ถึง 12 ชั่วโมง บางรายแสดงอาการภายใน 4 ถึง 96 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดหรือด่าง ภายใน

ระบบทางเดินอาหาร เชื้อนี้จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุกๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ มีอาการปวดท้อง อาจปวดเกร็ง ท้องเดิน อุจจาระเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือนกุ้งเน่า บางรายคล้ายเป็นบิด อุจจาระมีมูกเลือด มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน อาการที่เป็นอาจหายเองภายใน 2 ถึง 5 วัน อัตราตายต่ำ โรคนี้มักพบในฤดูร้อน ไม่ค่อยพบในฤดูหนาว

การป้องกัน

รับประทานอาหารทะเลที่ทำให้สุกใหม่ๆ แยกอาหารสุกและดิบออกจากกัน ไม่วางปะปนกัน รวมทั้งแยกอุปกรณ์ในการประกอบอาหารหรือทำความสะอาดอุปกรณ์สำหรับอาหารทะเลก่อนนำไปใช้กับอาหารชนิดอื่น

ปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อ

1. Thermostable direct hemolysin (TDH) ทนความร้อนที่ 100°C นาน 10 นาที สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยไม่ต้องใช้ lecithin เป็นpore-forming toxin ทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เซลล์แตก
2. TDH- related hemolysin
3. Adherence factors
4. Urease
5. Hemolysin อื่นๆ เช่น lecithin-dependent hemolysin (LDH) ไม่ทนร้อน, phosphate regulated hemolysin ทนร้อน
6. Antigens เช่น O-antigen, K-antigen

การวินิจฉัย

1. มีประวัติกินอาหารทะเล ตรวจพบเชื้อจากอุจจาระหรือ อาเจียน

II. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. วิธีการตรวจวินิจฉัย

1.1 การเพาะแยกเชื้อและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1.2 Hemolysis test โดยทดสอบบนอาหาร Wagatsuma agar + 5% red blood cell ถ้าเชื้อนี้สร้าง Hemolysin จะเกิด - hemolysis เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า Kanagawa phenomenon

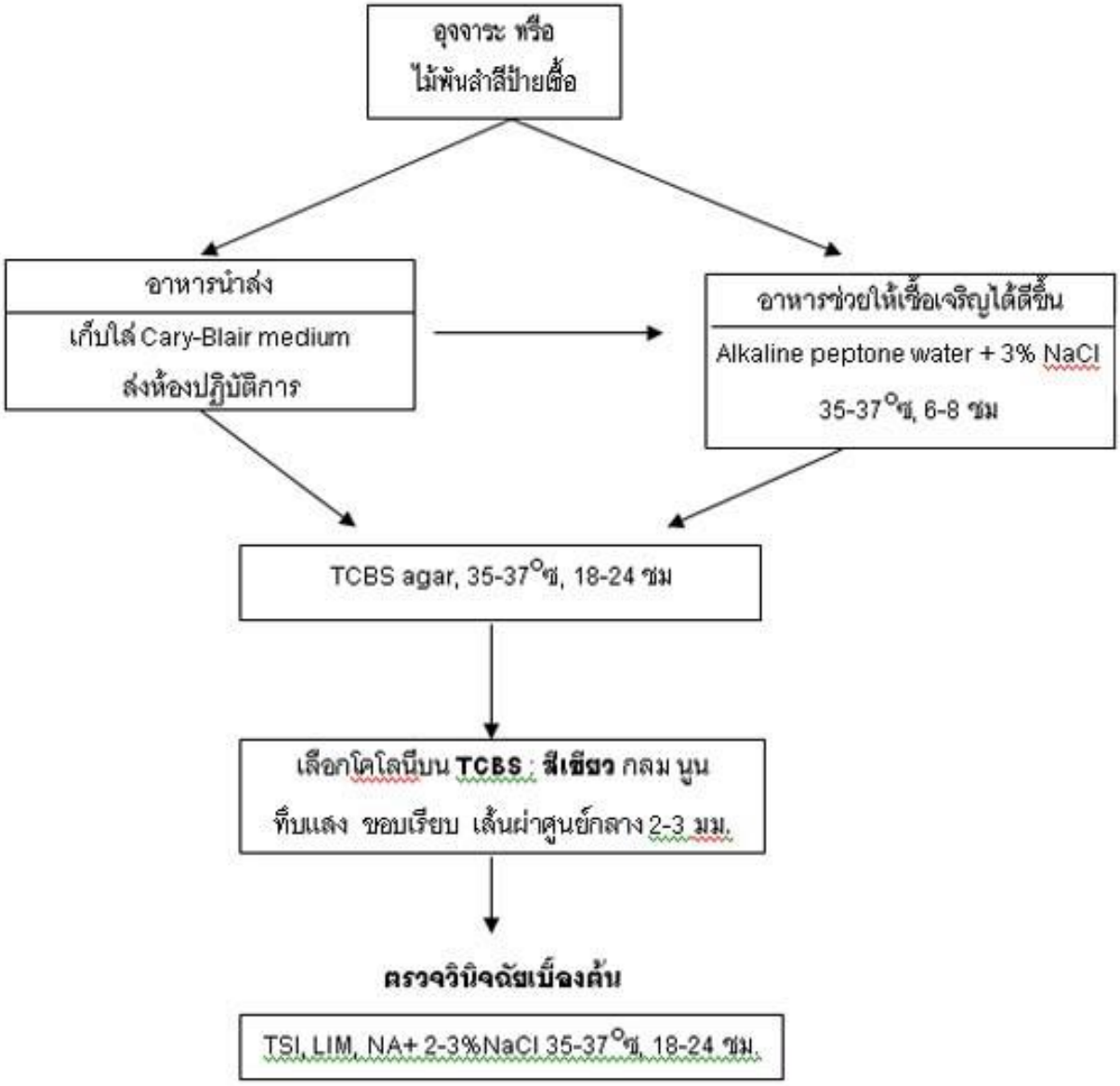
1.3 Reversed passive latex agglutination (RPLA) วิธีการตรวจหาแอนติเจน (thermostable direct hemolysin) โดยตรวจจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* หลักการคือเคลือบแอนติบอดีต่อแอนติเจนนี้บน latex ถ้าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ทดสอบมีแอนติเจนนี้จะเกิดการเกาะกลุ่มกระจายที่ก้นหลุม (microtiter plate ชนิด V-type)

1.4 DNA hybridization เป็นการตรวจหา DNA จำเพาะ โดยใช้หลักการจับกันของเบสคู่สม (complementary base) ระหว่าง DNA เส้นเดี่ยวของตรวจสอบ (DNA prob) จับกับ DNA ที่มาจากตัวอย่าง

1.5 Polymerase chain reaction เป็นการตรวจหา DNA จำเพาะ เช่น DNA ที่กำหนดการสร้าง TDH ใช้หลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่มีเพียงเล็กน้อยนั้นในหลอดทดลอง

2. วิธีการตรวจวินิจฉัยมาตรฐาน

เพาะแยกเชื้อและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี



แผนภูมิที่ 1 การเพาะเชื้อและตรวจวินิจฉัยเชื้อ *V.parahaemolyticus* เบื้องต้นจากตัวอย่างผู้ป่วย

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*

ลักษณะทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ	% ผลบวก
Hydrogen sulfide (TSI)	-	0
Urease (Christensen)	-	0
Indole	+	98.4
Methyl red	+	84.3
Nitrate to nitrite	+	100
Voges-proskauer	-	0
Simmons citrate	+	96.6
Motility	+	100
Gelatinase	+	99.6
Phenylalanine deaminase	-	0
Lysine decarboxylase	+	100
Arginine dihydrolase	-	0
Ornithine decarboxylase	+	97.3
Glucose, Acid/Gas	+/-	100/0
Acid from:		
Lactose	-	0
Sucrose	-	5.3
Inositol	-	0
Maltose	+	100
Mannitol	+	99.6
Xylose	-	0
Trehalose	+	100
Sorbitol	-	0.5
Mannose	+	100
Galactose	+	100
Sorbose	-	0
Acid from:		
Raffinose	-	0
Adonitol	-	0
Rhamnose	-	0
Dulcitol	-	0.3
Melibiose	-	15.3
Catalase	+	100
Oxidase	+	100
Growth in :		
0% NaCl	-	0
3% NaCl	+	100
6% NaCl	+	100
8% NaCl	+	100
10% NaCl	-	0.6
Growth at 43°C	+	100

(ที่มา : Krieg and Holt, 1984; Sakazaki, 1973a)

3. วิธีการตรวจ

3.1 หลักการ เป็นการตรวจเชื้อจากตัวอย่าง โดยเพาะเชื้อให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แยกเชื้อบริสุทธิ์ที่สงสัย นำมาทดสอบคุณสมบัติ

3.2 วิธีทำ

3.2.1 การเพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus*

เพาะเชื้อจาก อุจจาระหรือ Rectal swab (แผนภูมิที่ 1) เพาะเชื้อจากอาหาร (แผนภูมิที่ 2)

อ่านผลตามตารางที่ 1

แผนภูมิที่ 2 การเพาะเชื้อและตรวจวินิจฉัยเชื้อ *V.parahaemolyticus* เบื้องต้นจากตัวอย่างอาหารทะเล

3.2.2 การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น (ตารางที่ 1)

3.2.3 การตรวจยืนยันเชื้อที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิง

- ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี
- การตรวจยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษ
- จำแนกสายพันธุ์ serotyping (O และ K- antigen)

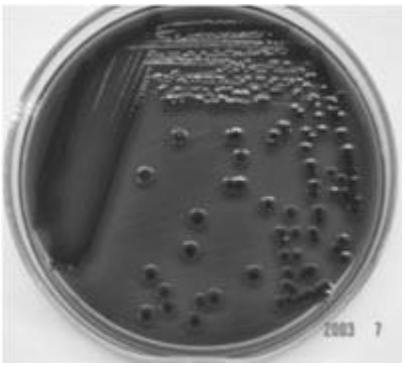
ส่งเชื้อตรวจยืนยันโดยเฉพาะเชื้อลงใน nutrient agar + 1 % NaCl ในหลอดหรือขวด บ่มที่ 37°ซ 1 คืน บรรจุหลอดเชื้อในภาชนะที่กันแตก ส่งทางไปรษณีย์

3.3 การควบคุมคุณภาพ

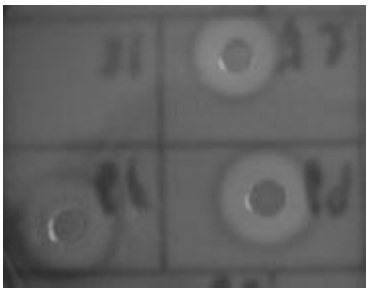
การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ผลการวินิจฉัยมีความถูกต้องแม่นยำและเชื่อถือได้ใช้เชื้อมาตรฐาน *V. parahaemolyticus* DMST 15285 ทำการทดสอบควบคู่ไปด้วย

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น

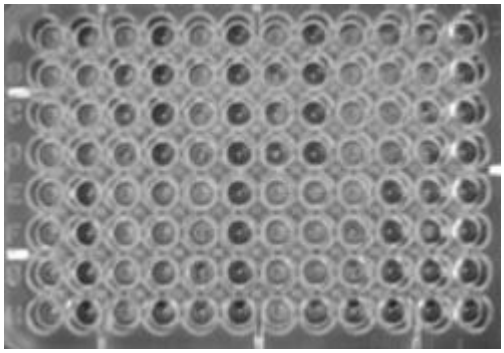
สีโคโลนี บน TCBS		**TSI**				**LIM**			เชื้อที่สงสัย
	Oxidase	Slant	Butt	H_2S	Gas	Lys	Ind	Mot	
สีเขียว	+	K	A	-	-	+	+	+	*V. parahaemolyticus*
	+	K	A	-	-	+	+	+	*V. vulnificus*
	+	K	A	-	-	+	+	+	*V. mimicus*



รูปที่ 1 โคโลนีสีเขียวของเชื้อ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)



รูปที่ 2 Hemolysis test บน Wagatsuma agar



รูปที่ 3 Reversed passive latex agglutination

การวิเคราะห์แยกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* โดยยีน *toxR* ด้วยเทคนิค PCR

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในทะเลและในบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ในมนุษย์อันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวเข้าไปซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับยีนฮีโมไลซีน (hemolysin gene) ชนิด *tdh* หรือ *trh* ที่ผลิต thermostable direct haemolysin (TDH) หรือ TDH-related haemolysin (TRH) โดยจัดว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นปัจจัยส่งเสริมความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factor) ของเชื้อชนิดนี้

ยีน toxR เป็นยีนที่อยู่ในชุดควบคุม (regulatory gene) การสร้างสารพิษคลอเรลลา (cholera toxin operon) และยีนอื่นๆ ใน *Vibrio cholerae* นอกจากนี้ยังพบยีนดังกล่าวใน *V. parahaemolyticus*, *V. fisheri* และ *Vibrio* spp. ซึ่งอาจบอกได้ว่ายีน toxR มีและตรวจพบได้ในสกุล *Vibrio* โดยพบว่ายีนดังกล่าวของ *V. parahaemolyticus* มีความเหมือนกับยีนที่พบใน *V. cholerae* 52% ซึ่งน้อยกว่ายีนที่พบใน rRNA (92%) ดังนั้นหากมีการเลือกใช้ชุด primer และเลือกใช้สภาวะของ PCR ที่เหมาะสม ก็จะสามารถแยกชนิดของ *V. parahaemolyticus* ออกจาก *V. cholerae* ได้

วัสดุอุปกรณ์

1. แบคทีเรีย : *V. parahaemolyticus*
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ : Thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS)
   Luria-Bertani (LB)
3. วัสดุสารเคมี
   3.1 สำหรับทำ PCR
   - *Taq* polymerase
   - 10X buffer
   - primers สำหรับยีน *toxR* : 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3' (forward)
     5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3' (reverse)
   -dNTPs : dATP, dGTP, dTTP, dCTP
   - น้ำกลั่น
   3.2 สำหรับทำ agarose gel electrophoresis
   - ผง agarose gel
   - 10X Tris borate EDTA buffer (TBE) [108 g Tris base, 55 g boric acid, 40 ml ของ 0.5 M EDTA]
   - tracking dye
   - lambda phage X174 DNA ตัดด้วย *Hae*III

4. อุปกรณ์

- microcentrifuge tube ขนาด 1.5-2 มิลลิลิตร และ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร
- micropipette ขนาด 20-200 และ 0.1-0.5 ไมโครลิตร พร้อม tips ที่มีแผ่นกรอง (filtered tip)
- hot plate
- centrifuge แบบตั้งโต๊ะ
- shaker incubator
- microwave
- เครื่องชั่ง
- เครื่อง agarose gel electrophoresis
- เครื่องทำ PCR

วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีเกลือ 1% ใน shaker incubator ที่ความเร็วรอบ 160 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. ดูดเชื้อในข้อ 1 มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทำเจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
4. สภาวะของการทำ PCR

ส่วนผสม มีดังนี้

ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template)	ปริมาตร	3	ไมโครลิตร (สารละลายจากข้อ 3)
10X buffer ที่มี 20 mM $MgCl_2$	ปริมาตร	5	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5U/ไมโครลิตร)	ปริมาตร	0.25	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	ชนิดละ	4	ไมโครลิตร
primers (10 pmol/ไมโครลิตร)	ชนิดละ	2	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	ปริมาตร	33.75	ไมโครลิตร

สภาวะที่ใช้ทำ PCR จำนวน 20 รอบ ประกอบด้วย

Denaturation	(94 องศาเซลเซียส)	เป็นเวลา	1 นาที
Annealing	(63 องศาเซลเซียส)	เป็นเวลา	1.5 นาที
Extension	(72 องศาเซลเซียส)	เป็นเวลา	1.5 นาที

เมื่อครบ 20 รอบ ให้ตั้งค่าต่อเนื่อง ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และตั้งต่อเนื่องไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบ amplicon (PCR product)

การเตรียม 1.2 % agarose gel

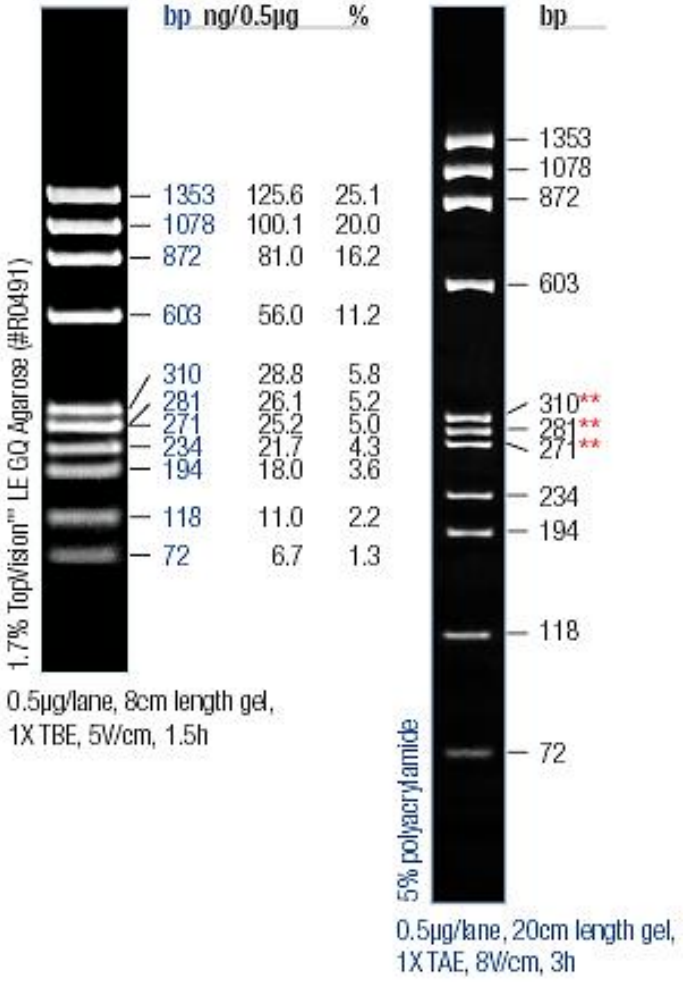
ชั่งผงวุ้น agarose gel น้ำหนัก 1.2 กรัม ลงใน 0.5X TBE buffer นำไปเข้าเครื่อง microwave เพื่อละลายผงวุ้น จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแล้วเทใส่แม่พิมพ์ที่วาง comb ไว้แล้ว ปล่อยทิ้งให้แข็งตัว

ดึง comb ออก แล้วหยิบแม่พิมพ์ที่มีวุ้นอยู่ด้านบนวางลงในถังแช่ TBE buffer โดยเท buffer ให้ท่วมแผ่น agarose gel

โหลดตัวอย่างที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ tracking dye ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร (ผสมลงบน petrifilm) ลงในหลุมบนแผ่น agarose gel

เปิดกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ภายในแผ่น agarose gel ประมาณ 30-45 นาที

นำแผ่น agarose gel มาย้อมใน ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 10-20 นาที จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator ซึ่งยีน *toxR* มีขนาดประมาณ 368 คู่เบสโดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda phage X174 DNA ตัดด้วย *Hae*III ดังรูป



เอกสารอ้างอิง

1. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibushi M. Identification of *Vi rio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 1173-1177.
2. Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, Nishibushi M, Karunasagar I, Karunasagar I. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36: 423-427.
3. http://www.fisheries.go.th/rgm-samutsa/AnalysisMethod/MicrobiologicalMethod/Vpara.pdf
4. http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/puket/download/Vibrio%20parahaemolyticu1.doc