

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการตรวจหาชิ้น rtxA และ rtxC ของเชื้อ Vibrio cholerae โดยวิธี duplex PCR

ตารางที่ 4.1: ผลการตรวจหาชิ้น rtxA และ rtxC ของเชื้อ Vibrio cholerae โดยวิธี duplex PCR

Strains	Virulence profile*	rtxA and rtxC detection (% positive sample)			
		rtxA+, rtxC+	rtxA+, rtxC-	rtxA-, rtxC+	rtxA-, rtxC-
<i>V. cholerae</i> O1 (Clinical ; n = 71)	ctr ⁺ /zau ⁺ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 66)	59 (83.1)	0 (0)	0 (0)	7 (9.9)
	ctr ⁺ /z ⁻ au ⁺ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 1)	1 (1.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	c ⁻ tr ⁺ /za ⁻ u ⁺ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 4)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	1 (25)
	Total	63 (88.7)	0 (0)	0 (0)	8 (11.3)
<i>V. cholerae</i> O1 (Environmental; n = 4)	ctr ⁺ /zau ⁺ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 4)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	1 (25)
<i>V. cholerae</i> non-O1 (Clinical ; n = 105)	ct ⁻ r ⁺ /zau ⁻ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 86)	69 (65.7)	0 (0)	13 (12.4)	4 (3.8)
	ct ⁻ r ⁺ /zau ⁺ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 2)	2 (1.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ct ⁻ r ⁺ /za ⁻ u ⁺ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 10)	7 (6.7)	0 (0)	2 (1.9)	1 (0.95)
	ct ⁻ r ⁺ /za ⁺ u ⁻ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 1)	1 (0.95)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ct ⁻ r ⁺ /z ⁻ a ⁺ u ⁻ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 3)	3 (2.85)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ct ⁻ r ⁺ /zau ⁻ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.85)
<i>V. cholerae</i> non-O1 (Environmental ; n = 55)	Total	82 (78.1)	0 (0)	15(14.2)	8 (7.6)
	ct ⁻ r ⁺ /zau ⁻ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 31)	24 (43.64)	0 (0)	5 (9.09)	2 (3.64)
	ct ⁻ r ⁺ /za ⁻ u ⁺ /hlyA ⁺ /stn ⁻ (n = 22)	16 (29.09)	0 (0)	6 (10.9)	0 (0)
	ct ⁻ r ⁺ /zau ⁻ /hlyA ⁺ /stn ⁺ (n = 2)	2 (3.64)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	42 (76.4)	0 (0)	11 (20)	2 (3.64)

* c = ctxA, t = tcpA, r = toxR, z = zot, a = ace, u = ompU



เชื้อ *V. cholerae* กลุ่ม O1 และ non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 235 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่มียีน *hlyA* (*hlyA*⁺) 232 ตัวอย่างหรือเท่ากับ 98.72% และเชื้อที่ไม่มียีน *hlyA* (*hlyA*⁻) 3 ตัวอย่างหรือเท่ากับ 1.28% เมื่อทำการตรวจหา ยีน *rtxA* และ *rtxC* พบว่า เชื้อกลุ่ม O1 และ non-O1 ที่เป็น *hlyA*⁺ ประมาณ 75-88 % มีทั้งยีน *rtxA* และ *rtxC* ในขณะที่เชื้อส่วนน้อย (3-25%) ไม่พบยีน *rtxA* และ *rtxC* สำหรับเชื้อกลุ่ม *hlyA*⁻ ทั้งหมด (100%) ไม่พบยีน *rtxA* และ *rtxC* จากผลดังกล่าวแสดงถึง ความแตกต่าง ในการสร้าง RTX toxin ของเชื้อกลุ่มที่เป็น *hlyA*⁺ และ *hlyA*⁻ โดยเชื้อกลุ่ม O1 และ non-O1 ที่เป็น *hlyA*⁺ ส่วนใหญ่มีการสร้าง RTX toxin แต่กลุ่มที่เป็น *hlyA*⁻ ไม่มีการสร้างที่ออกซินดังกล่าวโดย serogroup ไม่มี ผลต่อการสร้างที่ออกซิน เมื่อเปรียบเทียบเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย พบว่า กลุ่ม O1 และกลุ่ม non-O1 มียีนทั้งสอง 88.7% และ 78.1% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมกลุ่ม O1 และกลุ่ม non-O1 มียีนทั้งสอง 75% และ 76.37% จากผลดังกล่าวแสดงถึงแหล่งที่มาของเชื้อไม่มีความเกี่ยวข้องกับการพบยีนดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Chow และคณะที่พบว่า เชื้อทั้งที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม สร้าง RTX toxin ได้ไม่แตกต่างกัน (7) อีกทั้งการศึกษาของ Kumar และคณะแสดงถึงความสัมพันธ์ของยีน *hlyA* กับ *rtxA* โดยพบว่า 71.11% ในการตรวจหา virulence gene ของเชื้อสามารถตรวจพบทั้งยีน *hlyA* และ *rtxA* ในขณะที่ 12.22% ของเชื้อตรวจไม่พบยีนทั้งสอง (31) นอกจากนี้ virulence profile ของเชื้อที่แตกต่างกันพบว่า ไม่มีผลต่อการตรวจพบยีน *rtx* เนื่องจากส่วนใหญ่ของเชื้อสามารถตรวจพบยีน *rtx* ได้ถึงแม้มี virulence gene ที่ไม่เหมือนกัน

มีการศึกษาพบว่า RTX toxin มีความเกี่ยวข้องในการเกิด cytotoxic ของเซลล์หลายชนิด เช่น ทำให้เกิด actin depolymerization ใน HEp-2 cells (7) เกิดการทำลายของ host cell cytoskeleton (23, 51) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ หรือช่วยให้เชื้อหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจาก actin cytoskeleton มีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ การขนส่งภายในเซลล์ กระบวนการ phagocytosis รวมถึงการควบคุม epithelial barrier และ immune cells signaling (30) โดยมีการศึกษาถึงความเกี่ยวข้องระหว่าง RTX toxin กับ immune cells พบว่า ที่ออกซินมีบทบาทในการป้องกันการกำจัดแบคทีเรียออกจากลำไส้ (42, 43) โดยการชะลอหรือยับยั้งกระบวนการเกิด phagocytosis ทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดในร่างกายต่อไปได้ (51, 52) ดังนั้นการมียีน *rtx* อยู่อาจเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เชื้อสามารถก่อโรคได้ถึงแม้ไม่มีการสร้าง cholera toxin (31)

4.2 ผลการตรวจการสร้าง hemolysin และ protease

ตารางที่ 4.2: ผลการตรวจการสร้าง hemolysin โดยวิธี hemolysin assay

<i>V. cholerae</i> strains	<i>hlyA</i>	hemolysis level (% positive sample)				Average of hemolysin production (%)
		1-25% (Low)	25-50% (Medium)	50-75% (High)	75-100% (Very high)	
O1 (Clinical)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=11)	8 (72.7)	3 (27.3)	0 (0)	0 (0)	20.9
O1 (Environmental)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=4)	3 (75)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	19
Non-O1 (Clinical)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=27)	20 (74)	4 (15)	1 (4)	2 (7)	23.9
	<i>hlyA</i> ⁻ (n=3)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13.5
Non-O1 (Environmental)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=30)	24 (80)	5 (17)	1 (3)	0 (0)	20.5

จากตัวอย่างกลุ่มเชื้อ O1 และ non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 75 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่ม O1 จำนวน 15 ตัวอย่างและกลุ่ม non-O1 จำนวน 60 ตัวอย่างจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมอย่างละ 30 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบ hemolysin assay พบว่า เชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้าง hemolysin ได้ ในระดับต่ำ โดยเฉพาะเชื้อที่ไม่พบ *hlyA* จะได้ค่าเฉลี่ยของการสร้าง hemolysin เพียง 13.5 % ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มที่มี *hlyA*⁺ อย่างมีนัยสำคัญ (21.1%) ดังนั้นการสร้าง hemolysin ได้มากหรือน้อยไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่แยกเชื้อได้ หรือ serogroup ของเชื้อ แต่สัมพันธ์กับการมี *hlyA* โดยการวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า เชื้อกลุ่มที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมสามารถสร้าง hemolysin ได้ไม่ต่างกัน (3, 5, 29, 44) เช่น การศึกษาของ Bidinost และคณะ พบว่า เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมสามารถสร้าง hemolysin ได้ 71.4% และ 70.5% ตามลำดับ (5) ดังนั้นยีน *hlyA* จึงเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการสร้าง hemolysin ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยในการก่อโรคของเชื้อกลุ่มดังกล่าว เช่น การเหนี่ยวนำให้เกิด high enterotoxicity และการตายของเซลล์ในลำไส้เล็ก (50, 65)



ตารางที่ 4.3: ผลการตรวจการสร้าง protease โดยวิธี protease assay

Strains	<i>hlyA</i>	Protease activity* (% positive sample)			Average of protease production (%)
		Low	Intermediate	High	
<i>V. cholerae</i> O1 (Clinical ; n = 11)	<i>hlyA</i> ⁺ (n =11)	2 (18.2)	8 (72.7)	1 (9.1)	8.7
<i>V. cholerae</i> O1 (Environmental ; n = 4)	<i>hlyA</i> ⁺ (n =4)	1 (25)	3 (75)	0 (0)	7.9
<i>V. cholerae</i> non-O1 (Clinical ; n = 30)	<i>hlyA</i> ⁺ (n =27)	6 (22)	18 (67)	3 (11)	9.3
	<i>hlyA</i> ⁻ (n =3)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	8.8
<i>V. cholerae</i> non-O1 (Environmental ; n = 30)	<i>hlyA</i> ⁺ (n =30)	9 (30)	21 (70)	0 (0)	8.2

* Low activity (>8 mm), Intermediate (8-12 mm), High (>12 mm)

จากตารางที่ 4.3 กลุ่มเชื้อ O1 และ non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมเมื่อนำมาทดสอบ protease assay พบว่า เชื้อกลุ่ม *hlyA*⁺ ส่วนใหญ่ 67-81% สร้าง protease ได้และสร้างได้ในระดับปานกลาง เช่นเดียวกับเชื้อกลุ่มที่เป็น *hlyA*⁻ ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงยีน *hlyA* ไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ เนื่องจาก ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คือ *hap* เมื่อพิจารณาเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยสามารถสร้าง protease ได้ในระดับสูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาของ Iyer และคณะพบว่า 54.5% ของเชื้อกลุ่ม O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยสามารถสร้าง protease ได้สูง ในขณะที่ 38.1% ของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสร้าง protease ได้ในระดับต่ำ (29) แสดงว่านอกจากที่ออกซินอื่นๆแล้ว protease ก็ยังเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมความรุนแรงในการก่อโรค โดยมีการศึกษาพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนของ host ที่มีส่วนประกอบของ mucin (20) และ occludin ใน tight junctions (33, 59) และมีบทบาทเกี่ยวกับการอยู่รอดของเชื้อในสิ่งแวดล้อมด้วย โดยพบว่าสภาวะเหนียวทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์คือเมื่อเชื้อเจริญในสิ่งแวดล้อมที่สารอาหารจำกัด ซึ่งในสภาวะดังกล่าวเชื้อจะใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย glycoprotein เพื่อใช้เป็นแหล่งสารอาหาร (26) และการสร้างเอนไซม์จะถูกยับยั้งเมื่อมีกลูโคส(4)

4.3 ผลการตรวจcytotoxic activity ของเชื้อ *Vibrio cholerae*

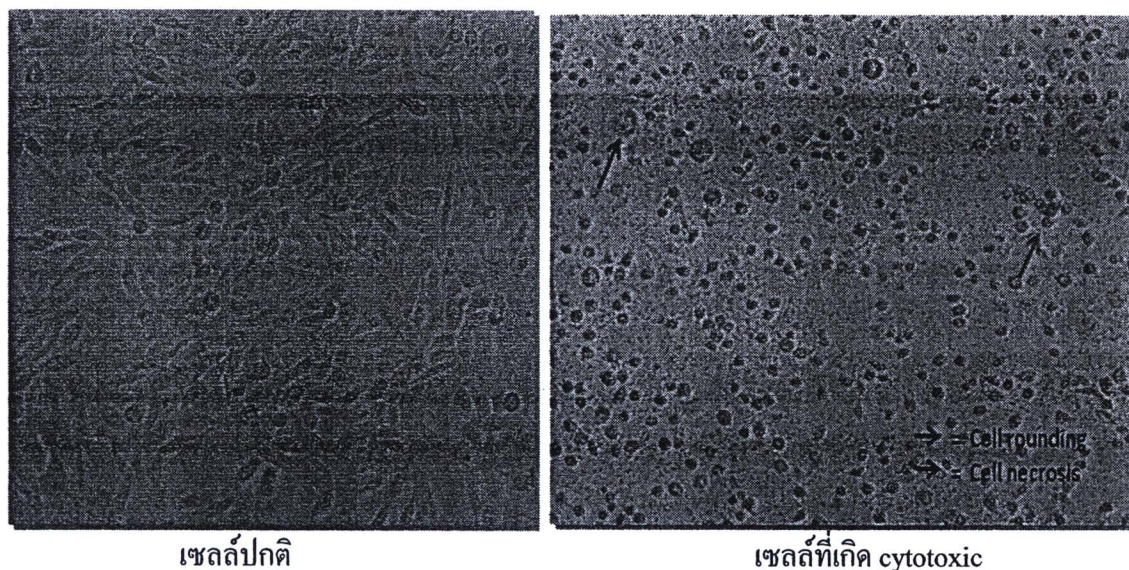
ตารางที่ 4.4: ผลการตรวจ cytotoxic activity ของเชื้อ *Vibrio cholerae*

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่.....2.2 ส.ย. 2555.....
เลขทะเบียน.....246169.....
เลขเรียกหนังสือ.....

Strains	<i>hlyA</i>	Average of cytotoxic activity			Total average of cytotoxic activity (%)
		Elongation (%)	Rounding (%)	Necrosis (%)	
<i>V. cholerae</i> O1 (Clinical ; n = 11)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=11)	3	41	24	68
<i>V. cholerae</i> O1 (Environmental ; n = 4)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=4)	1	36	22	59
<i>V. cholerae</i> non-O1 (Clinical ; n = 30)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=27)	4	41	34	79
	<i>hlyA</i> ⁻ (n=3)	6	16	10	32
<i>V. cholerae</i> non-O1 (Environmental ; n = 30)	<i>hlyA</i> ⁺ (n=30)	3	43	17	63

จากตัวอย่างกลุ่มเชื้อ O1 และ non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 75 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่ม O1 จำนวน 15 ตัวอย่างและกลุ่ม non-O1 จำนวน 60 ตัวอย่างแยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมอย่างละ 30 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบ cytotoxic activity พบว่า เชื้อกลุ่ม *hlyA*⁺ ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมมีการเกิด cytotoxicity เฉลี่ยอยู่ในช่วง 59%-79% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อกลุ่ม *hlyA*⁻ มีการเกิด cytotoxicity เฉลี่ยเท่ากับ 32 ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึง ยีน *hlyA* มีผลกับการเกิด cytotoxicity มีการศึกษาในการวิจัยอื่นพบว่า *hlyA* มีความเกี่ยวข้องทำให้เซลล์หลายชนิด เช่น Vero cells, HeLa cells เกิดการบาดเจ็บ เซลล์แตก (lysis) หรือทำให้เกิด vacuole ภายในเซลล์ (8, 17) และเมื่อเกิด cytotoxicity พบว่า เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม สีดำคล้ำภายในเซลล์ (rounding) พบได้มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ขยายใหญ่ขึ้น ผนังเซลล์แตกและเกิดการตาย (necrosis) และลำดับสุดท้ายคือ เซลล์มีการยืดยาวจากปกติ (elongation) (3) เช่นเดียวกับการศึกษาที่พบว่า เชื้อกลุ่ม non-O1 ทั้งจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมสามารถทำให้เกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ได้ (3, 5, 44) การทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่า การมีหรือไม่มี *hlyA* มีความสัมพันธ์กับการเกิด cytotoxicity มากกว่าการมียืนความรุนแรงของโรคตัวอื่น

รูปที่ 4.1 ความสามารถในการก่อให้เกิด cytotoxic activity ของเชื้อ *V. cholerae* non-O1 ที่มี *hlyA*



4.4 สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัยนี้ ชี้ให้เห็นว่า การสร้างสารพิษและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อกลุ่ม non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมทั้งการตรวจหาชิ้น *rtxA* และ *rtxC* โดยวิธี duplex PCR, การสร้าง hemolysin โดยวิธี hemolysin assay, การสร้าง protease โดยวิธี protease assay และการเกิด cytotoxic activity ของเชื้อ พบว่า เชื้อกลุ่ม non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมมีความสามารถในการสร้างสารพิษและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์และสารพิษได้ในระดับสูงกว่าเชื้อที่แยกได้สิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามสิ่งที่น่าสนใจคือ การมี *hlyA* มีความสัมพันธ์กับการสร้าง hemolysin และความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกิด cytotoxic activity ของเชื้อ ปัจจัยเหล่านี้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ โดยเฉพาะในเชื้อกลุ่ม non-O1 ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าเชื้อ non-O1 สามารถทำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ แม้จะเป็นเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมก็ตาม