



คุณลักษณะของ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

**Characteristics of *Vibrio vulnificus* from Clinical and
Environmental Samples**

ชณัฐกานต์ แสงศรีคำ

Chanatkan Sangsricome

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณลักษณะของ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม
 ผู้เขียน นางสาวชณัฐกานต์ แสงศรีคำ
 สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

.....ประธานกรรมการ
 (ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทย์วงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
 (ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

.....
 (ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....กรรมการ
 (ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....กรรมการ
 (ดร.อนิรุทธิ์ ลิ้มตระกูล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ_____

(ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ_____

(นางสาวชณัฐกานต์ แสงศรีคำ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ _____

(นางสาวชณัฐกานต์ แสงศรีคำ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	คุณลักษณะของเชื้อ <i>Vibrio vulnificus</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วยและ สิ่งแวดล้อม
ผู้เขียน	นางสาวชณัฐกานต์ แสงศรีคำ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2555

บทคัดย่อ

ได้แยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างอาหารทะเล น้ำทะเล และดินตะกอนทะเล ในจังหวัดสงขลา และสุราษฎร์ธานี ตั้งแต่สิงหาคม 2552 ถึงกันยายน 2553 จำนวน 288 ตัวอย่าง โดยเพิ่มปริมาณเชื้อใน APW pH 8.6 และคัดเลือกเชื้อลักษณะโคโลนี สีฟ้า-เขียว บนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ CHROMagar™ *Vibrio* ยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ยีน *vvhA* เป็นยีนเป้าหมาย พบ *V. vulnificus* จำนวน 141 ตัวอย่าง (48.9%) มีความชุกของ *V. vulnificus* สูงสุดในเดือนมีนาคม (7.2 %) และต่ำสุดในเดือนเมษายน (2.0%) ส่วนใหญ่พบเชื้อในหอยนางรม (26.2%) รองลงมา คือ กุ้ง (21.9%) และดินตะกอนทะเล (20.5%) ตามลำดับ ตรวจสอบ biotype ของ *V. vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วย 10 สายพันธุ์ และจากสิ่งแวดล้อม 244 สายพันธุ์ พบ biotype 1 (99.2 %) และ biotype 2 (0.8 %) และผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion พบว่า *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ยังคงไวต่อยาหลักที่ใช้ในการรักษา คือ doxycycline, ceftazidime, cefotaxime และบางส่วนคือต่อ carbenicillin (17.6 %), ampicillin (9.8 %), gentamicin (2.8 %) และ erythromycin (0.8 %) ตรวจสอบคุณลักษณะทางอณูชีววิทยาของ *V. vulnificus* โดยใช้ *vcg* และ *viuB* gene พบว่าทั้ง 254 สายพันธุ์ (100%) มี *vcg-C* และ 231 สายพันธุ์ (95%) มี *viuB* gene เมื่อตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม จำนวน 49 สายพันธุ์ ด้วย AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R-PSE420 ไพรเมอร์ 2 และไพรเมอร์ 4 พบว่าให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันทุกสายพันธุ์ โดยสรุป ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการศึกษาเชื้อ *V. vulnificus* สายพันธุ์ต่างๆ ในครั้งนี้จึงไม่สามารถใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยและสายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อมได้

Thesis Title	Characteristics of <i>Vibrio vulnificus</i> from Clinical and Environmental Samples
Author	Miss Chanatkan Sangsricome
Major Program	Microbiology
Academic Year	2012

Abstract

V. vulnificus was isolated from 288 seafood, sea water and marine sediment samples in Songkhla and Surat Thani provinces from August 2009 to September 2010. Samples were enriched in APW pH 8.6 and subsequently cultured in selective media, CHROMagar™ *Vibrio*. Blue-green suspected colonies were isolated and confirmed by PCR using a *vvhA* marker gene. *V. vulnificus* was detected in 141 samples (48.9 %). The highest prevalence of *V. vulnificus* occurred in March (7.2 %) and lowest prevalence occurred in April (2.0 %). *V. vulnificus* was found mostly in oysters (26.2 %), shrimp (21.9 %) and marine sediment (20.5 %) respectively. Ten strains isolated from patients and 244 strains isolated from environment were identified as biotype 1 (99.2 %) and biotype 2 (0.8 %). The antibiotic susceptibility test on 12 different antibiotics by disc diffusion demonstrated that all *V. vulnificus* strains were sensitive to doxycycline, ceftazidime, cefotaxime. However certain strains resisted to carbenicillin (17.6 %), ampicillin (9.8 %), gentamicin (2.8 %) and erythromycin (0.8 %). The molecular characteristics of *V. vulnificus* using *vcg* and *viuB* marker gene demonstrated that all 254 strains (100 %) were identified as the *vcg*-C (C-type) and 231 strains (95 %) contained *viuB* gene. AP-PCR analysis of 49 *V. vulnificus* from clinical and environmental strains by using primers R-PSE420, primer 2 and primer 4 revealed highly DNA polymorphism among the *V. vulnificus* population. In conclusion, the fingerprinting patterns of all different *V. vulnificus* strains in this study cannot be used to identify the differences between E-strains and C-strains.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	19
2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	21
อุปกรณ์และเครื่องมือ	22
แบบที่เรียกใช้ศึกษา	23
วิธีการทดลอง	24
3 ผลการทดลอง	34
4 วิเคราะห์ผลการทดลอง	49
5 สรุปผลการทดลอง	57
รายการเอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก	72
ประวัติผู้เขียน	79

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	5
1.2	7
1.3	10
1.4	16
2.1	23
2.2	31
2.3	32
2.4	32
3.1	
ตัวอย่าง	35
3.2	37
3.3	39
3.4	41
3.5	42

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
2.1	20
3.1	34
3.2	35
3.3	36
3.4	38
3.5	39
3.6	40
3.7	40
3.8	43
3.9	45
3.10	47
3.11	48

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

bp	=	Base pair(s)
°C	=	Degree Celsius
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxyribonucleic triphosphates
EDTA	=	Ethylene diamine tetra acetic acid
g	=	Gram(s)
kb	=	Kilobase(s)
L	=	Litre(s)
LA	=	Luria-Bertani agar
LB	=	Luria-Bertani
mg	=	Milligram(s)
ml	=	Mililitre(s)
mm	=	Milimeter
NaCl	=	Sodium chloride
ng	=	Nanogram(s)
OD	=	Optical density
PCR	=	Polymerase chain reaction
pH	=	Hydrogen ion concentration
<i>Pfu</i>	=	<i>Pyrococcus furiosus</i>
ppt	=	Part per thousand
RNase	=	Ribonuclease
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TCBS	=	Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar
Tris	=	Tris(hydroxyl methyl)
µg	=	Microgram(s)
µl	=	Microlitre(s)
%	=	Percentage
16S rRNA	=	16S subunit of ribosomal ribonucleic acid

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

V. vulnificus เป็นเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* รูปแท่งโค้ง ไม่มีสปอร์ ดิตตีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ โดยการใช้ polar flagellum ในอาหารเหลว เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและจัดอยู่ในกลุ่ม halophile เจริญได้ที่ดินน้ำที่มีอุณหภูมิ 15 ถึง 25 °C และมีชีวิตอยู่ได้ที่ 10 °C แต่ไม่สามารถแบ่งตัว เจริญเติบโต (viable but non culturable: VBNC) (Thompson *et al.*, 2004) สามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* ได้จากสิ่งแวดล้อม อาทิ เช่น น้ำทะเล ตะกอนใต้ทะเล และแพลงตอนสัตว์ สัตว์น้ำหลายชนิด กุ้ง ปู ปลา และโดยเฉพาะหอย ซึ่งพบว่าหอยนางรมเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ (Jaksic *et al.*, 2002)

V. vulnificus ถูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด (biotype) คือ biotype 1, 2 และ 3 โดยอาศัยความแตกต่างทาง phenotype, genotype, serology และ host range โดยทั่วไปเชื้อ biotype 1 ก่อโรคในคน (Linkous and Oliver, 1999) biotype 2 ก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาไหล ปัจจุบัน พบว่า เชื้อ biotype 2 สามารถก่อโรคในคนได้ (Amaro and Biosca, 1996) และ biotype 3 ก่อโรค ในคนและสัตว์น้ำ โดยพบเชื้อ biotype 3 ในประเทศอิสราเอล (Paz *et al.*, 2007; Bisharat *et al.*, 1999)

V. vulnificus เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูง สามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 2 วิธี วิธีแรกคือ การรับประทานอาหาร หรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ ส่วนวิธีที่ 2 คือ เชื้อเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล หากเชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานอาหาร อาจก่อโรคได้ 2 แบบ แบบแรกคือ ก่อโรคโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งพบประมาณ 45 % ของการติดเชื้อมีอัตราการตายสูงถึง 60 % ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ (Linkous *et al.*, 1999) และแบบที่ 2 คือ ก่อให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งทำให้เกิดอาการอาเจียน และท้องเสียเป็นระยะๆ ซึ่งพบประมาณ 12 % และมีอัตราการตายต่ำ (Strom and Paranjpye, 2000) หากเชื้อเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล (wound infection) อันเกิดจากการสัมผัสบาดแผลกับเชื้อซึ่งปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเล หรือน้ำทะเล จะก่อให้เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ พบประมาณ 25 % ของการติดเชื้อ และอัตราการตายสูงถึง 65-70 % (Linkous *et al.*, 1999)

ข้อมูลในประเทศไทย จากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ระหว่างปี 2544-2549 พบผู้ป่วยจากการติดเชื้อ แบบ septicemia ถึง 56 คน พบผู้ป่วยมากในช่วงอายุ 46-55 ปี แต่เนื่องจากเชื้อเมือกก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) จะมีอัตราการตายต่ำและสามารถหายเองได้ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าจำนวนผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อ *V. vulnificus* มีมากกว่ารายงาน การติดเชื้อ *V. vulnificus* พบได้ตลอดทั้งปี แต่พบมากในเดือนมิถุนายน และธันวาคม (ศรียรรณา และคณะ, 2549) ทั้งนี้ไม่มีรายงาน biotype ของเชื้อและไม่มีการศึกษาสมบัติของเชื้อในช่วงเวลาดังกล่าว นอกจากนี้ไม่มีการศึกษาความชุกของเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหารทะเลและสิ่งแวดล้อมด้วย จึงไม่สามารถสรุป สาเหตุการระบาดและทราบความรุนแรงของเชื้อ ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *V. vulnificus* ในสิ่งแวดล้อม ศึกษาสมบัติของ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม และตรวจสอบอัตราการตายปฏิกิริยาระหว่าง ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์การระบาดของเชื้อ *V. vulnificus* ในประเทศไทยอย่างถูกต้อง และสามารถใช้เป็นแหล่งอ้างอิงในการเปรียบเทียบกับการระบาดของเชื้อนี้ในอนาคต เพื่อการป้องกันและควบคุมเชื้อ *V. vulnificus* ทั้งยังสร้างความเชื่อมั่นในความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภคและผู้ผลิตอาหารทะเล

การตรวจเอกสาร

1.1 จีโนส *Vibrio*

1.1.1 ลักษณะทั่วไป

จีโนส *Vibrio* จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ประกอบด้วย 1 จีโนส คือ *Vibrio* อยู่ในจีโนส *Vibrio* มีมากกว่า 72 สปีชีส์ ซึ่งสปีชีส์ที่มีความสำคัญด้านการแพทย์และก่อให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fernalisii*, *V. metschnikovii* และ *V. carchariae* โดยมี 3 สปีชีส์ที่เป็นสาเหตุใหญ่ซึ่งทำให้เกิดโรคในคน คือ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Hsueh *et al.*, 2004) จีโนส *Vibrio* มีรูปร่างเป็นแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรง หรือโค้ง หัวท้ายมน แบบ comma-shaped มีขนาด ยาว 1.4 ถึง 2.6 μm กว้าง 0.5 ถึง 0.8 μm ติดสีแกรมลบ ไม่มีสปอร์เคลื่อนที่ได้ โดยการใช้ polar flagellum ในอาหารเหลว เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ สามารถสร้างเอนไซม์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (exoenzyme) ได้หลายชนิด เช่น gelatinase, amylase, chitinase และ DNase ให้ผลบวกกับการทดสอบ oxidase ยกเว้น *V. metschnikovii* (Miyasaka *et al.*, 2006; Tarr *et al.*, 2006) สปีชีส์ที่เป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคในคนให้ผลบวกกับการทดสอบ lysine decarboxylase และ ornithine decarboxylase แต่ให้ผลลบกับการทดสอบ arginine dihydrolase คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของ *Vibrio* คือ จะไวต่อการทดสอบ O/129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine) (Tarr *et al.*, 2006) *Vibrio* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรด แต่ไม่ให้เกิดแก๊ส โดยทั่วไปสามารถสร้าง indole และบางครั้งต้องใช้การยืนยันในระดับโมเลกุล เนื่องจากการแปลผลทางชีวเคมีอาจคลาดเคลื่อน จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลพบว่า *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีปริมาณ guanine รวมกับ cytosine (G+C Content) ของ DNA เท่ากับ 39 ถึง 51% mole เชื้อในกลุ่ม *Vibrio* จะถูกทำลายเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 นาที เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 ถึง 40 °C และสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือ ซึ่งสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคน มีความต้องการเกลือที่ความเข้มข้น 1 ถึง 3 % อย่างไรก็ตาม *V. cholerae* สามารถทนได้ในความเข้มข้นเกลือ 0 % เชื้อจะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางและต่างถึง pH 9 และไม่ทนต่อสภาวะกรด (Tarr *et al.*, 2006)

เชื้อ *Vibrio* สามารถพบได้ในแหล่งน้ำกร่อย ชายฝั่งทะเล และในน้ำทะเลทั่วไป สัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู จะพบเชื้อนี้มากบริเวณที่มีการย่อยสลายของสารอินทรีย์ เชื้อ *Vibrio* เป็น normal microbiota ในสัตว์น้ำ สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำทะเลหรือน้ำที่มีสภาพเป็นด่างได้นาน 1-2 สัปดาห์ สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อม คือ อุณหภูมิของน้ำ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยพบว่าเชื้อจะมีความไวต่อสภาวะแวดล้อมต่างกัน

แต่การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิผิวน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด (Kelly, 1982) เชื้อ *Vibrio* ยังสามารถเกาะกับสารโคตินบนแพลงตอนสัตว์ และสัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้มลำตัว โดยจะทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้ดีกว่าการอยู่เป็นเซลล์อิสระในน้ำทะเล สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของสัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้ม เช่น หอยกาบ หอยนางรม และหอยแมลงภู่ เนื่องจากสัตว์เหล่านี้รับสารอาหารโดยวิธี filter-feeding จึงทำให้เจอเชื้อมากกว่าในน้ำที่อาศัยอยู่ถึง 100 เท่า (Oonaka *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004) จึงเป็นสาเหตุที่สำคัญซึ่งทำให้สัตว์ทะเลเหล่านี้เป็นรังเก็บสะสมโรค (reservoir host) และทำให้เกิดโรคในคนหลังบริโภคอาหารทะเลเหล่านี้

1.1.2 การก่อโรคและการระบาด

Vibrio ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1.1) *Vibrio* บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในลำไส้ โดยมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อ ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ ผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อุจจาระอาจมีมูกเลือดปน การติดเชื้อภายในลำไส้ที่รู้จักกันดี คือ การติดเชื้อ *V. cholerae* เนื่องจากมีความรุนแรงสูงทำให้ผู้ติดเชื้อถ่ายเหลวเป็นน้ำขาวขำว (rice water stool) การก่อโรคของ *Vibrio* สายพันธุ์อื่น ๆ นั้น มีรายงาน ทั้งในประเทศที่พัฒนาและกำลังพัฒนา เช่น ทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย ทวีปยุโรป และตะวันออกกลาง ได้แก่ การทำให้เกิดลำไส้อักเสบ การติดเชื้อทางบาดแผลและติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งอาการลำไส้อักเสบและติดเชื้อในกระแสเลือด เกิดจากการรับประทานอาหาร ทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อหรือปรุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ และอาการลำไส้อักเสบ ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน สามารถแยกได้จากอุจจาระเท่านั้น ในรายที่ติดเชื้อไม่รุนแรงสามารถหายเองได้ แต่ในรายที่ติดเชื้อรุนแรงผู้ป่วยจะมีไข้ หนาวสั่น อุจจาระมีมูกหรือเลือดปน ในกรณีนี้ผู้ป่วยจะต้องได้รับยาปฏิชีวนะหรือน้ำเข้าไปทดแทน หากมีอาการลำไส้อักเสบจะมีอัตราการตายต่ำ พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบหลังจากการกินอาหารทะเลที่ปนเปื้อน แต่สามารถหายเองได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *V. mimicus* และ *V. vulnificus* ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *Vibrio* มีหลายชนิด ได้แก่ การสร้าง elastase, collagenase, lipase, haemagglutinin, protease, siderophore, adhesion factor, enterotoxin, cytotoxin, protease, และ hemolysin โดย hemolysin จะเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อ โรคของ *Vibrio* หลายสปีชีส์ ได้แก่ *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Barton and Ratard, 2006) นอกจากนี้บางสปีชีส์ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด ตัวอย่าง เช่น *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii*, *V. alginolyticus* และ *V. mimicus* โดยเชื้อจะเข้าสู่กระแสโลหิตผ่านทางเส้นเลือดดำใหญ่จากทางเดินอาหารไปยังตับ หรือผ่านทางระบบท่อน้ำเหลืองของลำไส้ ผู้ป่วยมีอาการไข้ ความดันต่ำ อ่อนแรง หนาวสั่น มักมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ ท้องเสีย และอาเจียนร่วมด้วยเสมอ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดมากกว่า 70 % จะมีตุ่มน้ำพองใสที่ผิวหนังบริเวณปลายแขนขา

เนื่องจากมีน้ำและโปรตีนออกมาจากเลือด เชื้อที่พบได้บ่อยที่สุด คือ *V. vulnificus* เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด มีโพลีแซคคาไรด์แคปซูล และสามารถใช้เหล็กในรูป transferrin ได้ (Barton and Ratard, 2006)

จากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *Vibrio* พบว่าคนที่ร่างกายแข็งแรงเมื่อได้รับเชื้อมีโอกาสน้อยมากที่จะติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในกระแสเลือดมักเกิดจาก *V. vulnificus* โดยเกิดในกลุ่มที่มีความเสี่ยง คือ ผู้ป่วยโรคตับ ไต เบาหวาน มะเร็ง โดยจะมีอัตราการตายสูง 45 ถึง 60 % (Hlady and Klontz, 1996) อาการของโรค คือ แผลจะบวมแดง มีอาการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังและมีตุ่มน้ำ หลังจากนั้นจะมีการตายของเนื้อเยื่อตามมาด้วยการติดเชื้อในกระแสเลือด ส่วนการติดเชื้อในกระแสโลหิตอันเกิดจากเชื้อ *V. cholerae non-O1*, *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* อาการจะรุนแรงน้อยกว่า

ตารางที่ 1.1 อาการทางคลินิกที่เกิดจากการติดเชื้อในจีนัส *Vibrio*

สปีชีส์	อาการทางคลินิก			
	ลำไส้ อักเสบ	ติดเชื้อทาง บาดแผล	ติดเชื้อใน กระแสเลือด	ติดเชื้อ ในหู
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	+	++
<i>V. carchariae</i>		+		
<i>V. cholerae O1</i>	+++	+		
<i>V. cholerae non-O1</i>	+++	++	+	+
<i>V. cincinnatiensis</i>			+	
<i>V. fluvialis</i>	++			
<i>V. furnissii</i>	(+)			
<i>V. metschnikovii</i>	(+)		(+)	
<i>V. mimicus</i>	++		+	
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+	+
<i>V. vulnificus</i>	+	++	++	

+++ = มีการรายงานบ่อยครั้ง, ++ = มีการรายงานน้อย (6-100 ครั้ง), + = มีการรายงานน้อยมาก (1-5 ครั้ง) และ (+) = มีอาการทางคลินิกไม่ชัดเจน
(แหล่งที่มา: ดัดแปลงจาก Dalsgaard, 1998 และ Daniels, 2000)

1.1.3 การเพาะแยกเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อโดยทั่วไป ทำโดยการนำตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ (pre-enrichment) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีสารยับยั้งเชื้อ (selective media) จากนั้นนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical tests) ดังระบุในตารางที่ 1.2 และปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองวิทยา (serological characterization) เชื้อในจีโนส *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถเจริญบน nutrient agar ที่มีเกลือ 0.5 % ถึง 1 % บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายในเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะกลมมน ขอบเรียบ สีครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 2 ถึง 5 mm. แต่บางสปีชีส์ เช่น *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โคโลนีมีลักษณะแผ่ (swam) *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส แมนโนส หรือคาร์โบไฮเดรตต่างๆ ซึ่งช่วยในการบ่งชี้เชื้อ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดีและ pH สูง มีความสามารถในการใช้ tellurite thiosulphate และ citrate จึงมีการนำสารเหล่านี้มาเติมในอาหาร Thiosulfate citrate bile-salt sucrose agar (TCBS) เพื่อเตรียมเป็นอาหารสำหรับคัดเลือกเชื้อ *Vibrio* ซึ่งสามารถแยกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักน้ำตาลซูโครสได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้จะมีโคโลนีสีเหลือง ได้แก่ *V. cincinnatiensis*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii* และ *V. carchariae* ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสจะมีโคโลนีสีเขียว ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. mimicus* จากนั้นนำโคโลนีที่สงสัยไปเลี้ยงบนอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ oxidase, gelatinase, motility, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, ortho-nitrophenil-galacto-pyranoside (ONPG), ลักษณะความชอบเกลือ (halophilic characteristics) และทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส แมนโนส เซลโลไบโอส เป็นต้น ตาม Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Baumann and Schubert, 1984)..

ตารางที่ 1.2 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Vibrio* spp. Adapted from Elliot *et al.*, 1995 (คัดลอกจาก BAM, 2004)

Biochemical test	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophilia</i>	<i>P. shigelloides</i>
TCBS agar	Y	Y	Y	Y	NG	Y	G	G	G	Y	G
mCPC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
CC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
AGS	KA	Ka	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA	KK	nd
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lysine decarboxylase	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
Growth in	0 % NaCl	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	3 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6 % NaCl	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	8 % NaCl	+	-	V	-	-	V	-	+	-	-
	10 % NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: TCBS= thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose, mCPC= modified cellobiose-polymyxin B-colistin, CC agar= cellobiose-colistin agar, AGS= arginine-glucose slant, Y = yellow, NG = no or poor growth, nd = not done G = green, V = variable, P = purple, KK = slant alkaline / butt alkaline. KA = slant alkaline /butt acidic, Ka = slant alkaline/ Butt slightly acidic

1.2 *Vibrio vulnificus*

1.2.1 ลักษณะทั่วไป

V. vulnificus เป็นเชื้อแบคทีเรียหนึ่งในจิ้นัส *Vibrio* ที่ก่อโรค มีลักษณะเช่นเดียวกับสมาชิกอื่นๆ ในจิ้นัสนี้ คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งโค้ง ไม่มีสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ polar flagellum ในอาหารเหลว เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและจัดอยู่ในกลุ่ม halophile

1.2.2 ระบาดวิทยา

เชื้อ *V. vulnificus* สามารถแยกได้จากสิ่งแวดล้อม อาทิ น้ำทะเล ตะกอนใต้ทะเล และสัตว์ทะเลหลายชนิด โดยเฉพาะหอย ซึ่งหอยนางรม ได้ชื่อว่าเป็นแหล่งเก็บกักเชื้อ (Hlady and Klontz, 1996; Chan *et al.*, 1989; Panicker *et al.*, 2004a; Muench, 1989; Johnston *et al.*, 1985) ในผู้ป่วยสามารถตรวจพบ *V. vulnificus* ได้จากตัวอย่างเลือดมากที่สุด รองลงมาคือ จากบาดแผล และอุจจาระ (CDC, 2009)

V. vulnificus สามารถเจริญได้ดีในเขตอากาศอบอุ่น ถึงร้อน ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการตรวจพบเชื้อ และผู้ป่วยบริเวณรัฐที่ติดกับอ่าวเม็กซิโก (Kaysner *et al.*, 1987) จากการสำรวจข้อมูลโดย COVIS (The Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance System) ในปี 1997-2006 สหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยจากเชื้อ *Vibrio* 4,755 ราย 76 % เกิดจากการบริโภคอาหารทะเล และติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด และรองลงมา คือ *V. vulnificus* พบจำนวนผู้ป่วยสูงสุดในเดือนสิงหาคม และ 80.5 % ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *V. vulnificus* เกิดจากการรับประทานหอยนางรม (Iwamoto *et al.*, 2010) ซึ่งในปี 1997 Oliver และ Kaper รายงานการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยนางรม โดยเฉลี่ย 6×10^4 CFU/กรัม (Oliver, 1997) โดยพบว่าปริมาณเชื้อเพียง 100 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ในผู้ที่มีภาวะธาตุเหล็กในเลือดสูงหรือ ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบปริมาณที่ทำให้เกิดโรคในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ปริมาณการพบ *V. vulnificus* ในสิ่งแวดล้อม มีความสัมพันธ์อุณหภูมิและความเค็มของน้ำ (Kelly, 1982) ในทวีปยุโรป ประเทศเดนมาร์ก ปี 1994 พบผู้ป่วยจาก *V. vulnificus* ถึง 11 ราย ในหน้าร้อน แม้ว่าในน้ำทะเลและดินตะกอนมีความหนาแน่นของเชื้อ *V. vulnificus* เพียง 0.8 ถึง 19 CFU/liter และ 0.04 ถึง > 11 CFU/g (Hoi *et al.*, 1998) สาธารณรัฐเยอรมัน พบเชื้อ *V. vulnificus* ใน blue mussels 3.5 % (Lhafi and Kühne, 2007) ประเทศเนเธอร์แลนด์ พบเชื้อทั้งในสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยในเดือนสิงหาคม (Veenstra *et al.*, 1994) ในตะวันออกกลาง มีรายงานการพบเชื้อในประเทศอิสราเอล (Bisharat *et al.*, 1999b; Paz *et al.*, 2007; Bisharat and Raz, 1996) ทวีปเอเชีย มีการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในประเทศญี่ปุ่น (Miyasaka *et al.*, 2006; Venkateswaran *et al.*,

1989; Mahmud *et al.*, 2008) ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (Yano *et al.*, 2004) มีการตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* ที่ทะเลบริเวณเกาะฮ่องกง (Chan *et al.*, 1986) และในไต้หวัน (Hsueh *et al.*, 2004) ข้อมูลในประเทศไทยจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี 2544-2549 พบผู้ป่วยจากการติดเชื้อแบบ septicemia ถึง 56 คน พบผู้ป่วยมากในช่วงอายุ 46-55 ปี พบผู้ป่วยติดเชื้อ *V. vulnificus* ได้ตลอดทั้งปี พบมากในเดือนมิถุนายน และธันวาคม (ศรีวรรณ และคณะ, 2549)

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เชื้อ *V. vulnificus* สามารถแบ่งได้เป็น 3 biotype (biogroup) คือ biotype 1, 2 และ 3 ตาม host range และลักษณะทาง phenotype, genotype และ serotype (ตารางที่ 1.3) เชื้อที่ก่อโรคในคนและพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป มักพบที่เกิดจาก biotype 1 (Linkous *et al.*, 1999) ส่วน biotype 2 นั้น ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาไหล แต่มีรายงานว่าเชื้อชนิด biotype 2 สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้ด้วยเช่นกัน (Amaro *et al.*, 1996) ซึ่ง Amaro และคณะ พบว่าทั้ง biotype 1 และ 2 มีความสามารถในการเกาะติด และมีความเป็นพิษต่อ cell line ของมนุษย์และปลา โดยมี LD50 เท่ากับ 10^5 ถึง 10^8 (Amaro *et al.*, 1996) ส่วนเชื้อ biotype 3 พบการระบาดนี้ในประเทศอิสราเอล โดยระบาดในบ่อเลี้ยงปลา และคนงานที่ทำงานในการเพาะเลี้ยงปลา โดยการติดเชื้อจากบาดแผลและมีภาวะโลหิตเป็นพิษ (Paz *et al.*, 2007; Bisharat *et al.*, 1999b) เนื่องจากพบเชื้อได้ทั่วไปในน้ำทะเล และสัตว์ทะเล แต่มีรายงานการติดเชื้อ *V. vulnificus* ต่ำ เมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่มเดียวกัน ทำให้มีการศึกษาวิจัยที่มีผลต่อ ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ เชื้อสามารถแบ่งตามแหล่งที่แยกมา (isolation source) เป็น environmental strains และ clinical strains จากการศึกษาความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity) พบว่า clinical strains มีความสามารถในการก่อสูงกว่า environmental strains (Kim *et al.*, 2003; Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2006) ทั้งๆ ที่เชื้อทั้งสองกลุ่มมี virulent factors เหมือนกัน และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง phenotype (Wong *et al.*, 2005; Bisharat *et al.*, 1999) แสดงให้เห็นว่า ลักษณะจำเพาะทางอณูชีววิทยา (gene marker) ของเชื้อที่เป็น virulent factor ที่สำคัญยังไม่ถูกค้นพบการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง environmental strains และ clinical strains โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ได้แก่ ribotyping (Hoi *et al.*, 1997) และ random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) (Warner and Oliver, 1998) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ทั้ง 2 วิธีนี้ ในการแยกความแตกต่างระหว่าง environmental และ clinical strains ได้ 80-90 % (Shin *et al.*, 2007; Warner and Oliver, 2008) กล่าวคือ ใน clinical strains จะพบ amplicon ขนาด ประมาณ 200 bp ถึง 100 % แต่จะพบ amplicon นี้ เพียง 8 % ใน environmental strains (Warner and Oliver, 1999) จากการศึกษา DNA ของ amplicon นี้ และบริเวณใกล้เคียง โดยวิธี cloning และ sequencing ไม่พบว่า บริเวณนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนชนิดใดเลย (Rosche *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม โดยอาศัยผลการทดลองจากวิธี RAPD, มีการคิดค้น primers เพื่อที่จะใช้จำแนก *V. vulnificus* ออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่อาจ

จะก่อโรคได้ (clinical: C-strains) และสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (environmental: E-strains) (Rosche *et al.*, 2005) นอกจากนั้นยังใช้วิธีการตรวจหารูปแบบของ plasmid (plasmid profile) ใน *V. vulnificus* มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเป็น C และ E-strains ของเชื้อ (Depaola *et al.*, 2003; Biosca *et al.*, 1997) โดยอาศัยหลักการที่ว่า plasmid มีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบ gene marker ที่ใช้ในการจำแนกระหว่าง environmental strains และ clinical strains ได้ 100 % และยังไม่พบ virulence factor ที่ทำให้เชื้อ C-strains มีความสามารถในการก่อโรคมมากกว่า E-strains

ตารางที่ 1.3 ความแตกต่างของ *Vibrio vulnificus* biogroups^a

Test	Result for biotype ^b :		
	1	2	3
Ornithine decarboxylase	55	-	+
Production of Indole	+	-	+
D-Mannitol fermentation	45	-	-
D-Sorbitol fermentation	-	+	-
Citrate (Simmons)/	(+)	+	-
Salicin fermentation	+	+	-
Cellobiose fermentation	+	+	-
Lactose fermentation	(+)	+	-
ONPG ^c test	(+)	+	-

^a The first three tests are important for differentiating biotype 2 from biotypes 1 and 3. The remaining tests are important for differentiating biotype 3 from biotypes 1 and 2. Adapted from Bisharat *et al.*, 1999

^b Symbols: +, most (90% or greater) strains positive; (+), many strains (75 to 89.9%) positive; -, most strains negative (10% or less are positive). Numbers give the actual percentage of strains that are positive.

^c ONPG, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

1.2.3 พยาธิสภาพ

Vibrio vulnificus เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิด foodborne disease และ wound infection แม้ว่าจะมีการอัตราการติดเชื้อนี้ต่ำ เมื่อเทียบกับเชื้ออื่นใน Genus *Vibrio* แต่เชื้อนี้เป็นเชื้อก่อให้เกิดอัตราการตายสูงที่สุดใน foodborne disease ของสหรัฐอเมริกา (Todd, 1989) เชื้อสามารถก่อโรคได้ 3 แบบ ขึ้นกับลักษณะการติดเชื้อ ในการติดเชื้อโดยการกินน้ำ หรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ เชื้อสามารถ บุกรุกเข้าสู่ กระแสโลหิต ก่อให้เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการไข้ หนาวสั่น อ่อนเพลีย ความดันต่ำ อาเจียน และเสียชีวิตในที่สุด ซึ่งพบประมาณ 45 % ของการติดเชื้อ อัตราการตายจะสูงถึง 60% ภายใน 24 ชั่วโมง (Linkous *et al.*, 1999) เชื้อสามารถก่อให้เกิดโรค ภาวะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งพบประมาณ 12 % ของการติดเชื้อ พบอัตราการตายต่ำ และสามารถหายเองได้ (Strom *et al.*, 2000) เชื้อสามารถก่อให้เกิด การติดเชื้อที่บาดแผล (wound infection) เกิดจากบาดแผลที่มีการสัมผัสเชื้อที่มีการปนเปื้อนในอาหารทะเล หรือน้ำทะเล เชื้อสามารถลุกลามอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดเนื้อเยื่ออักเสบ ผิวหนังมีอาการบวม ร้อนแดง เจ็บปวด อาจกลายเป็นตุ่ม จนเกิดอาการเนื้อเน่าตายของเนื้อเยื่ออ่อน ได้ผิวหนัง พบว่ามีประมาณ 25 % ของการติดเชื้อ และอัตราการตายสูงถึง 45 % (Linkous *et al.*, 1999) การติดเชื้อที่บาดแผลอาจนำไปสู่ภาวะโลหิตเป็นพิษได้ หากเชื้อบุกรุกเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจะให้มีอัตราการตายสูงขึ้น

1.2.4 ปัจจัยก่อความรุนแรง

ความรุนแรงของโรคนั้นอยู่กับ 2 ปัจจัย ปัจจัยแรก คือ host ผู้ที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเลือดสูง จะมีอาการรุนแรง บุคคลเหล่านี้ ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีอาการตับอักเสบเรื้อรัง ตับแข็ง ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำก็จะมีอาการรุนแรงเช่นกัน ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ไตวาย เบาหวาน หรือผู้ทานยากดภูมิคุ้มกัน (Strom *et al.*, 2000; Linkous *et al.*, 1999) ปัจจัยที่สอง คือ สมบัติของเชื้อ สมบัติสำคัญที่ก่อความรุนแรง (virulence factors) ได้แก่ pili, capsule, endotoxin (lipopolysaccharide (LPS)), exoenzyme, toxin, และความสามารถในการใช้เหล็กในการเจริญ (Strom *et al.*, 2000; Linkous *et al.*, 1999)

เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จะใช้ pili ในการยึดเกาะ (attachment) และเพิ่มจำนวน (colonization) บนผิวของ host โดยเฉพาะ epithelial cells (Paranjpye and Strom, 2005) เชื้อจะมียีน *pilD* (originally designated *vvpD*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง pili ใช้ในการเข้ายึดเกาะกับเซลล์โฮสต์ กลุ่มยีน *pil* ประกอบด้วย *pilABCD* โดย *pilD* gene encode IV prepilin peptidase-N-methyltransferase เชื้อ *V. vulnificus* ที่ขาดหรือเกิดข้อบกพร่องของ *pilD* จะไม่สามารถสร้าง pili บนผิวเซลล์ได้ และทำให้การติดเชื้อในหนูลดลง (Paranjpye *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้ออาศัย outer membrane proteins (OMP) จับกับ fibronectin ของเซลล์ เพื่อยึดเกาะกับเซลล์ OMP ถูกสร้างจาก *ompU* gene พบว่าหากมีความผิดปกติของ

ompU gene เชื้อจะสูญเสียความสามารถในการเข้าทำลายเซลล์ (Goo *et al.*, 2006) นอกจากนั้นยังพบว่า หากมีความผิดปกติที่ *flgE* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้าง flagellar hook protein จะทำให้เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Lee *et al.*, 2004)

capsule มีองค์ประกอบเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์และมีความสำคัญเกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อ เป็นส่วนที่ช่วยให้เชื้อสามารถหลบหลีก phagocytic cells ในระบบภูมิคุ้มกันได้ (Amaro *et al.*, 1994) โคโลนีของเชื้อที่มี capsule จะมีลักษณะขุ่น (opaque) ส่วนที่ไม่มี capsule จะใส (translucent) (Rosche *et al.*, 2006), capsule จะป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดขาวมาจับกิน (antiphagocytosis) เชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมี capsule ในขณะที่เชื้อที่ไม่มี ความรุนแรงจะไม่มี capsule (Amaro *et al.*, 1994)

endotoxin หรือ Lipopolysaccharide (LPS) เป็นส่วนที่ก่อให้เกิด ภาวะ septic shock (Amaro *et al.*, 1997) ซึ่งพบได้ในเชื้อกลุ่ม Gram negative bacteria โดย LPS จะกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor พบว่าหากฉีด LPS ในหนู หนูจะเกิดภาวะความดันต่ำ และตายภายใน 1 ชั่วโมง (Amaro *et al.*, 1997)

เชื้อจะสร้าง exoenzyme เพื่อใช้ในการบุกรุก host cell (invasiveness) exoenzyme ที่สำคัญ คือ extracellular metalloprotease ซึ่งถูกสร้างจาก *vvp* gene โดยที่การแสดงออกของ *vvp* gene จะขึ้นอยู่กับปริมาณธาตุเหล็กในเซลล์ (Kim *et al.*, 2007) สามารถพบ *vvp* gene ได้ใน *V. vulnificus* ทั้ง clinical strain และ environmental strain (Shin *et al.*, 2005) พบว่าเชื้อในกลุ่ม *V. vulnificus* จะสร้างเอนไซม์ชนิด zinc metalloprotease เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ elastase, phospholipase, protease, collagenase ซึ่งจะทำให้เชื้อสามารถบุกรุกผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ จะทำให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์ตาย และก่อให้เกิด septicemia ในที่สุด

extracellular toxin สำคัญที่เชื้อสร้าง คือ cytotoxin ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 56 kDa สร้างจากยีน *vvhA* มีความเป็นพิษสูง มีสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Gray and Kreger, 1987) นอกจากนั้นยังสามารถทำลาย CHO cell (Gray and Kreger, 1985) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ vascular permeability ในหนูตะเภา (Gray *et al.*, 1985) และทำให้หนูขาว (mice) เสียชีวิตจากการเกิด edema และทำลาย capillary endothelial cells (Gray *et al.*, 1987; Kook *et al.*, 1996) โดย cytotoxin ไปกระตุ้น guanylate cyclase ทำให้ cyclic GMP เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิด vasodilation (Kook *et al.*, 1999)

เชื้อสามารถผลิต siderophore เพื่อเพิ่มความสามารถในการใช้ธาตุเหล็กในกระแสโลหิต ซึ่งความสามารถในการสร้าง siderophore (Biosca *et al.*, 1996) ถูกจัดเป็น virulence factor ที่สำคัญ การทดลองฉีดเชื้อ *V. vulnificus* เข้าสู่หนูที่มีปริมาณธาตุเหล็กในกระแสโลหิตสูงพบว่า ก่อให้อัตราการตายสูงถึง 100% อัตราการตายลดลง เมื่อปริมาณเหล็กในกระแสโลหิตต่ำลง (Biosca *et al.*, 1996; Bogard and Oliver, 2007) เชื้อสามารถสร้างได้ทั้ง hydroxamate และ phenolate siderophore (Simpson and Oliver, 1983; Litwin *et al.*, 1996) ซึ่งสร้างจาก *venB* gene

(Litwin *et al.*, 1996) และ *vuuA* gene เป็นยีนในกลุ่ม *vulnibactin-associated genes* (*vuuA*, *venB*, *vvsA* และ *vvsB*) พบว่าการทำลาย siderophores ทำให้ความรุนแรงของเชื้อลดลง (Biosca *et al.*, 1996; Litwin *et al.*, 1996; Bogard *et al.*, 2007; Miyoshi *et al.*, 1997) นอกจากนั้นเชื้อยังมี *fur* gene ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ferric uptake regulator ซึ่งมีความสำคัญในการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ (Goo *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามรายละเอียดกลไกที่ทำให้ธาตุเหล็กมีผลต่อการเจริญ และบุกรุกของเชื้อ ยังคงต้องทำการศึกษาต่อไป

1.2.5 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1.2.5.1 การตรวจเพาะเชื้อ

เชื้อ *Vibrio* เป็นเชื้อที่เจริญง่าย สามารถเลี้ยงได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว บางสปีชีส์สามารถเจริญได้ แม้ความเข้มข้นของเกลือต่ำ อย่างเช่น *V. cholerae*, และ *V. mimicus* แต่บางสปีชีส์ เช่น *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* และ *marine bacterium* ต้องการความเข้มข้นของ Na^+ อยู่ในช่วง 70 ถึง 300 mM ดังนั้น การตรวจหาเชื้อ *Vibrios* ในตัวอย่างอาหาร สิ่งแวดล้อม และสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย นิยมเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลว Alkaline Peptone Water (APW) ซึ่งมีเกลืออยู่ 0.5-2 % ก่อนแล้วจึงใช้เทคนิค most probable number (MPN) เพื่อหาปริมาณการปนเปื้อนเชื้อในตัวอย่าง (Kaysner and DePaola, 2004; <http://www.cfsan.fda.gov>) เชื้อ *Vibrio* สามารถเจริญได้บนอาหารหลายชนิดในห้องปฏิบัติการ อย่างเช่น MacConkey agar ที่ใช้เพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อให้ลักษณะโคโลนีไม่มีสี สามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่ผสมเลือด (Blood agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป คือ Nutrient agar ให้โคโลนีมีลักษณะกลม หนูน ขอบเรียบ สีครีม แต่บางสปีชีส์ เช่น *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* โคโลนีมีลักษณะแผ่ (swam) แต่ลักษณะการเจริญในอาหารเหล่านี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างในแต่ละสปีชีส์ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* ที่นิยมใช้แพร่หลายคือ Thiosulphate Citrate Bile-salt Sucrose (TCBS) มีเกลือน้ำดี ทำให้อาหารมีสภาวะที่เป็นด่าง pH สูง ช่วยในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae จึงเป็น selective medium ของเชื้อ *Vibrio* spp. สามารถดูลักษณะโคโลนี บน TCBS ได้ 2 อย่าง คือ เชื้อที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้ อย่างเช่น *V. cholerae* จะมีสีเหลือง แต่เชื้อไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้ เช่น *V. parahaemolyticus* *V. vulnificus* และ *V. mimicus* จะให้โคโลนีสีเขียว นอกจากนี้เชื้อในจีนัส *Vibrio* อาจแยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้ออื่น เช่น Cellobios Polymyxin B Colistin (CPC) ใช้ในการแยกเชื้อ *V. cholerae* และ *V. vulnificus* โดยโคโลนีของ *V. cholerae* จะมีสีม่วง เนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส เมื่อเทียบกับโคโลนีของ *V. vulnificus* ซึ่งมีสีเหลืองจากการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส (Donovan and van Netten, 1995) อาหารอีกชนิดที่นิยม คือ CHROMagar™ *Vibrio* ซึ่งเป็นอาหารที่มี substrate สำหรับเอนไซม์ β -galactosidase ทำให้สามารถคัดแยกเชื้อ *Vibrio* โดย *V. parahaemolyticus*

จะให้โคลนีสีม่วง ส่วน *V. vulnificus* จะให้โคลนีสีเขียวอมฟ้า ซึ่งเป็นสีที่ใกล้เคียงกับโคลน *V. cholerae* บนอาหาร CHROMagar™ Vibrio (Harwood *et al.*, 2004) ดังนั้น การยืนยันเชื้อต้องนำไปทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) ดังที่ระบุในตารางที่ 1.2 หรือนำไปทดสอบทางอณูชีววิทยาจึงสามารถวินิจฉัยชนิดของเชื้อได้

1.2.5.2 การตรวจทางอณูชีววิทยา

เนื่องจากวิธีทางชีวเคมี ใช้เวลานาน ผลที่ได้ยังมีความใกล้เคียงกันระหว่างเชื้อ *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ดังนั้น จึงมีการยืนยันโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา อันได้แก่ PCR, DNA hybridization เป็นต้น โดยใช้ส่วนของยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. vulnificus* เป็น marker ได้แก่ cytolysin gene (*vvhA*), *rpoS* gene, *gyrB* gene และ *toxR* gene

cytolysin gene (*vvhA*) เป็นยีนอนุรักษ์ (conserved sequence) จึงพบใน *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ โดยมีความไวของการทดสอบ 10 พีโคกรัม โดยไม่พบผลบวกปลอม (Panicker *et al.*, 2004b; Harwood *et al.*, 2004; Coleman *et al.*, 1996) การใช้ *rpoS* gene โดยวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และ lateral flow dipstick (LFD) assay ควบคู่กัน มีความไวในการทดสอบ 2.8 CFU/ reaction เมื่อทดสอบในหอย (Surasilp *et al.*, 2011) และ *gyrB* gene (encoding gyrase B or topoisomerase II) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ *gyrB* gene กับ *vvhA* gene พบว่ามีความไวและความจำเพาะของการทดสอบเท่ากัน และไม่พบผลบวกปลอมกับ *Vibrio* และ non-*Vibrio* species อื่นๆ (Parvathi *et al.*, 2005) *toxR* gene ซึ่งเป็นยีนอนุรักษ์ของ Vibrionaceae ทำหน้าที่เป็น transmembrane regulatory protein ที่อาศัยปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวควบคุมกิจกรรม ยีน *toxR* พบครั้งแรกใน *V. cholerae* โดยทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ cholera toxin และต่อมาพบว่าสามารถควบคุมการทำงานของยีนอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น *tcpA* (toxin-regulated pilus), *ompT* และ *ompU* (outer membrane proteins) (Miller and Mekalanos, 1988) โดยยีน *toxR* ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนก่อความรุนแรงของโรคโดยสร้างโปรตีน *toxR* ไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง upstream ของโปรโมเตอร์ของยีนก่อความรุนแรงของโรค (Lin *et al.*, 1993) จากการศึกษพบว่า *toxR* เป็น integral membrane protein ที่มีขนาด 32 kDa ประกอบด้วย 3 domain คือ N-terminal cytoplasmic DNA-binding domain, central transmembrane domain และ C-terminal periplasmic domain การบ่งชี้ *V. vulnificus* โดยใช้ *toxR* gene โดยวิธี real time-PCR ทดสอบกับเชื้อบริสุทธิ์ *V. vulnificus* (pure culture) มีความไว 5×10^3 copies/ μ l แต่หากตรวจสอบเชื้อจากตัวอย่างน้ำหรือเนื้อหอยโดยตรง จะให้ความไว 10 cells/ml (Takahashi *et al.*, 2005)

1.2.5.3 วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา

การใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (serology test) ในการตรวจสอบเชื้อในกลุ่มของ *V. vulnificus* ทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อ biotype 1 และ 3 มีความหลากหลายของ antigen บนผิว cell มาก ในขณะที่ biotype 2 (serogroup E) ไม่มีความหลากหลาย (Nishibuchi and Seidler, 1985) อย่างไรก็ตามสามารถแยกเชื้อ biotype 1 ออกจาก biotype 2 โดยที่อาศัยสมบัติในการสร้าง indole และผลิต ornithine decarboxylase ซึ่งเชื้อ biotype 1 สร้างแต่ biotype 2 ไม่สร้าง (Harwood *et al.*, 2004)

ตารางที่ 1.4 ตารางแสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *Vibrio vulnificus* คัดลอกจาก (Harwood *et al.*, 2004)

Medium abbreviation	pH	Incubation (°C)	Carbohydrate	Colony color	Reference
Thiosulphate citrate bile salt agar (TCBS)	8.6	37	Sucrose	Green	Kobayashi <i>et al.</i> , 1963
<i>Vibrio vulnificus</i> agar (VV)	8.6	37	Salicin	Grey, dark center	Brayton <i>et al.</i> , 1983
SDS polymyxin sucrose agar (SPS)	7.6	37	Sucrose	Blue with halo	Kitaura <i>et al.</i> , 1983
Cellobiose polymyxin B colistin agar (CPC)	7.6	40	Cellobiose	Yellow	Massad and Oliver, 1987
Modified cellobiose polymyxin B colistin agar (mCPC)	7.6	40	Cellobiose	Yellow	Tamplin <i>et al.</i> , 1991
<i>Vibrio vulnificus</i> enumeration agar (VVE)	8.5	37	Cellobiose, lactose, X-Gal	Blue green	Miceli <i>et al.</i> , 1993
Cellobiose colistin agar (CC)	8.5	40	Cellobiose	Yellow	Hoi <i>et al.</i> , 1998
<i>Vibrio vulnificus</i> medium (VVM)	8.5	37	Cellobiose	Yellow	Cerda-Cuellar <i>et al.</i> , 2000
<i>Vibrio vulnificus</i> medium+colistin (VVMc)	8.5	37	Cellobiose	Yellow	Cerda-Cuellar <i>et al.</i> , 2001

1.2.6 การรักษา

V. vulnificus มีอัตราการติดเชื้อต่ำแต่ มีความรุนแรงและมีอัตราการตายสูงหากไม่ได้รับการรักษาภายใน 24 ชั่วโมง หรือถ้าเป็นการติดเชื้อในบาดแผลอาจลุกลามจนต้องตัดอวัยวะส่วนนั้นทิ้ง ดังนั้น การวินิจฉัยที่ถูกต้องด้วยการส่งสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ และการรักษาที่ถูกต้องและยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการรักษา จึงมีความจำเป็นมาก ผลการศึกษาในหนู พบว่าควรให้ยาร่วมกัน 2 กลุ่ม ทำให้การรักษาการติดเชื้อ *V. vulnificus* ได้ผลดี คือ ให้ยากลุ่ม คือ cefotaxime ร่วมกับ minocycline จะให้ผลดีกว่าการให้ยาชนิดเดียว (Chuang *et al.*, 1997) ดังนั้น ยาต้านจุลชีพที่ CDC แนะนำให้ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *V. vulnificus* โดยประมวลข้อมูลจากการรักษาก่อนหน้านี้และจากสัตว์ทดลอง คือ doxycycline ร่วมกับ third-generation ของ cephalosporin เช่น ceftazidime หรือใช้ยาในกลุ่ม fluoroquinolone เช่น ciprofloxacin ร่วมกับ doxycycline หรือ cephalosporin แต่ในเด็กห้ามใช้ doxycycline และ fluoroquinolone สามารถใช้ trimethoprim-sulfamethoxazole ร่วมกับ aminoglycoside ได้ (CDC, 2009)

1.2.7 ความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ความไวต่อยาต้านจุลชีพเป็นปัจจัยหนึ่ง ที่สำคัญในการรักษาโรคให้ได้ผลดี หากเชื้อดื้อต่อยาจะทำให้การรักษาไม่ได้ผล หรือใช้เวลานาน แต่จากข้อมูลของการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ปรากฏมีเชื้อดื้อยา ตั้งแต่ปี 1912 แต่สำหรับ เชื้อ *V. vulnificus* พบว่ามีการดื้อยาไม่มากนัก ในปี 1986 Tison และ Kelly ทดสอบความไวของเชื้อ *V. vulnificus* 30 สายพันธุ์ ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม พบว่า *V. vulnificus* ไวต่อยา amikacin, ampicillin, carbenicillin, cephalothin, gentamicin, chloramphenicol, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole และ tetracycline แต่ดื้อต่อ colistin ซึ่งผลการศึกษานี้ พบว่าผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะไม่แตกต่างจากเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 33 สายพันธุ์ ซึ่งศึกษาโดย Hollis และคณะ ปี 1976 (Tison and Kelly, 1986; Hollis *et al.*, 1976) และ *V. vulnificus* ที่แยกได้ ในปี 1995-1998 ดื้อต่อยา clindamycin (MICs > 256 µg/mL) และไวต่อ ampicillin, carbenicillin, cephalothin, cefamandole, cefotaxime, ceftriaxone, cefoperazone, aztreonam, imipenem, gentamicin, amikacin, tetracycline, minocycline, chloramphenicol, fluoroquinolones, ofloxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin (Radu *et al.*, 1998; Chuang *et al.*, 1998; Morris and Tenney, 1985; Chiang and Chuang, 2003) เช่นเดียวกับในปี 2005-2006 เชื้อ *V. vulnificus* 151 สายพันธุ์ และ *V. parahaemolyticus* 168 สายพันธุ์ และยังคงไวต่อยาหลักที่ใช้รักษาอย่าง tetracycline, ciprofloxacin และ cefotaxime (Han *et al.*, 2007) เชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากดินและน้ำในประเทศฮ่องกง ไวต่อ tetracycline แต่ดื้อต่อ ampicillin และ erythromycin ในประเทศไทย การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Vibrio* spp. ที่แยกจากหอยนางรม

บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* 7 isolates พบเชื้อไวต่อ tetracycline oxytetracycline และ imipenem 100 % (สุดสายชล และ ธดาภรณ์, 2549) ต่อมา ปี 2549 ถึง 2550 รุ่งอรุณ และคณะ แยกเชื้อ *V. vulnificus* จากหอยนางรมหรือหอยตะเภาขาว จังหวัด สุราษฎร์ธานี โดยเก็บตัวอย่าง 5 จุด ในบริเวณอ่าวบ้านดอน จำนวน 360 ตัวอย่าง พบเชื้อ *V. vulnificus* 27.5 % นำเชื้อ *V. vulnificus* 297 isolates มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าทุก isolates ไวต่อ doxycycline, norfloxacin, ciprofloxacin และไวต่อ cefotaxime 84.5 % แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *V. vulnificus* ยังดื้อยาต้านจุลชีพน้อย (Khantho, 2008)

วัตถุประสงค์

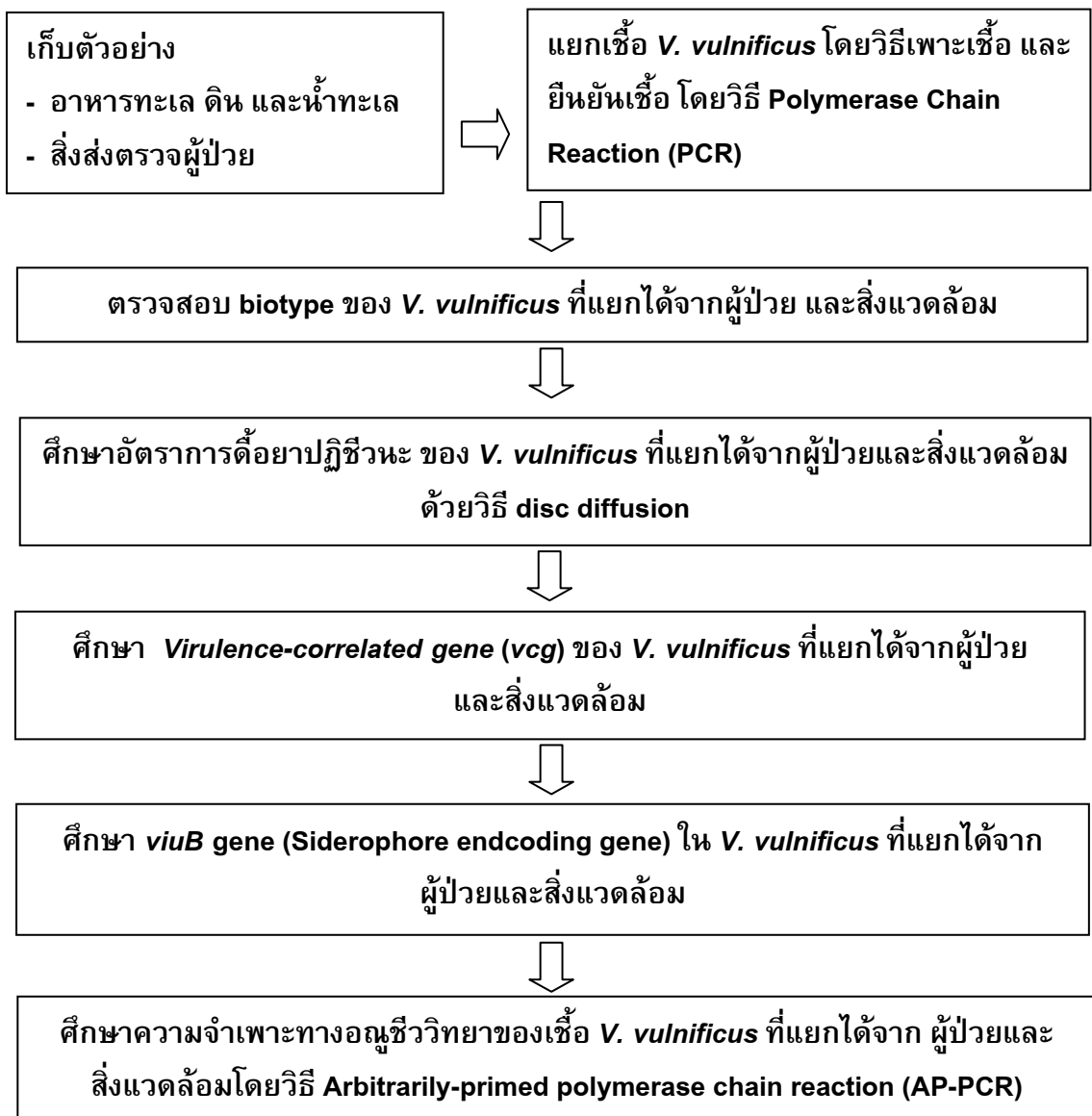
1. แยกเชื้อ *V. vulnificus* จากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อาหารทะเล น้ำทะเล ดินตะกอนทะเล
2. เปรียบเทียบลักษณะ และสมบัติ ของ *V. vulnificus* จากผู้ป่วยและที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
3. ศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *V. vulnificus* จากผู้ป่วยและที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

ขั้นตอนการวิจัย

คุณลักษณะของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการวิจัย

2.1 วัสดุ

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Agar	Difco
CHROMagar™ vibrio	CHROM agar
Luria Bertani (LB) broth	Novagen
Luria Bertani (LB) agar	Novagen
Mueller Hinton agar (MHA)	Difco
Mueller Hinton Broth (MHB)	Difco
Tryptone	Difco
Tryptic soy broth (TSB)	Difco
Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar	Difco

2.1.2 แผ่นยาด้านจุลชีพ

Ampicillin (10 µg)	Oxoid
Carbenicillin (100 µg)	Oxoid
Cefotaxime (30 µg)	Oxoid
Ceftazidime (30 µg)	Oxoid
Chloramphenicol (30 µg)	Oxoid
Ciprofloxacin (5µg)	Oxoid
Doxycycline (30 µg)	Oxoid
Erythromycin (15 µg)	Oxoid
Gentamicin (10 µg)	Oxoid
Imipenem (10 µg)	Oxoid
Sulphamethoxazole/Trimethoprim (25 µg)	Oxoid
Tetracycline (30 µg)	Oxoid

2.1.3 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

Absolute ethanol	Merck
Boric acid	Merck
Chloroform	Merck
Ethidium bromide	Sigma

Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	Merck
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Sigma
Isoamyl alcohol	Merck
Phenol	Sigma
Sodium acetate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium citrate dehydrate	Sigma
Sodium dodecyl sulfate	Sigma
Sodium hydroxide	Sigma

2.1.4 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

Agarose	Bioline
10X <i>Ex Taq</i> buffer	Takara
<i>Ex Taq</i> DNA polymerase	Takara
dNTPs	Amresco
λ <i>Hind</i> III ladder	New England Biolabs
100 kb DNA ladder	Amresco
Magnesium chloride	invitrogen
Primers	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA polymerase	invitrogen
<i>Pfu</i> DNA polymerase	ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
RNase	Merck
Tris base	Promega

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้

Target genes	Primer	Sequence(5'→3')	PCR Product (bp)	Reference
<i>vvh</i>	F- <i>vvh</i>	TTCCAACCTTCAAACCGAACTATGA	205	(Panicker <i>et al.</i> , 2004a)
	R- <i>vvh</i>	ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG		
<i>viuB</i>	F- <i>viuB</i>	GGTTGGGCACTAAAGGCAGATATA	504	(Panicker <i>et al.</i> , 2004a)
	R- <i>viuB</i>	CGGCAGTGGACTAATACGCAGC		
<i>vcg-C</i>	P1	AGCTGCCGATAGCGATCT	278	(Rosche <i>et al.</i> , 2005)
	P3	CGCTTAGGATGATCGGTG		
<i>vcg-E</i>	P2	CTCAATTGACAATGATCT	278	
	P3	CGCTTAGGATGATCGGTG		
AP-PCR	R-PSE420	TATCAGGCTGAAAATCTT	-	(Vickery <i>et al.</i> , 1998)
	Primer 2	GTTTCGCTCC	-	(Okuda <i>et al.</i> , 1997)
	Primer 4	AAG AGC CCG T	-	

2.2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- หลอด PCR ขนาด 0.2 ml
- Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 μ l (Socorex, Switzerland)
- ชุด Electrophoresis รุ่น 200/2.0 (Bio-Rad, USA)
- เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
- เครื่องวัด McFarland standard (Densimat) (bioMerieux)
- เครื่องชั่ง (Denver Instrument, USA)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Eppendorf 5415 C, Brickman Instrument Inc. Germany)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (MIKRO 22R, Germany)
- เครื่อง vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -20 °C (Sanyo, Japan)

- ตู้เย็นแช่แข็ง -80 °C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็น 4 °C (Sanyo, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking incubator) (Labline Instrument Inc. USA)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet) รุ่น ABS 1200A (ASTEC microflow, UK)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer, UK)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Satorus AG, Germany)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Perkin Elmer, UK และ ASTEC, Japan)
- เครื่อง UV light transilluminator (UVP) (San Gabriel Inc. USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1235 (Shel-Lab, USA)
- เครื่อง Hot plate & Stirrer (Fisher Scientific, USA)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)

2.3 แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

2.3.1 เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *V. vulnificus* ATCC 27562

2.3.2 เชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. vulnificus* DMST 31751, *V. vulnificus* DMST 31752, *V. vulnificus* DMST 31753, *V. vulnificus* DMST 32989, *V. vulnificus* DMST 32990, *V. vulnificus* DMST 32991 และได้รับการอนุเคราะห์ เก็บเชื้อ *V. vulnificus* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 4 สายพันธุ์ *V. vulnificus* PSU258, *V. vulnificus* PSU251, *V. vulnificus* PSU252, *V. vulnificus* PSU253

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่าง กุ้ง ปู ปลา หอยนางรม ดิน และน้ำทะเล ประเภทละ 4 ตัวอย่างต่อเดือน โดยเก็บตัวอย่าง กุ้ง ปู และ ปลา จากตลาดสดคลองเรียน ตลาดสดปลาช่า ตลาดสดกิมหยง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และเก็บตัวอย่างหอยนางรม ดิน และน้ำทะเล จากฟาร์ม หอยนางรม อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี ตรวจวัดอุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลในการเก็บ

ทุกครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลาเก็บตัวอย่าง 12 เดือน (กันยายน 2552 ถึง สิงหาคม 2553) รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 288 ตัวอย่าง

2.4.2 การแยกเชื้อ *V. vulnificus*

2.4.2.1 การแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่าง อาหารทะเล ดินตะกอน ทะเล และน้ำทะเล

นำตัวอย่างมาโดยไม่ต้องผ่านการล้างน้ำ ทำการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้ ตัวอย่างปลาจะใช้เหงือกและเนื้อบริเวณท้อง ตัวอย่างกุ้งใช้บริเวณหัว ตัวอย่างหอยใช้ส่วนเนื้อ ตัวอย่างปูใช้ส่วนที่ใช้หายใจ (นมปู) ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาณ 25 กรัม ผสมกับ APW+1% NaCl (pH 8.6) 225 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ระดับความเจือจาง 1:10 บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมา streak ลงบน CHROMagar™ Vibrio ทำ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการแยกเชื้อ *V. vulnificus* โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีฟ้า-เขียว จาก CHROMagar Vibrio ตัวอย่างละ 2 โคโลนี เก็บไว้เป็น stock culture เพื่อยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยวิธี PCR ต่อไป

2.4.2.2 การยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างผู้ป่วย

เชื้อ *V. vulnificus* ที่ได้จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วย ซึ่งได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้น ด้วยวิธีตรวจเพาะเชื้อทางชีวเคมีมาแล้ว นำมา streak ลงบน CHROMagar™ Vibrio บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการแยกเชื้อ *V. vulnificus* โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีฟ้า-เขียวจาก CHROMagar™ Vibrio ตัวอย่างละ 2 โคโลนี เก็บไว้เป็น stock culture เพื่อยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยวิธี PCR ต่อไป

2.4.3 การยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (อาหารทะเล น้ำ และดินตะกอนทะเล) และตัวอย่างจากผู้ป่วย มาทำการยืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. vulnificus* โดยวิธี PCR โดยใช้ *vvh* gene เป็นยีนเป้าหมาย

การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) สำหรับทดสอบ *vvh* gene เริ่มต้นโดยทำการเลี้ยงเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหาร LB broth+1% NaCl 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 °C เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 0.85% normal saline ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที นำออกมาทำให้เย็นทันทีในกล่องน้ำแข็ง (ice-bath) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที ดีเอ็นเอต้นแบบ ได้จากการนำส่วนใสที่ได้หลังจากการหมุนเหวี่ยง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 ไมโครลิตร (ซึ่งจะได้ระดับความเจือจาง 1:10)

นำดีเอ็นเอต้นแบบ มาตรวจหา *vvh* gene โดยใช้ primers F-*vvh* และ R-*vvh* (ตารางที่ 2.1) (Panicker *et al.*, 2004a) ใช้เชื้อ *V. vulnificus* ATCC 27562 เป็น positive control ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น negative control ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μ l)
DW	8.9
10X buffer	2.0
25 mM MgCl ₂	1.0
2.5 mM dNTPs	1.0
1 μ M <i>vvh</i> primers (forward และ reverse)	6.0
Taq DNA polymerase	0.1
DNA template	1.0
Total	20.0

สภาวะการทำ PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	94	5	1
2. Denature	94	1	} 30
3. Annealing	57	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

ตรวจสอบหา ผลผลิต PCR ของ *vvh* gene ขนาด 205 bp ด้วยวิธี electrophoresis ใน 1 % agarose gel และ TBE buffer ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที ในการแยก DNA นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide 3 นาที แล้วล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำแผ่น agarose gel ไปตรวจหา ผลผลิต PCR ภายใต้แสงยูวี โดยเปรียบเทียบกับผลผลิต PCR ของ *vvh* gene ที่ได้จากเชื้อควบคุม และแถบ DNA มาตรฐาน

2.4.4 การทดสอบ Biotype

นำ *V. vulnificus* ได้รับการยืนยันด้วยวิธี PCR แล้ว มาทดสอบชนิด biotype โดยตรวจสอบการผลิตสาร Indole (Indole test)

เลี้ยงเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหาร 1% tryptone + 1 % NaCl บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent สังเกตวงแหวนที่ด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผลบวกจะเห็นวงแหวนสีแดงด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และผลลบจะไม่เห็นวงแหวนสีแดง เชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ให้ผลบวกและ biotype 2 ให้ผลลบ (Angelo and Kaysner, 2009)

2.4.5 การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะ

ทดสอบความไวของ *V. vulnificus* ต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี disc diffusion โดยคัดเลือกยาปฏิชีวนะ 12 ชนิด ตามแนวทางของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) ซึ่งเป็นยาที่แนะนำให้ใช้กับเชื้อแบคทีเรีย Enterobacteriaceae และ Vibrionaceae ดังนี้ ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), gentamicin (10 µg), ceftazidime (30 µg), imipenem (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), doxycycline (30 µg), chloramphenicol (30 µg), carbenicillin (100 µg), erythromycin (15 µg), sulphamethoxazole/trimethoprim (25 µg), Tetracycline (30 µg)

2.4.5.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *V. vulnificus* 254 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 10 สายพันธุ์ จากผู้ป่วย และ 244 สายพันธุ์ จากสิ่งแวดล้อม ในอาหาร Mueller Hinton Broth ปริมาตร 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นระยะเวลา 3-5 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

2.4.5.2 วิธีการทดสอบ

ถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4.5.1 โดยใช้ไม้พันสำลีเกลี่ยเชื้อบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ทิ้งเพื่อให้ผิวหน้าแห้งเป็นระยะเวลา 3-5 นาที วางแผ่นยาปฏิชีวนะ ที่ต้องการศึกษาบนผิวหน้าอาหาร กดเบาๆ ให้แผ่นยาติดกับวุ้น แต่ละแผ่นวางห่างกัน 15-20 mm และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 15 mm นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง

2.4.5.3 การอ่านผล

สังเกตวงใสรอบแผ่นยา (clear zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วย vernier caliper นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐานใน CLSI 2009 ซึ่งแสดงผล 3 ลักษณะ คือ susceptibility (S) เมื่อเชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพ intermediate (I) เมื่อยาที่มีความไวปานกลาง และ resistant (R) เมื่อเชื้อดื้อต่อยาที่ใช้ทดสอบ

2.4.6 ศึกษา Virulence-correlated gene (vcg)

นำเชื้อที่ผ่านการยืนยันด้วยวิธี PCR โดยอาศัย *w/h* gene เป็นยืนยันเป้าหมาย มาทำการศึกษาค้นหา virulence-correlated gene (vcg) โดยใช้ primer *vcg-C* และ *vcg-E* (Rosche *et al.*, 2005)

ทำการสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform extraction (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al.*, 1989) โดยนำเชื้อที่ต้องการทดสอบเลี้ยงในอาหาร LB broth + 1 % NaCl ปริมาตร 1.5 ml เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 6-8 ชม. นำเชื้อไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,600 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม PBS pH 8.0 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,600 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PBS-EDTA (ภาคผนวก ข 2.3) ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข 2.4) ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากันอีกครั้งโดยการกลับหลอดไปมา (inverted technique) แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1; ปริมาตร: ปริมาตร: ปริมาตร) (ภาคผนวก ข 2.5) 450 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที ตูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 450 μ l และทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีกครั้ง ตูดสารละลายส่วนใสใสในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 M NaOAc (ภาคผนวก ข 2.6) ปริมาตร 40 μ l และ absolute ethanol ที่เย็นจัด 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยวางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 300 μ l ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติม RNase (ความเข้มข้น 1 mg/ml) ปริมาตร 3 μ l นำไปปมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการสกัดดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 300 μ l ตูดสารละลายส่วนใสใสในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนถึงสิ้นสุดขั้นตอนการล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้ววางทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 μ l (Tris-HCL EDTA) (ภาคผนวก ข 2.7) ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm เพื่อหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ การคำนวณหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ สามารถคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 nm ($Abs_{260\text{ nm}}$) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งมีค่า $Abs_{260\text{ nm}}$ เท่ากับ 1 จะมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 μ g/ml และคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้โดยการหาอัตราส่วนของ $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอ

บริสุทธิ์ แต่ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในระหว่างการเตรียมดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ ถ้าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่

นำ DNA template ที่เตรียมได้ในข้างต้นมาทำ PCR เพื่อหา *vcg* ใช้ไพรเมอร์ตามที่ระบุในตารางที่ 2.1 โดยเตรียมส่วนผสมในการทำ PCR ดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
DW	9.75
10X buffer	2.0
2.5 mM dNTPs	1.0
2 µM <i>vcg</i> -C หรือ <i>vcg</i> -E primers (forward และ reverse)	6.0
<i>Pfu</i> DNA polymerase	0.25
DNA	1.0
Total	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับ *vcg* gene ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	94	5	1
2. Denature	94	30 วินาที	} 30
3. Annealing	50	30 วินาที	
4. Extension	72	30 วินาที	
5. Final extension	72	7	1

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการทำให้ electrophoresis เช่นเดียวกับข้อ 2.4.3

2.4.7 การศึกษา *viuB* gene (Siderophore encoding gene)

เพื่อที่จะการศึกษาหาหินที่เกี่ยวข้องกับการก่อความรุนแรงของโรค คือ *viuB* gene (Panicker *et al.*, 2004b) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2.4.6 มาใช้เป็น DNA template โดยใช้ไพรเมอร์ ตามที่ระบุใน ตารางที่ 2.1 เตรียมส่วนผสมในการทำ PCR และสภาวะในการทำ PCR ดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
DW	9.75
10X buffer	2.0
2.5 mM dNTPs	1.0
2 µM <i>viuB</i> primers (forward และ reverse)	6.0
<i>Pfu</i> DNA polymerase	0.25
DNA	1.0
Total	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับ *viuB* gene

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	94	5	1
2. Denature	94	30 วินาที	} 30
3. Annealing	50	30 วินาที	
4. Extension	72	30 วินาที	
5. Final extension	72	7	1

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการทำให้ electrophoresis เช่นเดียวกับข้อ 2.4.3

2.4.8 การศึกษาความจำเพาะทางอนุชีววิทยาของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมโดยวิธี Arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) (ดัดแปลงจากวิธีของ William *et al.*, 1990)

นำเชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและหอยนางรม และเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ซึ่งผ่านการตรวจสอบ *vcg* และ *viuB* genes แล้ว (ตารางที่ 2.2 ตารางที่ 2.3 และตารางที่ 2.4) มาตรวจสอบความจำเพาะทางอนุชีววิทยา โดยวิธี AP-PCR

ตารางที่ 2.2 ชื่อ *Vibrio vulnificus* Biotype 1 จากสิ่งแวดล้อมซึ่งนำมาทดสอบ AP-PCR

Isolate	รหัส	แหล่งที่มา	จังหวัด
1	<i>V. vulnificus</i> PSU001	หอยนางรม 1	สุราษฎร์ธานี
2	<i>V. vulnificus</i> PSU003	หอยนางรม 2	สุราษฎร์ธานี
3	<i>V. vulnificus</i> PSU033	หอยนางรม 5	สุราษฎร์ธานี
4	<i>V. vulnificus</i> PSU034	หอยนางรม 6	สุราษฎร์ธานี
5	<i>V. vulnificus</i> PSU035	หอยนางรม 7	สุราษฎร์ธานี
6	<i>V. vulnificus</i> PSU038	หอยนางรม 8	สุราษฎร์ธานี
7	<i>V. vulnificus</i> PSU041	หอยนางรม 9	สุราษฎร์ธานี
8	<i>V. vulnificus</i> PSU043	หอยนางรม 11	สุราษฎร์ธานี
9	<i>V. vulnificus</i> PSU046	หอยนางรม 12	สุราษฎร์ธานี
10	<i>V. vulnificus</i> PSU070	หอยนางรม 13	สุราษฎร์ธานี
11	<i>V. vulnificus</i> PSU072	หอยนางรม 14	สุราษฎร์ธานี
12	<i>V. vulnificus</i> PSU077	หอยนางรม 17	สุราษฎร์ธานี
13	<i>V. vulnificus</i> PSU080	หอยนางรม 18	สุราษฎร์ธานี
14	<i>V. vulnificus</i> PSU081	หอยนางรม 19	สุราษฎร์ธานี
15	<i>V. vulnificus</i> PSU082	หอยนางรม 20	สุราษฎร์ธานี
16	<i>V. vulnificus</i> PSU104	หอยนางรม 21	สุราษฎร์ธานี
17	<i>V. vulnificus</i> PSU106	หอยนางรม 22	สุราษฎร์ธานี
18	<i>V. vulnificus</i> PSU109	หอยนางรม 23	สุราษฎร์ธานี
18	<i>V. vulnificus</i> PSU111	หอยนางรม 24	สุราษฎร์ธานี
20	<i>V. vulnificus</i> PSU125	หอยนางรม 25	สุราษฎร์ธานี
21	<i>V. vulnificus</i> PSU128	หอยนางรม 26	สุราษฎร์ธานี
22	<i>V. vulnificus</i> PSU129	หอยนางรม 27	สุราษฎร์ธานี
23	<i>V. vulnificus</i> PSU131	หอยนางรม 28	สุราษฎร์ธานี
24	<i>V. vulnificus</i> PSU156	หอยนางรม 30	สุราษฎร์ธานี
25	<i>V. vulnificus</i> PSU158	หอยนางรม 31	สุราษฎร์ธานี
26	<i>V. vulnificus</i> PSU165	หอยนางรม 33	สุราษฎร์ธานี
27	<i>V. vulnificus</i> PSU166	หอยนางรม 34	สุราษฎร์ธานี
28	<i>V. vulnificus</i> PSU182	หอยนางรม 37	สุราษฎร์ธานี
29	<i>V. vulnificus</i> PSU184	หอยนางรม 39	สุราษฎร์ธานี
30	<i>V. vulnificus</i> PSU208	หอยนางรม 41	สุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Isolate	รหัส	แหล่งที่มา	จังหวัด
31	<i>V. vulnificus</i> PSU209	หอยนางรม 42	สุราษฎร์ธานี
32	<i>V. vulnificus</i> PSU211	หอยนางรม 43	สุราษฎร์ธานี
33	<i>V. vulnificus</i> PSU213	หอยนางรม 44	สุราษฎร์ธานี
34	<i>V. vulnificus</i> PSU235	หอยนางรม 46	สุราษฎร์ธานี
35	<i>V. vulnificus</i> PSU237	หอยนางรม 47	สุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 2.3 เชื้อ *Vibrio vulnificus* Biotype 1 จากผู้ป่วยซึ่งนำมาทดสอบ AP-PCR

ลำดับ	รหัส	แหล่งที่มา	หน่วยงาน
1	DMST 31751	เลือด	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
2	DMST 31752	เลือด	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3	DMST 31753	เลือด	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
4	DMST 32989	เลือด	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
5	DMST 32990	เลือด	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
6	DMST 32991	เลือด	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
7	<i>V. vulnificus</i> PSU251	เลือด	โรงพยาบาลหาดใหญ่
8	<i>V. vulnificus</i> PSU252	เลือด	โรงพยาบาลหาดใหญ่
9	<i>V. vulnificus</i> PSU253	เลือด	โรงพยาบาลหาดใหญ่
10	<i>V. vulnificus</i> PSU258	อุจจาระ	โรงพยาบาลหาดใหญ่

ตารางที่ 2.4 เชื้อ *Vibrio vulnificus* biotype 2 จากสิ่งแวดล้อมซึ่งนำมาทดสอบ AP-PCR

Isolate	รหัส	แหล่งที่มา	จังหวัด
1	<i>V. vulnificus</i> PSU025	หอยนางรม 42	สุราษฎร์ธานี
2	<i>V. vulnificus</i> PSU039	ดิน 5	สุราษฎร์ธานี

เตรียมเชื้อ *V. vulnificus* และสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น (2.4.6) หาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm เจือจาง DNA ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/ μ l

เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R-PSE420 ไพรเมอร์ 2 และ ไพรเมอร์ 4 (ตารางที่ 2.1) มีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR สำหรับ AP-PCR มีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	15.0
10x <i>Ex Taq</i> buffer	3.0
2.5 mM dNTPs	4.0
5 mM primer R-PSE420 หรือ primer 2 หรือ primer 4	5.0
<i>Ex Taq</i> DNA polymerase	0.5
DNA	2.5
Total	30.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับ AP-PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	95	4	1
2. Denature	95	1	} 45
3. Annealing	36	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ : ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาจะมี slope time 5 นาที

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี electrophoresis ใน 1.5 % agarose gel และ 1x TBE โดยผสมผลผลิต PCR 15 µl กับ loading dye 2 µl หยอดใส่แผ่นเจล แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 2 ระดับ คือ 100 โวลต์ นาน 5-7 นาที จากนั้นปรับเป็น 15 mA ประมาณ 12-15 ซม. เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต

บทที่ 3

ผลการทดลอง

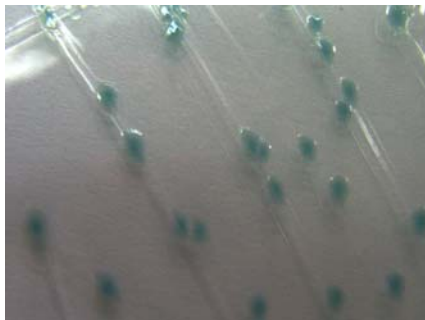
3.1 ผลการแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

3.1.1 ผลการแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างผู้ป่วย

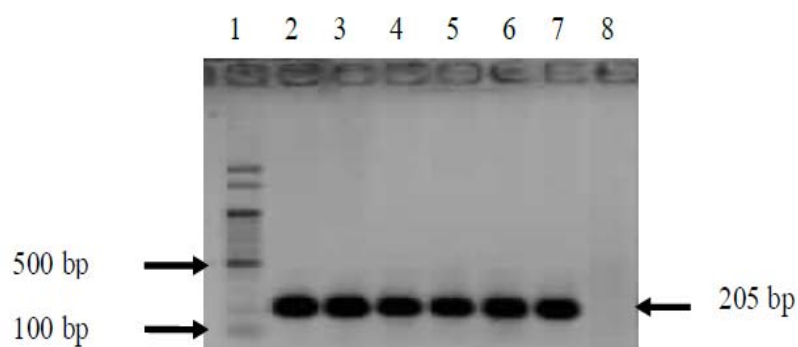
เชื้อ *V. vulnificus* แยกได้จากผู้ป่วย โดยโรงพยาบาลหาดใหญ่ 4 ไอโซเลท และได้รับความอนุเคราะห์ จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 6 ไอโซเลท รวม 10 ไอโซเลท นำมาทดสอบอีกครั้งบนอาหาร CHROMagar™ Vibrio เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีฟ้า-เขียว มายืนยันว่าเป็น *V. vulnificus* ด้วยการทำ PCR เพื่อหา *vh* gene พบว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท มี *vh* gene ดังนั้นจึงยืนยันว่าทั้ง 10 ไอโซเลท เป็น *V. vulnificus*

3.1.2 ผลการแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

เก็บตัวอย่าง กุ้ง ปู ปลา จากตลาดสดคลองเรียน ตลาดสดปลาซา ตลาดสดกิมหยง ตัวอย่างหอยนางรม ดิน และน้ำทะเล จากฟาร์มหอยนางรม อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี รวมทั้งหมด 288 ตัวอย่าง นำมาตรวจหา *V. vulnificus* โดยวิธีเพาะเชื้อ และคัดเลือก *V. vulnificus* บนอาหาร CHROMagar™ Vibrio (รูปที่ 3.1) และยืนยันว่าเป็น *V. vulnificus* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ *vh* gene เป็นยีนเป้าหมาย ซึ่งจะได้ผลผลิต PCR ขนาด 205 bp (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของ *V. vulnificus* บนอาหาร CHROMagar™ Vibrio มีโคโลนีลักษณะ สีฟ้า-เขียว



รูปที่ 3.2 ผลผลิต PCR *vvh* gene ของเชื้อ *V. vulnificus*

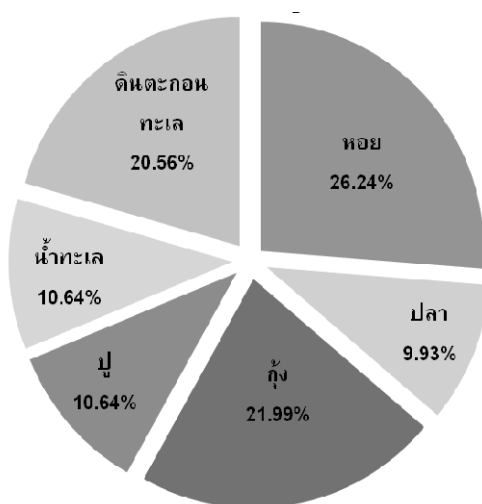
- ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder
- ช่องที่ 2-6 เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารทะเล
- ช่องที่ 7 *V. vulnificus* ATCC 27562
- ช่องที่ 8 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ผลการตรวจแยกเชื้อพบเชื้อ *V. vulnificus* จากสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 141 ตัวอย่าง (48.9 %) (ตารางที่ 3.2) โดยในตัวอย่างกุ้งพบเชื้อ 64.6 % (31/48) ปู 31.3 % (15/48) ปลา 29.2 % (14/48) หอยนางรม 77.1 % (37/48) น้ำทะเล 31.3 % (15/48) และดินตะกอนทะเล 60.4 % (29/48)

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Vibrio vulnificus* แยกตามชนิดตัวอย่าง

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบ <i>V. vulnificus</i>	จำนวน isolates
กุ้ง	48	31	53
ปู	48	15	25
ปลา	48	14	25
หอยนางรม	48	37	64
น้ำทะเล	48	15	26
ดินตะกอนทะเล	48	29	51
รวม	288	141 (48.9%)	244

เมื่อพิจารณาจากจำนวนตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *V. vulnificus* ทั้งหมด 141 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยนางรมมากที่สุด 26.2 % (37/144) รองลงมา คือ กุ้ง 21.9 % (31/141) ดินตะกอน 20.5 % (29/141) น้ำทะเล 10.6 % (15/141) ปู 10.6 % (14/141) และพบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในปลาน้อยที่สุด คือ 9.9 % (14/141) (รูปที่ 3.3)



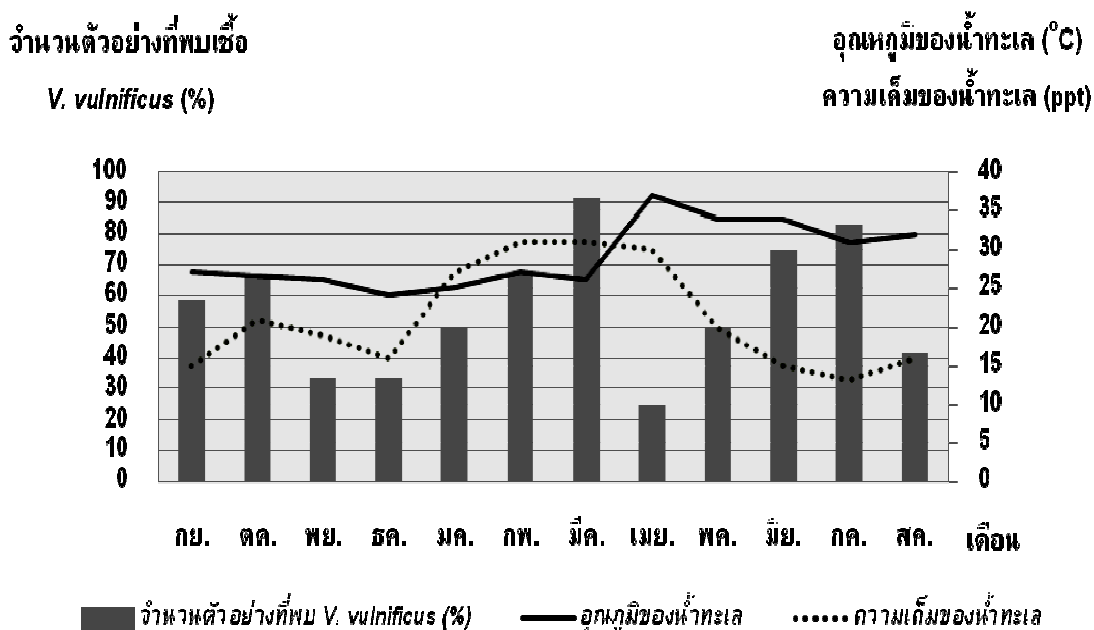
รูปที่ 3.3 แผนภูมิแสดงสัดส่วนการพบเชื้อ *V. vulnificus* ตามชนิดของตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่างอาหารทะเล ดินตะกอนทะเล และน้ำทะเล ในแต่ละเดือน เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ กันยายน 2552 จนถึงสิงหาคม 2553 แสดงให้เห็นว่าสามารถพบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในตัวอย่างอาหารทะเล ดินตะกอนทะเล และน้ำทะเลได้ทั้งปี (ตารางที่ 3.4) โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่างมากที่สุดในเดือนมีนาคม 87.5 % (21/24) รองลงมาเป็นกุมภาพันธ์ 66.7 % (16/24) ตามลำดับ พบการปนเปื้อนของเชื่อน้อยที่สุดในเดือนเมษายน 25 % (6/24) โดยทั้งในเดือนมีนาคมและกุมภาพันธ์ พบการปนเปื้อนในหอยมากที่สุด 16.7 % (4/24) และในเดือนเมษายน พบการปนเปื้อนในหอย 8.3 % (2/24)

ตารางที่ 3.2 จำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในแต่ละเดือน ตั้งแต่เดือน กันยายน 2552 ถึงเดือนสิงหาคม 2553

จำนวนตัวอย่าง ที่พบ <i>V. vulnificus</i>	กุ้ง (n=4)	ปู (n=4)	ปลา (n=4)	หอย (n=4)	น้ำทะเล (n=4)	ดิน ตะกอน (n=4)	รวม (n=24)
ก.ย - 52	3	3	0	4	0	3	13
ต.ค - 52	3	0	1	4	1	3	12
พ.ย - 52	2	3	1	3	0	1	10
ธ.ค - 52	1	2	0	2	0	2	7
ม.ค - 53	4	0	0	4	0	2	10
ก.พ - 53	4	0	4	4	0	4	16
มี.ค - 53	4	3	3	4	4	3	21
เม.ย - 53	2	1	0	2	0	1	6
พ.ค - 53	3	0	0	2	0	4	9
มิ.ย - 53	2	0	2	2	4	3	13
ก.ค - 53	1	1	1	4	4	2	13
ส.ค - 53	2	2	2	2	2	1	11
รวม (%)	31/48 (64.6)	15/48 (31.3)	14/48 (29.2)	37/48 (77.3)	15/48 (31.3)	29/48 (60.4)	141/ 288 (49.0)

จากการวิเคราะห์ปัจจัยความเค็มของน้ำ และอุณหภูมิของน้ำทะเล ต่อการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยนางรม ดินตะกอนทะเล และน้ำทะเล ในเดือนมีนาคม ซึ่งมีการปนเปื้อนในตัวอย่างมากที่สุด อุณหภูมิของน้ำทะเลในฟาร์มหอย เท่ากับ 26 °C และน้ำทะเลมีความเค็ม 31 ppt (รูปที่ 3.4) พบการปนเปื้อนของเชื้อต่ำสุดในเดือนเมษายน โดยที่ในเดือนนี้ น้ำทะเลในฟาร์มมีอุณหภูมิ 37 °C และความเค็ม 30 ppt ตามลำดับ (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเค็มของน้ำทะเลและการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอย น้ำทะเล และดินตะกอน จากฟาร์มหอยนางรม จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตั้งแต่เดือนกันยายน 2552 ถึงเดือนสิงหาคม 2553

3.2 ผลการทดสอบไบโอไทป์ (biotype)

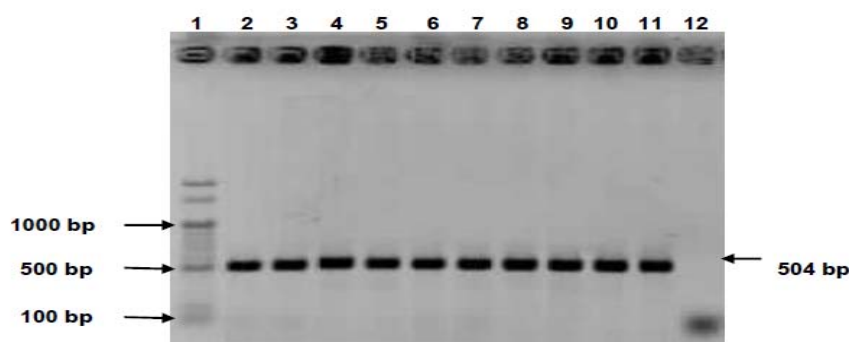
นำเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วย 10 ไอโซเลท และจากสิ่งแวดล้อม 244 ไอโซเลท รวมทั้งหมด จำนวน 254 ไอโซเลท มาทดสอบไบโอไทป์ ด้วยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้การพิจารณาจากความสามารถในการผลิตสาร Indole ของเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อ ใน 1 % tryptone + 1 % NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 จะให้ผลบวกส่วน biotype 2 ให้ผลลบ (Angelo *et al.*, 2009) และใช้ *V. vulnificus* ATCC 27562 เป็นสายพันธุ์ควบคุมผลบวก พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วยทั้ง 10 ไอโซเลท เป็น *V. vulnificus* biotype 1 และ *V. vulnificus* จากสิ่งแวดล้อม 244 ไอโซเลท มี 242 ไอโซเลท (99.2 %) เป็น biotype 1 และมี 2 ไอโซเลท (0.8 %) ที่แยกได้จากหอย และดินจากฟาร์มหอยนางรม จังหวัดสุราษฎร์ธานี ในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน 2553 เป็น biotype 2 (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 แสดงไบโอไทป์ของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อม

แหล่งที่มาของ <i>V. vulnificus</i>	Biotype	
	1	2
1. <i>V. vulnificus</i> ที่แยกจากผู้ป่วย (n=10)	10	0
โรงพยาบาลหาดใหญ่	4	0
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	6	0
2. <i>V. vulnificus</i> ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม (n=244)	242	2
กุ้ง	53	0
ปู	25	0
ปลา	25	0
หอย	63	1
น้ำทะเล	26	0
ดินตะกอนทะเล	50	1

3.3 ผลการตรวจสอบ *vcg* และ *viuB* gene ของ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม และจากผู้ป่วย

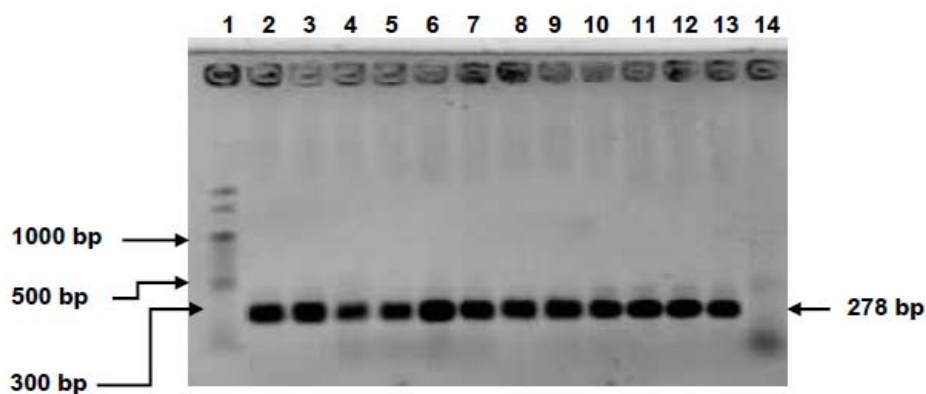
พบว่า *V. vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วยทั้ง 10 ไอโซเลท มี *viuB* gene ส่วน *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 244 ไอโซเลท มี *viuB* gene 231 ไอโซเลท (95 %) (รูปที่ 3.5) และสามารถพบ *viuB* gene ในเชื้อ biotype 2 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมทั้ง 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.4)



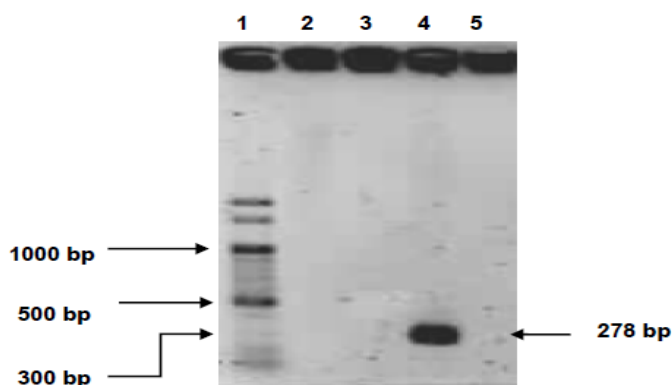
รูปที่ 3.5 ผลผลิต PCR *viuB* gene ของเชื้อ *V. vulnificus*

- ช่องที่ 1 DNA ladder (100 bp)
- ช่องที่ 2 –10 เชื้อจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ให้ผลบวก *viuB* gene
- ช่องที่ 11 *V. vulnificus* ATCC 27562 ผลบวก *viuB* gene.
- ช่องที่ 12 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ในการวิเคราะห์ชนิดของ *vcg* ในเชื้อ *V. vulnificus* โดยวิธี PCR จะอาศัย primer 2 ชุด ชุดแรกตรวจหา *vcg-C* gene clinical type (C-type) ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 278 bp (รูปที่ 3.6) และ primer ชุดที่ 2 ตรวจหา *vcg-E* gene environmental type (E-type) ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 278 bp (รูปที่ 3.7) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้ง 10 ไอโซเลท และที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 244 ไอโซเลท (100 %) เป็น C-type (ตารางที่ 3.4)



รูปที่ 3.6 ผลผลิต PCR *vcg-C* ของเชื้อ *V. vulnificus* ขนาด 278 bp
 ช่องที่ 1 DNA ladder (100 bp)
 ช่องที่ 2-12 เชื้อจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ให้ผลบวก *vcg-C*
 ช่องที่ 13 *V. vulnificus* DMST 31751 ผลบวก *vcg-C*
 ช่องที่ 14 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ



รูปที่ 3.7 ผลผลิต PCR *vcg-E* ของเชื้อ *V. vulnificus* ขนาด 278 bp
 ช่องที่ 1 DNA ladder (100 bp)
 ช่องที่ 2-3 เชื้อจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ให้ผลลบ *vcg-E*
 ช่องที่ 4 *V. vulnificus* ATCC 27562 ให้ผลบวก *vcg-E*
 ช่องที่ 5 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ตารางที่ 3.4 ผลการศึกษาลักษณะจำเพาะทางอณูชีววิทยาของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่ได้จากผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อม

ชนิดของ	<i>V. vulnificus</i> ที่แยกได้ จากผู้ป่วย (isolates)			<i>V. vulnificus</i> ที่แยกได้ จากสิ่งแวดล้อม (isolates)		
	<i>vcg-C</i>	<i>vcg-E</i>	<i>viuB+</i>	<i>vcg-C</i>	<i>vcg-E</i>	<i>viuB+</i>
Biotype 1	10	0	10	242	0	229
Biotype 2	0	0	0	2	0	2
Total	10 (100 %)	0	10 (100 %)	244 (100 %)	0	231 (95 %)

3.4 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *V. vulnificus* ต่อยาปฏิชีวนะ 12 ชนิด

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 244 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในระหว่างปี 2552-2553 ทุกสายพันธุ์ให้ผลไวต่อยาหลักที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อคือ doxycycline, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, sulphamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมให้ผลดีต่อ carbenicillin สูงที่สุด และดีต่อยา ampicillin, gentamicin และ erythromycin ลดลงตามลำดับ วิเคราะห์ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ได้กล่าวไปในเบื้องต้น พบว่ามีรูปแบบของการดีต่อยาในเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 6 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 ไวต่อยาที่ทดสอบทุกชนิด (0.8 %) แบบที่ 2 ดีต่อ carbenicillin (17.6 %) แบบที่ 3 ดีต่อ ampicillin (9.8 %) แบบที่ 4 ดีต่อ erythromycin (0.8 %) แบบที่ 5 gentamicin (2.9 %) แบบที่ 6 ดีต่อ carbenicillin และ ampicillin (4.5 %) และแบบที่ 7 ดีต่อ carbenicillin ampicillin และ gentamicin (0.8%) (ตารางที่ 3.5)

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 10 สายพันธุ์ ต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด พบว่าทุกสายพันธุ์ให้ผลไวต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 12 ชนิด แต่มีบางสายพันธุ์ให้ผลไวปานกลางต่อ carbenicillin (50 %) และ erythromycin (30 %)

ตารางที่ 3.5 แสดงแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม

รูปแบบ	แบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ	จำนวน (%)
1	susceptibility to all antibiotics	2 (0.8)
2	carbenicillin	43 (17.6)
3	ampicillin	24 (9.8)
4	erythromycin	2 (0.8)
5	gentamicin	7 (2.9)
6	carbenicillin, ampicillin	11 (4.5)
7	gentamicin, carbenicillin, ampicillin	2 (0.8)

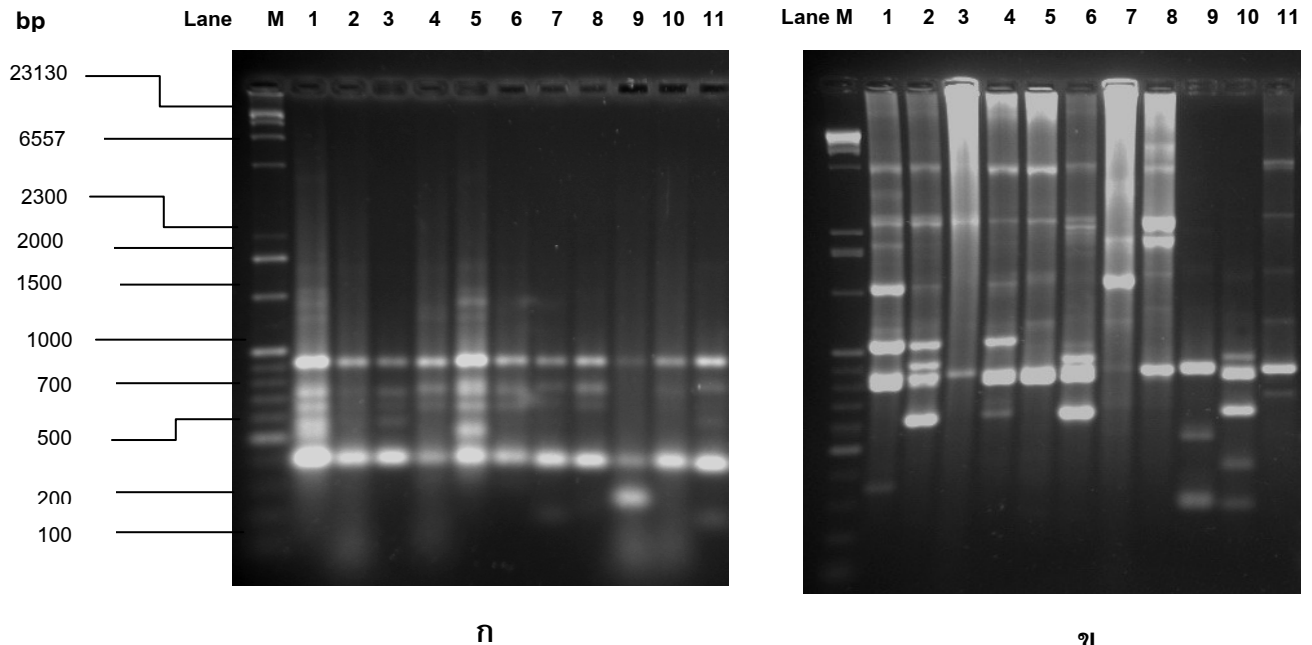
3.5 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม โดยใช้วิธี Arbitrarily-primed-polymerase chain reaction (AP-PCR) (ดัดแปลงจากวิธีของ (Welsh and McClelland, 1990)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* ทำในเชื้อ *V. vulnificus* 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เชื้อ *V. vulnificus* 11 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 10 ไอโซเลท และ *V. vulnificus* ATCC 27562 1 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 2 เชื้อ *V. vulnificus* 37 ไอโซเลท ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ซึ่ง ในแต่ละเดือนรวมทั้งสิ้น 12 เดือน การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอทำโดยเทคนิค AP-PCR ใช้ไพรเมอร์ R-PSE420, ไพรเมอร์ 2 และไพรเมอร์ 4

3.5.1 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วย

ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. vulnificus* กลุ่มที่ 1 คือ เชื้อ *V. vulnificus* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 10 ไอโซเลท และ *V. vulnificus* ATCC 27562 1 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 11 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ R-PSE420 ซึ่งมีขนาด 18 เบส แสดงให้เห็นว่า ทั้ง 11 ไอโซเลท ให้ชั้นดีเอ็นเอ จำนวน 3-6 ชั้น ชั้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 100-1500 คู่เบส และในทั้ง 11 ไอโซเลท จะพบชั้นดีเอ็นเอขนาด 400 และ 900 คู่เบส (รูปที่ 3.8-ก) เมื่อใช้ไพรเมอร์ 2 ซึ่งมีขนาด 10 เบส มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 11 ไอโซเลท พบว่าแต่ละไอโซเลทให้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยให้ชั้นดีเอ็นเอ จำนวน 2-8 ชั้น ขนาด 300-9,000 คู่เบส และพบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ในเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 10 ไอโซเลท (91%) (รูปที่ 3.8-ข) จากการใช้

primer 2 ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าไม่มีไอโซเลทใด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย



รูปที่ 3.8 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* แยกได้จากผู้ป่วย โดยใช้ไพรเมอร์ R-PSE420 (ก) และไพรเมอร์ 2 (ข)

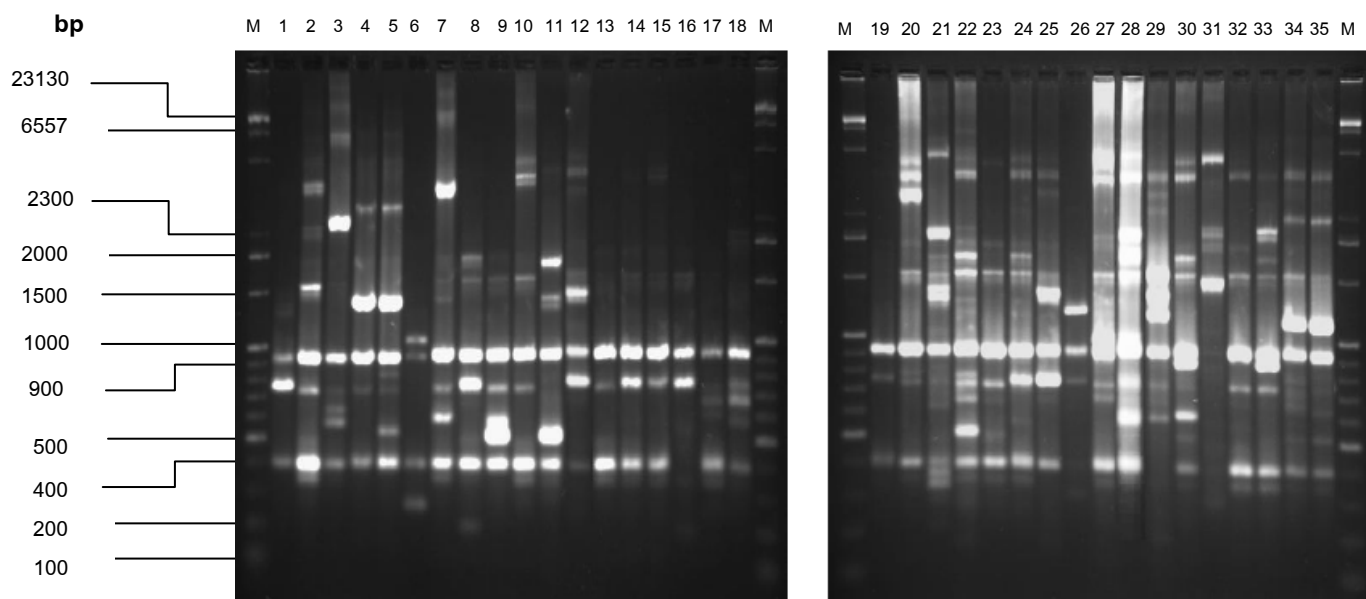
- Lane M : MW marker (λ HindIII +100 bp DNA ladder)
- Lane 1 : *V. vulnificus* DMST 31751 Lane 7 : *V. vulnificus* PSU258
- Lane 2 : *V. vulnificus* DMST 31752 Lane 8 : *V. vulnificus* PSU251
- Lane 3 : *V. vulnificus* DMST 31753 Lane 9 : *V. vulnificus* PSU252
- Lane 4 : *V. vulnificus* DMST 32989 Lane 10 : *V. vulnificus* PSU253
- Lane 5 : *V. vulnificus* DMST 32990 Lane 11 : *V. vulnificus* ATCC 27562
- Lane 6 : *V. vulnificus* DMST 32991

3.5.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม

3.5.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม

3.5.2.1 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ที่แยกได้จากหอยนางรม

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ที่แยกได้จากหอยนางรม จำนวน 35 ไอโซเลท และด้วยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R-PSE420 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส ใน 34 ไอโซเลท (97 %) และพบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ใน 32 ไอโซเลท (91 %) มีเพียง 1 ไอโซเลท คือ *V. vulnificus* PSU209 (รูปที่ 3.9 lane 31) ที่ไม่พบชิ้นดีเอ็นเอทั้งขนาด 400 และ 900 คู่เบส จากผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่า มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 32 รูปแบบ โดยแต่ละรูปแบบให้ชิ้นดีเอ็นเอ จำนวน 3–8 ชิ้น ที่มีขนาด 100–9000 คู่เบส โดยพบว่ามี 5 ไอโซเลท ที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน และสามารถจัดรูปแบบได้เป็น 2 กลุ่มย่อย รูปแบบย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *V. vulnificus* PSU080, PSU081, PSU082 (รูปที่ 3.9 lane 13, 14, 15) และรูปแบบย่อยที่ 2 ประกอบด้วย *V. vulnificus* PSU235, PSU237 (รูปที่ 3.9 lane 34 และ 35)



รูปที่ 3.9 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ที่แยกจากหอยนางรม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้ไพรเมอร์ R-PSE420

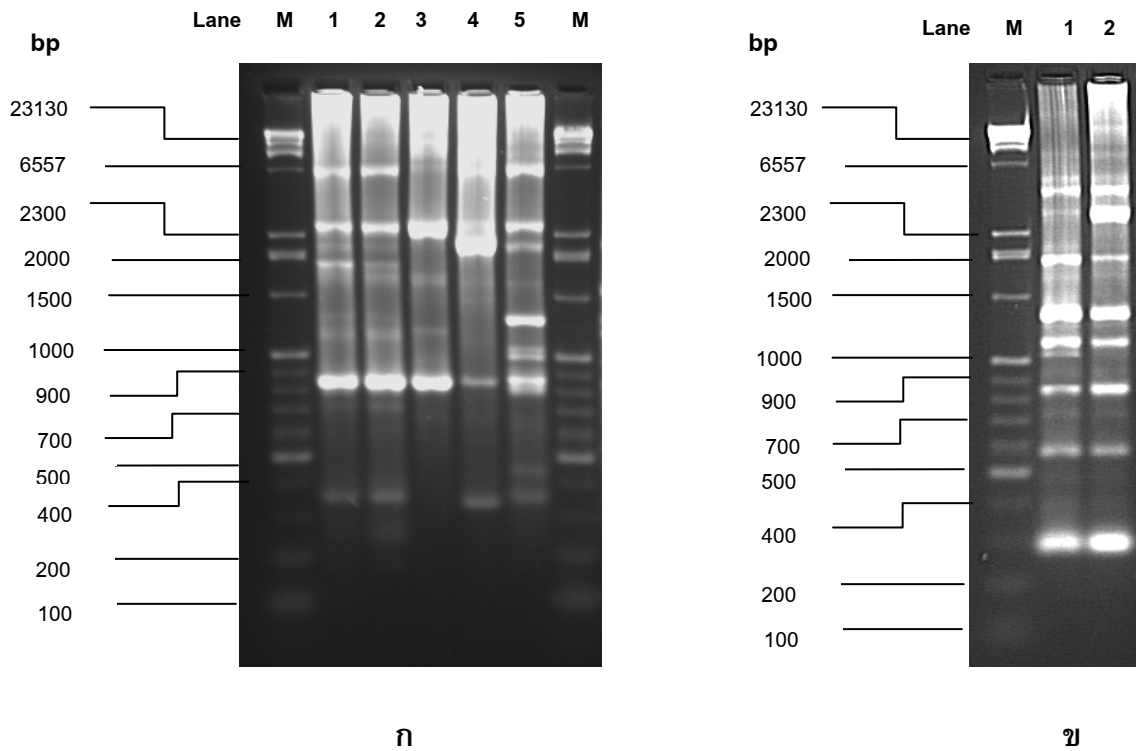
Lane M:	MW marker (λ HindIII + 100 bp DNA ladder)		
Lane 1:	<i>V. vulnificus</i> PSU001	Lane 14:	<i>V. vulnificus</i> PSU081
Lane 2:	<i>V. vulnificus</i> PSU003	Lane 15:	<i>V. vulnificus</i> PSU082
Lane 3:	<i>V. vulnificus</i> PSU033	Lane 16:	<i>V. vulnificus</i> PSU104
Lane 4:	<i>V. vulnificus</i> PSU034	Lane 17:	<i>V. vulnificus</i> PSU106
Lane 5:	<i>V. vulnificus</i> PSU035	Lane 18:	<i>V. vulnificus</i> PSU109
Lane 6 :	<i>V. vulnificus</i> PSU038	Lane 19:	<i>V. vulnificus</i> PSU111
Lane 7:	<i>V. vulnificus</i> PSU041	Lane 20:	<i>V. vulnificus</i> PSU125
Lane 8:	<i>V. vulnificus</i> PSU043	Lane 21:	<i>V. vulnificus</i> PSU128
Lane 9:	<i>V. vulnificus</i> PSU046	Lane 22:	<i>V. vulnificus</i> PSU129
Lane 10:	<i>V. vulnificus</i> PSU070	Lane 23:	<i>V. vulnificus</i> PSU131
Lane 11:	<i>V. vulnificus</i> PSU072	Lane 24:	<i>V. vulnificus</i> PSU156
Lane 12:	<i>V. vulnificus</i> PSU077	Lane 25:	<i>V. vulnificus</i> PSU158
Lane 13:	<i>V. vulnificus</i> PSU080	Lane 26:	<i>V. vulnificus</i> PSU165
		Lane 27:	<i>V. vulnificus</i> PSU166
		Lane 28:	<i>V. vulnificus</i> PSU182
		Lane 29:	<i>V. vulnificus</i> PSU184
		Lane 30:	<i>V. vulnificus</i> PSU208
		Lane 31:	<i>V. vulnificus</i> PSU209
		Lane 32:	<i>V. vulnificus</i> PSU210
		Lane 33:	<i>V. vulnificus</i> PSU213
		Lane 34:	<i>V. vulnificus</i> PSU235
		Lane 35:	<i>V. vulnificus</i> PSU237

เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ที่ให้รูปแบบย่อยที่ 1 เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน จึงตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อในรูปแบบย่อยที่ 1 (*V. vulnificus* PSU080, *V. vulnificus* PSU081 และ *V. vulnificus* PSU082) โดยไพรเมอร์ 2 ด้วยวิธี AP PCR (รูปที่ 3.10-ก lane 1, 2 และ 3) พบว่าสายพันธุ์ PSU082 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างไป ส่วนสายพันธุ์ PSU080 และ PSU081 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 4 มาทดสอบหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ PSU080 และ PSU081 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ PSU080 และ PSU081 เป็นคนละสายพันธุ์กัน เนื่องจากให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3.10-ข lanes 1 และ 2)

เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ที่ให้รูปแบบย่อยที่ 2 เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน จึงตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อในรูปแบบย่อยที่ 2 (*V. vulnificus* PSU235 และ *V. vulnificus* PSU237) โดย primer 2 ด้วยวิธี AP PCR พบว่าสายพันธุ์ PSU235 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจาก สายพันธุ์ PSU237 แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ PSU235 และ PSU237 เป็นคนละสายพันธุ์กัน เนื่องจากให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3.11-ก lanes 4 และ 5)

3.5.2.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ที่แยกได้จาก หอยนางรม และดินตะกอน

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ที่แยกได้จากหอยนางรม จำนวน 2 ไอโซเลท (*V. vulnificus* PSU025 และ *V. vulnificus* PSU039) ด้วยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R-PSE420 พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แสดงว่าสายพันธุ์ PSU025 และ PSU039 เป็นคนละสายพันธุ์ ทั้งสองสายพันธุ์ให้ชั้นดีเอ็นเอ จำนวน 2 – 3 ชั้น มี ขนาด 200 – 900 คู่เบส (รูปที่ 3.12-ก) และเมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองสายพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ 2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า PSU025 และ PSU039 เป็นคนละสายพันธุ์ เนื่องจากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกัน โดยแต่ละสายพันธุ์ให้ชั้นดีเอ็นเอ จำนวน 7–18 ชั้น ที่มีขนาด 100–6500 คู่เบส (รูปที่ 3.12-ข)



รูปที่ 3.10-ก AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ที่แยกจากหอยนางรม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้ไพรเมอร์ 2

Lane M: MW marker (λ HindIII +100 bp DNA ladder)

Lane 1 : *V. vulnificus* PSU080

Lane 4 : *V. vulnificus* PSU235

Lane 2 : *V. vulnificus* PSU081

Lane 5 : *V. vulnificus* PSU237

Lane 3 : *V. vulnificus* PSU082

รูปที่ 3.10-ข AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ที่แยกจากหอยนางรม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้ไพรเมอร์ 4

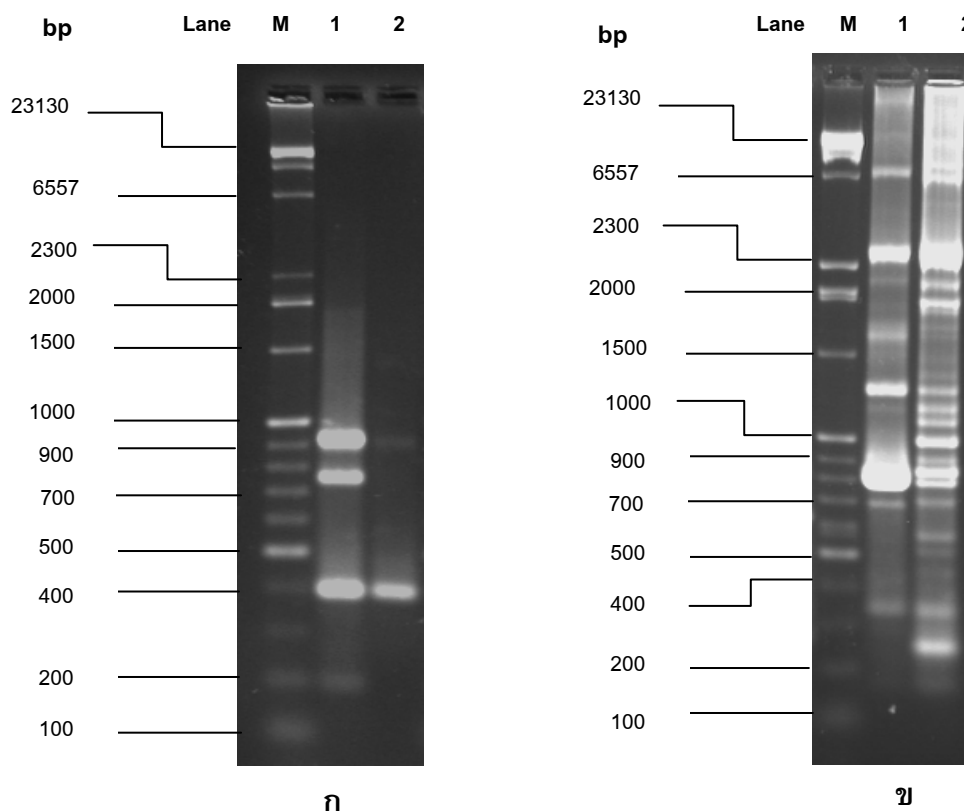
Lane M : MW marker (λ HindIII +100 bp DNA ladder)

Lane 1 : *V. vulnificus* PSU080

Lane 2 : *V. vulnificus* PSU081

3.5.2.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ที่แยกได้จากหอยนางรม และดินตะกอน

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ที่แยกได้จากหอยนางรม จำนวน 2 ไอโซเลท (*V. vulnificus* PSU025 และ *V. vulnificus* PSU039) ด้วยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R-PSE420 พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แสดงว่าสายพันธุ์ PSU025 และ PSU039 เป็นคนละสายพันธุ์ ทั้งสองสายพันธุ์ให้ชั้นดีเอ็นเอ จำนวน 2 – 3 ชั้น มีขนาด 200 – 900 คู่เบส (รูปที่ 3.11-ก) และเมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองสายพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ 2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า PSU025 และ PSU039 เป็นคนละสายพันธุ์ เนื่องจากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกัน โดยแต่ละสายพันธุ์ให้ชั้นดีเอ็นเอ จำนวน 7–18 ชั้น ที่มีขนาด 100–6500 คู่เบส (รูปที่ 3.11-ข)



รูปที่ 3.11 AP-PCR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ที่แยกจากหอยนางรมและดินตะกอนทะเล ในจังหวัดสุราษฎร์ธานีด้วยไพรเมอร์ R-PSE420 (รูปที่ 3.11-ก) และ ไพรเมอร์ 2 รูปที่ (3.11-ข)

Lane M : MW marker (λ HindIII +100 bp DNA ladder)

Lane 1 : *V. vulnificus* PSU025 Lane 2 : *V. vulnificus* PSU039

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

Vibrio vulnificus เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิด foodborne disease ที่มีอัตราการตายสูงที่สุดในกลุ่ม foodborne disease ของสหรัฐอเมริกา (Todd, 1989) เนื่องจากผู้ติดเชื้อบางรายมีโรคประจำตัวที่สำคัญ อย่างโรคตับ โรคเบาหวาน ทำให้มีภูมิคุ้มกันต่ำ เมื่อติดเชื้อมักมีอาการรุนแรง และเสียชีวิตจากภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม halophile สามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* ได้จากสิ่งแวดล้อม อาทิ เช่น น้ำทะเล ตะกอนใต้ทะเล และแพลงตอนสัตว์ สัตว์น้ำหลายชนิด กุ้ง ปู ปลา และ โดยเฉพาะหอย ซึ่งพบว่าหอยนางรมเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ (Hlady, W. G. et al., 1996; Chan et al., 1989; Panicker et al., 2004a; Muench, 1989; Johnston et al., 1985) การศึกษาครั้งนี้ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่างอาหารทะเล กุ้ง ปู และปลา ที่จำหน่ายในตลาดสด จังหวัดสงขลา และสิ่งแวดล้อมทางทะเล ได้แก่ น้ำทะเล ดินตะกอนทะเล และหอยนางรม ซึ่งเก็บจากฟาร์มเลี้ยงหอยนางรม ในอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตั้งแต่สิงหาคม 2552 ถึงกันยายน 2553 จำนวน 288 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบโดยวิธีการเพาะแยกและคัดเลือกเชื้อในขั้นตอนแรกด้วย CHROMagar™ *Vibrio* ซึ่ง *V. vulnificus* จะให้โคโลนีลักษณะ สีฟ้า-เขียว จากนั้นจึงยืนยันเชื้อโดยวิธี PCR โดยใช้ส่วนของ hemolysin gene (*vvh*) เป็น ยีนเป้าหมาย (marker gene) (Panicker et al., 2004b; Harwood et al., 2004; Coleman et al., 1996) ซึ่งวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการใช้วิธีทางชีวเคมี ผลการศึกษาพบเชื้อ *V. vulnificus* ในสิ่งแวดล้อมในรอบปี ทั้งหมด 141 ตัวอย่าง (48.9%) โดยพบ *V. vulnificus* ปนเปื้อนในหอยนางรมมากที่สุด 26.2% รองลงมา คือ กุ้ง ดินตะกอน น้ำทะเล ปู และ ปลา (22.0%, 20.5%, 10.6%, 10.6% และ 9.9% ตามลำดับ) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาความชุกของ *V. vulnificus* ในปี 1989-1990 จากตัวอย่างอาหารทะเลและน้ำบริเวณ Great Bay ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยวิธี MPN และยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* ด้วย API 20E system พบ *V. vulnificus* 31.7 % และพบในหอยมากที่สุด 37.8% (O'Neill et al., 1990; O'Neill, K. R. et al., 1992) และ USDA พบว่า 38% ของหอยนางรมดิบจากรัฐ Louisiana ในปี 2007 ปนเปื้อน *V. vulnificus* มากกว่า 10,000 MPN/g (DePaola et al., 2009) ในประเทศโครเอเชีย ปี 2000 สํารวจหอย กุ้ง และปลา จำนวน 117 ตัวอย่างใน พบเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยมากที่สุด ถึง 42.8% รองลงมา คือ กุ้ง 30% และพบในปลาน้อยที่สุดเช่นกัน คือ 2 % (Jaksic et al., 2002) ซึ่งการพบเชื้อมากที่สุดนี้ในหอย เนื่องจากหอยกินอาหารโดยการกรองน้ำเข้าออก (filter feeding) ทำให้เชื้อ *V. vulnificus* ที่อยู่ในแพลงตอนสัตว์และน้ำทะเล เข้าไปสะสมใน

ตัวหอยได้มาก และการที่หอยมีเปลือกแข็งหุ้มลำตัว จะทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้ดีกว่าการอยู่เป็นเซลล์อิสระในน้ำทะเลซึ่งอุณหภูมิและความเค็มอาจเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งตรวจสอบสภาวะแวดล้อมที่เชื้อ *V. vulnificus* ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม พบว่า โอกาสการพบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* เริ่มสูงขึ้น ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ และสูงที่สุดในเดือนมีนาคม (14.9%) แต่กลับลดลงต่ำสุดในเดือนเมษายน (4.3%) ซึ่งผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาในประเทศแถบอเมริกา ยุโรป ที่พบเชื้อสูงในช่วงเดือนสิงหาคม ถึงตุลาคม (Han *et al.*, 2009) ปัจจัยที่สำคัญต่อความชุกของ *V. vulnificus* ในหอยนางรม คือ อุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเล จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอุณหภูมิ ที่พบปริมาณเชื้อสูงสุด คือ 18-26 °C และมีความเค็ม 15-25 ppt. จากนั้น ปริมาณเชื้อจะลดลง เมื่ออุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลสูงกว่า 26 °C และ 25 ppt. (O'Neill, K. *et al.*, 1992; Motes *et al.*, 1998) จากผลการทดลองในเดือนมีนาคม ซึ่งพบเชื้อมากที่สุด น้ำทะเลมีอุณหภูมิ 26 °C และมีความเค็ม 31 ppt ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อทำให้พบเชื้อมากที่สุด แต่ในเดือนเมษายนซึ่งน้ำทะเลมีอุณหภูมิ 37 °C และมีความเค็ม 30 ppt ซึ่งไม่เหมาะแก่การเจริญ จึงพบเชื่อน้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลอ่าวไทยค่อนข้างสูงตลอดปี โดยบริเวณฟาร์มหอยนางรมสุราษฎร์ธานี มีอุณหภูมิน้ำผิวดินในช่วงที่ศึกษา 24-37 °C และมีความเค็มสูง 15-31 ppt. มีรายงานความเค็มโดยเฉลี่ยของทะเลอ่าวไทยที่ 35 ppt (ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนกลาง, 2554) ซึ่งอาจทำให้เชื้อเกิดการปรับตัวให้สามารถเจริญได้ดีในแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูงอย่างทะเลอ่าวไทย

เชื้อ *V. vulnificus* สามารถแบ่งเป็น 3 biotypes คือ biotype 1, 2 และ 3 ตาม host range และลักษณะทาง phenotype, genotype และ serotype โดยมักพบเชื้อ biotype 1 ก่อโรคในคนและปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Linkous *et al.*, 1999) ส่วน biotype 2 นั้น พบได้น้อยกว่า และก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาไหล แต่มีรายงานว่าเชื้อชนิด biotype 2 สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้ (Amaro *et al.*, 1996) ซึ่งเชื้อ biotype 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างจาก biotype 1 คือ ไม่สร้าง indole และ ornithine decarboxylase (Tison *et al.*, 1982) ส่วนเชื้อ biotype 3 พบการระบาดในคนงานที่ทำงานในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาของประเทศอิสราเอล โดยพบการติดเชื้อจากบาดแผลที่สัมผัสกับสัตว์น้ำไม่พบจากติดเชื้อจากการกิน (Paz *et al.*, 2007; Bisharat *et al.*, 1999b) การศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากดินตะกอนทะเลน้ำทะเล และอาหารทะเล ประเภท กุ้ง หอย ปู และ ปลา จำนวน 242 ไอโซเลท เป็น biotype 1 (99.2 %) เนื่องจากให้ผลลบในการทดสอบการสร้าง Indole และพบเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 เพียง 2 ไอโซเลท (0.8%) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินตะกอนทะเล จากฟาร์มหอยนางรม จังหวัดสุราษฎร์ธานี การศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลที่ผ่านมาในประเทศเดนมาร์ก ที่พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากหอยนางรมและน้ำทะเล 99.6% เป็น biotype 1 และพบ 0.4% เป็น biotype 2 โดยแยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเล (Hoi *et al.*, 1998) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ

biotype 2 ไม่ได้พบเฉพาะในปลาไหลเท่านั้น หากปะปนอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทะเล และดิน ตะกอนทะเล ส่วนการศึกษาตัวอย่างจากผู้ป่วยมีเชื้อ *V. vulnificus* เพียง 10 สายพันธุ์เท่านั้น และทั้งหมด เป็น biotype 1 ซึ่งสอดคล้องการพบเชื้อที่เก็บจากผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกา, ญี่ปุ่น และประเทศในทวีปยุโรปหลายประเทศ (Oliver, 2005)

เชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง environmental strain และ clinical strain มี virulent factors เหมือนกัน และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง phenotype (Wong *et al.*, 2005; Bisharat *et al.*, 1999b) การศึกษาทางด้าน genotype จึงมีความสำคัญในการจำแนก *V. vulnificus* ออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่อาจก่อโรคได้ (clinical: C-strain) และสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (environmental: E-strain) โดยอาศัยผลการทดลองจากวิธี RAPD ของ Warner และ Oliver ต่อมา Rosche และคณะ ได้ออกแบบ virulent correlated gene primers (vcg primer) ซึ่งประกอบด้วย vcg-C และ vcg-E จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณลักษณะของ *V. vulnificus* จำนวน 55 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย มี vcg-C ถึง 90% และเชื้อจากสิ่งแวดล้อม 93 % พบ vcg-E จึงน่าจะสามารถนำมาแยก *V. vulnificus* เป็น C-type และ E-type ได้ การทดลองครั้งนี้ ได้ทดสอบความสอดคล้องกันของเชื้อ C-type และ *viuB* gene เนื่องจาก เป็นยีนในกลุ่ม *vulnibactin-associated genes* ซึ่งสำคัญในการสร้าง siderophore เพื่อเพิ่มความสามารถในการนำธาตุเหล็กจากโฮสต์เข้าสู่เซลล์ ผลการศึกษา พบว่า *viuB* gene มีความสัมพันธ์ กับเชื้อ C-type (Rosche, *et al.*, 2005) ดังนั้นในการศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาของเชื้อ *V. vulnificus* ครั้งนี้จึงเลือกใช้ virulence-correlated gene (vcg) และ *viuB* gene มาศึกษา ซึ่งพบว่า เชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 254 ไอโซเลท แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม ในจังหวัดสงขลา และสุราษฎร์ธานี ทุกสายไอโซเลท เป็น C-type และพบ *viuB* gene ถึง 95 % แตกต่างจากการศึกษาประเทศอเมริกา ที่เชื้อในสิ่งแวดล้อมจะพบ E-type มากกว่า จากการศึกษาที่ผ่านมาโดย Han และคณะ พบว่าเชื้อที่เป็น C-type จะมี *viuB* gene ถึง 75.5% แต่ใน E-type ไม่พบ *viuB* gene ถึง 83% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกันระหว่าง C-type และ *viuB* gene (Han *et al.*, 2009) แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในประเทศจีน ซึ่งตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งจาก 10 เมือง ของประเทศจีน ผลการศึกษา พบว่า *V. vulnificus* ส่วนใหญ่เป็น C-type และ พบ E-type เพียง 6.25% ทั้งนี้แสดงว่า ลักษณะทางอณูชีววิทยาของ *V. vulnificus* ที่ใช้แยกเป็น C-type และ E-type เป็นลักษณะเฉพาะในแต่ละพื้นที่ (Ji *et al.*, 2011) และอีกเหตุผลหนึ่งอาจมาจากความสามารถในการนำเชื้อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำ ซึ่งจากการศึกษาความสามารถของหอยนางรมในการนำเชื้อเข้าสู่ร่างกาย (uptake) เชื้อสายพันธุ์ C-type และ E-type เข้าสู่ตัวหอยนางรม พบว่าหอยสามารถนำเชื้อ C-type เข้าสู่ร่างกายได้สูงกว่า E-type (Froelich *et al.*, 2009) ดังนั้นในระยะหลังจะพบว่าผลการศึกษาการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในหอยนางรม เชื้อส่วนใหญ่เป็น C-type มากกว่า E-type (Baker-Austin *et al.*, 2009)

การติดเชื้อ *V. vulnificus* มีอาการรุนแรงและมีอัตราการตายสูงหากไม่ได้รับการรักษา ภายใน 24 ชั่วโมง การรักษาที่ถูกต้อง เช่น การตัดเนื้อตายทิ้งในกรณีเกิดการติดเชื้อที่บาดแผล และการให้ยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพจำเป็นมาก ซึ่ง US-CDC ได้ให้คำแนะนำในการให้ยาเพื่อรักษา โดยประมวลข้อมูลจากการรักษาก่อนหน้านี้และจากสัตว์ทดลอง คือ doxycycline ร่วมกับ third-generation ของ cephalosporin เช่น ceftazidime หรือใช้ ยาในกลุ่ม fluoroquinolone เช่น ciprofloxacin ร่วมกับ doxycycline หรือ cephalosporin แต่ในเด็กห้ามใช้ doxycycline และ fluoroquinolone สามารถใช้ trimethoprim-sulfamethoxazole ร่วมกับ aminoglycoside ได้ (CDC, 2009) ในการศึกษาครั้งนี้ ทดสอบความไวของ *V. vulnificus* ต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี disc diffusion โดยคัดเลือกยาปฏิชีวนะ 12 ชนิด ตามแนวทางของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) ซึ่งยาที่นำมาทดสอบสอดคล้องกับยาที่ใช้ตามคำแนะนำของ US-CDC ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 244 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในระหว่างปี 2552-2553 ทุกสายพันธุ์ ให้ผลไวต่อยาหลักที่ใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อ คือ doxycycline, cefotaxime, ceftazidime, Imipenem, ciprofloxacin, sulphamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline การดื้อยาของ *V. vulnificus* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมในภาคใต้ของประเทศไทย มีรูปแบบการดื้อยาที่สอดคล้องกับการศึกษาในที่ผ่านมา ปี 2000 Radu และคณะ ได้ตรวจสอบการดื้อยาของ *V. vulnificus* ที่แยกจากน้ำทะเลบริเวณอ่าว Pulau Kapas, Terengganu ประเทศมาเลเซีย จำนวน 57 สายพันธุ์ ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ไวต่อ chloramphenicol และ tetracycline (Radu *et al.*, 2000) และการศึกษาเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจาก กุ้ง ปู และปลา จำนวน 60 ตัวอย่าง ในปี 2007 – 2008 โดยใช้ API 20E ในประเทศไนจีเรีย เมื่อนำเชื้อ *V. vulnificus* 10 สายพันธุ์ นำไปทดสอบ antibiotics 10 ชนิด ผลปรากฏว่าทุกสายพันธุ์ไวต่อ tetracycline และ ceftriazone (Adeleye *et al.*, 2010) เชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากน้ำทะเลในอ่าว ประเทศซาอุดีอาระเบียจำนวน 10 ไอโซเลท ปี 2010 ไวต่อ tetracycline 100 % แต่ดื้อต่อ ampicillin 100 % และ gentamicin 90% (Elhadi, 2012) ในประเทศไทย การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Vibrio* spp. ที่แยกจากหอยนางรม บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* 7 ไอโซเลท ไวต่อ tetracycline, oxytetracycline และ imipenem 100 % ต่อมาปี 2549 ถึง 2550 รุ่งอรุณ และคณะ แยกเชื้อ *V. vulnificus* จากหอยนางรมหรือหอยตะไกรทระจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเก็บตัวอย่าง 5 จุด ในบริเวณอ่าวบ้านดอน จำนวน 360 ตัวอย่าง พบเชื้อ *V. vulnificus* 27.5 % นำเชื้อ *V. vulnificus* 297 ไอโซเลท มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า เชื้อไวต่อ doxycycline, norfloxacin, ciprofloxacin 100% และไวต่อ cefotaxime 84.5 % แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *V. vulnificus* ยังดื้อยาต้านจุลชีพน้อย (Khantho, 2008) และในการศึกษาครั้งนี้ ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยได้รับความมอเคราะห์เชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และโรงพยาบาลหาดใหญ่ จำนวน 10 สายพันธุ์ ต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด พบว่าทุกสายพันธุ์ให้ผลไวต่อยา doxycycline, cefotaxime, ceftazidime, imipenem,

ciprofloxacin, sulphamethoxazole/ trimethoprim, tetracycline, ampicillin, gentamicin, chloramphenicol แต่มีบางสายพันธุ์ (50%) ให้ผลไวปานกลางต่อ carbenicillin และ erythromycin (30 %) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการตรวจสอบเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย ปี 2005-2006 เชื้อ *V. vulnificus* 151 สายพันธุ์ และ *Vibrio parahaemolyticus* 168 สายพันธุ์ ยังคงไวต่อยาหลักที่ใช้รักษาอย่าง tetracycline, ciprofloxacin และ cefotaxime (Han *et al.*, 2007) ในประเทศไทยมีรายงานผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่จังหวัดอำนาจเจริญ เมื่อ มกราคม 2553 พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ยังคงไวต่อยาปฏิชีวนะ ที่นำมาทดสอบทั้ง 10 ชนิด ซึ่งรวมถึง cefazidime, ciprofloxacin, gentamicin, ampicillin trimethoprim/ sulfamethoxazole และ doxycycline (อภิชัย สะตังค์, 2553) แม้ผลการศึกษาจะบ่งชี้ว่ายังสามารถใช้ยาปัจจุบันรักษาการติดเชื้อจาก *V. vulnificus* ในผู้ป่วยได้ แต่ผลการตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* ในสิ่งแวดล้อมแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *V. vulnificus* มีการพัฒนาการดื้อยามากขึ้นเป็นลำดับ ซึ่งผลการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของ *V. vulnificus* ในสิ่งแวดล้อมจะสามารถใช้เพื่อการเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อ โดยที่เชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อมอาจถ่ายโอนยีนดื้อยา ให้กับเชื้อตัวอื่นผ่านทางพลาสมิด แบคทีริโอฟาจ หรือ transposon ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการถ่ายโอนยีนเพื่อการอยู่รอด ทำให้เกิดการแพร่กระจายการดื้อยา จากพื้นที่หนึ่งไปสู่อีกพื้นที่หนึ่งได้รวดเร็ว ซึ่งมีผลทำให้เกิดปัญหาการเพิ่มขึ้นของเชื้อดื้อยา ผลการศึกษาเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 36 สายพันธุ์ที่แยกได้จากหอยในประเทศมาเลเซีย พบ *V. vulnificus* มีการดื้อต่อยา tetracycline สูงถึง 50% และ 58.3 % ของเชื้อที่มีการดื้อต่อยา tetracycline มีพลาสมิด ขนาด 1.4 to 9.7 MDa. ดังนั้นจึงควรเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อนี้ต่อไป (Radu *et al.*, 1998; Radu *et al.*, 2006)

การศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อ *V. vulnificus* เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ก่อโรค (clinical type) และสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (environmental-type) ระดับโมเลกุล ถูกพัฒนาขึ้นหลายวิธี เพื่อเพิ่มศักยภาพการจำแนกสายพันธุ์ที่แยกจากพื้นที่ระบาดต่างๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ความหลากหลายของเชื้อ เช่น ribotyping (RT) restriction fragment length polymorphism (RFLP) pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) amplified fragment length polymorphism (AFLP) arbitrarily primed (AP-PCR) หรือ randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) แต่ละวิธีมีขั้นตอน รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกที่แตกต่างกัน ในการศึกษาแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในครั้งนี้นำวิธี arbitrarily primed (AP-PCR) ซึ่งวิธีนี้จะใช้ primer แบบสุ่ม เพื่อสุ่มจับกับสายดีเอ็นเอของเชื้อในตำแหน่งที่จำเพาะ และเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และในการศึกษารั้งนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ R-PSE420 ไพรเมอร์ 2 และไพรเมอร์ 4 ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาไพรเมอร์นี้สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของ *Vibrio* spp. แต่ละสายพันธุ์ (Okuda *et al.*, 1997; Vickery *et al.*, 1998;) ผลการศึกษาพบว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 11 ไอโซเลท มีรูปแบบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันเมื่อใช้ primer R-PSE420 และจะเห็นความ

แตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ชัดเจนขึ้นเมื่อใช้ primer 2 ซึ่งอาจเนื่องมาจากขนาดของ primer ซึ่ง primer R-PSE420 มีขนาด 17 เบส แต่ primer 2 มีเพียง 10 เบส ทำให้มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่จับแบบสุ่มได้หลายตำแหน่งกว่า primer R-PSE420 ทำให้เห็นรูปแบบดีเอ็นเอที่หลากหลายและมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลายขนาด ดังนั้น จึงพบว่าเชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ที่แยกได้จากผู้ป่วย มีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด แสดงถึงความหลากหลายของเชื้อ *V. vulnificus* ผลการศึกษา พบว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ที่แยกได้จาก หอยนางรม ซึ่งเก็บจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 35 ไอโซเลท โดยใช้ primer R-PSE420 ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันถึง 32 รูปแบบ โดยมี 3 ไอโซเลท คือ *V. vulnificus* PSU080, *V. vulnificus* PSU081 และ *V. vulnificus* PSU082 ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และอีก 2 ไอโซเลท *V. vulnificus* PSU235 และ *V. vulnificus* PSU237 ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันอีกกลุ่ม แต่ทั้ง 5 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบด้วย primer 2 พบความแตกต่างเพิ่มขึ้น และทดสอบอีกครั้งด้วย primer 4 จึงเห็นว่าทุกไอโซเลทให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากเชื้อ *V. vulnificus* PSU080, *V. vulnificus* PSU081 และ *V. vulnificus* PSU082 เป็นเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากเป็นเชื้อที่แยกได้จากหอยนางรมที่เก็บจากแหล่งเดียวกันและเก็บในเดือนเดียวกัน ความแตกต่างอาจเกิดจากการปรับตัวแล้วมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนโครโมโซมเพียงเล็กน้อย สำหรับการตรวจสอบ รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ที่แยกได้จาก หอยนางรม และดินตะกอนทะเล พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อใช้ primer R-PSE420 และ primer 2 แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทไม่ได้มาจากต้นกำเนิด (clone) เดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับ *V. vulnificus* biotype 1 ทั้ง 35 ไอโซเลท พบว่ามีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และ biotype 2 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก และจำนวนชิ้นน้อยกว่า biotype 1 แต่จากการศึกษาของ Hoi และคณะ พบว่าการใช้วิธี RAPD ด้วย primer ขนาด 10 เบส ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกับ *V. vulnificus* biotype 1 ในบางสายพันธุ์ (Hoi *et al.*, 1997)

เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง 47 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม จะเห็นได้ว่าในการศึกษครั้งนี้เชื้อที่พบในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองแหล่งไม่ได้มาจากต้นกำเนิด (clone) เดียวกัน จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกจากน้ำ และหอยนางรมในอ่าว Galveston ด้วยวิธี RAPD ทำให้ทราบว่าความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *V. vulnificus* ไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่มาและชนิดของตัวอย่าง (Lin *et al.*, 2003) แม้การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี arbitrarily primed PCR (AP-PCR) ครั้งนี้สามารถบอกได้ว่าแต่ละไอโซเลทที่พบในพบในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมเป็นเชื้อ *V. vulnificus* ที่ต่างสายพันธุ์ แต่ไม่สามารถบ่งชี้ลักษณะจำเพาะที่แตกต่างกันทางอณูชีววิทยาของเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง 47 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งผลสอดคล้องกับที่เคยมีการศึกษาหลายวิธี ได้แก่ ribotyping

(RT) (Hoi *et al.*, 1997) restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Bisharat *et al.*, 1999) pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Tamplin *et al.*, 1996) amplified fragment length polymorphism (AFLP)(Arias *et al.*, 1997) arbitrarily primed PCR (AP-PCR) หรือ randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Vickery *et al.*, 1998; Radu *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 1998) มีเพียงการศึกษาด้วยวิธี RAPD ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมได้ 80-90 % เนื่องจากพบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส ถึง 100 % ในเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยแต่พบเพียง 8 % ในเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อม (Warner and Oliver, 1999) การที่วิธีการเหล่านี้ไม่สามารถบอกลักษณะจำเพาะทางอนุชีววิทยาของเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค (Clinical type) และไม่ก่อโรค (Environmental type) ได้ อาจเนื่องจาก มีข้อจำกัดคือ วิธีนี้ใช้การตรวจดูชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส ซึ่งอาจมีความไม่ชัดเจน มีความไม่แน่นอนในการทำซ้ำซึ่งต้องใช้บุคคลเดียวกัน และทุกครั้งต้องใช้สภาวะในการทดสอบที่ใกล้เคียงกันให้มากที่สุด (Urwin and Maiden, 2003) ดังนั้น การศึกษาระบาดวิทยาของ *V. vulnificus* ควรใช้วิธีการศึกษาแบบอื่นร่วมด้วย เช่น Multilocus Sequence typing (MLST) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบลำดับเบสของ housekeeping genes หลายๆ ยีนร่วมกัน เนื่องจากวิธีนี้ใช้ลำดับเบสเป็นตัวตรวจสอบ จึงมีข้อดี คือ มีความชัดเจน และถูกต้อง มากกว่าการตรวจดูชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส และสามารถทำซ้ำได้ การทดสอบแต่ละครั้ง สามารถทำได้ไม่จำกัดจำนวนตัวอย่าง และสามารถนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน <http://www.mlst.net> หรือ <http://pubmlst.org> ซึ่งปัจจุบันการศึกษาทางระบาดวิทยาของ *V. vulnificus* ด้วยวิธี MLST ใช้การตรวจสอบลำดับเบสของ housekeeping genes จำนวน 10 ยีน ดังนี้ *glp* (Glucose-6-phosphate isomerase), *gyrB* (DNA gyrase, subunit B), *mdh* (Malate-lactate dehydrogenase), *metG* (Methionyl-tRNA synthetase), *purM* (Phosphoribosylaminoimidazole synthetase), *dtdS* (Threonine dehydrogenase), *lysA* (Diaminopimelate decarboxylase), *pntA* (Transhydrogenase alpha subunit), *pyrC* (Dihydroorotase), *tnaA* (Tryptophanase) (Bisharat) วิธีการนี้ Sanjuan และคณะ ได้นำมาศึกษาสายวิวัฒนาการของ *V. vulnificus* biotype 2 โดยใช้การตรวจสอบลำดับเบสของ ยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อโรค 3 ยีน (*vvhA*, *wzz*, and *pilF*) และ housekeeping gene 4 ยีน (*glp*, *mdh*, *pyrC*, and *pntA*) พบว่า เมื่อนำยีน *pilF* มาทำ Maximum likelihood phylogenetic trees สามารถแยก *V. vulnificus* ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่แยกได้จากผู้ป่วยและแยกจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นยีน *pilF* จึงน่าจะนำมาเป็น genetic marker สำหรับตรวจสอบเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคได้ในอนาคต (Sanjuan *et al.*) แม่วิธีนี้จะมีประสิทธิภาพและมีข้อดีดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและข้อมูลที่เก็บในฐานข้อมูลยังมีไม่มากนัก แต่ในอนาคตอาจเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการนำมาใช้หาความแตกต่างกันทางอนุชีววิทยาของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมได้หากมีค่าใช้จ่ายถูกลงและมีข้อมูลในฐานข้อมูลเพียงพอต่อการจำแนก

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า มีการปนเปื้อนของ เชื้อ *V. vulnificus* ในสิ่งแวดล้อม ทั้งอาหารทะเล น้ำทะเล และดินตะกอนทะเล โดยมีอัตราการพบเชื้อค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามเชื้อที่พบมีอัตราการดื้อยาต่ำ และยังคงไวต่อยาหลักที่ใช้ในการรักษา และผลจากวิธี AP-PCR พบว่าเชื้อมีความหลากหลายมาก แต่ไม่สามารถบ่งชี้ลักษณะจำเพาะทางอนุชีววิทยาของเชื้อ *V. vulnificus* ได้ เนื่องจากเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากผู้ป่วย ทั้งหมดเป็น C-type นอกจากนี้ยังพบ *viuB* gene ถึง 95 % จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อที่พบทุกสายพันธุ์อาจสามารถก่อโรคได้ ทำให้ประชาชนที่สัมผัสหรือบริโภคอาหารทะเลมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ ดังนั้นควรมีมาตรการเฝ้าระวังการติดเชื้อ *V. vulnificus* ต่อไปเพื่อสุขอนามัยของประชาชนโดยรวม

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. ตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ได้แก่ กุ้ง ปู ปลา ดินตะกอน ทะเล น้ำทะเล และหอยนางรม ทั้งหมด 141 ตัวอย่าง (48.9 %) โดยมีสัดส่วนการพบ *V. vulnificus* ปนเปื้อนในหอยนางรมมากที่สุด รองลงมา คือ กุ้ง ดินตะกอน น้ำทะเล ปู และปลา ตามลำดับ โดยพบสูงสุดในเดือนมีนาคม และต่ำสุดในเดือนเมษายน แสดงว่าผู้ที่สัมผัสหรือบริโภคอาหารทะเลมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *V. vulnificus* และเสี่ยงมากขึ้นในเดือนกุมภาพันธ์ และมีนาคม
2. *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดสงขลา และสุราษฎร์ธานี ทุกสายพันธุ์ ตรวจพบ *vcg-C* และ 95 % ตรวจพบ *viuB* gene ด้วย แสดงว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้ทั้งหมดเป็น C-type และมีความสามารถในการก่อโรค
3. *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นเชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตรวจพบ *vcg-C* และ *viuB* gene ทุกสายพันธุ์ แสดงว่า *V. vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้งหมดเป็น C-type และมีปัจจัยในการก่อโรค
3. *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 99.2 % เป็น Biotype 1 มีเพียง 0.8 % เป็น Biotype 2 ส่วนเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็น Biotype 1 ทุกสายพันธุ์ แสดงว่าเชื้อ Biotype 1 แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมมากกว่า Biotype 2 และสัมพันธ์กับการก่อโรคในคน
4. *V. vulnificus* ที่ศึกษาทุกสายพันธุ์ไวต่อยาหลักที่ใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อ คือ doxycycline, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin และ tetracycline แสดงว่ายังสามารถใช้ยาเหล่านี้รักษาการติดเชื้อ *V. vulnificus* ได้
5. รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* ที่แยกจากผู้ป่วย 10 สายพันธุ์ และแยกจากหอยนางรม จำนวน 37 สายพันธุ์ โดยวิธี AP-PCR ให้รูปแบบที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า *V. vulnificus* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

รายการเอกสารอ้างอิง

- ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนกลาง. กรมทรัพยากรทางทะเล 2554.
<http://www.coastaldatabase.com/> (วันที่สืบค้น 12 เมษายน 2554)
- ศรีวรรณ หัตยานานนท์, กรองแก้ว ศุภวัฒน์ และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ. 2549. มหันตภัยจากเชื้อ *Vibrio vulnificus*. weekly epidemiological surveillance report. 37 (45): 797-801.
- สุดสายชล หอมทอง และ ฐดาภรณ์ วงศ์พัฒน์. 2549. ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Vibrio* spp. จากหอยนางรม บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. วารสารวิชาการ ม.อบ. 8 (1): 42-52.
- อภิชัย สะดีวงศ์. 2553. รายงานการสอบสวนผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในกระแสเลือด จังหวัดอำนาจเจริญ.
- Amaro, C., and Biosca, E. G. 1996. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. 1996. Appl Environ Microbiol. 62 (4): 1454-1457.
- Amaro, C., Biosca, E. G., Fouz, B., Toranzo, A. E., and Garay, E. 1994. Role of iron, capsule, and toxins in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus* biotype 2 for mice. Infect Immun. 62(2): 759-763.
- Amaro, C., Fouz, B., Biosca, E. G., Marco-Noales, E., and Collado, R. 1997. The lipopolysaccharide O side chain of *Vibrio vulnificus* serogroup E is a virulence determinant for eels. Infect Immun. 65 (6): 2475-2479.
- Angelo, D., and Kaysner, C. 2009. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> (accessed 18/4/10)

- Arias, C. R., Verdonck, L., Swings, J., Garay, E., and Aznar, R. 1997. Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (7): 2600.
- Baker-Austin, C., Gore, A., Oliver, J. D., Rangdale, R., McArthur, J. V., and Lees, D. N. 2009. Rapid in situ detection of virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oyster matrices using real-time PCR. *Environmental Microbiology Reports*. 2 (1): 76-80.
- Barton, J. C., and Ratard, R. C. 2006. *Vibrio vulnificus* bacteremia associated with chronic lymphocytic leukemia, hypogammaglobulinemia, and hepatic cirrhosis: relation to host and exposure factors in 252 *V. vulnificus* infections reported in Louisiana. *American Journal of the Medical Sciences*. 332 (4): 216-220.
- Baumann, P., and Schubert, R. H. W. 1984. Facultatively anaerobic Gram negative rods. Family II in Vibrionaceae. In: *Bergey's manual of systemic bacteriology*.
- Biosca, E. G., Amaro, C., Larsen, J. L., and Pedersen, K. 1997. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio vulnificus*: proposal for the substitution of the subspecific taxon biotype for serovar. *Appl Environ Microbiol*. 63 (4): 1460-1466.
- Biosca, E. G., Fouz, B., Alcaide, E., and Amaro, C. 1996. Siderophore-mediated iron acquisition mechanisms in *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl Environ Microbiol*. 62 (3): 928-935.
- Bisharat, N. 2011. *Vibrio vulnificus* MLST Home Page: Primers and cycling conditions for *Vibrio vulnificus* MLST. <http://pubmlst.org/vvulnificus/> (accessed 21/11/11)
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D. N., Wykstra, D. L., Swerdlow, D. L., and Farmer, J. J., 3rd. 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel *Vibrio* Study Group. *Lancet*. 354 (9188): 1421-1424.

- Bisharat, N., and Raz, R. 1996. *Vibrio* infection in Israel due to changes in fish marketing. *Lancet*. 348 (9041): 1585-1586.
- Bogard, R. W., and Oliver, J. D. 2007. Role of iron in human serum resistance of the clinical and environmental *Vibrio vulnificus* genotypes. *Appl Environ Microbiol*. 73 (23): 7501-7505.
- CDC. *Vibrio vulnificus*, 12 Nov 2009. <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/vibriov/#treatment> (accessed 12/1/12)
- Chan, K. Y., Woo, M. L., Lam, L. Y., and French, G. L. 1989. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong. *J Appl Bacteriol*. 66 (1): 57-64.
- Chan, K. Y., Woo, M. L., Lo, K. W., and French, G. L. 1986. Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of Hong Kong. *Appl Environ Microbiol*. 52 (6): 1407-1411.
- Chatzidaki-Livanis, M., Hubbard, M. A., Gordon, K., Harwood, V. J., and Wright, A. C. 2006. Genetic distinctions among clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*. 72 (9): 6136-6141.
- Chiang, S. R., and Chuang, Y. C. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. *J Microbiol Immunol Infect*. 36 (2): 81-88.
- Chuang, Y. C., Ko, W. C., Wang, S. T., Liu, J. W., Kuo, C. F., Wu, J. J., and Huang, K. Y. 1998. Minocycline and cefotaxime in the treatment of experimental murine *Vibrio vulnificus* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 42 (6): 1319-1322.
- Chuang, Y. C., Liu, J. W., Ko, W. C., Lin, K. Y., Wu, J. J., and Huang, K. Y. 1997. In vitro synergism between cefotaxime and minocycline against *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 41 (10): 2214-2217.

- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard-Tenth edition. Document M02-A10. Wayne, Pennsylvania.
- Coleman, S. S., Melanson, D. M., Biosca, E. G., and Oliver, J. D. 1996. Detection of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 in eels and oysters by PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 62 (4): 1378-1382.
- Dalsgaard, A. 1998. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. *Int. J. Food Science and Technology.* 33: 127-138.
- Daniels, N.A. 2000. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *J. Infect. Med.* 17: 665-685.
- DePaola, A., Jones, J. L., Noe, K. E., Byars, R. H., and Bowers, J. C. 2009. Survey of postharvest-processed oysters in the United States for levels of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection.* 72 (10): 2110-2113.
- DePaola, A., Nordstrom, J. L., Dalsgaard, A., Forslund, A., Oliver, J., Bates, T., Bourdage, K. L., and Gulig, P. A. 2003. Analysis of *Vibrio vulnificus* from market oysters and septicemia cases for virulence markers. *Appl Environ Microbiol.* 69 (7): 4006-4011.
- Elhadi, N. 2012. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiling of Clinically Significant *Vibrio vulnificus* Isolated from Coastal Water in Eastern Province of Saudi Arabia. *British Journal of Pharmacology and Toxicology.* 3 (2): 93-97.
- Froelich, B., Ringwood, A., Sokolova, I., and Oliver, J. 2009. Uptake and depuration of the C- and E-genotypes of *Vibrio vulnificus* by the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Environmental Microbiology Reports.* 2 (1): 112-115.

- Goo, S. Y., Han, Y. S., Kim, W. H., Lee, K. H., and Park, S. J. 2007. *Vibrio vulnificus* IipA-induced cytokine production is mediated by Toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*. 282 (38): 27647-27658.
- Goo, S. Y., Lee, H. J., Kim, W. H., Han, K. L., Park, D. K., Lee, H. J., Kim, S. M., Kim, K. S., Lee, K. H., and Park, S. J. 2006. Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis. *Infect Immun*. 74 (10): 5586-5594.
- Gray, L. D., and Kreger, A. S. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun*. 48 (1): 62-72.
- Gray, L. D., and Kreger, A. S. 1987. Mouse skin damage caused by cytolysin from *Vibrio vulnificus* and by *V. vulnificus* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 155 (2): 236-241.
- Han, F., Pu, S., Hou, A., and Ge, B. 2009. Characterization of clinical and environmental types of *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana oysters. *Foodborne Pathog Dis*. 6 (10): 1251-1258.
- Han, F., Walker, R. D., Janes, M. E., Prinyawiwatkul, W., and Ge, B. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (21): 7096.
- Harwood, V. J., Gandhi, J. P., and Wright, A. C. 2004. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *J Microbiol Methods*. 59 (3): 301-316.
- Hlady, W. G., and Klontz, K. C. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J Infect Dis*. 173 (5): 1176-1183.

- Hoi, L., Dalsgaard, A., Larsen, J. L., Warner, J. M., and Oliver, J. D. 1997. Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (5): 1674-1678.
- Hoi, L., Larsen, J. L., Dalsgaard, I., and Dalsgaard, A. 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (1): 7-13.
- Hollis, D., Weaver, R., Baker, C., and Thornsberry, C. 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 3 (4): 425-431.
- Hsueh, P. R., Lin, C. Y., Tang, H. J., Lee, H. C., Liu, J. W., Liu, Y. C., and Chuang, Y. C. 2004. *Vibrio vulnificus* in Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (8): 1363-1368.
- Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E., and Swerdlow, D. L. 2010. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 23 (2): 399.
- Jaksic, S., Uhtil, S., Petrak, T., Bazulic, D., and Gumhalter Karolyi, L. 2002. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. *Food Control*. 13 (8): 491-493.
- Ji, H., Chen, Y., Guo, Y., Liu, X., Wen, J., and Liu, H. 2011. Occurrence and characteristics of *Vibrio vulnificus* in retail marine shrimp in China. *Food Control*. 22 (12): 1935-1940.
- Johnston, J. M., Becker, S. F., and McFarland, L. M. 1985. *Vibrio vulnificus*. Man and the sea. *JAMA*. 253 (19): 2850-2853.
- Kaysner, C. A., and DePaola, A. 2004. *Bacteriological Analytical Manual Online*. <http://www.cfsan.fda.gov>. (accessed 20/9/10)

- Kaysner, C. A., Abeyta, C., Jr., Wekell, M. M., DePaola, A., Jr., Stott, R. F., and Leitch, J. M. 1987. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (6): 1349-1351.
- Kelly, M. T. 1982. Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Beneckea) vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (4): 820-824.
- Khantho, R. 2008. Prevalence and antimicrobial resistant patterns of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolated from Pacific oysters (*Crassostrea Belcheri*) in Thailand. Master of science Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
- Kim, C. M., Park, R. Y., Chun, H. J., Kim, S. Y., Rhee, J. H., and Shin, S. H. 2007. *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE is essentially required for swarming. *FEMS Microbiol Lett*. 269 (1): 170-179.
- Kim, Y. R., Lee, S. E., Kim, C. M., Kim, S. Y., Shin, E. K., Shin, D. H., Chung, S. S., Choy, H. E., Progulske-Fox, A., Hillman, J. D., Handfield, M., and Rhee, J. H. 2003. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. *Infect Immun*. 71 (10): 5461-5471.
- Kook, H., Lee, S. E., Baik, Y. H., Chung, S. S., and Rhee, J. H. 1996. *Vibrio vulnificus* hemolysin dilates rat thoracic aorta by activating guanylate cyclase. *Life Sci*. 59 (3): PL41-47.
- Kook, H., Rhee, J. H., Lee, S. E., Kang, S. Y., Chung, S. S., Cho, K. W., and Baik, Y. H. 1999. Activation of particulate guanylyl cyclase by *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Eur J Pharmacol*. 365 (2-3): 267-272.
- Lee, J. H., Rho, J. B., Park, K. J., Kim, C. B., Han, Y. S., Choi, S. H., Lee, K. H., and Park, S. J. 2004. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun*. 72 (8): 4905-4910.

- Lhafi, S. K., and Kühne, M. 2007. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *Int J Food Microbiol.* 116 (2): 297-300.
- Lin, M., Payne, D. A., and Schwarz, J. R. 2003. Intraspecific diversity of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay water and oysters as determined by randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 69 (6): 3170-3175.
- Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J. J., and Nishibuchi, M. 1993. *V. parahaemolyticus* has a homolog of the *V. cholerae* *toxRS* operon that mediates environment induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J. Bacteriol.* 175: 3844-3855.
- Linkous, D. A., and Oliver, J. D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett.* 174 (2): 207-214.
- Litwin, C. M., Rayback, T. W., and Skinner, J. 1996. Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infect Immun.* 64 (7): 2834-2838.
- Mahmud, Z. H., Neogi, S. B., Kassu, A., Mai Huong, B. T., Jahid, I. K., Islam, M. S., and Ota, F. 2008. Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS Microbiol Ecol.* 64 (2): 209-218.
- Miller, V. L., and Mekalanos, J. J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutation: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *V. cholerae* requires *toxR*. *Journal of Bacteriology.* 170: 2575-2583.
- Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K., and Hara-Kudo, Y. 2006. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic birds in Japan. *Epidemiol Infect.* 134 (4): 780-785.

- Miyoshi, S., Inami, Y., Moriya, Y., Kamei, T., Rahman, M. M., Yamamoto, S., Tomochika, K., and Shinoda, S. 1997. Characterization of a mutant of *Vibrio vulnificus* for heme utilization. *FEMS Microbiol Lett.* 148 (1): 101-106.
- Morris, J. G., Jr., and Tenney, J. 1985. Antibiotic therapy for *Vibrio vulnificus* infection. *JAMA.* 253 (8): 1121-1122.
- Motes, M., DePaola, A., Cook, D., Veazey, J., Hunsucker, J., Garthright, W., Blodgett, R., and Chirtel, S. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and environmental microbiology.* 64 (4): 1459.
- Muench, K. H. 1989. Hemochromatosis and infection: alcohol and iron, oysters and sepsis. *Am J Med.* 87 (3N): 40N-43N.
- Nishibuchi, M., and Seidler, R. J. 1985. Demonstration of a common antigen in sonicated cells for identification of *Vibrio vulnificus* serotypes. *J Clin Microbiol.* 21 (1): 97-101.
- O'Neill, K., Jones, S., and Grimes, D. 1992. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. *Applied and environmental microbiology.* 58 (10): 3257-3262.
- O'Neill, K. R., Jones, S. H., and Grimes, D. J. 1990. Incidence of *Vibrio vulnificus* in northern New England water and shellfish. *FEMS Microbiology Letters.* 60 (1-2): 163-167.
- Oliver, J. 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiology and Infection.* 133 (3): 383-392.
- Oliver, J. & D., Kaper, J. B. 1997. *Vibrio* species. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J., eds. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* 228-264.

- Oonaka, K., Furuhashi, K., Iguchi, K., Hara, M., and Fukuyama, M. 2002. [Basic studies on *Vibrio vulnificus* infection: isolation of *V. vulnificus* from sea water, sea mud, and oysters]. *Kansenshogaku Zasshi. Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases.* 76 (7): 528-535.
- Panicker, G., Call, D. R., Krug, M. J., and Bej, A. K. 2004a. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol.* 70 (12): 7436-7444.
- Panicker, G., Vickery, M., and Bej, A. 2004b. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. *Canadian journal of microbiology.* 50 (11): 911-922.
- Paranjpye, R. N., and Strom, M. S. 2005. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect Immun.* 73 (3): 1411-1422.
- Parvathi, A., Kumar, H. S., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. 2005. Study of the occurrence of *Vibrio vulnificus* in oysters in India by polymerase chain reaction (PCR) and heterogeneity among *V. vulnificus* by randomly amplified polymorphic DNA PCR and *gyrB* sequence analysis. *Environ Microbiol.* 7 (7): 995-1002.
- Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O., and Cohen, D. 2007. Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. *Environ Res.* 103 (3): 390-396.
- Radu, S., Elhadi, N., Hassan, Z., Rusul, G., Lihan, S., Fifadara, N., and Purwati, E. 2006. Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles (*Anadara granosa*): antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. *FEMS Microbiology Letters.* 165 (1): 139-143.

- Radu, S., Elhadi, N., Hassan, Z., Rusul, G., Lihan, S., Fifadara, N., Yuherman, and Purwati, E. 1998. Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles (*Anadara granosa*): antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 165 (1): 139-143.
- Radu, S., Rusul, G., Yeang, L. K., and Nishibuchi, M. 2000. Detection and molecular characterization of *Vibrio vulnificus* from coastal waters of Malaysia.
- Rosche, T., Yano, Y., and Oliver, J. 2005. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiology and immunology.* 49 (4): 381-389.
- Rosche, T. M., Smith, B., and Oliver, J. D. 2006. Evidence for an intermediate colony morphology of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol.* 72 (6): 4356-4359.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanjuan, E., Gonzalez-Candelas, F., and Amaro, C. Polyphyletic origin of *Vibrio vulnificus* biotype 2 as revealed by sequence-based analysis. *Applied and environmental microbiology.* 77 (2): 688-695.
- Shin, N. R., Lee, D. Y., and Yoo, H. S. 2007. Identification of quorum sensing-related regulons in *Vibrio vulnificus* by two-dimensional gel electrophoresis and differentially displayed reverse transcriptase PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50 (1): 94-103.
- Shin, S. H., Sun, H. Y., Park, R. Y., Kim, C. M., Kim, S. Y., and Rhee, J. H. 2005. *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE has no direct effect on the iron-assimilation from human holotransferrin. *FEMS Microbiol Lett.* 247 (2): 221-229.
- Simpson, L. M., and Oliver, J. D. 1983. Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* 41 (2): 644-649.

- Strom, M. S., and Paranjpye, R. N. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect.* 2 (2): 177-188.
- Surasilp, T., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Sridulyakul, P., Sithigorngul, P., and Chaivisuthangkura, P. 2011. Rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to *rpoS* gene. *Molecular and Cellular Probes.* 25: 158-163.
- Takahashi, H., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Kumagai, S., and Konuma, H. 2005. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus* *Journal of Microbiological Methods.* 61 (1): 77-85.
- Tamplin, M. L., Jackson, J. K., Buchrieser, C., Murphree, R. L., Portier, K. M., Gangar, V., Miller, L. G., and Kaspar, C. W. 1996. Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 62 (10): 3572.
- Tarr, C. L., Patel, J. S., Puhr, N. D., SOWERS, E., Bopp, C. A., and Strockbine, N. A. 2006. Identification of *Vibrio* isolates using a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology.* JCM. 01544-01506v 01541.
- Thompson, F. L., Iida, T., and Swings, J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 68 (3): 403.
- Tison, D. L., and Kelly, M. T. 1986. Virulence of *Vibrio vulnificus* strains from marine environments. *Applied and Environmental Microbiology.* 51 (5): 1004-1006.
- Todd, E. C. 1989. Costs of acute bacterial foodborne disease in Canada and the United States. *Int J Food Microbiol.* 9 (4): 313-326.

- Urwin, R., and Maiden, M. C. J. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in microbiology*. 11 (10): 479-487.
- Veenstra, J., Rietra, P. J., Coster, J. M., Slaats, E., and Dirks-Go, S. 1994. Seasonal variations in the occurrence of *Vibrio vulnificus* along the Dutch coast. *Epidemiol Infect.* 112 (2): 285-290.
- Venkateswaran, K., Nakano, H., Okabe, T., Takayama, K., Matsuda, O., and Hashimoto, H. 1989. Occurrence and distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp., and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland Sea of Japan. *Appl Environ Microbiol.* 55 (3): 559-567.
- Vickery, M. C. L., Smith, A. L., DePaola, A., Jones, D. D., Steffan, R. J., and Bej, A. K. 1998. Optimization of the arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for intra-species differentiation of *Vibrio vulnificus*. *Journal of microbiological methods*. 33 (2): 181-189.
- Warner, E., and Oliver, J. D. 2008. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. *Appl Environ Microbiol.* 74 (1): 80-85.
- Warner, J. M., and Oliver, J. D. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl Environ Microbiol.* 64 (8): 3025-3028.
- Warner, J. M., and Oliver, J. D. 1999. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other vibrio species. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (3): 1141-1144.
- Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*. 18 (24): 7213.

Wong, H. C., Liu, S. H., and Chen, M. Y. 2005. Virulence and stress susceptibility of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* isolated from samples from Taiwan and the United States. *J Food Prot.* 68 (12): 2533-2540.

Yano, Y., Yokoyama, M., Satomi, M., Oikawa, H., and Chen, S. S. 2004. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. *J Food Prot.* 67 (8): 1617-1623.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani (LB) agar

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง LB agar 35 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50 °C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ : เติมน้ำ NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* spp.

2. Luria Bertani (LB) broth

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง LB broth 20 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

หมายเหตุ : เติมน้ำ NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* spp.

4. Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Yeast extract	5	g
Proteose peptone no.3	10	g
Sodium citrate	10	g
Sodium thiosulfate	10	g
Oxgall	8	g
Sucrose	20	g
Sodium chloride	10	g
Ferric citrate	1	g
Brom thymol blue	0.04	g
Bacto agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง TCBS 89 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน วางให้เย็นลงประมาณ 50 °C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

6. Tryptic soy broth (TSB)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Pancreatic digest of casein	15	g
Papaic digest of soybean	5	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง TSB 30 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

7. CHROMagar vibrio (CV)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Peptone & yeast extract	8	g
Chromogenic mix	0.3	g
Sodium chloride	51.4	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่ง CV 74.7 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนส่วนผสมละลายเข้ากัน วางให้เย็นลงประมาณ 50 °C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ (ทุกขั้นตอนการเตรียมต้องไม่ให้โดนแสง)

8. Mueller Hinton Agar (Difco)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Acid Digest of Casein	17.5	g
Beef extract powder	2.0	g
Starch	1.5	g
Agar	17.0	L

การเตรียม ชั่ง Mueller Hinton Agar 38 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด จนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 25 x 150 มิลลิลิตร ในปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 45-50 °C เทอาหารใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

9. Mueller Hinton Broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

Beef extract powder	2.0	g
Acid Digest of Casein	17.5	g
Soluble Starch	1.5	g

การเตรียม

ชั่ง Mueller Hinton broth 21 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟ อ่อนๆ แบ่งใส่หลอดขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

1.1 Loadind dye

ชั่ง Bromphenol blue 0.25 g และ Sucrose 4 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1.2 10x Tris borate EDTA (TBE) buffer

ชั่ง Tris base 108 g และ Boric acid 55 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 ml นำไปต้มพอละลาย อย่าให้เดือด แล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 จำนวน 40 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ml ด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำไปใช้ให้เจือจางในระดับความเข้มข้น 1:10 (1x TBE)

1.3 Ethidium bromine (10 mg/ml)

ชั่ง Ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก จนกว่าจะละลาย (ใช้เวลาหลายชั่วโมง) เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (ต้องสวมถุงมือทุกครั้งเตรียมและระวังอย่าหายใจเอาผง Ethidium bromide เข้าไประหว่างการชั่ง)

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform

2.1 Phosphate buffer solution (PBS) pH 8.0

Na ₂ HPO ₄	1.44	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
KCl	0.2	g
Sodium chloride	8	g
น้ำกลั่น	1	L

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

2.2 1 M EDTA

ชั่ง EDTA 372.2 g ในน้ำกลั่น 800 ml กวนอย่างแรงโดยใช้แท่งแม่เหล็ก แล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH ชนิดเกล็ด ซึ่ง EDTA สามารถละลายได้หมดพอดี จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

2.3 PBS-EDTA

ผสม PBS pH 8.0 ปริมาตร 240 μ l และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 60 μ l จะได้ PBS-EDTA ปริมาตร 300 μ l

2.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่น 90 ml ช้อนเล็กน้อยเพื่อให้ละลายดีขึ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

2.5 Phenol: Chloroform: isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)

ผสม Chloroform และ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ให้เข้ากัน จากนั้นเติม melted phenol ในอัตราส่วน 25 ผสมให้เข้ากันดี แล้วเติม 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อปิดผิวสารละลาย เขย่าแรงๆ ให้ผสมกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 วัน ปล่อยให้แยกชั้น เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.6 3M Sodium acetate (NaOAc)

ละลาย Sodium acetate trihydrate 408.1 g ด้วยน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วย Glacial acetic เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

2.7 Tris EDTA (TE) buffer

ผสมสารละลาย 10 mM Tris-HCl และสารละลาย 1 mM EDTA โดยละลาย Tris-HCl 1.211 g ในน้ำกลั่น แล้วเติมสารละลาย 0.5 M EDTA 1 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวชนัญญากานต์ แสงศรีคำ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210220020

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาคใต้	2537

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ต.พะวง
อ.เมือง จ.สงขลา

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ชนัญญากานต์ แสงศรีคำ 2554. การตรวจหาเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหารทะเล ในจังหวัดสงขลา.
ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ “มหาวิทยาลัยบูรพา 2554”. อาคาร 50 ปี
มหาวิทยาลัยบูรพา. 6-7 กรกฎาคม 2554.