

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### 2.1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius, 1798)

จัดอยู่ในชั้นครัสเตเชีย (crustacea) เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อเรียกภาษาอังกฤษว่า Giant black tiger prawn หรือ Tiger prawn หรือ Jumbo tiger prawn (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

##### 2.1.1 ลักษณะทั่วไป

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ขนาดยาวประมาณ 18-25 เซนติเมตร มีเปลือกเรียบและมันเงาหุ้มตัวอยู่ภายนอก เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน ลำตัวมี 19 ปล้องเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวางเป็นปล้องๆ ขาเดินมีสีแดงปนดำ ขาวายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงิน โคนขาวายน้ำมีแถบสีเหลือง ระวังคัมภีร์มีสีน้ำตาลและมีขนสีแดงอยู่โดยรอบ หนวดมีสีดำไม่มีลายชัดเจน โดยสีของกุ้งจะเปลี่ยนแปลงไปตามการปรับตัวและสภาพแวดล้อม เช่น กุ้งเลี้ยงในบ่อจะมีสีซีด เป็นต้น ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ สันกรียวตรงขนานไปกับลำตัว ร่องข้างกรีดทั้ง 2 ด้านมีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีดอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก

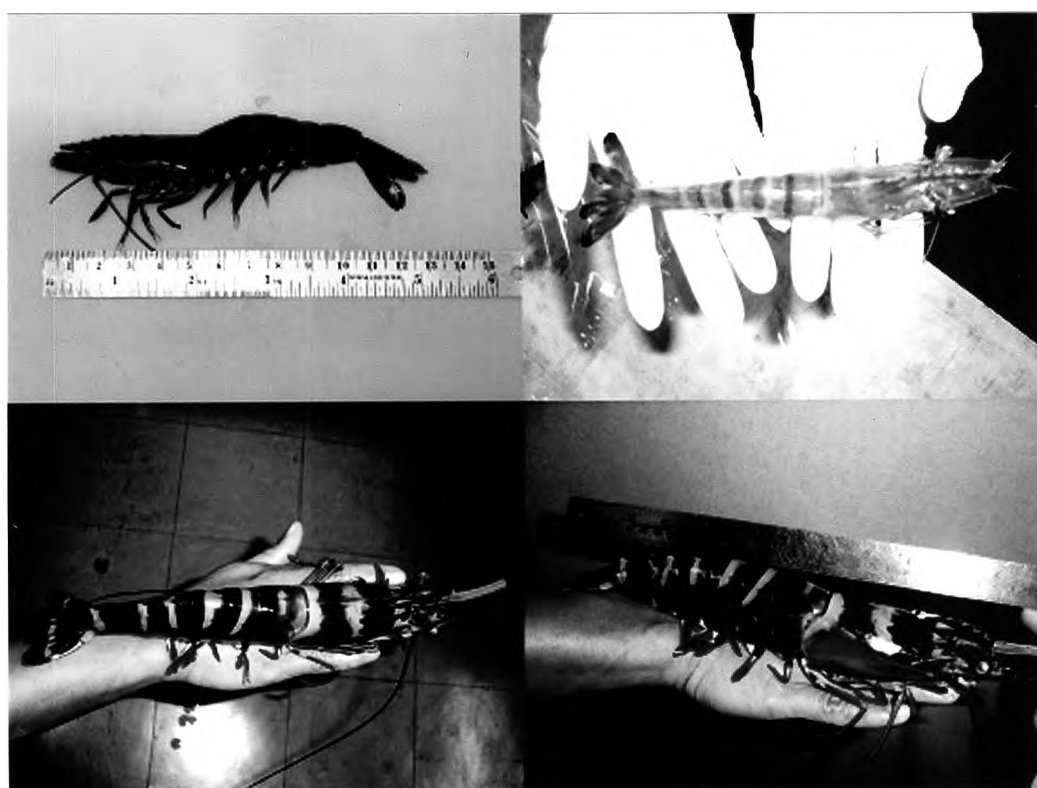
##### 2.1.2 ลักษณะนิสัย

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่เจริญเติบโตเร็ว เจริญได้ในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม ในธรรมชาติชอบอาศัยอยู่บริเวณน้ำลึกเขตร้อนที่มีท้องทะเลเป็นโคลนปนทราย ทนต่อการเปลี่ยนแปลงต่อสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีช่วงอุณหภูมิ 12-36°C และทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ในช่วงประมาณ 0.2-70 ส่วนในพันส่วน ชอบหมกตัวและอยู่ตามหน้าดิน หากินตามก้นบ่อหรือผิวดินโดยใช้ขาเดินคู่ที่ 1 หรือ 2 จับอาหารแทะกิน กุ้งจะกินอาหารจำพวกพืชและสัตว์ที่ตายแล้วและยังมีชีวิตอยู่กินอาหารได้ทุกเวลา ในช่วงที่ลอกคราบจะหยุดกินอาหารและกินมากหลังจากที่ลอกคราบเสร็จใหม่ๆ สามารถเพาะและแพร่พันธุ์ได้จากพ่อแม่พันธุ์จากทะเลหรือจากบ่อ ชอบหมกตัวและชอบอยู่ตามหน้าดิน กุ้งชนิดนี้มีการแพร่กระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางใน Indo-West Pacific แถบตะวันออกของแอฟริกาถึงทะเลแดง มหาสมุทรอินเดีย จีน ฮองกง ไต้หวัน ตอนใต้ของญี่ปุ่น เกาหลี ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และตอนเหนือของออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบแพร่กระจายทั่วไป พบมากบริเวณเกาะช้าง บริเวณนอกฝั่งชุมพรถึงนครศรีธรรมราช ทางฝั่งอันดามันจะพบมากที่ภูเก็ตและระนอง

##### 2.1.3 วงจรชีวิต

มีอายุขัยประมาณ 18-24 เดือน ขนาดของกุ้งเพศเมียจะใหญ่กว่าเพศผู้ โดยแม่กุ้งวางไข่ในน้ำทะเลลึก 30-40 เมตร ใกล้กับพื้นดิน ไข่ที่ผสมแล้วจะจมมีลักษณะกลมสีเหลืองอมเขียว ขนาดเล็ก

เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.29 มิลลิเมตร เมื่อไขฟักออกเป็นตัว ลูกกุ้งวัยอ่อนจะเคลื่อนที่เข้าสู่ชายฝั่ง ล่องลอยตามบริเวณผิวน้ำเหมือนพวกแพลงตอนสัตว์ทั่วไป และเจริญเติบโตโดยวิธีลอกคราบ พอลูก กุ้งเจริญเติบโตถึงขั้นสุดท้ายก็จะกลายเป็นกุ้งวัยรุ่นซึ่งมีลักษณะต่างๆ ครบสมบูรณ์สามารถแยกเพศ จากลักษณะของอวัยวะช่วยสืบพันธุ์ภายนอกได้ชัดเจน ช่วงนี้จะเดินทางมาเจริญเติบโตบริเวณน้ำ กร่อย เนื่องจากมีอาหารอุดมสมบูรณ์ และจะเริ่มเดินทางกลับออกสู่ทะเลเมื่อมีขนาดประมาณ 50 กรัม เพื่อทำการผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไป กุ้งที่สมบูรณ์เพศแล้วสามารถอยู่ได้ในน้ำที่มีความลึกถึง 160 เมตร แต่พบมากที่ความลึก 20-70 เมตร



รูปที่ 2.1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius, 1798)

#### 2.1.4 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงหลายรูปแบบ ได้แก่ แบบธรรมชาติ แบบกึ่งพัฒนา และแบบ พัฒนา ซึ่งกุ้งชนิดนี้จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30°C ความเค็มของน้ำ 15-30 ส่วนในพันส่วน ปริมาณ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำไม่น้อยกว่า 3-5 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) พีเอชของน้ำ 7.5-8.5 แอมโมเนียไม่ควรเกิน 0.1 ส่วนในล้านส่วน ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ไม่ควรเกิน 0.033 ส่วนในล้านส่วน มี ธาตุอาหารจำพวกไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกาไม่มากเกินไป น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงต้องปราศจาก

สารพิษต่างๆ ได้แก่ ยาปราบศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง และโลหะหนัก จำพวกปรอท ทองแดง สังกะสี แคดเมียม เป็นต้น และสภาพพื้นบ่อไม่ควรเน่าเสีย ป้องกันโดยการดูแลควบคุมอาหารที่ให้อาหารและควบคุมปริมาณของแพลงตอนพืชในบ่อ (ชลอ ลิมสุวรรณ, 2535; วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

## 2.2 โรคไวรัสโอซิส

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบปัญหาจากการตายอันเนื่องมาจากการติดเชื้อต่างๆ เช่น เชื้อไวรัส (โรคหัวเหลือง โรคตัวแดงดวงขาว) เชื้อรา โพรโทซัว พยาธิ และแบคทีเรีย (Lightner และ Redman, 1998) ซึ่งโรคไวรัสโอซิสเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของกุ้ง โรคนี้เกิดจากแบคทีเรียสกุลไวรัสโอซิส เช่น *V. harveyi* (โรคเรืองแสง), *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* และ *V. vulnificus* (โรคเสี้ยนดำ) เป็นต้น โดยแบคทีเรียสกุลไวรัสโอซิสส่วนใหญ่มักเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสในกุ้งกุลาดำ (ชลอ ลิมสุวรรณ, 2543; ยอดยิ่ง เทพรานนท์, 2540; ปภาศิริ ศรีโสภณภรณ์, 2532) มีรายงานว่าพบแบคทีเรียสกุลไวรัสโอซิสในกุ้งที่ป่วยและตายด้วยโรคต่างๆ เช่น หัวเหลือง ตัวแดงดวงขาว (ยอดยิ่ง เทพรานนท์, 2540) และพบ *V. harveyi*, *V. anguillarum* และ *V. vulnificus* ในกุ้งที่ติดเชื้อ *Monodon baculovirus* (MBV) (Vaseeharan และ Ramasamy, 2003)

## 2.3 *Vibrio vulnificus*

### 2.3.1 ลักษณะของ *V. vulnificus*

*V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยใช้โพลาร์แฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ ช่วงอุณหภูมิ 9-31<sup>o</sup>ซ (Strom และ Paranjpy, 2000) ระดับความเค็ม 5-25 ส่วนในพันส่วน (Motes และคณะ, 1998) แบคทีเรียชนิดนี้พบครั้งแรกเมื่อปี 1964 ซึ่งในช่วงแรกคิดว่าเป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *V. parahaemolyticus* แต่หลังจากตรวจสอบพบว่าโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในดีเอ็นเอแตกต่างกัน จึงได้ตั้งชื่อให้ว่า *Beneckea vulnifica* จนกระทั่งในปี 1979 Farmer J.J. ได้ตั้งชื่อใหม่ว่า *V. vulnificus* (ยอดยิ่ง เทพรานนท์, 2540; Strom และ Paranjpy, 2000; Tison และ Kelly, 1989) สามารถแบ่งตามลักษณะทางกายวิภาคและเจ้าบ้านที่แตกต่างกันได้ 3 ไบโอไทป์ ได้แก่

#### 2.3.1.1 *V. vulnificus* ไบโอไทป์ 1

ก่อให้เกิดกระเพาะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โลหิตเป็นพิษ (septicemia) และการติดเชื้อทางบาดแผล โดยลักษณะอาการที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อทางบาดแผลมีหลายลักษณะ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ไบโอไทป์นี้จะเข้าสู่มนุษย์โดยการรับประทานอาหารทะเลดิบโดยเฉพาะอย่างยิ่ง หอยนางรมหรือการที่บาดแผลสัมผัสกับน้ำทะเลที่ปนเปื้อน

### 2.3.1.2 *V. vulnificus* ไบโอดี 2

ก่อให้เกิดโรคในหนูและปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาไหล บั๊จจัยความรุนแรงของไบโอดี 2 จะเหมือนกับไบโอดี 1 แต่ไบโอดี 2 จะสามารถทำให้เกิดความรุนแรงในปลาไหลได้ในทั้งภาวะที่มีแคปซูล และไม่มีแคปซูล (Linkous และ Oliver, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าไบโอดีนี้สามารถเป็นแบคทีเรียช่วยโอกาสในมนุษย์ โดยมีรายงานการตรวจพบในบาดแผลของผู้ป่วย (Strom และ Paranjpy, 2000; Linkous และ Oliver, 1999; Biosca และ Amaro, 1996)

ความแตกต่างทางชีวเคมีและกายภาพของไบโอดี 1 และ 2 คือ ไบโอดี 1 จะสามารถผลิต indole และ ornithine decarboxylase นอกจากนี้ยังมีไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลากหลาย สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ในขณะที่ไบโอดี 2 มีไลโปพอลิแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียว คือ serovar E (Martin และ Siebeling, 1991)

### 2.3.2.3 *V. vulnificus* ไบโอดี 3

ก่อให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผลในมนุษย์ เป็นไบโอดีใหม่ที่มีการรายงานครั้งแรกในปี 1999 โดยพบการระบาดในประเทศอิหร่าน ไบโอดีนี้จะมีโคไลนีสีเขียวเมื่อเลี้ยงบนอาหาร TCBS ไม่สามารถเจริญในอาหาร Macconkey และไม่สามารถจำแนกโดยชุดตรวจ API 20E ลักษณะทางชีวเคมีของไบโอดีนี้จะคล้ายคลึงกับไบโอดี 1 โดยจะมีความแตกต่างบางประการ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 (Bisharat และคณะ, 1999)

### 2.3.2 การแพร่กระจาย

พบแพร่กระจายทั่วไปในน้ำทะเลเขตอบอุ่นบริเวณปากอ่าวและสัตว์น้ำ เช่น หอย ปลา ไรแดง และกุ้ง (Vaseeharan และ Ramasamy, 2003; Strom และ Paranjpy, 2000; Linkous และ Oliver, 1999; Song และคณะ, 1990)

### 2.3.3 อาการของโรค

ทำให้เกิดกระเพาะและลำไส้อักเสบ โลหิตเป็นพิษ และการติดเชื้อทางบาดแผลในมนุษย์และก่อโรคในสัตว์น้ำ เช่น ปลา และกุ้ง ในกรณีโรคในกุ้งพบว่า *V. vulnificus* สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งไบโอดี 1 และ 2 (Amaro และคณะ, 1999) โดยจะทำให้เกิดโรคเสี้ยนดำในกุ้งกุลาดำ (ชโลล์มสุวรรณ, 2543; ปภาศิริ ศรีโสภณภรณ์, 2532) และเป็นแบคทีเรียช่วยโอกาส พบว่าสามารถอยู่ร่วมกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอชนิดอื่นๆ ในน้ำเลือดกุ้งได้เป็นอย่างดี และมีความสัมพันธ์กับสัตว์ที่มีการติดเชื้อในเลือด (ยอดยิ่ง เทพรานนท์, 2540) โดยจะพบในกุ้งที่เป็นโรคและอ่อนแอ เช่น กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *Monodon baculovirus* (MBV) (Vaseeharan และ Ramasamy, 2003)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *V. vulnificus* (Holt, J.G. และคณะ., 1994)

สมบัติ	<i>V. vulnificus</i>
3-12 polar flagella	-
Lateral flagella on solid media	-
Swarming	-
Straight rod <sup>a</sup>	-
PHB accumulation	-
Pigment	-
Arginine dihydrolase	-
Oxidase	+
Nitrate reduction	+
Luminescence	-
D-glucose, gas	-
Acetoin and/or diacetyl production	-
Na <sup>+</sup> required for growth	+
Organic growth factor requirement	-
4°C, growth	-
30°C, growth	+
35°C, growth	+
40°C, growth	+
Amylase	+
Gelatinase	+
Lipase	+
Alginase	-
Chitinase	+
Utilization of :	
Acetate	+
Aconitate	+
β-Alanine	-

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สมบัติ	<i>V. vulnificus</i>
D-Alanine	+
L-Alanine	+
$\gamma$ -Aminobutyrate	-
$\delta$ -Aminovalerate	-
L-Arabinose	-
L-Arginine	+
L-Aspartate	+
Butyrate	-
Caprate	+
Caproate	-
Caprylate	+
Cellobiose	+
Citrate	+
Citrulline	-
Ethanol	-
D-Galactose	+
D-Galacturonate	-
D-Glucuronate	+
L-Glutamate	+
Glutarate	-
D-Glucuronate	+
DL-Glycerate	+
Glycine	-
Heptanoate in	-
L-Histidine	d
<i>p</i> -Hydroxybenzoate	-

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สมบัติ	<i>V. vulnificus</i>
$\beta$ -Hydroxybutyrate	-
<i>myo</i> -Inositol	-
Isobutyrate	-
$\alpha$ -Ketoglutarate	+
DL-Lactose	+
Lactose	d
L-Leucine	-
DL-Malate	d
D-Manitol	d
D-Mannose	+
Melibiose	-
L-Ornithine	-
Pelargonate	-
L-Proline	+
Propanol	-
Propionate	+
Putrescine	-
Pyruvate	+
Quinate	-
L-Rhamnose	-
D-Ribose	+
Salicin	-
L-Serine	-
D-Sorbitol	-
Sucrose	-
Trehalose	+
L-Tyrosine	+

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สมบัติ	<i>V. vulnificus</i>
Valerate	-
D-Xylose	-

หมายเหตุ + = แท่งตรง, - = แท่งโค้ง

+ = ผลบวก 90% ขึ้นไป, - = ผลลบ 90% ขึ้นไป, d= ผลบวก 11-89%

ตารางที่ 2.2 อาการที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อทางบาดแผลของ *V. vulnificus* (Oliver, 2005)

อาการ	เปอร์เซ็นต์การเกิด (n=168)
เซลล์อักเสบ (cellulitis) ที่บริเวณแผล (cellulitis)	88
ตุ่มพอง (bullae)	88
เป็นไข้ (มากกว่า 37.8 <sup>o</sup> ซ)	65
หนาวสั่น	29
การเปลี่ยนแปลงของสภาพจิตใจ <sup>a</sup>	18
อาการบวมเนื่องจากโลหิตซึมออกจากหลอดเลือด (ecchymosis)	18
ความดันโลหิตต่ำ <sup>b</sup>	12
ท้องร่วง	6
อาเจียน	6

หมายเหตุ a = การมีไข้ หรือการไม่สามารถจดจำสถานที่หรือเพื่อนได้ หรือการหลับใน

b = ความดันของการบีบตัวของหัวใจน้อยกว่า 90 มิลลิเมตรปรอท



ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบลักษณะทางชีวเคมีของ *V. vulnificus* แต่ละไบโอดีป (Bisharat และคณะ, 1999)

ลักษณะ	ไบโอดีป		
	1	2	3
Oxidase	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Sucrose fermentation	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	-	+
Indole production	+	-	+
D-mannitol fermentation	+	-	-
D-sorbitol fermentation	-	+	-
Citrate (Simmon's)	+	+	-
Salicin fermentation	+	+	-
Cellobiose fermentation	+	+	-
Lactose fermentation	+	+	-
ONPG test	+	+	-

หมายเหตุ + = ผลบวกเท่ากับหรือมากกว่า 75%, - = ผลลบเท่ากับหรือมากกว่า 75%

### 2.3.4 การก่อให้เกิดโรค

#### 2.3.4.1 ความรุนแรงของ *V. vulnificus*

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ *V. vulnificus* เช่น การสร้างฮีโมไลซินและไซโทไลซิน ที่หลั่งออกสู่นอกเซลล์ (extracellular hemolysin และ cytolysin) เมทัลโลโปรตีเอส (metalloprotease) การใช้ธาตุเหล็ก (iron utilization) การแสดงออกของ capsular polysaccharide (CPS) ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ และการทนทานต่อสารฆ่าแบคทีเรีย เป็นต้น การศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ *V. vulnificus* นิยมใช้หนูเป็นตัวแทนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ทำการฉีด *V. vulnificus* ไปโอไทป์ 1 และ 2 สายพันธุ์ที่รุนแรงเข้าที่ช่องท้องของหนู พบว่าปริมาณที่ทำให้เกิดการตาย 50% ( $LD_{50}$ ) มีค่าประมาณ  $1 \times 10^5$  CFU/mouse (Strom และ Paranjpye, 2000; Linkous และ Oliver, 1999; Amaro และคณะ, 1994)

#### 2.3.4.2 ปัจจัยของผิวเซลล์ (cell surface)

##### 2.3.4.2.1 Capsular polysaccharide (CPS)

*V. vulnificus* สามารถสร้างแคปซูลบนผิวนอกของเซลล์ แคปซูลที่สร้างขึ้นจะมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรียชนิดนี้ โดยช่วยให้สามารถทนทานต่อแบคทีเรียซิดอล และช่วยป้องกันเซลล์จากระบบการกลืนทำลายของแมโครฟาจ การแสดงออกของแคปซูลจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะของโคโลนี สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลจะมีความรุนแรง โคโลนีจะทึบแสง ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูลจะไม่มี ความรุนแรง โคโลนีจะโปร่งแสง แบคทีเรียชนิดนี้จะสร้างแคปซูลได้ดีในการเจริญช่วง log phase และที่อุณหภูมิ 30-37°C ปัจจุบันพบว่ามียีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออก เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลแรมโนส ยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์ sugar epimerase และยีน *wza* ที่ถอดรหัส outer membrane transporter ของแคปซูล หากยีนเหล่านี้เกิดการกลายพันธุ์จะมีผลกระทบต่อ การแสดงออกของแคปซูล ส่งผลให้ *V. vulnificus* มีความรุนแรงลดลง (Gulig และคณะ, 2005; Strom และ Paranjpye, 2000; Linkous และ Oliver, 1999; Wright และคณะ, 1999)

Collado และคณะ (2000) ศึกษาความรุนแรงของ *V. vulnificus* ที่สร้างและไม่สร้างแคปซูลในปลาไหล (*Anguilla anguilla*) โดยการแช่เชื้อทั้ง 2 ชนิด (immersion) และฉีดเข้าที่ช่องท้องของปลาไหล (intraperitoneal injection) พบว่าการฉีกมีค่า  $LD_{50}$  ต่ำกว่าการแช่เชื้อ และ *V. vulnificus* ที่สร้างแคปซูลจะมีค่า  $LD_{50}$  ต่ำกว่าไม่สร้างแคปซูล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแคปซูลเป็นปัจจัยการก่อโรคที่สำคัญในปลาไหล

##### 2.3.4.2.2 ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide)

ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์หรือเอนโดทอกซินของแบคทีเรียเป็นตัวกลางในการเกิดการช็อกที่เกิดจากโลหิตเป็นพิษ (septic shock) โดยการชักนำการตอบสนองต่อการเป็นไข้ (pyrogenic

response) ของมนุษย์ ซึ่งไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ของ *V. vulnificus* สามารถก่อให้เกิดการช็อกที่เกิดจากโลหิตเป็นพิษได้ แม้ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ของ *V. vulnificus* จะมีความสามารถในการก่อให้เกิดการเป็นใช้น้อยกว่าไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคชนิดอื่นๆ แต่ก็มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของไซโตไคน์ (cytokine) ในเจ้าบ้าน โดยจะไปชักนำให้เกิดการอักเสบ การทำลายเนื้อเยื่อ และการช็อกที่เกิดจากโลหิตเป็นพิษในระหว่างที่ร่างกายติดเชื้อ (Strom และ Paranjpye, 2000)

ชนิดของไลโปพอลิแซ็กคาไรด์สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกไบโอไทป์ โดยไบโอไทป์ 1 จะมีสายโซ่ O-polysaccharide ที่หลากหลาย สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี และเนื่องด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ของไบโอไทป์ 1 มีความซับซ้อนของ antigenic heterogeneity สูง ดังนั้นจึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการเพิ่มความรุนแรงของ *V. vulnificus* (Martin และ Siebeling, 1991) ส่วนไบโอไทป์ 2 จะมีสายโซ่ O-polysaccharide 1 ชนิด คือ serovar E ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคในปลาไหล และยังพบว่าสายโซ่ O-polysaccharide ของไบโอไทป์นี้จะทนทานต่อสารฆ่าแบคทีเรียของปลาไหล ในขณะที่ไบโอไทป์ 1 จะถูกทำลาย (Amaro และคณะ, 1997)

#### 2.3.4.2.3 พิล (pili)

เป็นระยางค์อยู่ภายนอกเซลล์มีลักษณะกลวงและเป็นฟิลาเมนต์ (filament) ที่ประกอบด้วยโปรตีนยื่นออกมาจากผิวเซลล์ มีหน้าที่ทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะติดกับเจ้าบ้านหรือเกาะกันเอง และเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมระหว่างเซลล์ (ยอดยิ่ง เทพรานนท์, 2540) ยีนที่ถอดรหัสสองคู่ประกอบในการสร้างพิลไทป์ IV ของ *V. vulnificus* คือ *vvpA* โดย พิลไทป์ IV เป็นชนิดของพิลที่พบทั่วไปในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella bovis* และ *V. cholerae* (Strom และ Paranjpye, 2000)

Gander และ LaRocco (1989) แสดงพิลบนเซลล์ *V. vulnificus* เป็นครั้งแรกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และศึกษาการเกาะติดของพิลบนเยื่อบุผิวเซลล์มนุษย์ พบว่าจำนวนพิลมีผลต่อการเกาะติด โดยจำนวนพิลของ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากเลือดหรือบาดแผลที่ติดเชื้อมากกว่าที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้ *V. vulnificus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมเกาะติดกับเยื่อบุผิวเซลล์เจ้าบ้านได้น้อย

#### 2.3.4.3 แฟลกเจลลา และการเคลื่อนที่ของ *V. vulnificus*

แฟลกเจลลา เป็นส่วนที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

Lee และคณะ (2004a) นำยีน *flgE* ที่ถอดรหัสการสร้างโปรตีนฮุกของแฟลกเจลลา (flagella core protein) มาทำการกลายพันธุ์ (*flgE* mutant) เป็นผลให้ *V. vulnificus* ไม่มีการสร้าง

แฟลกเจลลา และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เมื่อทำการฉีด *flgE* mutant เข้าที่ช่องท้องของหนูที่ไม่มีการเสริมธาตุเหล็กในอาหาร พบว่าค่า LD<sub>50</sub> เพิ่มขึ้น 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ฉีดด้วยสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย และเมื่อฉีด *flgE* mutant เข้าที่ได้ผิวหนังของหนูที่มีการเสริมธาตุเหล็กและเดกซ์แทรนในอาหาร พบว่าค่า LD<sub>50</sub> เพิ่มขึ้น 1000 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *V. vulnificus* จะลดความรุนแรงเมื่อขาดแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่

#### 2.3.4.4 สารพิษและเอนไซม์

##### 2.3.4.4.1 ฮีโมไลซิน (hemolysin) และ ไซโทไลซิน (cytolysin)

เป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง และสามารถใช้ในการบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของแบคทีเรีย (Munro และคณะ, 2003) โปรตีนของไซโทไลซิน มี 2 ชนิด คือ 56 และ 40 กิโลดาลตัน ไซโทไลซินขนาด 56 กิโลดาลตัน นอกจากจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแตกแล้ว ยังเป็นสาเหตุให้เกิดการซึมผ่านระบบท่อลำเลียง (vascular permeability) ที่ผิวหนังของหนูตะเภาส่งผลให้หนูตาย ไซโทไลซินจะทำให้เซลล์แตกโดยการสร้างรูบนผนังเซลล์ และกระตุ้นเอนไซม์กวานิเลตไซเคลส ซึ่งจะช่วยเพิ่มระดับของ cyclic GMP ในเซลล์ทำให้เกิดการพองของเส้นเลือดและการบวมน้ำ ยีนที่ถอดรหัสไซโทไลซินคือ *vwA* ปัจจุบันการศึกษาบทบาทของไซโทไลซินของ *V. vulnificus* ยังไม่ชัดเจน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง และสายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกของไซโทไลซิน (Strom และ Paranjpye, 2000)

Lee และคณะ (2004b) ทำการทดลองในระดับหลอดทดลอง (in vitro) ด้วยการเติมไซโทไลซินพบว่า trifluoperazin และ calcium-calmodulin antagonist สามารถยับยั้งการเพิ่มการซึมผ่านของผนังเซลล์เอนโดทีเลียมได้ และเมื่อนำ trifluoperazin ไปทดลองในหนู พบว่าหนูมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น

ฮีโมไลซินขนาด 40 กิโลดาลตัน มียีนที่ถอดรหัส คือ *vIIY* ลำดับเบสของยีนนี้ยังมีความเหมือนกับลำดับเบสของโลจิโอไลซิน (logiolysin) ที่สร้างโดย *Logionella pneumophila* ซึ่งบทบาทของ *vIIY* ต่อความรุนแรงของ *V. vulnificus* ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา (Gulig และคณะ, 2005; Strom และ Paranjpye, 2000)

##### 2.3.4.4.2 เมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease)

เมทัลโลโปรติเอส (*V. vulnificus* protease, VVP) เป็นโปรติเอสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ มีขนาด 45 กิโลดาลตัน VVP จะทำให้เกิดการเพิ่มการซึมผ่านระบบท่อลำเลียง การบวมน้ำ และเป็นสาเหตุให้เส้นเลือดถูกทำลาย โดยมีสังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อฉีด VVP เข้าที่ช่องท้อง หรือเส้นเลือด หรือใต้ผิวหนังของหนู พบว่าทำให้น้ำเยื่อผิวหนังของหนูตาย (dermonecrosis) เป็นบริเวณกว้างอย่างรวดเร็ว VVP จะมีความคล้ายคลึงกับโปรติเอสที่ผลิตจาก *V. anguillarum* (EmpA), *V. cholerae* (HprC) และ *V. proteolyticus* (NprP) ยีนที่ถอดรหัส VVP คือ *vvp* หรือ *empV* หรือ

*vvpE* และการแสดงออกของ *vvp* จะเพิ่มขึ้นเมื่อการเจริญอยู่ในช่วง stationary phase ในการศึกษา ระดับหลอดทดลอง พบว่าไปโอโทปี 1 และ 2 สามารถสร้าง VVP ได้ แต่มีเพียงไปโอโทปี 1 เท่านั้นที่สามารถเจริญและหลั่ง VVP ออกมาในร่างกายมนุษย์ (Gulig และคณะ, 2005; Watanabe และคณะ, 2004; Strom และ Paranjpye, 2000)

#### 2.3.4.4.3 เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin)

เป็นสารพิษจากแบคทีเรียชนิดเอกโซทอกซิน (exotoxin) ซึ่งจะมีเป้าหมายของการเป็นพิษอยู่ที่ลำไส้ มีผลทำให้เกิดท้องร่วง และลำไส้อักเสบ (ยอดยิ่ง เทพรานนท์, 2540)

Stelma และคณะ (1988) ศึกษาการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *V. vulnificus* โดยสามารถแยกเอนเทอโรทอกซินซึ่งตอบสนองต่ออาการทางเดินอาหารอักเสบ และโลหิตเป็นพิษ

#### 2.3.4.4.4 โปรตีนที่หลั่งออกมาสู่นอกเซลล์ (extracellular protein; ECPs) อื่น ๆ

*V. vulnificus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมสามารถผลิต ECPs ได้อีกหลายชนิด ได้แก่ อะไมเลส ไคติเนส คอนดรอยติเนส เซลลาจีเนส ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส อีลาสเทส เจลาติเนส แลคซิทีเนส มิวซินเนส ฟอสโฟไลเปส ไฮยาลูโรนิเดส และ ดีเอ็นเอส ซึ่ง ECPs เหล่านี้อาจมีผลต่อความรุนแรงของ *V. vulnificus* เช่น *V. vulnificus* จะสร้างไคติเนสขึ้นเพื่อย่อยสลายสารประกอบที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้จำเป็นต่อการเจริญในสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชีย (crustacea) และซูโอแพลงก์ตอน (zooplankton) โดยกระบวนการไฮโดรไลซิสของไคตินต้องอาศัยการทำงานของไคติเนส 2 ชนิด คือ เอนโดไคติเนส (endochitinase) และ ไคติไบเอส (chitinase) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอีลาสเทส พบว่าสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ในหนู (Strom และ Paranjpye, 2000; Linkous และ Oliver, 1999)

#### 2.3.4.5 การใช้ธาตุเหล็ก (iron utilization)

การเพิ่มระดับธาตุเหล็กในซีรัมเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรค และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรง *V. vulnificus* จะมีกลไกการผลิตซิเดอโรฟออร์ เพื่อนำธาตุเหล็กจากส่วนประกอบของเจ้าบ้านที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ เช่น ทรานสเฟอริน แลคโตเฟอริน ฮีโมโกลบิน เมทเทอโมโกลบิน และ เฮปโตโกลบิน ออกมา แล้วส่งต่อให้เซลล์แบคทีเรีย หากไม่สามารถผลิตซิเดอโรฟออร์ได้จะทำให้ความรุนแรงลดลง *V. vulnificus* สามารถผลิตซิเดอโรฟออร์ได้ 2 ชนิด คือ ฟีนาลเทท หรือ แคททีโคล (phenalate หรือ catechol) และ ไฮโดรซามาเท (hydroxamate) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า *V. vulnificus* จะไม่เจริญในซีรัมของมนุษย์ที่ปราศจากธาตุเหล็ก (Gulig และคณะ, 2005; Strom และ Paranjpye, 2000; Linkous และ Oliver, 1999)

## 2.4 โรคเสี้ยนดำ

โรคเสี้ยนดำเกิดจาก *V. vulnificus* โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะทำให้กุ้งเป็นโรคได้ในบางโอกาสเท่านั้น (Song และคณะ, 1989) และมักพบในการเลี้ยงกุ้งที่มีระบบความเค็มต่ำ หรือการเลี้ยงที่มีระบบความเค็มปกติแต่เป็นช่วงน้ำจืดหรือน้ำฝน (ชลอ ลิมสุวรรณ, 2543) การระบาดของโรคเสี้ยนดำในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกปี พ.ศ.2531 ซึ่งเป็นช่วงที่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเริ่มมีการขยายตัว กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้อาจมีจุดหรือเสี้ยนสีดำหรือสีน้ำตาลที่ตำแหน่งใต้เปลือก โดยเฉพาะบริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกของแต่ละปล้องและแพนหาง จุดหรือเสี้ยนเหล่านี้สามารถแทงทะลุผ่านกล้ามเนื้อกุ้งทั้ง 2 ด้าน หรือด้านเดียวเข้าไปฝังอยู่ภายใน โดยจะมีขนาดแตกต่างกัน หากมีการฝังในกล้ามเนื้อแม้กุ้งจะมีการลอกคราบแล้วเสี้ยนจะยังคงฝังอยู่ภายในกล้ามเนื้อ เมื่อนำกุ้งที่เป็นโรคเสี้ยนดำไปต้มจนสุก ลักษณะจุดหรือเสี้ยนสีดำจะปรากฏเด่นชัด ทำให้เป็นปัญหาต่อการขายภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นจุดหรือเสี้ยนจะเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเนื่องจากมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมาก (ปภาศิริ ศรีโสภณภรณ์, 2538) การเกิดจุดหรือเสี้ยนสีดำเป็นผลมาจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เรียกว่าระบบโพรฟีนอลออกซิเดส

ระบบโพรฟีนอลออกซิเดสเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ที่สำคัญในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มครัสเตเชีย โดยเซลล์เม็ดเลือดชนิดฮีโมแกรนูลาและแกรนูลาเซลล์เป็นแหล่งที่สร้างและเก็บเอนไซม์ในระบบนี้ (Sritunyalucksana และ Söderhäll, 2000) ซึ่งเม็ดเลือดเหล่านี้จะถูกกระตุ้นโดยผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต (Torbjörn และ Söderhäll, 1999) ได้แก่ โลโพลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย และบีตา-1,3-กลูแคน ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ราและยีสต์ ให้เกิดดีแกรนูเลชัน หลังเอนไซม์กระตุ้นโพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activating enzyme; ppA) ได้แก่ เซอรีนโปรติเอส (serine protease) และโพรฟีนอลออกซิเดสออกจากเม็ดแกรนูลา จากนั้นเซอรีนโปรติเอสจะถูกกระตุ้นโดยผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นเซอรีนโปรติเอสที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ซึ่งจะไปเปลี่ยนโพรฟีนอลออกซิเดสให้เป็นฟีนอลออกซิเดส และฟีนอลออกซิเดสจะออกซิไดซ์ฟีนอลให้เปลี่ยนเป็นควิโนน จากนั้นควิโนนจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่เป็นโดพาโครม (dopachrome) เกาะรวมตัวเป็นเม็ดสีดำ (เมลานิน) (Johanson และ Söderhäll, 1989) โดยมีรายงานว่าเม็ดสีดำและควิโนนทำหน้าที่ในการยับยั้งเอนไซม์ของแบคทีเรียและเป็นฟังจิสตาติก (fungistatic) (Sung และคณะ, 1998)

## 2.5 *Vibrio mimicus*

### 2.5.1 ลักษณะของ *V. mimicus*

*V. mimicus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยใช้โพลาร์แฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีเกลือ 0-7% ช่วง pH ประมาณ 6.8-8 และอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญ โดยจะไม่พบ *V. mimicus* ในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10°C (Rodkhum และคณะ, 2001; Chowdhury และคณะ, 1989) แบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะทางชีวเคมีคล้ายกับ *V. cholerae* โดยความแตกต่างระหว่าง 2 สายพันธุ์ ที่สำคัญคือ *V. mimicus* จะไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลซูโครส ทำให้โคโลนีเป็นสีเขียวเมื่อเจริญบนอาหาร TCBS และให้ผลเป็นลบเมื่อทดสอบกับ Voges-Proskauer (Lee และคณะ, 2002) ซึ่งการค้นพบ *V. mimicus* ในช่วงแรกมีการรายงานว่าเป็น *V. cholerae*-lysine-decarboxylase negative หรือ *V. cholerae*-mannitol negative หรือ *V. cholerae*-sucrose negative ต่อมา Davis และคณะ (1981) ได้ทำการวิเคราะห์ DNA hybridization และลักษณะทางกายภาพของ *V. cholerae* พบว่ามี *V. cholerae* ที่มีลักษณะแตกต่างจาก *V. cholerae* กลุ่มอื่นๆ จึงระบุว่า เป็น *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ไม่ปกติ (atypical strains of *V. cholerae*) และภายหลังได้มีการตั้งชื่อใหม่เป็น *V. mimicus* ลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ดังแสดงในตารางที่ 2.4

### 2.5.2 การแพร่กระจาย

สามารถพบ *V. mimicus* ได้จากคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคท้องร่วง และติดเชื้อที่หู นอกจากนี้ยังพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น หอยนางรม กุ้ง แพลงก์ตอนสัตว์ แพลงก์ตอนพืช ปลา ไข่เต่า และแหล่งน้ำกร่อย เป็นต้น (Jermyn และ Boyd, 2005; Vieira และคณะ, 2001; Acuña และคณะ, 1999; Chun และคณะ, 1999; Davis และคณะ, 1981)

### 2.5.3 อาการของโรค

*V. mimicus* จะเข้าสู่มนุษย์โดยการรับประทานอาหารดิบ เช่น หอยนางรม และไข่เต่า ที่ปนเปื้อน แบคทีเรียชนิดนี้จะเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน กล้ามเนื้อเป็นตะคริว กระเพาะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) หูอักเสบ เป็นไข้ และโลหิตเป็นพิษ (hemorrhagic septicemia) ในมนุษย์ (Lee และคณะ, 2002; Kang และคณะ, 1998; Chowdhury และคณะ, 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบ *V. mimicus* ในกุ้งที่ป่วยเป็นโรค และมีการศึกษาการเกิดโรคของ *V. mimicus* ในกุ้งโดยการแช่เชื้อ พบว่ากุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 80% (Oanh และคณะ [online])

ตารางที่ 2.4 ลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* (Rodkhum และคณะ, 2001)

สมบัติ	<i>V. mimicus</i>	<i>V. cholerae</i>
Hemolysis บน blood agar	+	+
โคโลนีบน TCBS	เขียว	เหลือง
การติดสีแกรม	แกรมลบ	แกรมลบ
รูปร่าง	แท่งสั้น	แท่งสั้น
Oxidase	+	+
การเคลื่อนที่	+	+
O/F	F	F
Decarboxylation of :		
Arginine	-	-
Lysine	+	+
Ornithine	d	d
Nitrate Reduction	+	+
Voges-Proskauer	+	+
Growth in :		
0% NaCl (W/V)	+	+
5% NaCl (W/V)	d	d
7% NaCl (W/V)	d	-
10% NaCl (W/V)	-	-
Production of		
Indole	+	+
Urease	-	-
Acid from :		
Salicin	-	-
Lactose	v	-
Arabinose	-	-
Sucrose	-	+

หมายเหตุ + : ผลบวก 85-100%, - : ผลบวก 0-15%, d : ผลบวก 16-84%, v : ไม่คงที่



## 2.5.4 การก่อให้เกิดโรค

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ *V. mimicus* เช่น cholera toxin (CT), *Escherichia coli* heat stable enterotoxin-like toxin, heat-labile hemolysin, heat-stable hemolysin และ cytotoxin นอกจากนี้ *V. mimicus* ยังมีการสร้างโปรตีนที่สัมพันธ์กับการก่อโรคอีกหลายชนิด เช่น ฮีแมกกลูทีนิน เมทัลโลโปรติเอส โปรติเอส ไลเปส และ ฟอสโฟไลเปส

### 2.5.4.1 Cholera toxin (CT)

สามารถผลิต cholera toxin ได้เช่นเดียวกับ *V. cholerae* ซึ่ง cholera toxin เป็นเอนเทอโรทอกซินที่มีสมบัติไม่ทนกรด ไม่ทนความร้อน และเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วง (Lee และคณะ, 2002; Acuña และคณะ, 1999; Miyoshi และคณะ, 1997; Campos และคณะ, 1996)

### 2.5.4.2 ฮีโมไลซิน (hemolysin)

ทำให้เกิดอาการท้องร่วง โดยฮีโมไลซินจะไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยการเกาะและทำให้เกิดรูที่ผนังเซลล์ *V. mimicus* จะผลิตฮีโมไลซิน 2 ชนิด คือ heat-labile hemolysin และ heat-stable hemolysin (Miyoshi และคณะ, 1997)

### 2.5.4.3 ฮีแมกกลูทีนิน (hemagglutinin; HAs)

มีบทบาทสำคัญในการเกาะกับชั้นเยื่อเมือกของผนังลำไส้เล็ก และตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งคาดว่าผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงนี้มีฮอมอโลก (homolog) ของสารเมือกที่เกี่ยวข้องกับการเกาะของ *V. mimicus* แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตฮีแมกกลูทีนิน 3 ชนิด คือ เมทัลโลโปรติเอส, ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (VM-LPSHA) และ outer membrane protein ขนาด 39 กิโลดาลตัน (VM-OMPHA) ฮีแมกกลูทีนินทั้ง 3 ชนิดจะทำงานร่วมกันในการเกาะกับชั้นเยื่อเมือกของผนังลำไส้เล็ก (Alam และคณะ, 1997)

#### 2.5.4.3.1 ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ และ outer membrane protein ขนาด 39 กิโลดาลตัน

*V. mimicus* จะเกาะกับชั้นเยื่อเมือกของผนังลำไส้เล็ก และตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยใช้ VM-LPSHA และ VM-OMPHA ซึ่งจะถูกยับยั้งการทำงานโดยไกลโคโปรตีน เช่น มิวซิน (mucin) ฟีตุอิน (fetuin) และ เอเชียโลฟีตุอิน (asialofetuin) (Alam และคณะ, 1997)

#### 2.5.4.3.2 เมทเทลโลโปรติเอส (metalloprotease)

เป็นเอนไซม์สำคัญในการเพิ่มการซึมผ่านระบบท่อลำเลียง (vascular permeability) ที่ผิวหนัง และเพิ่มการสะสมของเหลวที่ ileal loop ของกระต่าย *V. mimicus* จะผลิตเมทเทลโลโปรติเอส 2 ชนิด คือ 31 กิโลดาลตัน (VMP) และ 61 กิโลดาลตัน (VMC) VMP จะมีแอกติวิตีคล้ายกับฮีแมกกลูทีนิน/โปรติเอส (hemagglutinin/protease; Hap) ของ *V. cholerae* ซึ่ง Hap มี

หน้าที่กระตุ้น cholera toxin และสลายโปรตีนที่สำคัญของเจ้าบ้าน เช่น แลคโตเฟอริน (lactoferrin) ไฟบริโนเนคติน (fibrinectin) และ มิวซิน (mucin) (Lee และคณะ, 2005,2003)

#### 2.5.4.4 ฟอสโฟไลเปส (phospholipase)

จะไปทำลายเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน โดยจะทำให้เกิดกระบวนการไฮโดรลิซิส (hydrolysis) ฟอสโฟไลเปสในผนังเซลล์เจ้าบ้าน (Lee และคณะ, 2002) ฟอสโฟไลเปสมีขนาดโปรตีน 53 กิโลดาลตัน และยีนที่ถอดรหัส คือ *phl* (Kang และคณะ, 1998)

## 2.6 การตรวจวิเคราะห์ *V. vulnificus* และ *V. mimicus*

การตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการแบบดั้งเดิม เป็นการให้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์และจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้เวลาอันยาวนานจึงจะทราบผลการตรวจ และจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ (Sanjuan และ Amaro, 2004; Macian และคณะ, 2000; HØI และคณะ, 1998) ทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบสูง นอกจากนี้ยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง จึงส่งผลให้การศึกษาการระบาดของโรคทำได้ยาก การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางโมเลกุล (Fukushima และ Seki, 2004; Nilsson และคณะ, 2003) เป็นอีกหนทางหนึ่งที่รวดเร็วและมีความไวสูง แต่มีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญ และห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย

## 2.7 โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมา ซึ่งกำเนิดจากบีลิมโฟไซต์เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติเจนเหล่านี้มีสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายยาว (heavy chain) และสายสั้น (light chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติทางชีวภาพของแอนติเจนนั้น

ตามปกติเมื่อมีแอนติเจนแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายจะมีสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายชนิดรวมกัน ซึ่งแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีหลายอีพิโทปจึงสามารถกระตุ้นการตอบสนองของบีลิมโฟไซต์จำนวนมากที่มาตรวจจับแต่ละอีพิโทป เป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดที่ทำหน้าที่ต่างๆ กันปะปนอยู่ในซีรัมเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี แอนติบอดีชนิดนี้จะสามารถชักนำการตอบสนองรูปแบบต่างๆ แต่ความหลากหลายของซีรัมบางครั้งอาจลดประสิทธิภาพ หรือก่อให้เกิดปัญหาในการใช้นอกร่างกาย เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ปนเปื้อน ดังนั้นการใช้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากบีลิมโฟไซต์ 1 เซลล์ ซึ่งมีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวของแอนติเจนจะสามารถแก้ปัญหานี้ได้

## 2.7.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี มี 2 วิธี ได้แก่

### 2.7.1.1 วิธี somatic hybridization

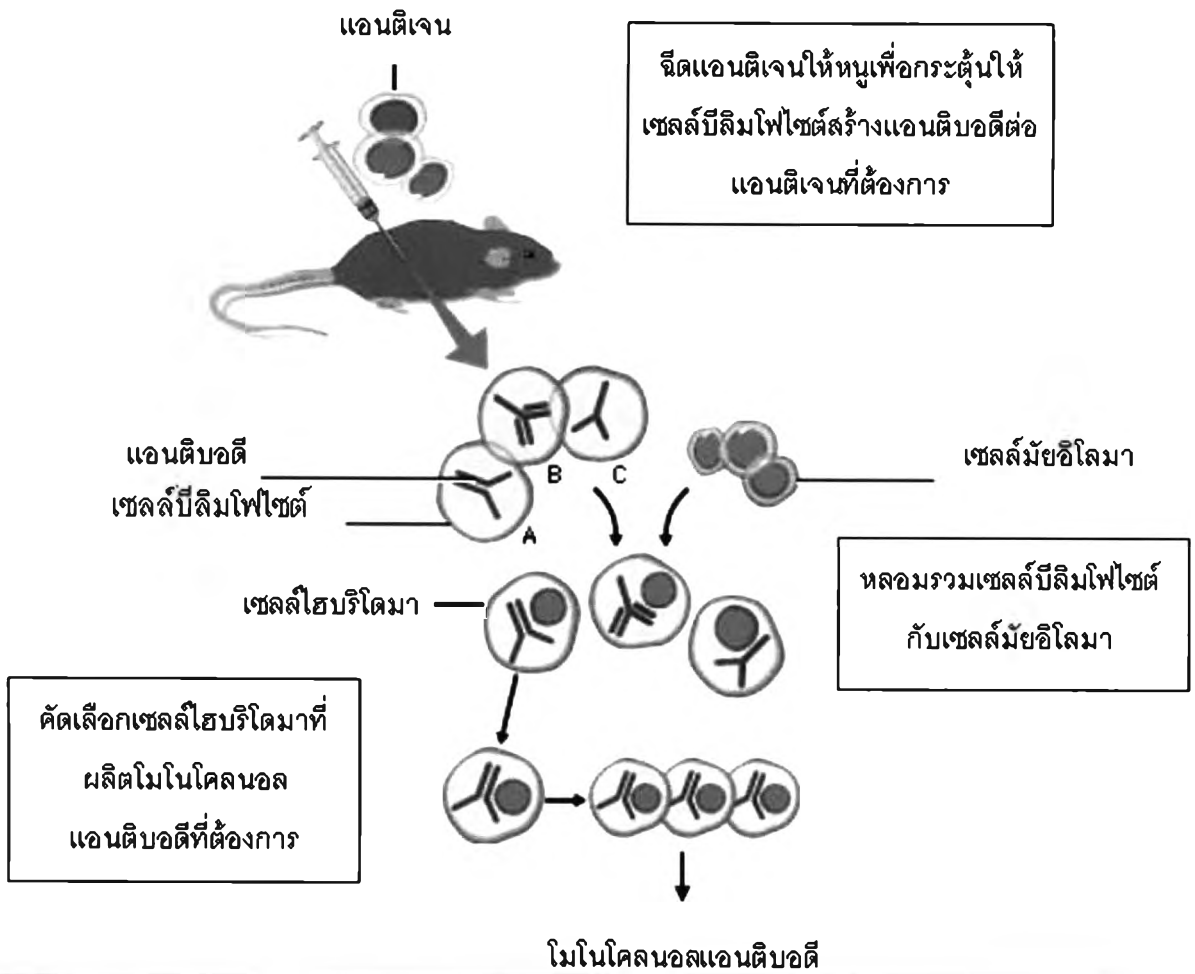
ในปีค.ศ.1975 George Köhler และ Cesar Milestein คิดค้นวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยการเชื่อมเซลล์บีลิมโฟไซต์ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีที่ต้องการเข้ากับเซลล์มะเร็งของเซลล์พลาสมาหรือเซลล์มัยอิโลมา (myeloma cell) ที่มีคุณสมบัติในการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างไม่จำกัด วิธีการนี้ทำให้ได้เซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่มีสมบัติพิเศษของเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 ฝ่าย ทำให้สามารถผลิตแอนติบอดีที่ต้องการได้ในปริมาณมาก (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548; ธารารักษ์ ธารากุล และสิริฤกษ์ ทรงศิริไฉ, 2537)

### 2.7.1.2 วิธีทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetically engineered antibody)

วิธีนี้เป็นการดัดแปลงในระดับยีนทำให้โมเลกุลแอนติบอดีมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามที่ต้องการ (ธารารักษ์ ธารากุล และสิริฤกษ์ ทรงศิริไฉ, 2537)

## 2.7.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

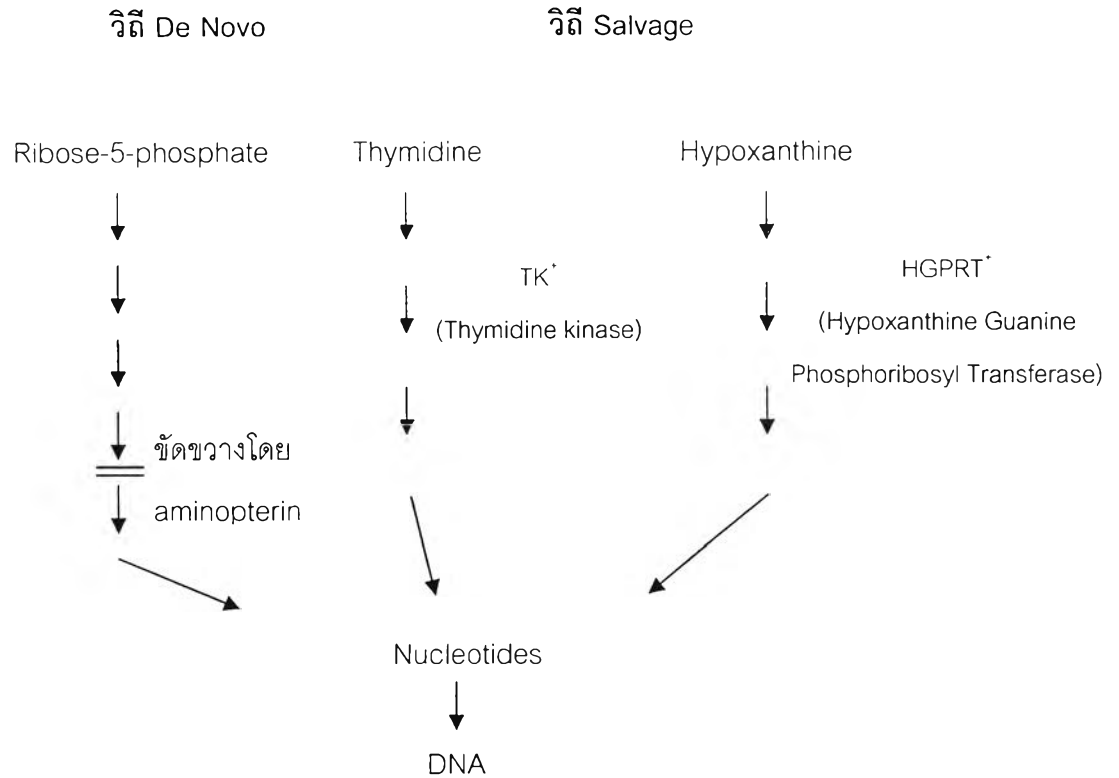
การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาเกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์บีลิมโฟไซต์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการกับเซลล์มัยอิโลมาโดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล ซึ่งในทางปฏิบัติไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมาได้ทั้งหมด แต่จะมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเอง เซลล์ไม่หลอมรวมกัน และเซลล์ไฮบริโดมาปะปนอยู่จำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาสภาพที่คัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้ วิธีที่ใช้อยู่ทั่วไป ได้แก่ การใช้เซลล์มัยอิโลมาที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ HGPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase) ที่เกี่ยวกับแนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ทำให้หลังจากที่หลอมรวมเซลล์มัยอิโลมาดังกล่าวกับเซลล์บีลิมโฟไซต์แล้ว เซลล์มัยอิโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวมจึงถูกกำจัดไปได้ด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT medium ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine โดย aminopterin จะยับยั้งวิถี de novo ของการสร้างนิวคลีโอไทด์ ส่วนเซลล์บีลิมโฟไซต์จะมีชีวิตรอดเพียงระยะสั้นๆ และจะตายเอง ดังนั้นจึงมีเพียงเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่จะสามารถเจริญเติบโตได้ใน HAT medium โดยใช้วิถี salvage ซึ่งอาศัย hypoxanthine และ thymidine จาก HAT medium และอาศัยเอนไซม์ HGPRT จากยีนปกติของเซลล์บีลิมโฟไซต์ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) (รูปที่ 2.2 และ 2.3)



รูปที่ 2.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

(ดัดแปลงจาก <http://images.encarta.msn.com/xrefmedia/aencmed/targets/illus/ilt/T059309A.gif>)





รูปที่ 2.3 แนวทางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และการยับยั้งของ aminopterin ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในวิถี de novo (Abbas และคณะ, 1991)

2.7.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

สามารถคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาได้หลายวิธี เช่น ELISA และ Western blot เป็นต้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการแล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้นมีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียวจริง และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ปริมาณที่ต้องการ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.7.4 ประโยชน์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ ทั้งในแง่การ การตรวจ และการรักษาโรคต่างๆ เช่น การวัดปริมาณยาต่างๆ ในเลือด การวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรค จากจุลินทรีย์ การตรวจแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกัน ความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และการตรวจแอนติเจน ของเซลล์มะเร็งบางชนิด เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการวิจัย เนื่องจาก โมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียว ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน ดังนั้นจึงนำไปใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ ตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล

เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เช่น การตรวจหาตำแหน่งของ *V. harveyi* ในเนื้อเยื่อ กุ้งกุลาดำที่ติดโรคด้วยวิธี Immunohistochemistry (Phianphak และคณะ, 2005) เป็นต้น

Simonson และ Siebeling (1988) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนแกนของ แฟลกเจลลา (H) ของ *V. cholerae* และ *V. vulnificus* โดยใช้เทคนิค ELISA ในการวิเคราะห์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนแกนของแฟลกเจลลา (H) ของ *V. cholerae* ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 12 โคลน คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแกนของ แฟลกเจลลาของ *V. cholerae* และ *V. mimicus* 4 โคลน และที่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุล วิบริโอชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ 8 โคลน การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนแกนของ แฟลกเจลลา (H) ของ *V. vulnificus* ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 โคลน ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่เป็น IgG2 และ IgG3 มี IgM เพียง 2 โคลน ผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแกนของ แฟลกเจลลาของ *V. cholerae*, *V. mimicus* และ *V. vulnificus* ไปทดสอบกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่ แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม พบว่าระบุเป็น *V. cholerae* และ *V. mimicus* 47 ตัวอย่าง จาก 103 ตัวอย่าง และระบุเป็น *V. vulnificus* 20 ตัวอย่าง จาก 31 ตัวอย่าง

Martin และ Siebeling (1991) ศึกษาการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. vulnificus* โดย ปลูกภูมิคุ้มกันในระยะตายด้วย heat-killed whole cell พบว่าแสดงปฏิกิริยาข้ามกับสายพันธุ์อื่น และ ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไลโปพอลิแซ็กคาไรด์โดยนำม้ามของหนู BALB/c ที่ปลูก ภูมิคุ้มกันด้วย formalin-killed cell มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมา SP2/O-Ag14 และคัดเลือกเซลล์ ไฮบริโดมาโดยใช้การวิเคราะห์ ELISA ของไลโปพอลิแซ็กคาไรด์และ whole cell พบว่าได้โมโน โคลนอลแอนติบอดีที่ใช้สามารถจำแนก serovar ของไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ของ *V. vulnificus* ออกเป็น 5 serovar *V. damsela* และ *V. hollisae* อย่างละ 1 serovar ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นนี้ ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามระหว่าง *V. vulnificus* และ *V. damsela* หรือ *V. hollisae*

Tamplin และคณะ (1991) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. vulnificus* โดยนำม้ามของหนู BALB/c ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย formalin-killed cell มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมา SP2/O และ คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยเทคนิค ELISA โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้คือ FBRT37 และเมื่อนำมาใช้จำแนก *V. vulnificus* ที่แยกได้จากน้ำทะเล ตะกอน และหอยนางรม โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่ามีความถูกต้องสูงถึง 99.7% เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี และระดับต่ำ ที่สุดที่สามารถตรวจสอบโดยเทคนิค ELISA คือ ประมาณ  $2 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม

Chen และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*) ที่ก่อโรคในมนุษย์ ปลา และหอย โดยใช้เทคนิค ELISA ในการคัดเลือก พบว่าได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1

จำเพาะต่อสายพันธุ์เดียวกันนั้น กลุ่มที่ 2 แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุล vibrio ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง *V. alginolyticus* กับ *V. parahaemolyticus* 22 โคลน และที่จำเพาะกับแฟลกเจลลา H ขนาด 52 กิโลดาลตัน ของ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* 6 โคลน กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุล vibrio ทุกชนิด แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น ซึ่งกลุ่มสุดท้ายนี้ไว้ใช้จำแนกแบคทีเรียสกุล vibrio จากแบคทีเรียชนิดอื่น นอกจากนี้ยังสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้จำแนกแบคทีเรียได้ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบมีชีวิต รูปแบบ formalin-fixed และ รูปแบบ sodium azide-killed

Parker และ Levis (1995) ศึกษาการผลิต anti-*V. vulnificus* hemolysin โดยปลุกภูมิคุ้มกัน ในกระต่ายและแพะ จากนั้นนำ anti-*V. vulnificus* hemolysin ที่ผลิตได้มาใช้ตรวจสอบ *V. vulnificus* ในตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อม (หอยนางรม ตะกอน และน้ำทะเล) ด้วยเทคนิค sandwich ELISA พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบโคโลนีของ *V. vulnificus* ได้ถูกต้อง 95% จากประมาณ 340 ตัวอย่าง ที่สันนิษฐานว่าเป็นโคโลนีของ *V. vulnificus* และเทคนิคนี้ให้ผลลบแม่นยำ 99% เมื่อทดสอบกับโคโลนีที่ไม่ใช่ *V. vulnificus*

Wright และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ capsular polysaccharide (CPS) ของ *V. vulnificus* สายพันธุ์ M06-24/O แล้วนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ (7/G4-D2) มาใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของ CPS เปรียบเทียบกับ *V. vulnificus* สายพันธุ์ CVD752 (เป็น acapsular transposon mutant ของสายพันธุ์ M06-24/T ซึ่งไม่สามารถสร้าง CPS ได้) M06-24/T (เป็น spontaneous translucent phase variant ที่มีการสร้าง CPS ลดลง) และ M06-24/31T (เป็นสายพันธุ์ที่สร้าง CPS ได้แต่ไม่มีการแสดงออกของแคปซูลที่ผิวของเซลล์) ด้วยวิธี ELISA, flow cytometry (FC) และ immunoelectron microscopy พบว่าสายพันธุ์ M06-24/O ให้ผลดีที่สุด จากนั้นผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7/G4-D2 มาใช้ในการศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของ CPS โดยการวิเคราะห์ FC พบว่า *V. vulnificus* มีการแสดงออกของ CPS ได้ดีที่สุดในการเจริญช่วง log phase และลดลงในช่วง stationary phase นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะแวดล้อมมีผลกระทบต่อแสดงออกของ CPS โดยที่อุณหภูมิ 30°C จะแสดงออกได้ดีกว่าที่ 37°C

Jung และคณะ (2001) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* โดยปลุกภูมิคุ้มกันในหนูด้วย heat-killed ของ *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* ได้ 5 โคลนที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ตำแหน่ง dye front, 18 และ 22 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุล vibrio 5 สายพันธุ์ บางโคลนสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* กับ *Photobacterium damsela* ssp.

*damselae* ด้วยวิธี ELISA และใช้ตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) ด้วยวิธี Immunohistochemistry

Phianphak และคณะ (2005) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* โดยปลูก ภูมิคุ้มกันในหนูด้วย heat-killed และ SDS-mercaptoethanol treated ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 15 โคลน ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีขนาดตั้งแต่ 8-49 กิโลดาลตัน แบ่งเป็น 6 กลุ่ม โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลไวรัสและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ ยกเว้น VH39-4E ที่แสดงปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับ *Aeromonas hydrophila* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Immunodot blot พบว่าความเข้มข้นของ *V. harveyi* ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางโคลนสามารถตรวจสอบได้คือ  $10^4$  CFU/ml นอกจากนี้ยังสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 กลุ่ม ที่ผลิตได้มาใช้ในการระบุตำแหน่งของ *V. harveyi* ในเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดโรคเรืองแสงด้วยวิธี Immunohistochemistry