**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การดื้อยาของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

# Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Isolated from Seawater in Bang Sean Beach Area, Chonburi Province

**หัวหน้าโครงการวิจัย**
**ดร. กุลวรา พูลผล**
**คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

**โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้**
**จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)**
**ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑**
**มหาวิทยาลัยบูรพา**

**รหัสโครงการ 1604 อ้างอิง 694218**
**รหัส 256108A1080027**
**สัญญาเลขที่ 196/2561**

**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การดื้อยาของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

# Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Isolated from Seawater in Bang Sean Beach Area, Chonburi Province

**หัวหน้าโครงการวิจัย**
**ดร. กุลวรา พูลผล**
**คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

**1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561**

# ส่วน ก

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลืออย่างดีจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 196/2561

ดร. กุลวรา พูลผล
หัวหน้าโครงการวิจัย

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร. กุลวรา พูลผล ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย) การดื้อยาของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

(ภาษาอังกฤษ) Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Isolated from Seawater in Bang Sean Beach Area, Chonburi Province

รหัสโครงการ 1604 อ้างอิง 694218 รหัส 256108A1080027 สัญญาเลขที่ 196/2561 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 370,000 บาท (สามแสนเจ็ดหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้ ได้แก่ ใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ Vibrio spp. ที่ก่อโรคได้ที่พบในน้ำทะเลในประเทศไทย ใช้ประเมินความเสี่ยงในการติดเชื้อ Vibrio spp. จากน้ำทะเลในประเทศไทย นำข้อมูลการพบการดื้อยา ไปใช้ในการวางแผนในการเฝ้าระวัง การป้องกัน การเกิดโรค รวมทั้งเพื่อป้องกันปัญหาที่อาจส่งผลกระทบในด้านการค้าขายและการส่งออกสัตว์ทะเลที่ใช้รับประทาน สามารถเผยแพร่ข้อมูลความเสี่ยงและแนะนำความรู้ที่ถูกต้องแก่ประชาชนในการป้องกันตนเองจากการติดเชื้อได้ และสามารถเผยแพร่ตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ เพื่อเป็นประโยชน์แก่นักวิจัยและประชาชนทั่วไป

## บทคัดย่อ

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้ในทะเล สามารถก่อให้เกิดโรคการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร การติดเชื้อที่บาดแผล และการติดเชื้อในกระแสเลือด สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในสัตว์ทะเล ดินโคลนทะเล ในทั่วโลก การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ การติดเชื้อที่บาดแผลเกิดจากการลงไปเล่นน้ำทะเลและมีบาดแผล ชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี เป็นสถานที่ที่มีนักท่องเที่ยวมาเป็นจำนวนมากเนื่องจากใกล้กรุงเทพฯ ในงานวิจัยนี้สนใจความรุนแรงของเชื้อที่จะก่อให้เกิดการติดเชื้อจาก *Vibrio parahaemolyticus* ในหาดบางแสนซึ่งอยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งความรุนแรงของเชื้อนี้อาจจะมีผลต่อการท่องเที่ยวและสาธารณสุข งานวิจัยได้เก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากตำแหน่งต่างๆ บริเวณหาดบางแสนเป็นเวลา 9 เดือน ซึ่งเป็นช่วงที่มีนักท่องเที่ยวเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างน้ำทะเลถูกนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อและจำแนกชนิดโดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี การตรวจหา *toxR* gene เพื่อยืนยันการพิสูจน์เชื้อ ผลการทดลองพบว่ามี 53 สายพันธุ์ที่แยกได้เป็น *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งพบมากที่สุดในเดือนมิถุนายนและกรกฎาคม การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค *tdh* gene และ *trh* gene พบว่ามี 20 สายพันธุ์ที่มียีนดังกล่าว ผลการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยา Ampicillin

## Abstract

*Vibrio parahaemolyticus* is a marine pathogenic bacterium which causes gastrointestinal infection, wound infection and bacteremia. The bacterium can be found in marine animals as well as in sediment and coastal water worldwide. Gastroenteritis from *V. parahaemolyticus* is resulted from consumption of contaminated seafood while the skin infection is resulted from swimming with open wound in the sea. Bangsaen beach, Chonburi, is a famous beach and a nearest beach from Bangkok, Thailand. In this study, we concerned virulence of *V. parahaemolyticus* infection from Bangsaen beach which located in eastern seaboard of Thailand that may affect on public health and tourism. Seawater samples were collected from different positions along to Bangsaen beach for 9 months during January to September 2018 which is high season of tourism. The samples were enriched, cultivated and then the colonies were selected for biochemical testing. Amplification DNA with specific-primer *toxR* gene was detected to confirm of *V. parahaemolyticus*. Based on those procedures, 53 isolates were recovered and mostly found in June and July. Investigation of virulence properties concerning to *tdh* gene and *trh* gene showed that 20 isolates containing *tdh* gene while no *trh* gene was found. The antimicrobial resistance profiles of the *V. parahaemolyticus* isolates revealed that most of the *V. parahaemolyticus* strains were resistant to ampicillin.

# สารบัญเรื่อง (Table of Contents)


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | 2 |
| Abstract (ไทย) | 4 |
| Abstract (English | 5 |
| บทนำ | 11 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 16 |
| ผลการศึกษาวิจัย | 20 |
| วิจารณ์ผลการทดลอง | 26 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 27 |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | 34 |

# สารบัญตาราง (List of tables)

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ primer toxR 18

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR Thermal Cycle สำหรับ primer toxR 18

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง PCR สำหรับ Primer trh 19

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ 53 สายพันธุ์ 21

ตารางที่ 5 แสดงจำนวน V. parahaemolyticus ที่พบในเดือนมกราคมถึงกันยายน 2562 23

# สารบัญภาพ (List of illustrations)

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลในบริเวณชายหาดบางแสน จ. ชลบุรี 20

ภาพที่ 2 แสดงผลการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR Primer toxR บน 1.5% agarose gel 23

ภาพที่ 3 แสดงผล PCR product ใน 1.5% agarose gel ของเชื้อที่ทดสอบหา tdh gene ด้วยวิธี PCR 24

ภาพที่ 4 แสดงผล PCR product ใน 1.5% agarose gel ของเชื้อที่ทดสอบหา tdh gene ด้วยวิธี PCR 24

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

| | |
|---|---|
| g | Gram |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litre |
| ml | Milliliter |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PBS- T | Phosphate buffered saline with Tween |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| pH | Potential of Hydrogen ion |
| V | Volt |
| µl | Microliter |

# ส่วน ข

# บทนำ

## 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อดื้อยานับว่าเป็นปัญหาสำคัญในทางการแพทย์ เนื่องจากทำให้รักษายาก ผู้ป่วยจึงมีอัตราการตายที่สูง ในปัจจุบันมีอุบัติการณ์เกิดแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายสปีชีร์ด้วยกันรวมถึง *Vibrio* species ด้วย (1)

*Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่สำคัญชนิดหนึ่งทำให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขในหลายประเทศที่กำลังพัฒนาและที่พัฒนาแล้ว (2) *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบและจัดเป็น marine bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลในเขตอบอุ่นทั่วโลก รวมถึงมีการปนเปื้อนในอาหารทะเลอีกด้วย *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* สามารถก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อเข้าไป นอกจากนี้ยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่บาดแผลได้จากการมีบาดแผลและไปเล่นน้ำทะเลที่มีเชื้อปนเปื้อน (3, 4) ซึ่งยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้และมีอัตราการตายสูง (5) ถึงประมาณ 40 ราย ต่อปี ในบางประเทศ (6) นอกจากนี้ยังเคยมีการรายงานการระบาดของเชื้อดังกล่าวในทวีปยุโรปและเอเชียอีกด้วย (2-4, 7)

ปัจจัยในการก่อให้เกิดโรคที่สำคัญของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ ได้แก่ hemolysin ซึ่งเป็น pore-forming toxin (8) และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับ hemolytic, cytotoxic และ enterotoxic activities (9) ยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง (virulence genes) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ thermostable direct hemolysin (TDH) gene และ TDH-related hemolysin (TRH) gene สำหรับของเชื้อ *V. vulnificus* ได้แก่ *V. vulnificus* hemolysin (VVH) gene สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจะพบได้น้อย (10) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีรายงานการพบ virulence genes ดังกล่าวนี้เพิ่มมากขึ้นในเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (11-18) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพบเชื้อสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงอยู่ในสิ่งแวดล้อมมากขึ้นและส่งผลถึงความเสี่ยงในการติดเชื้อมากขึ้น

การรักษาการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในปัจจุบัน หากเป็นการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ไม่จำเป็นต้องรักษาด้วยยาต้านแบคทีเรีย แต่หากเป็นการติดเชื้อที่บาดแผลและการติดเชื้อในกระแสเลือด มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับการรักษาด้วยยาต้านแบคทีเรีย โดยปกติแล้ว *Vibrio* spp. มีความไวต่อยาต้านแบคทีเรียหลายชนิดด้วยกัน แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการพบอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาในหลายประเทศ (19) อีกทั้งเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยยังมีรูปแบบการดื้อยาที่คล้ายกันอีกด้วย โดยเชื้อมีการดื้อต่อยา ampicillin, penicillin และ tetracycline (1) อีกทั้งยังมีอีกรายงานพบการดื้อยาหลายชนิด (multi-drug resistance) ของ *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากน้ำทะเลอีกด้วย (20) ทั้งนี้มีการสันนิษฐานว่าการดื้อยาของ *Vibrio* spp. ดังกล่าวอาจเกิดจากมนุษย์มีการใช้ยาต้านแบคทีเรียมากขึ้น ทั้งในการรักษาโรคของมนุษย์เอง การใช้ยาต้านแบคทีเรียในระบบการเกษตรเพื่อป้องกันหรือกำจัดโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อได้ (1) นอกจากนี้แล้ว พลาสมิด (plasmid) ของแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา ก็ทำให้การดื้อยาสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียเซลล์อื่นได้อย่างรวดเร็ว

จังหวัดชลบุรี มีพื้นบางส่วนติดกับทะเล ทำให้เป็นแหล่งท่องเที่ยวทางทะเลสำหรับการเล่นน้ำและรับประทานอาหารทะเล อีกทั้งยังมีแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล รวมถึงเป็นแหล่งในการจับสัตว์ทะเลมาเพื่อการค้าขายและบริโภค มีรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมดิบที่ขายในจังหวัดชลบุรี สูงถึงร้อยละ 91 และ 22 ตามลำดับ (17) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ *V. parahaemolyticus* จากกุ้งในประเทศไทยซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา

หากมนุษย์ได้รับการติดเชื้อจากสายพันธุ์ที่ดื้อยาอาจทำให้เกิดความรุนแรงของโรคมากขึ้น รวมทั้งยากต่อการรักษา ส่งผลให้มีอัตราการตายสูงขึ้น นอกจากนี้แล้วเชื้อสามารถปนเปื้อนในสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นอาหารและส่งผลต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ การส่งสินค้าออกนอกประเทศได้ ดังนั้นการทราบอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในน้ำทะเล จึงมีความสำคัญในการเฝ้าระวัง การป้องกันการเกิดโรคที่รักษาได้ยาก อีกทั้งยังทราบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของวิวัฒนาการของแบคทีเรีย และความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่ดื้อยามายังมนุษย์

**2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

2.1 เพื่อหาอุบัติการณ์การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำทะเล บริเวณหาดบางแสน จ.ชลบุรี

2.2 เพื่อตรวจหาอัตราการพบ virulence genes ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำทะเล บริเวณหาดบางแสน จ.ชลบุรี

2.3 เพื่อตรวจหาอุบัติการณ์การดื้อยาของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำทะเล บริเวณหาดบางแสน จ.ชลบุรี

2.4 เพื่อตรวจหายีนดื้อยาของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำทะเล บริเวณหาดบางแสน จ.ชลบุรี

**3. ขอบเขตของโครงการวิจัย**

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี อย่างน้อย 10 บริเวณ ทุกเดือน เป็นเวลา 1 ปี ตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงและพิสูจน์เชื้อโดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เชื้อที่แยกได้จะนำไปตรวจสอบ species-specific gene และ virulence genes ด้วยวิธี polymerase chain reaction และตรวจหาการดื้อยาของเชื้อที่แสดงออกทางฟีโนทัยป์ ด้วยวิธี disc agar diffusion, broth microdilution assay และทางจีโนทัยป์ด้วยการตรวจหายีนดื้อยา (antibiotic resistance genes) ในเชื้อดังกล่าว

**4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย**

ปัจจุบันมีการพบเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ดื้อยายาปฏิชีวนะสูง ซึ่งมีทั้งสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อม การศึกษาอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาโดยศึกษาเชื้อจากในน้ำทะเลจะทำให้ประเมินความเสี่ยงในการติดเชื้อ ทั้งจากการบริโภคอาหารทะเลและการเล่นน้ำทะเล

**5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ Vibrio spp. ที่ก่อโรคได้ที่พบในน้ำทะเลในประเทศไทย
2. ใช้ประเมินความเสี่ยงในการติดเชื้อ Vibrio spp. จากน้ำทะเล ในประเทศไทย
3. นำข้อมูลการพบการดื้อยา ไปใช้ในการวางแผนในการเฝ้าระวัง การป้องกัน การเกิดโรค รวมทั้งเพื่อป้องกันปัญหาที่อาจส่งผลกระทบในด้านการค้าขายและการส่งออกสัตว์ทะเลที่ใช้รับประทาน
4. สามารถเผยแพร่ข้อมูลความเสี่ยงและแนะนำความรู้ที่ถูกต้องแก่ประชาชนในการป้องกันตนเอง

จากการติดเชื้อได้

5. เผยแพร่ตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ เพื่อเป็นประโยชน์แก่นักวิจัยและประชาชนทั่วไป

4. **การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง**

แบคทีเรียในจีนัส Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนโค้งเล็กน้อย มีแฟลกเจลลาซึ่งใช้ในการเคลื่อนที่ และชอบความเค็ม ดังนั้นจึงมักพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำทะเล น้ำกร่อย รวมถึงในอาหารทะเล สปีชีร์ที่พบก่อโรคในมนุษย์ ที่สำคัญ ได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, และ *Vibrio alginolyticus* เป็นต้น เชื้อในกลุ่ม Vibrio ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะ *V. cholerae* ทำให้เกิดอหิวาตกโรคซึ่งมีความรุนแรงมาก แต่อย่างไรก็ตามมักจะพบเชื้อชนิดนี้ ในช่วงที่มีการระบาด หรือหากพบก็จะเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความรุนแรงมากนัก นอกจากนี้เชื้อ *V. cholerae* ยังสามารถพบได้ในแหล่งน้ำที่ไม่ต้องมีความเค็มและอาหารทั่วไปได้ เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เป็นเชื้อที่พบในน้ำทะเลและปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเล มีรายงานการติดเชื้อสองสปีชร์นี้ได้ในทั่วโลกจากการรับประทานอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไปและโดยการได้รับเชื้อทางบาดแผลจากการลงเล่นน้ำทะเล การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในน้ำทะเลเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้มีการการเปลี่ยนแปลงอัตราการพบเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ ทำให้อัตราการพบเชื้อแตกต่างกันไปตามระยะเวลาและอุณหภูมิ (21)

**1. ลักษณะทั่วไปของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus***

เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี NaCl ถึง 8% ดังนั้นจึงพบในน้ำทะเลได้ แบคทีเรียชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางบาดแผลและการติดเชื้อในกระแสเลือด สายพันธุ์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่จะมีการสร้าง Thermostable direct hemolysin (TDH) และ TDH-related haemolysin (TRH) ซึ่งเป็นปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ

*V. vulnificus* ชอบความเค็มค่อนข้างสูง สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี NaCl ถึง 6% แบคทีเรียชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้ แต่มักพบก่อให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผลและการติดเชื้อในกระแสเลือด สายพันธุ์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่จะมีการสร้าง hemolysin ซึ่งเป็นปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ

**2. ปัจจัยในการก่อโรค (virulence factors) ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus***

มีปัจจัยในการก่อโรคหลายชนิดที่มีบทบาทในการเกิดโรคติดเชื้อจาก *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เช่น แคปซูล เอนไซม์ชนิดต่างๆ exotoxin ความสามารถในการเกาะติดกับ host cells และที่สำคัญคือคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis activity) ซึ่งมาจากที่เชื้อมี Thermostable direct hemolysin (TDH) และ TDH-related haemolysin (TRH) เป็น toxin ที่ถูกถอดรหัสมาจาก *tdh* และ *trh* genes ตามลำดับ ยีนทั้งสองชนิดนี้มี amiono acids ที่คล้ายกัน 67% อีกทั้งโปรตีนที่ถูกถอดรหัสมาก็มีหน้าที่คล้ายกัน TDH และ TRH เป็น toxins ที่จะฝังตัวอยู่ใน cell membrane ของ host ทำหน้าเป็น porins การฝังตังของ toxins ดังกล่าวนี้ทำให้เกิดการผลักสารออกนอกเซลล์ (nonspecific efflux) ของ divalent cations และ influx ของน้ำ ลักษณะเช่นนี้สามารถตรวจได้โดยการดูลักษณะของการเกิด β-type hemolysis หรือที่เรียกว่า Kanagawa phenomenon ซึ่ง hemolysin genes ดังกล่าวนี้ได้ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความรุนแรงของเชื้อ และส่วนใหญ่ถูกพบในสายพันธุ์ที่ก่อโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย ขณะที่สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจะพบ

ได้น้อย (10) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบ virulence genes ดังกล่าวนี้เพิ่มมากขึ้นในเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (11-18) สำหรับเชื้อ *V. vulnificus* จะมี *V. vulnificus* hemolysin (VVH) ซึ่งถูกถอดรหัสมาจาก *vvhA* gene (22)

**3. การเกิดโรค**

การติดเชื้อในกลุ่ม Vibrio ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร การติดเชื้อทางบาดแผล และการติดเชื้อในกระแสเลือด ได้ถึง 51%, 24% และ 17% ตามลำดับ โดยมีอัตราการตายจากโรคดังกล่าวเป็น 1%, 5% และ 44% ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วพบว่า 91% ของผู้ที่ติดเชื้อในกระแสเลือด และ 86% ของผู้ที่ติดเชื้อที่บาดแผลเกิดในช่วงฤดูร้อนซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดเนื่องจากอุณหภูมิในน้ำทะเลอุ่นขึ้น (23)

**4. อุบัติการณ์การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus***

มีรายงานการพบเชื้อ *Vibrio* spp. ในหลายประเทศทั่วโลก ทั้งจากผู้ป่วย อาหารทะเลสด น้ำทะเล และดินตะกอน สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อคือ ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 20 °C และยังมักพบในน้ำที่ไม่ค่อยสะอาด (24) อย่างไรก็ตามก็ยังพบการระบาดของ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลในประเทศแถบเมดิเตอเรเนียนซึ่งมีระบบสาธารณสุขที่ดี (14)

ในน้ำทะเลในบางเขต เช่น ในแถบแปซิฟิค แคนาดา และ แอตแลนติกเหนือ จะพบเชื้อได้ต่ำ เนื่องจากน้ำมีอุณหภูมิฉลี่ยทั้งปีต่ำ ขณะที่ในบางบริเวณ เช่น แอตแลนติกกลาง อ่าวเม็กซิโก ซึ่งมีอุณหภูมิในน้ำทะเลเฉลี่ยสูงทั้งปี จะพบเชื้อได้มากกกว่า (25)

ในประเทศสหรัฐอเมริกามีรายงานการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลที่บริเวณ Great Bay และ *V. parahaemolyticus* ที่ Alaska, Long Island และ New York (26) พบอุบัติการณ์ของ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลบริเวณอ่าว Trieste (north Adriatic sea) (15), Kii channel ประเทศญี่ปุ่น (18) นอกจากนี้อุบัติการณ์การพบเชื้อ *V. vulnificus* ในน้ำทะเลที่เกาะเจจูซึ่งสัมพันธ์กับการพบการติดเชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วย ในปี 2010 และ 2011 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นในน้ำทะเลจะส่งผลให้เชื้อเจริญได้ดีน้ำทะเลและเป็นแหล่งเจริญเติบโตของเชื้อ (27) และมีรายงานการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหารทะเล น้ำทะเล จากอ่าวแถบเมดิเตอเรเนียน (14) พบเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหารทะเลและน้ำทะเลแถบประเทศมาเลเซีย (12) สำหรับในประเทศไทย ยังไม่มีการตรวจหาเชื้อจากน้ำทะเลมากนัก ส่วนใหญ่จะเน้นในการตรวจหาเชื้อจากอาหารทะเล แต่จากการตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมที่ขายในจังหวัดชลบุรี ในปี 2010 – 2011 ก็พบ *V. parahaemolyticus* ในอัตราที่สูงถึงร้อยละ 91 และ *V. vulnificus* ร้อยละ 22 (17)

**5. การตรวจหาเชื้อ**

เชื้อในกลุ่ม Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดง รูปร่างท่อนโค้ง (Gram-negative curved rods) และชอบอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (halophile) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ เชื้อ *Vibrio* spp. เจริญได้ใน blood agar และทำให้เกิดการแตกสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (beta-hemolysis) เช่น *V. cholerae* แต่บางชนิดก็ทำให้เกิดการแตกสลายเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ (alpha-hemolysis) เช่น *V. vulnificus* การเจริญบนอาหาร MacConkey agar จะให้โคโลนีที่ไม่มีสี เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose ได้

การเพาะเลี้ยงเชื้อ

การแยกเชื้อในกลุ่ม Vibrio จากตัวอย่างที่เป็นอาหารหรือน้ำหรือตะกอนดินทะเล ทำโดยนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาเชื้อมาทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment) ใน alkaline peptone water ก่อน จากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar ซึ่งเป็น selective medium ของเชื้อกลุ่ม Vibrio โดยเชื้อกลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาล sucrose ได้จะมีโคโลนีสีเหลือง ได้แก่ *V. cholerae* ส่วนเชื้อกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล sucrose ได้จะมีโคโลนีสีเขียว ได้แก่ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เป็นต้น (6) โดยปกติแล้วเชื้อในกลุ่ม Vibrio จะไม่สร้าง $H_2S$ ดังนั้นเชื้อที่สามารถเจริญขึ้นได้บน TCBS agar และไม่พบการสร้าง $H_2S$ จึงถือว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม Vibrio หากมีแบคทีเรียที่เจริญขึ้นได้บนอาหารนี้และพบการสร้าง $H_2S$ ได้ โดยจะพบเป็นโคโลนีขนาดเล็กสีดำ ซึ่งจะจัดว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มอื่น

การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical tests)

การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญในการจำแนกเชื้อกลุ่ม Vibrio ได้แก่ การทดสอบ oxidase test, การทดสอบใน triple sugar iron (TSI) agar, การทดสอบ Lysine decarboxylase, การทดสอบการเจริญในอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้นต่างๆ (salt requirement) เป็นต้น

การตรวจหาด้วยวิธี PCR

สามารถตรวจหา species-specific gene ของเชื้อกลุ่ม Vibrio ได้ โดยตรวจหา *toxR* gene ด้วยวิธี PCR

**6. การตรวจหา virulence genes**

การตรวจหา virulence genes ในเชื้อที่แยกได้จะทำให้ทราบถึงความรุนแรงของเชื้อสายพันธุ์นั้นๆ ว่ามีโอกาสก่อโรคได้มากน้อยเพียงใด virulence genes ที่สำคัญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ *tlh, tdh, trh* genes เป็นต้น และสำหรับในเชื้อ *V. vulnificus* มี virulence gene ที่สำคัญได้แก่ *vvhA* gene (5, 22) วิธีการตรวจยีน ดังกล่าว ที่นิยมกัน ได้แก่ วิธี polymerase chain reaction (PCR), DNA hybridization และ real-time PCR เป็นต้น

**7. การรักษา**

โดยปกติรักษาการติดเชื้อกลุ่ม Vibrio ที่เกิดโรคทางผิวหนังและการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยการใช้ยา Tetracycline หรืออาจใช้ expanded-spectrum cephalosporins เช่น ceftazidime ร่วมกับ doxycycline หรือเป็นการใช้ยาในกลุ่ม fluoroquinolone การรักษาในเด็กอาจใช้ Trimethoprim-sulfamethoxazole ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycoside

การใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางทะเลอาจเป็นสาเหตุในการทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา (antibiotic resistant genes) ของ *Vibrio* spp. ได้แก่ β-lactam และ penicillin resistant genes (penA and blaTEM-1), chloramphenicol resistant genes (catI, catII, catIII, catIV, and floR), tetracycline resistant genes (tatA, tatB, tatC, tatD, tatE, tatG, tatH, tatJ, tatY, tatZ) เป็นต้น antibiotic resistant genes สามารถถ่ายทอดจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้โดยการ conjugation, transduction, transformation เป็นต้น และพลาสมิด (Plasmids) ก็เป็นตัวกลางที่สำคัญที่ทำให้เกิดการถ่ายทอด antibiotic resistant genes ได้

# วิธีดำเนินการวิจัย

**1. การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล**

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลทะเลบริเวณชายหาดบางแสนตั้งแต่ 13°17’00”N 100°54’53”E ถึง 13°17’36”N 100°54’23”E จำนวน 10 จุด ห่างกันจุดละ 100-200 เมตร ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อ ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยเก็บน้ำที่ลึกไม่เกิน 50 เซนติเมตร วัดอุณหภูมิของน้ำทะเลโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ และวัด pH โดยกระดาษวัด pH และนำไปทำการทดสอบภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม - กันยายน 2562

**2 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus***

นำตัวอย่างน้ำทะเลที่ทำการสุ่มเก็บ ปริมาณ 25 มิลลิลิตร นำมาบ่มใน Alkaline peptone water จำนวน 225 ml จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง เพื่อเป็นการ enrichment เชื้อ

จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบน selective media สำหรับเชื้อกลุ่ม Vibrio ได้แก่ thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar และบ่มที่อุณหภูมิ 35 - 37 $^{O}$C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) จาก TCBS agar ที่มีลักษณะกลมนูน ขนาดปานกลาง ขอบเรียบ และมีสีเขียว มาคัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้โคโลนีที่บริสุทธิ์ และนำเชื้อไปทำการทดลองต่อไป เก็บเชื้อที่ได้เป็น stock ที่ 4 $^{O}$C และที่ -20 $^{O}$C

**3. วิธีการพิสูจน์เชื้อด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical tests)**

เป็นการตรวจสอบเพื่อยืนยันเชื้อที่ทำการคัดเลือกว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยจะนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ Oxidase test, Triple iron sugar (TSI) test, Lysine decarboxylase test และการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ต่าง ๆ กัน เพื่อพิสูจน์สปีชีร์ของเชื้อ

**3.1 การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส**

ใช้ loop เขี่ยเชื้อและมาป้ายลงบนกระดาษกรองที่หยดด้วยน้ำยา 1% Kovacs oxidase reagent อ่านผลภายใน 10 วินาที และทำการบันทึกผล โดยบริเวณรอยที่ป้ายเชื้อเกิดสีฟ้าหรือสีม่วงภายใน 10 - 15 นาที จะให้ผลบวก

**3.2 การทดสอบ Triple Sugar Iron Agar (TSI)**

ใช้ needle เขี่ยเชื้อมา stab เชื้อที่ต้องการทดสอบไปจนถึงก้นหลอดของหลอดอาหารและ streak บนส่วนลาดเอียง (slant) ของอาหาร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง และทำการบันทึกผล โดยดูสภาพความเป็นกรด ด่าง หรือเป็นกลาง ในหลอดทดลอง อ่านแยกเป็นสองส่วนคือ ส่วนเอียง (slant) และส่วนก้นหลอด (butt) ดังนี้

| สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ | ผลที่ slant | ผลที่ butt | การเกิด gas (G) | การสร้าง $H_2S$ (+) | สัญญลักษณ์ |
|---|---|---|---|---|---|
| | เหลือง (acid) | เหลือง (acid) | no | no | A/A |
| | เหลือง (acid) | เหลือง (acid) | yes | no | A/AG |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ส้ม | เหลือง (acid) | เหลือง (acid) | yes | yes | A/AG+ |
| | แดง (alkaline) | เหลือง (acid) | no | no | K/A |
| | แดง (alkaline) | เหลือง (acid) | yes | no | K/AG |
| | แดง (alkaline) | เหลือง (acid) | yes | yes | K/AG+ |
| | แดง (alkaline) | แดง (alkaline) | no | no | K/K |
| | แดง (alkaline) | ส้ม (neutral) | no | no | K/N |

**3.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ lysine decarboxylase**

ใช้ needle เขี่ยเชื้อ จากนั้นนำมา streak บนส่วนลาดเอียงของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง และทำการบันทึกผล โดยการอ่านผลถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วง จะอ่านผลเป็นบวก และถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จะอ่านผลเป็นลบ

**3.4 ทดสอบการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0%, 1% และ 6%**

ใช้ loop เขี่ยเชื้อลงใน nutrient broth ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่แต่ละความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง และทำการบันทึกผล โดยหากอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหมายถึงเชื้อสามารถเจริญได้

**3.5 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ**

สกัดเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 Nucleic acid extraction kit (Vivantis, Malaysia) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใน LB broth ที่มี 1 % NaCl ปริมาณ 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ 6000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทิ้ง supernatant นำ pellet มาเติม buffer R1 100 µl resuspend เติม lysozyme (50 mg/ml) 10 µl และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 3 นาที และทิ้ง supernatant จากนั้นนำ pellet มาเติม buffer R2 180 µl และเติม 20 µl Proteinase K จากนั้นนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม 2 เท่าของของ buffer BG และทำการ mix และนำไปบ่ม ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol 200 µl จากนั้นย้าย sample ลง Column และไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้าง column โดยการเติม wash buffer 650 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที และทิ้ง flow through จากนั้นทำให้ column แห้ง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที และทำการเปลี่ยน microcentrifuge tube และเติม 50 µl ของ elution buffer ลงใน column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที และเก็บ DNA ที่ -4 องศา หรือ -20 องศาเซลเซียส

**4. การตรวจหา species-specific gene (*ToxR* gene) ด้วยวิธี PCR**

**4.1 PCR**

โดยใช้ Primer toxR เป็น Primer ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* หลังจากทำ PCR จะได้ PCR product ที่มีขนาดแบน 368 bp โดยแสดงลำดับเบสของ primer แสดงดังตาราง ที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ primer toxR

| Primer | Sequence (5'-3') | Fragment size (bp) | Reference |
|---|---|---|---|
| F : *toxR* | GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG | 368 | Zulkifli et al, 2009 |
| R : *toxR* | ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG | | |

การทำปฏิกิริยามีปริมาณสาร 25 µl ซึ่งประกอบด้วย 10X buffer 2.5 µl, 50 mM $MgCl_2$ 1 µl, 10 mM dNTP 0.5 µl, toxR gene forward primer 0.5 µl, toxR gene reverse primer 0.5 µl, taq polymerase (5U) 0.25 µl, distilled water 16.8 µl และ DNA template 3 µl และอุณหภูมิในการเพิ่มดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR Thermal Cycle สำหรับ primer toxR

| Reaction | อุณหภูมิ | เวลาที่ใช้ |
|---|---|---|
| Initial denaturation | 94°C | 5 min |
| Final denaturation | 94°C | 1 min |
| Annealing | 63°C | 1.5 min |
| Initial extension | 72°C | 1 min 30 second |
| Final extension | 72°C | 10 min |

**4.2 วิธีวิเคราะห์ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis**

เตรียม 1.5 % agarose gel ใน 1X TAE buffer 50 มิลลิลิตร และละลายโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศา เทสารละลาย 1.5 % agarose gel ลงในถาดสำหรับเตรียมเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นำไปวางใน chamber และเติม 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล ผสม PCR product ของแต่ละตัวอย่าง 5 µL เข้ากับ SYBR Gold และ 6X Loading dye 1 µL บนแผ่นพาราฟิล์มแล้วนำไป load ลงใน well และใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker จากนั้นต่อสายไฟระหว่างขั้ว electrode ทั้งสองเข้ากับ Power supply ปรับตั้งค่าความต่างศักย์เป็น 100 โวลต์ โดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อครบเวลานำเจลมาดูผลด้วยเครื่อง gel doc

**4.3 การตรวจหา virulence factor ด้วยวิธี PCR**

โดยใช้ tdh และ trh Primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อการตรวจหา virulence gene ของเชื้อ *Vibrio* spp. (Bej et al, 1999)

*tdh*-F 5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3'

*tdh*-R 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3'

*trh*-F 5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'

*trh*-R 5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG -3'

การทำปฏิกิริยามีปริมาณสาร 25 µl ซึ่งประกอบด้วย 10X buffer 2.5 µl, 50 mM $MgCl_2$ 1 µl, 10 mM dNTP 2 µl, *trh* gene forward primer 0.5 µl, *trh* gene reverse primer 0.5 µl *Taq* polymerase

(5U) 0.5 µl, distilled water 11 µl และ DNA template 1 µl และอุณหภูมิในการเพิ่มดีเอ็นเอดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง PCR สำหรับ Primer trh

| Reaction | อุณหภูมิ | เวลาที่ใช้ |
|---|---|---|
| Initial denaturation | 94°C | 3 min |
| Final denaturation | 94°C | 1 min |
| Annealing | 62°C | 1 min |
| Initial extension | 72°C | 1 min |
| Final extension | 72°C | 5 min |

**5. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ**

ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยใช้วิธี disk agar diffusion method มีวิธีการดังนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 - 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง และเตรียมเชื้อใน 0.85% NaCl ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ McFarland no. 0.5 จากนั้นนำไปป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (supplemented with 2% w/v NaCl) และทดสอบด้วยแผ่นดิสก์ยาชนิดต่างๆ ได้แก่ amplicin (AMP) (10 µg), amikacin (AK) (30 µg), cefotaxime (CTX) (30 µg), ceftazidime (CAZ) (30 µg), chloramphenicol (C) (30 µg), gentamicin (CN) (30 µg), nalidixic acid (NA) (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (TSX) (25 µg), และ tetracycline (TE) (30 µg) จากนั้นนำไปบ่มที่ 35- 3 7 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง บันทึกผลขนาดของ inhibition zone และรายงานผลความไวของเชื้อต่อยาชนิดต่างๆ ตามมาตรฐานของ the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2010) M45-A2

**4. การตรวจหา antibiotic resistance genes**

ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ Beta-lactams (blaTEM, blaSHV, blaOXA), tetracyclines (tetA, tetB, tetC, tetG), chloramphenicols (catA1, catA2, catA3, catB3), และ kanamycin (aphA-3) เป็นต้น โดยวิธี PCR

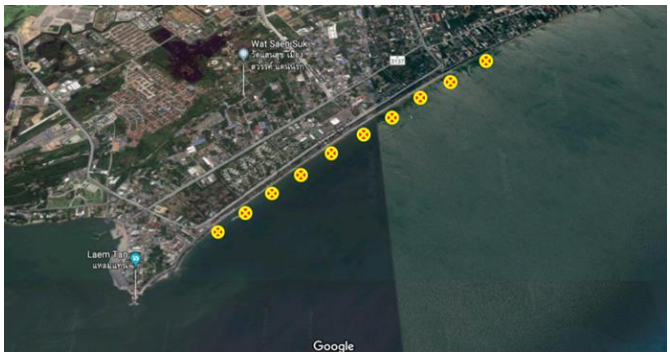
**5. การตรวจหา antibiotic resistance genes**

สกัด plasmid ของเชื้อด้วยชุดสกัดพลาสมิด และนำ plasmid ที่ได้มาตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ Beta-lactams (blaTEM, blaSHV, blaOXA), tetracyclines (tetA, tetB, tetC, tetG), chloramphenicols (catA1, catA2, catA3, catB3) และ kanamycin (aphA-3) โดยวิธี PCR

# ผลการวิจัย

**1. ลักษณะทั่วไปของตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บได้ บริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี**

จากการเก็บน้ำทะเล บริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี เพื่อนำมาตรวจสอบหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในเดือนมกราคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2561 ซึ่งการเก็บแต่ละครั้งจะทำการเก็บทั้งหมด 10 จุด (ภาพที่ ...) และแต่ละจุดจะเก็บบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับน้ำทะเลหรือลักษณะบริเวณชายหาด ทั้งนี้การบันทึกข้อมูลของน้ำทะเลประกอบด้วย อุณหภูมิ และค่า pH จากการเก็บบันทึกข้อมูลของตัวอย่างน้ำทะเล พบว่าน้ำทะเลมีอุณหภูมิ 23 -29 องศาเซลเซียส มีค่า pH 6 – 7




ภาพที่ 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลในบริเวณชายหาดบางแสน จ. ชลบุรี

**2. ผลการตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยการเพาะเลี้ยงบน TCBS agar**

ผลจากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำทะเล บริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรีและนำตัวอย่างมาเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วย Alkaline Peptone Water บ่มเชื้อเป็นเวลา 4 - 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm และนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้เพาะเลี้ยงบน Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar เพื่อใช้คัดเลือกและแยกสายพันธุ์ *Vibrio* spp. การแยกเชื้อแบ่งโดยสังเกตลักษณะและสีของโคโลนี โดยโคโลนีสีเขียวคือโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

จากตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บตั้งแต่เดือนมกราคมถึงกันยายน พ.ศ. 2561 มีตัวอย่างได้ทั้งหมด 180 ตัวอย่าง พบลักษณะทั้งโคโลนีสีเขียวและสีเหลือง โดยได้นำโคโลนสีเขียวไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อใช้มนการทดสอบต่อไป

**3. ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical tests)**

จากการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีที่มีสีเขียวบน TCBS agar แยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำมาทดสอบเพื่อพิสูจน์ชนิดเชื้อด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ Oxidase test, Triple iron sugar (TSI) test, Lysine decarboxylase test และการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ที่ 0%, 1%, 6% ผลการทดสอบพบว่ามีจำนวน 53 สายพันธุ์ที่ระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* แสดงดังตารางที่ 4

จาก *V. parahaemolyticus* ทั้ง 53 สายพันธุ์ พบว่าในทุกเดือนตั้งแต่มกราคมถึงกันยายน 2562 สามารถพบ *V. parahaemolyticus* ได้ ดังแสดงในตารางที่ 5 และพบว่าในเดือนมิถุนายนและกรกฎาคมพบจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างน้ำทะเลสูงกว่าทุกเดือน

**ตารางที่ 4** ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ 53 สายพันธุ์

| No. of Isolate | Biochemical tests | | | | | | Identified as |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Oxidase test | TSI | Lysine decarboxylase test | Growth in 0% NaCl | Growth in 1% NaCl | Growth in 6% NaCl | |
| 4 | + | K/A | + | - | + | + | *Vibrio parahaemolyticus* |
| 15 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 22 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 23 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 26 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 27 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 30 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 35 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 39 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 45 | + | K/AG | + | - | + | + | |
| 46 | + | K/AG | + | - | + | + | |
| 69 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 73 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 77 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 80 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 87 | + | K/AG | + | - | + | + | |
| 89 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 90 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 91 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 92 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 95 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 96 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 101 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 102 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 103 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 104 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 105 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 106 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 108 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 109 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 110 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 112 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 114 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 115 | + | K/A | + | - | + | + | |

Remark: + ; positive result, -; negative result, Alkaline slant/acidic butt (K/A); Red/Yellow = glucose fermentation only

| No. of Isolate | Biochemical tests | | | | | | Identified as |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Oxidase test | TSI | Lysine decarboxylase test | Growth in 0% NaCl | Growth in 1% NaCl | Growth in 6% NaCl | |
| 116 | + | K/A | + | - | + | + | *Vibrio parahaemolyticus* |
| 117 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 118 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 119 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 120 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 121 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 123 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 126 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 127 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 128 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 129 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 130 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 132 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 133 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 136 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 138 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 141 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 144 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 146 | + | K/A | + | - | + | + | |
| 158 | + | K/A | + | - | + | + | |

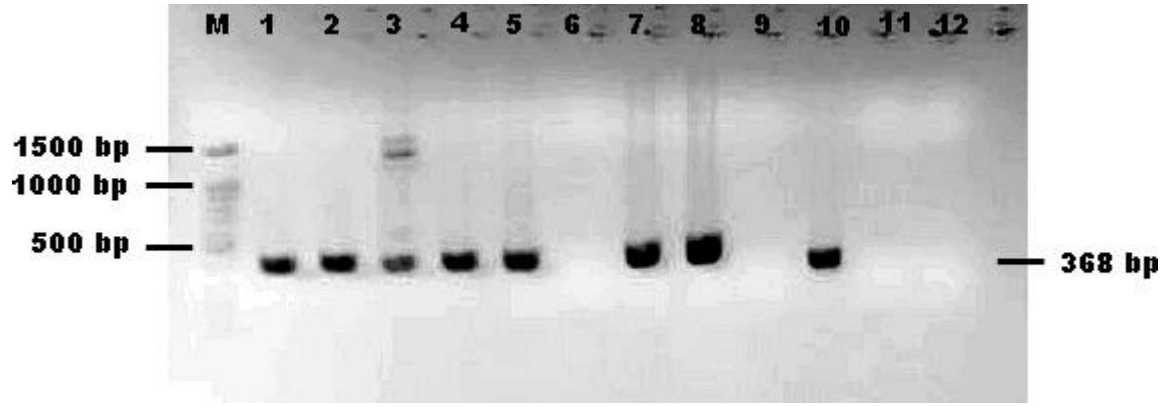
Remark: + ; positive result, -; negative result, Alkaline slant/acidic butt (K/A); Red/Yellow = glucose fermentation only

ตารางที่ 5 แสดงจำนวน *V. parahaemolyticus* ที่พบในเดือนมกราคมถึงกันยายน 2562

| เดือน (พ.ศ. 2562) | *V. parahaemolyticus* ที่พิสูจน์โดย biochemical tests |
|---|---|
| January | 2 |
| February | 6 |
| March | 3 |
| Apil | 3 |
| May | 8 |
| June | 15 |
| July | 12 |
| August | 3 |
| September | 1 |
| **Total** | **53** |

**4. ผลการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction ด้วย Primer toxR**

*V. parahaemolyticus* ที่ผ่านการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ถูกนำสกัด DNA และตรวจหา toxR gene ด้วยวิธี PCR เพื่อตรวจสอบและยืนยันความถูกต้อง พบว่าทั้ง53 สายพันธุ์ มี toxR gene โดยให้ PCR product ที่มีขนาด 368 bp แสดงดังภาพที่ 2 โดยมีสายพันธุ์ *V. parahaemolyticus* จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

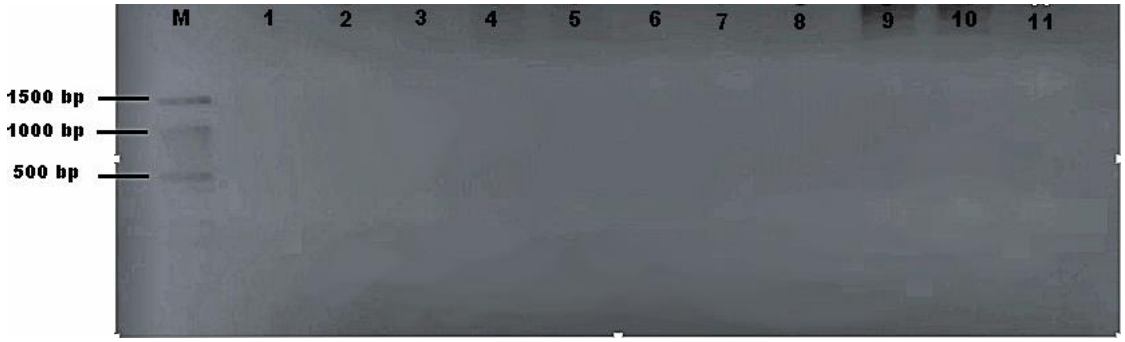



ภาพที่ 2 แสดงผลการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR Primer toxR บน 1.5% agarose gel (Lane M = 100 bp marker, Lane ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 และ 10 พบ PCR product ขนาด 368 bp และ Lane ที่ 6 และ 9 ไม่พบ band ของ PCR product)

**5. ผลการตรวจหายีนที่เกี่ยงข้องกับความรุนแรงของโรค (*tdh* gene และ *trh* gene) ใน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR**

การตรวจหา virulence genes ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 53 สายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า 20 สายพันธุ์ มี *tdh* gene โดยมีขนาด PCR product 269 bp (ภาพที่ 3) ขณะที่ไม่พบ *trh* gene ในทั้ง 53 สายพันธุ์ (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 3 แสดงผล PCR product ใน 1.5% agarose gel ของเชื้อที่ทดสอบหา *tdh* gene ด้วยวิธี PCR (lane M: 100 bp DNA marker, Lane 1: PCR product from *tdh* gene amplification)




ภาพที่ 4 แสดงผล PCR product ใน 1.5% agarose gel ของเชื้อที่ทดสอบหา *tdh* gene ด้วยวิธี PCR (lane M: 100 bp DNA marker, Lane 1: PCR product from *trh* gene amplification) (ไม่พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มียีนก่อความรุนแรงของโรค)

Lane M = 100 bp marker

Lane 1 - 10 = เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตัวอย่างที่ 6 โคโลนีที่ 2

Lane 11 = Negative control

**6. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial susceptibility test)**

ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยใช้วิธี disk agar diffusion method ตามมาตรฐานของ the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2010) M45-A2 ผลการทดสอบด้วยแผ่นดิสก์ยาชนิดต่างๆ ได้แก่ amplicin (AMP) (10 μg), amikacin (AK) (30 μg), cefotaxime (CTX) (30 μg), ceftazidime (CAZ) (30 μg), chloramphenicol (C) (30 μg), gentamicin (CN) (30 μg), nalidixic acid (NA) (30 μg), sulfamethoxazole/trimethoprim (TSX) (25 μg), และ tetracycline (TE) (30 μg) พบว่า ประมาณ 56 % ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดดื้อต่อยา Amplicillin และมี 1 สายพันธุ์ดื้อต่อยา cefotaxime

# อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

## อภิปรายผลการวิจัย

จากตัวอย่างน้ำทะเลทั้งหมด 180 ตัวอย่างจากบริเวณหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง เดือนเมษายน พบว่ามีอุณหภูมิเฉลี่ยของตัวอย่างน้ำทะเล 23 – 29 องศาเซลเซียสและค่า pH 6 - 7 ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับสภาพอากาศ บริเวณชายหาดบางแสนเป็นชายฝั่งทะเลอาจได้รับผลกระทบจากมรสุมทำให้สภาพอากาศมีการเปลี่ยนแปลงตลอดในแต่ละเดือน ส่งผลต่อประชากรสัตว์น้ำชายฝั่งหรือแม้กระทั่งจำนวนและชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลบริเวณชายฝั่ง (Beleneva, 2004) โดยเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีแนวโน้มที่จะพบมากในน้ำอุ่นและจะพบมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มมากกว่า 17 องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 43 องศาเซลเซียส (Pruzzo et al, 2005) และจากการศึกษาพบว่าในช่วงที่ซึ่งมีอุณหภูมิมากกว่า 20 องศาเซลเซียส สามารถพบ *V. vulnificus* หรือ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมได้เกือบร้อยละ 100 (Wright et al., 1996) และจากการศึกษาของ DePaola A ยังพบว่าอุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการพบ *V. parahaemolyticus* และเชื้อแบคทีเรียมีความหนาแน่นสูงขึ้นในหอยนางรมที่ประเทศสหรัฐอเมริกาในตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน ซึ่งกล่าวได้ว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ (DePaola A et al, 2010) นอกจากนี้พบว่าจากการศึกษาของ Urqyhart บริเวณแม่น้ำ Oyster และเกาะ Nannie ประเทศสหรัฐอเมริกา พบ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมในแต่ละช่วงของปี โดยเดือนที่อุณหภูมิของน้ำเย็นลง (เดือนตุลาคมถึงเดือนพฤษภาคม) สามารถพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ร้อยละ 55 และทางตรงกันข้ามพบว่าเดือนที่อุณหภูมิของน้ำอุ่นขึ้น (เดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน) สามารถพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ร้อยละ 72 ซึ่งความหนาแน่นของ *V. parahaemolyticus* จะเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนมิถุนายน หลังจากที่อุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส และพบว่าความหนาแน่นของ *V. parahaemolyticus* มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิเฉลี่ยของน้ำ ความเค็มเฉลี่ยและค่าเฉลี่ยของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ตลอดทั้งเดือนที่เก็บตัวอย่าง (Urquhart et al, 2016) และในงานวิจัยนี้พบว่าแต่ละเดือนสามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้แตกต่างกันซึ่งอาจสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า

จากการศึกษาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียบน TCBS agar จะเห็นได้ว่าเชื้อมีลักษณะโคโลนีขนาดปานกลาง สีเขียวเข้มและโคโลนีขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน - เข้ม และทำให้เชื้อเป็นสายพันธุ์เดียวโดยการนำโคโลนีมาเจริญบน TCBS agar อีกครั้ง โดยเชื้อที่มีโคโลนีสีเขียวอาจจะเป็น *V.vulnificus* และ *V. mimicus* จึงนำโคโลนีไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่เป็น *V. parahaemolyticus* จำนวน 53 ตัวอย่าง และพบว่าบางตัวอย่างไม่เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวงศ์ *Vibrio* แต่สามารถขึ้นใน Selective medium ได้ เช่น *Pseudomonas*, *Aeromonas* (MacFaddin JF, 1985)

จากการศึกษาของ Zen และคณะพบว่าเมื่อแยกสิ่งมีชีวิตที่มีความเกี่ยวข้องกับ *V. parahaemolyticus* บริเวณชายฝั่ง สังเกตเห็นว่าเกิดอุบัติการณ์มากกว่าร้อยละ 20 ตลอดทั้งปี (Zen et al, 1963) และพบการรายงานการตรวจสอบน้ำทะเล แพลงก์ตอน และการเก็บตัวอย่างของปลา ในทะเลเปิดบริเวณมหาสมุทรอินเดีย พบว่าสามารถแยก *V. parahaemolyticus* ได้จากปลาทูน่า (Yasunaga et al, 1964) และจากงานวิจัยของ Urtaza พบว่าตัวอย่างน้ำทะเล หอยนางรมและตะกอนที่เก็บจากบริเวณ Tangier Sound และแม่น้ำ Chester บริเวณอ่าว Chesapeake ระหว่างเดือนมิถุนายน ปีค.ศ. 2009 และเดือนสิงหาคม ปีค.ศ. 2012 พบเชื้อ *Vibrio* spp. จำนวน 2,350 ตัวอย่าง ซึ่งยืนยันว่าโดย primer *toxR* gene ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่ามี 1,340 ตัวอย่างที่เป็น *V. parahaemolyticus* และจาก *V. parahaemolyticus*

ทั้งหมดพบว่าร้อยละ 62.7 สามารถก่อโรคในมนุษย์ ซึ่ง *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่แยกได้จากน้ำทะเล (น้ำทะเลและแพลงก์ตอน) หอยนางรมและตะกอน ตามลำดับ (Urtaza et al, 2018)

ในทางตรงกันข้ามพบว่า ไม่สามารถแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างน้ำทะเลและแพลงก์ตอนที่เก็บในเขตมหาสมุทรของมหาสมุทรแปซิฟิก ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับสภาพอากาศในช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง (Horie et al, 1964)

โดยการศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศไทยพบการศึกษาการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาว จากจำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง โดยการสุ่มตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรปราการ ช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2557 มี 42 ตัวอย่างที่ปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 70 (นฤชล และคณะ, 2558) และในปี พ.ศ. 2559 มีการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 พบว่าเดือนมิถุนายนมีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณ $4X10^3$ CFU $ml^{-1}$ ซึ่งเกินมาตรฐานการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร ข้อมูลโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (วารุณี และคณะ, 2559) ซึ่งจากงานวิจัยข้างต้นเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์เพื่อใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อบริเวณชายหาดอื่นๆ ในจังหวัดชลบุรีและจังหวัดที่ติดชายฝั่งทะเล

จากการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย สามารถบอกได้เบื้องต้นว่าตัวอย่างใดเป็น *V. parahaemolyticus* และทำการยืนยันผลด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *toxR* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกในแบคทีเรียกลุ่ม *V. parahaemolyticus* (Pang et al. 2006; Khouadja S, 2014) และผลที่ได้เมื่อตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis พบว่าจาก 53 ตัวอย่างที่ให้ผลปฏิกิริยาทางชีวเคมีเป็น *V. parahaemolyticus* มีเพียง 20 ตัวอย่างที่พบยีนที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค

**สรุปผลการทดลอง**

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำทะเลทั้งหมด 180 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer toxR พบ 53 ตัวอย่างที่เป็น *V. parahaemolyticus* โดยในเดือนมิถุนายนและกรกฎาคมพบมากที่สุด และพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนที่ก่อความรุนแรงของโรค 20 สายพันธุ์ และเชื้อส่วนใหญ่ดื้อยาต่อ Ampicillin

**ผลผลิต (Output)**

Poster presentation ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย)

อุบัติการณ์การพบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

ชื่อเรื่อง (ภาษาอังกฤษ)

OCCURRENCE OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS ISOLATED FROM BANGSAEN BEACH, THAILAND)

ชื่อผู้วิจัย

Kulwara Poolpol*, Kittilak Rochaikun, Nanwan Simmalaotao, Pairat Ittarat, Phonlawat Janpiw

ชื่องานประชุมวิชาการ The 1st ASIA PACIFIC Workshop and Conference on Molecular Medicine

สถานที่นำเสนอ Denpasar-Bali, Indonesia

วันที่นำเสนอ 2 – 5 กรกฎาคม 2562

# ส่วน ค

# รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 256108A1080027 สัญญาเลขที่ 196/2561
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การดื้อยาของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ( Antibiotic resistance of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus Isolated from Seawater in Bang Sean Beach Area, Chonburi Province)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. กุลวรา พูลผล

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม 2560

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) .....185,000..... บาท

งวดที่ 2 (40%) .....148,000..... บาท

งวดที่ 3 (10%) .....-..... ..... บาท

รวม .....**333,000 บาท**.....

<u>รายจ่าย</u>

| รายการ | งบประมาณที่ตั้งไว้ | งบประมาณที่ใช้จริง | จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน |
|---|---|---|---|
| 1. ค่าตอบแทน | | | |
| 1.1 ค่าตอบแทนผู้วิจัย | 24,000 | 24,000 | |
| 1.2 ค่าเหมาจ้างผู้ช่วยวิจัย | 42,000 | 42,000 | |
| 2. ค่าจ้าง | - | - | |
| 3. ค่าวัสดุ | 262,000 | 228,700 | |
| 4. ค่าใช้สอย | 5,000 | 5,000 | |
| 5. ค่าครุภัณฑ์ | - | - | |
| 6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ | 37,000 | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6.1 ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน งวดที่ 1<br>6.2 ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน งวดที่ 2 | | 18,500<br><br>14,800 | |
| รวม | 370,000<br>(ได้รับจริง 333,000 บาท) | 333,000 | - |

(.....)

ดร. กุลวรา พูลผล

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

# เอกสารอ้างอิง

1. Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus in various countries: A review. Food Microbiol. 2016;57:128-34.

2. Igbinosa EO, Okoh AI. Emerging Vibrio species: an unending threat to public health in developing countries. Res Microbiol. 2008;159(7-8):495-506.

3. Strom MS, Paranjpye RN. Epidemiology and pathogenesis of Vibrio vulnificus. Microbes Infect. 2000;2(2):177-88.

4. Frank C, Littman M, Alpers K, Hallauer J. Vibrio vulnificus wound infections after contact with the Baltic Sea, Germany. Euro Surveill. 2006;11(8):E060817 1.

5. Jones MK, Oliver JD. Vibrio vulnificus: disease and pathogenesis. Infect Immun. 2009;77(5):1723-33.

6. Bross MH, Soch K, Morales R, Mitchell RB. Vibrio vulnificus infection: diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 2007;76(4):539-44.

7. Tanil GB, Radu S, Nishibuchi M, Rahim RA, Napis S, Maurice L, et al. Characterization of vibrio parahaemolyticus isolated from coastal seawater in peninsular Malaysia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005;36(4):940-5.

8. Takahashi A, Yamamoto C, Kodama T, Yamashita K, Harada N, Nakano M, et al. Pore formation of thermostable direct hemolysin secreted from Vibrio parahaemolyticus in lipid bilayers. Int J Toxicol. 2006;25(5):409-18.

9. Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of Vibrio parahaemolyticus virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. Infect Immun. 2010;78(4):1772-80.

10. Sakazaki R, Iwanami S, Tamura K. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, Vibrio parahaemolyticus. II. Serological characteristics. Jpn J Med Sci Biol. 1968;21(5):313-24.

11. Shinoda S, Furumai Y, Katayama S, Mizuno T, Miyoshi S. Ecological study of pathogenic vibrios in aquatic environments. Biocontrol Sci. 2013;18(1):53-8.

12. Paydar M, Thong KL. Prevalence and genetic characterization of Vibrio vulnificus in raw seafood and seawater in Malaysia. J Food Prot. 2013;76(10):1797-800.

13. Cabrera-Garcia ME, Vazquez-Salinas C, Quinones-Ramirez EI. Serologic and molecular characterization of Vibrio parahaemolyticus strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. Appl Environ Microbiol. 2004;70(11):6401-6.

14. Canigral I, Moreno Y, Alonso JL, Gonzalez A, Ferrus MA. Detection of Vibrio vulnificus in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. Microbiol Res. 2010;165(8):657-64.

15. Fabbro C, Cataletto B, Del Negro P. Detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). FEMS Microbiol Lett. 2010;307(2):158-64.

16. Rodriguez-Castro A, Ansede-Bermejo J, Blanco-Abad V, Varela-Pet J, Garcia-Martin O, Martinez-Urtaza J. Prevalence and genetic diversity of pathogenic populations of Vibrio parahaemolyticus in coastal waters of Galicia, Spain. Environ Microbiol Rep. 2010;2(1):58-66.

17. Changchai N, Saunjit S. Occurrence of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus in retail raw oysters from the eastern coast of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2014;45(3):662-9.

18. Hayat Mahmud Z, Kassu A, Mohammad A, Yamato M, Bhuiyan NA, Balakrish Nair G, et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic Vibrio parahaemolyticus from the Kii Channel, Japan. Microbiol Res. 2006;161(1):25-37.

19. Letchumanan V, Yin WF, Lee LH, Chan KG. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Vibrio parahaemolyticus isolated from retail shrimps in Malaysia. Front Microbiol. 2015;6:33.

20. Neela FA, Nonaka L, Suzuki S. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant Vibrio species isolated from coastal sediments and seawater. J Microbiol. 2007;45(1):64-8.

21. Tout J, Siboni N, Messer LF, Garren M, Stocker R, Webster NS, et al. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural Vibrio populations associated with the coral Pocillopora damicornis. Front Microbiol. 2015;6:432.

22. Wang R, Zhong Y, Gu X, Yuan J, Saeed AF, Wang S. The pathogenesis, detection, and prevention of Vibrio parahaemolyticus. Front Microbiol. 2015;6:144.

23. Hlady WG, Klontz KC. The epidemiology of Vibrio infections in Florida, 1981-1993. J Infect Dis. 1996;173(5):1176-83.

24. Randa MA, Polz MF, Lim E. Effects of temperature and salinity on Vibrio vulnificus population dynamics as assessed by quantitative PCR. Appl Environ Microbiol. 2004;70(9):5469-76.

25. O'Neill KR, Jones SH, Grimes DJ. Seasonal incidence of Vibrio vulnificus in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. Appl Environ Microbiol. 1992;58(10):3257-62.

26. McLaughlin JB, DePaola A, Bopp CA, Martinek KA, Napolilli NP, Allison CG, et al. Outbreak of Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis associated with Alaskan oysters. N Engl J Med. 2005;353(14):1463-70.

27. Lee KH, Heo ST, Kim YR, Pang IC. Isolation of Vibrio vulnificus from Seawater and Emerging Vibrio vulnificus Septicemia on Jeju Island. Infect Chemother. 2014;46(2):106-9.

28. Kim JY, Lee JL. Multipurpose assessment for the quantification of Vibrio spp. and total bacteria in fish and seawater using multiplex real-time polymerase chain reaction. J Sci Food Agric. 2014;94(13):2807-17.