บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เชื้อ *V. cholerae* เป็นเชื้อก่อโรคที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำและเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดอหิวาตกโรคในประเทศกำลังพัฒนาหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย (60) โดยเชื้อดังกล่าวสามารถแพร่กระจายได้ดีในแหล่งน้ำและเข้าสู่ร่างกายผ่านทางการรับประทานอาหารและน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนของเชื้อหรือการสัมผัสกับผู้ป่วย (57) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบว่า มีการระบาดของโรคดังกล่าวมากกว่าภาคอื่นของประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตจังหวัดขอนแก่น (70) ซึ่งมีการระบาดเมื่อ พ.ศ. 2550 จำนวนผู้ป่วย 221 ราย (65) และครั้งล่าสุด พ.ศ. 2553 จำนวนผู้ป่วย 153 ราย (34) ดังนั้น

ปัญหาการระบาดของโรคดังกล่าวจึงนับเป็นปัญหาสำคัญที่ควรให้ความสนใจในการหาแนวทางการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นเพื่อประโยชน์ในการวางแผนการป้องกันและแก้ไขต่อไป ปัจจุบันสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อ *V.cholerae* ตามลักษณะโครงสร้างของ O-antigen ได้มากกว่า 200 serogroups โดยเชื้อในกลุ่ม *V. cholerae* แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ *V. cholerae* O1, O139 , และ non-O1 โดยกลุ่ม *V. cholerae* serogroup O1 และ O139 เป็นกลุ่มเชื้อที่มีความเกี่ยวข้องและพบได้บ่อยที่สุดเมื่อมีการระบาดของโรค เนื่องจากเป็นกลุ่มที่สามารถสร้าง cholera toxin (CT) และ toxin co – regulated pilus (TCP) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการก่อโรคของเชื้อ โดย CT สร้างมาจากยีน *ctx A,B* ทำให้เกิดการหลั่งของสารน้ำในร่างกายเพิ่มขึ้น (fluid accumulation) ส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดอาการท้องร่วง ในขณะที่ยีน *tcpX* สร้าง TCP ที่มีบทบาทสำคัญในการเข้าเกาะติดเซลล์ลำไส้ของร่างกายเพื่อประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ (20) นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มดังกล่าวยังสามารถดำรงชีวิตในแหล่งน้ำหรือในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้โดยการเข้าสู่ภาวะที่เรียกว่า “viable but non-culturable (VBNC) ” ซึ่งในสภาวะดังกล่าวจะไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีดั้งเดิมในห้องปฏิบัติการ (15, 74) ในขณะที่ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อยังคงอยู่ (5, 7) เวลาต่อมาจึงมีการศึกษาพบว่านอกเหนือจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว วิธีการตรวจทางอิมมูโนวิทยาด้วย immunofluorescence technique ซึ่งเรียกว่า direct fluorescent monoclonal antibody (DFA) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ (13) โดยวิธีนี้สามารถช่วยตรวจการมีชีวิตของเชื้อ *V. cholerae* O1 และ O139 ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมในสภาวะที่เป็น VBNC ได้ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวก็มีข้อจำกัดคือ ราคาแพงและไม่สามารถบ่งบอกถึง toxigenicity ได้ ปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคทางด้านโมเลกุลาร์ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถตรวจเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้หรือเชื้อที่มีจำนวนน้อยเข้ามา

ช่วยในการตรวจ ดังนั้นจึงก่อให้เกิดแนวคิดการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโดยตรงจากแหล่งน้ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจให้มีความถูกต้องรวดเร็วมากยิ่งขึ้นและสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่ตรวจพบเป็นเชื้อที่มีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมจริง

วิธี multiplex PCR ที่นำมาศึกษาสามารถจำแนกเชื้อ *V .cholerae* O1 ,*V.cholerae* O139 และ *V.cholerae* non-O1 ได้ด้วย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการเกิดการระบาดของโรคอหิวาตกโรคที่มักเกิดจาก *V .cholerae* O1 และช่วยควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* ก่อโรคในแหล่งน้ำโดยตรงด้วยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) และวิธีทางอิมมูโนวิทยา (direct fluorescent antibody; DFA)
2. พัฒนาการตรวจการมีชีวิตของเชื้อด้วยวิธี Reverse Transcription PCR (RT-PCR)
3. ทราบอุบัติการณ์ของเชื้อ *V. cholerae* ในแหล่งน้ำ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1. ตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้จากเชื้อ *V. cholerae* กลุ่ม O1 ที่แยกได้ ตั้งแต่ปี 2546-2548 และเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่ใช้ในการอุปโภคและบริโภค 15 แหล่งในจังหวัดขอนแก่น

1.3.2. ตรวจตัวอย่างเชื้อจากแหล่งน้ำโดยตรงด้วยวิธี multiplex PCR โดยการตรวจหายีน *OmpW*, *ctxA, tcpA, rfb*O1 และ *rfb*O139

1.3.3. ตรวจการมีชีวิตของเชื้อด้วยการตรวจยีน *ompW*, *ctxA* และ *tcpA* โดยวิธี Reverse Transcription PCR

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การตรวจเชื้อโดยตรงจากแหล่งน้ำโดยวิธี multiplex PCR จะให้ผลในการตรวจที่รวดเร็วและถูกต้องกว่าวิธีการตรวจด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิมและวิธี Reverse Transcription PCR (RT-PCR) จะให้ผลการตรวจเชื้อที่มีชีวิตอยู่เช่นเดียวกับวิธีทางอิมมูโนวิทยา

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถประยุกต์ใช้ multiplex PCR ตรวจหาเชื้อได้โดยตรงจากแหล่งน้ำ ทำให้ตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการที่รวดเร็วถูกต้องยิ่งขึ้น
2. เกิดประโยชน์ในการเฝ้าระวังและป้องกันโรคอุบัติใหม่ (re-emerging disease)
3. พัฒนาการเรียนการสอนบัณฑิตศึกษา ในระดับปริญญาเอก
4. ชื่อวารสารที่คาดว่าจะเสนอตีพิมพ์ : Applied and Environmental Microbiology
5. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
   - กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
   - กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
   - หน่วยควบคุมโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลศรีนครินทร์
   - สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น (สคร.6 ขอนแก่น)
   - สำนักงานสิ่งแวดล้อม กระทรวงสาธารณสุข
   - ห้องปฏิบัติการของหน่วยงานกระทรวงสาธารณสุข
   - ศูนย์วิจัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1. นำผลการวิจัยที่ได้ลงตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
2. นำเสนอในสัมมนาทางวิชาการระดับชาติ

   ได้นำเสนอในการประชุมกรมควบคุมโรคเรื่อง Development of bacterial diarrhea detection by multiplex PCR and SYBR green real-time PCR เมื่อวันที่ 23 กุมภาพันธ์ 2554
3. อบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง
4. บริการความรู้แก่ประชาชนและผู้ประกอบการเกี่ยวกับการป้องกันและควบคุมโรคอาหารเป็นพิษร่วมกับหน่วยงานอื่น

1.7 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

สถานที่ทำการวิจัย : ห้องปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น