รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีผลต่อสุขภาพ

Study of health affected pathogenic bacteria isolated from various sources

คณะนักวิจัย

ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์	**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**
ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร	**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**
ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ	**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**
ผศ.ดร.ภารนัย สุขุมังกูร	**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**
ดร.กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์	**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**
ดร.กมนนัทธ์ ศิงฆมานันท์	**ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์**

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ SCI580246M

ชื่อชุดโครงการ การศึกษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีผลต่อสุขภาพ
Study of health affected pathogenic bacteria isolated from various sources

ชื่อโครงการย่อย

1. การหาเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในปลาเพาะเลี้ยง
   Investigation of pathogenic *Vibrio* spp. in cultured fish
2. การเปรียบเทียบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในจังหวัดสงขลา
   Comparison of PCR-based techniques for typing of *Vibrio cholerae* strains isolated from clinical and environmental samples in Songkhla province
3. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
   Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from seafood and clinical specimens using molecular techniques
4. ความชุกของเชื้อ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) ในเนื้อสัตว์ค้าปลีก
   Prevalence of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in retailed meats
5. การตรวจหาเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
   Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in Songklanagarind Hospital
6. การแยกแยะสายพันธุ์และการตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* ที่รวดเร็ว ทางอณูวิทยา
   Molecular genotyping and rapid detection of *Clostridium difficile*

คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด

ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ผศ.ดร.ภารนัย สุขุมังกูร	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ดร.กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ดร.กมนนัทธ์ ศิงฆมานันท์	ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

บทนำ

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารยังคงเป็นปัญหาใหญ่ที่สำคัญยิ่งของประเทศไทยมาเป็นเวลานาน จนถึงปัจจุบัน สาเหตุเกิดจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน จำนวนประชากรที่เกิดโรคท้องร่วงเฉียบพลันแต่ละปีเท่ากับ 1 ล้านคน และมีรายงานการเกิดโรคอาหารเป็นพิษมากกว่า 120,000 ราย/ปี

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารสามารถแพร่กระจายจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งหรือเกิดการระบาดได้ในกลุ่มคนที่อยู่ร่วมกันและบริโภคอาหารจากแหล่งเดียวกันได้ ทำให้เกิดความเสียหายไม่เพียงแต่บุคคลเท่านั้น ยังมีผลต่อเศรษฐกิจของประเทศ คือนอกจากจะทำให้เสียโอกาสในการทำงานขณะป่วย ยังต้องสูญเสียเงินในการรักษา ซึ่งแต่ละปีมีรายงานจากกระทรวงสาธารณสุขถึงค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยในกลุ่มนี้สูงมาก ทำให้เป็นภาระของประเทศ จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ต้องศึกษาถึงเชื้อสาเหตุ เพื่อหาทางควบคุมและป้องกันโรค นอกจากนี้ยังต้องมีการจัดการให้มีแหล่งอาหารที่ดีเพื่อผู้บริโภคด้วย

สาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ การรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย หรือไวรัสปนเปื้อน ที่พบบ่อยได้แก่เชื้อ *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., Norovirus และอื่น ๆ การรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงไม่สุกก็มีโอกาสติดเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* เป็นต้น นอกจากนี้ ในผู้ที่รับประทานยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ๆ ก็มีโอกาสติดเชื้อ *Clostridium difficile* ได้ ด้วยเหตุนี้ การตรวจหาเชื้อและปริมาณเชื้อในอาหารจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของอาหารและป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อในอาหารให้แก่ผู้บริโภค อีกทั้งยังเป็นแนวทางให้เกิดการปรับปรุงคุณภาพอาหารให้ดีขึ้น ไม่เพียงแต่เป็นประโยชน์ต่อคนไทยที่เป็นผู้บริโภคเท่านั้น แต่ยังเป็นการยกระดับคุณภาพอาหารของไทยให้สูงขึ้นเทียบเท่ากับ international food standard ซึ่งจะช่วยสนับสนุนให้ประเทศไทยเป็นประเทศส่งออกอาหารที่ได้มาตรฐานด้วย นอกจากนี้ การพัฒนาวิธีการตรวจที่รวดเร็วและแม่นยำก็เป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยให้ได้ข้อมูลที่รวดเร็วและถูกต้อง สุดท้าย การจัดการแหล่งอาหารให้มีคุณภาพและปลอดภัยก็เป็นสิ่งที่ทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์อีกด้วย

ทั้ง 6 โครงการวิจัยภายใต้ชุดโครงการนี้ ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคในทางเดินอาหาร ซึ่งมีทั้งในด้านการพัฒนาเทคนิคในการตรวจหาเชื้อ การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ การศึกษาทางด้านระบาดวิทยาและความชุกของเชื้อที่พบปนเปื้อนในอาหาร และการศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อและคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นโครงการวิจัยที่มีความสอดคล้องกัน และข้อมูลที่ได้จากการศึกษายังสามารถพัฒนาเป็นโครงการวิจัย

ต่อเนื่องได้ เช่น การพัฒนาการเพาะเลี้ยงชายฝั่งให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโดยใช้วิธีทางชีวภาพ เพื่อให้ผู้บริโภคได้มีแหล่งอาหารที่ปลอดภัย การลดการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร หรือเป็นข้อมูลในการติดตามและเฝ้าระวังการระบาดของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกและศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหาร สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย และปลาเพาะเลี้ยงในจังหวัดสงขลา
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหาร สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย และปลาเพาะเลี้ยงในจังหวัดสงขลาโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
3. เพื่อพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจหา จำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารและสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

สรุปผลการดำเนินงาน

โครงการย่อยที่ 1 การหาเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในปลาเพาะเลี้ยง
Investigation of pathogenic *Vibrio* spp. in cultured fish

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
งบประมาณที่ได้รับ 440,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี
เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม ปี 2557 ถึง เดือนกันยายน ปี 2559

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถจัดแบ่งเชื้อ vibrios สายพันธุ์มาตรฐาน สำหรับเตรียมเป็น DGGE marker ได้ 8 กลุ่ม เพื่อใช้ในการประเมินความหลากหลายของเชื้อ vibrios ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

2. จากการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อ vibrios จำนวนทั้งสิ้น 347 ไอโซเลต ได้จากกุ้งขาวที่เป็นโรค จำนวน 30 ไอโซเลต ปลาเพาะเลี้ยงชายฝั่งที่เป็นโรคจำนวน 241 ไอโซเลต และจากสิ่งแวดล้อมจำนวน 53 ไอโซเลต โดยใช้อาหาร TCBS agar และ CHROMagar Vibrio

3. ทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยเทคนิค DGGE ร่วมกับ species-specific PCR พบว่า มีเชื้อ vibrios จำนวน 4 สายพันธุ์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างมากที่สุด ได้แก่ เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 81 ไอโซเลต *V. harveyi* จำนวน 68 ไอโซเลต *V. vulnificus* จำนวน 35 ไอโซเลต และ *V. alginolyticus* จำนวน 28 ไอโซเลต โดยให้ผล DGGE ตรงกับ DGGE marker และให้ผลบวกกับการทดสอบโดยวิธี species-specific PCR

4. พบเชื้อที่ปรากฏตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอตรงกับ DGGE marker แต่ไม่สามารถยืนยันได้โดยวิธี species-specific PCR ซึ่งได้ทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี DNA sequencing พบว่าเป็นเชื้อ vibrios สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *V. campbellii, V. coralliilyticus, V. navarrensis*, *V. azureus, V. rotiferianus, V. owensii, V. diabolicus, V. tubiashii, V. neresis*, *V. hangzhouensis* เป็นต้น

5. พบเชื้อที่ปรากฏตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอไม่ตรงกับ DGGE marker และไม่สามารถยืนยันได้โดยวิธี species-specific PCR ซึ่งได้ทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี DNA sequencing พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น *Shewanella algae* และ *Enterovibrio nigrican* ซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลเช่นกัน

6. จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ โดยวิธี AP-PCR พบว่ามีแตกต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระดับสูง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียนี้

ผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ	manuscript พร้อมตีพิมพ์	1 เรื่อง
ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบ proceeding		1 เรื่อง
ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบ poster		1 เรื่อง

การผลิตบัณฑิต

นักศึกษาปริญญาโท 1 คน

ทุนวิจัยต่อยอด

1. หัวหน้าโครงการ	การแยกและประเมินประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจในการควบคุมเชื้อวิบริโอ
แหล่งทุน	ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2560
งบประมาณที่ได้รับ	440,000 บาท
ระยะเวลาโครงการ	2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม ปี 2559 ถึง เดือนกันยายน ปี 2561

โครงการย่อยที่ 2 การเปรียบเทียบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในจังหวัดสงขลา
Comparison of PCR-based techniques for typing of *Vibrio cholerae* strains isolated from clinical and environmental samples in Songkhla province

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

งบประมาณที่ได้รับ 440,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม ปี 2557 ถึง เดือนกันยายน ปี 2559

สรุปผลการทดลอง

1. ยีนที่ตรวจพบใน *V. cholerae* ส่วนใหญ่ (89%) คือ ยีน *hlyA* และ *vasH* (T6SS) โดยสามารถจัดกลุ่ม *V. cholerae* ที่แยกได้ตามรูปแบบของการมียีนก่อโรคออกเป็น 12 กลุ่ม ซึ่ง *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่มียีน *ctxA*, *zot*, *ace*, *tcpA*, *hlyA* (El Tor) และ *vasH* ซึ่งเป็นยีนก่อโรคสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษในการทำให้เกิดอหิวาตกโรค *V. cholerae* non-O1/non-O139 ส่วนใหญ่มีรูปแบบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคที่หลากหลายมาก และเกือบทั้งหมดตรวจไม่พบยีน *ctxA*, *zot*, *ace* หรือ *tcpA* ส่วน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความแตกต่างจากรูปแบบยีนที่พบในกลุ่มของ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 ซึ่งยีนที่พบสัมพันธ์กับเชื้อในกลุ่มนี้ คือ ยีน *vcsV2* (T3SS)

2. *V. cholerae* O1 แต่ละไอโซเลทมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูงมาก และมีความใกล้ชิดกับ *V. cholerae* O139 ส่วน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ทั้งที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ *V. cholerae* บางไอโซเลทที่แยกจากผู้ป่วยมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกับไอโซเลทที่พบในสิ่งแวดล้อม แสดงให้เห็นว่ายังคงพบเป็นเชื้อ ประจำถิ่นบริเวณนี้ หรือ อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นประชากรที่บริโภคน้ำ หรืออาหารทะเลจากแหล่งดังกล่าวจึงมีความเสี่ยงในการเกิดโรคได้

3. เทคนิค PCR ต่าง ๆ ทั้ง 5 เทคนิค มีคุณสมบัติดีและด้อยที่แตกต่างกัน ในการนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. cholerae*)ตารางที่ 8) ดังนั้นการพิจารณาเลือกใช้เทคนิคใดนั้น จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

ผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ manuscript พร้อมตีพิมพ์ 1 เรื่อง

ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบ proceeding 1 เรื่อง

ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบ poster 1 เรื่อง

การผลิตบัณฑิต

นักศึกษาปริญญาโท 1 คน

โครงการย่อยที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from seafood and clinical specimens using molecular techniques

หัวหน้าโครงการ ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

งบประมาณที่ได้รับ 721,600 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม ปี 2557 ถึง เดือนกันยายน ปี 2559

สรุปผลการทดลอง

1. ผลจากการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Vibrio vulnificus* มีความหลากหลายสูง และมี ยีนหลายยีนที่อาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในปลา และ ในคน

2. ยีนเหล่านี้ได้แก่ *vcg* type, *manIIA* ยีน, *nanA* ยีน, *nab* ยีน และ PRXII โดยพบยีนเหล่านี้ในเชื้อที่ก่อโรคในปลา และในคน สูงกว่าในเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม

3. ผลการทดสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นว่า น้ำเลี้ยงเชื้อจากกลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่ากลุ่มอื่น อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบการสลายเม็ดเลือดแดงกับตัวเซลล์ พบว่าเชื้อในกลุ่มที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ต่ำกว่ากลุ่มอื่น

4. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อ Caco-2 cell ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของเชื้อแต่ละกลุ่ม

ผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

-

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากเชื้อ *V. vulnificus* มีความหลากหลายมาก ทำให้ไม่สามารถใช้ primer คู่เดิมในการทำ VNTR และ MLST ได้ ดังนั้นสำหรับบางสายพันธุ์ต้องสร้าง primer ใหม่รวมทั้งสภาวะในการทำ PCR ใหม่ ปัจจุบันได้ผลเป็นที่เรียบร้อยแล้ว และกำลังส่งวิเคราะห์ VNTR และ MLST คาดว่าจะแล้วเสร็จภายในวันที่ 20 กันยายน 2560 นี้ จากนั้นจึงดำเนินการวิเคราะห์ผลเพิ่มเติมและจะพร้อมส่งร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ภายในวันที่ 15 ตุลาคม 2560

โครงการย่อยที่ 4	ความชุกของเชื้อ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) ในเนื้อสัตว์ค้าปลีก Prevalence of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in retailed meats
หัวหน้าโครงการ	รศ.ดร.ภารนัย สุขุมังกูร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ได้รับอนุมัติงบประมาณ	ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
งบประมาณที่ได้รับ	440,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	2 ปี
เริ่มทำการวิจัยเมื่อ	ตุลาคม ปี 2557 ถึง เดือนกันยายน ปี 2559
สถานะโครงการ	ส่งรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์แล้ว

โครงการย่อยที่ 5 การตรวจหาเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in Songklanagarind Hospital

หัวหน้าโครงการ ดร.กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
งบประมาณที่ได้รับ 440,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี
เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม ปี 2557 ถึง เดือนกันยายน ปี 2559

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคัดแยก *S. maltophilia* โดยการเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ บริเวณหออภิบาลผู้ป่วย (ICU) หออายุรกรรม (MED) หอผู้ป่วยโรคทางเดินหายใจ (RCU) และตัวอย่างอาหารพร้อมรับประทานสำหรับผู้ป่วยทั่วไป ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึง มกราคม พ.ศ. 2558 ผลการศึกษาสามารถแยก *S. maltophilia* จากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล จำนวน 157 isolates โดยพบเชื้อส่วนใหญ่บริเวณอ่างล้างมือ คิดเป็น 75% รองลงมาคือ น้ำดื่มและน้ำประปา คิดเป็น 41.7 และ 16.7% ตามลำดับ

2. ทำการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธี disk diffusion และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา co-trimoxazole, ciprofloxacin, ceftazidime และpiperacillin/ tazobactam ในการยับยั้งเชื้อโดยวิธี E-test พบว่า *S. maltophilia* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาต้านจุลินทรีย์สูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล ผลการหาค่า MIC พบว่า *S. maltophilia* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยดื้อต่อยา co-trimoxazole 6.3% และมีค่า MIC_{50}/ MIC_{90} เท่ากับ 0.064/0.064 µg/ml ส่วน *S. maltophilia* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมพบว่าเชื้อดื้อต่อยา co-trimoxazole คิดเป็น 10.8% โดยมีค่า MIC_{50}/MIC_{90}เท่ากับ 0.047/0.094 µg/ml

3. ตรวจหายีนดื้อต่อยา sulfonamide (*sul1*, *sul2* และ *sul3*), trimethoprim (*dfrA9*, *dfrA10* และ *dfrA20*) และ class 1 integronโดยวิธี PCR พบว่า *S. maltophilia* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยให้ผลบวกต่อยีน *sul1* จำนวน 4 isolates ส่วน *S. maltophilia* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมให้ผลบวกต่อยีน *sul1* จำนวน 7 isolates, *sul2* จำนวน 3 isolates และให้ผลบวกทั้งยีน *sul2* และ *sul3* จำนวน 1 isolate อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อที่ให้ผลบวกต่อยีน *dfr*

4. ผลจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *S. maltophilia* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาลและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย โดยวิธี PFGE สามารถจำแนกความแตกต่างของลาย

พิมพ์ดีเอ็นเอได้เป็น 9 clusters ทั้งนี้เชื้อจากทั้งสองกลุ่มมีความหลากหลายสูงและมีลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่สัมพันธ์กัน

ผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 1 เรื่อง

ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบ proceeding 1 เรื่อง

การผลิตบัณฑิต

นักศึกษาปริญญาโท 1 คน

โครงการย่อยที่ 6 **การแยกแยะสายพันธุ์และการตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* ที่รวดเร็วทางอณูวิทยา**

Molecular genotyping and rapid detection of *Clostridium difficile*

หัวหน้าโครงการ ดร.กมนนัทธ์ ศิงฆมานันท์ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

งบประมาณที่ได้รับ 716,100 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม ปี 2557 ถึง เดือนกันยายน ปี 2559

สรุปผลการทดลอง

1. การตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* สายพันธุ์ก่อโรคโดยตรงจากตัวอย่างอุจจาระส่งตรวจด้วยเทคนิค multiplex direct- PCR และ direct-LAMP ซึ่งอาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ผลิต toxin ของเชื้อโดยปราศจากการสกัดดีเอ็นเอ สามารถทำซ้ำได้ และมีความจำเพาะสูง จากตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ *C. difficile* จำนวน 393 ตัวอย่าง เทคนิค multiplex direct-PCR และ direct-LAMP มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก และค่าพยากรณ์ลบ ดังนี้ multiplex direct-PCR (88.2% 100%, 100% และ 99.4%) และdirect-LAMP (88.2%, 100%, 100% และ 99.4%) เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน toxigenic culture ที่มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก และค่าพยากรณ์ลบ 94.1%, 100%, 100% และ 99.7%

2. เทคนิค multiplex direct-PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ในปริมาณน้อยที่สุดได้ 10^5 CFU/ml และ 10^6 CFU/ml เมื่อเตรียมตัวอย่างอุจจาระด้วยการ spike ในขณะที่เทคนิค LAMP สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ในปริมาณน้อยที่สุดได้ 10^0 CFU/ml จากการเพิ่มปริมาณของยีน *16s rRNA* และยีน *tcdB* ของเชื้อ และเมื่อเตรียมตัวอย่างอุจจาระด้วยการ spike สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ปริมาณน้อยสุดได้ 10^0 และ 10^1 CFU/ml เมื่อเพิ่มปริมาณของยีน *16s rRNA* และยีน *tcdB* ของเชื้อตามลำดับ

3. การตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* สายพันธุ์ก่อโรคโดยตรงจากตัวอย่างอุจจาระส่งตรวจด้วยเทคนิค multiplex-direct PCR และ direct-LAMP ของเชื้อโดยปราศจากการสกัดดีเอ็นเอ เป็นวิธีที่รวดเร็วเทียบได้กับเทคนิค EIA ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในงานประจำและได้รับการรับรองจาก FDA อาศัยการตรวจหา toxin ของเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

4. การตรวจหาเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ก่อโรคโดยวิธี multiplex direct-PCR และ direct LAMP มีความรวดเร็ว ความไว และความจำเพาะสูง ทั้งสองวิธีจึงมีแนวโน้มสูงในการประยุกต์ใช้ในงานประจำ

5. เทคนิค MALDI-TOF MS สามารถแยกเชื้อ *C. difficile* จากแบคทีเรียชนิดอื่นได้ และแยกแยะกลุ่มของเชื้อ *C. difficile* ภายในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยอิงตามความ

คล้ายคลึงกันของลายพิมพ์มวลเปปไทด์ นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ที่ก่อโรคกระจายอยู่ในกลุ่มย่อยที่แตกต่างกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโปรไฟล์โปรตีนของเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ที่ก่อโรคมีรูปแบบของสเปคตรัมที่กว้าง กลุ่มย่อย B เป็นกลุ่มหลักของเชื้อ *C. difficile* ที่พบในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งมีการกระจายมากในหอผู้ป่วยอายุรกรรมชาย

6. การศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นครั้งแรกที่ศึกษาระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ *C. difficile* โดยใช้วิธี MALDI-TOF MS ในประเทศไทย

ผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ	manuscript พร้อมตีพิมพ์	2 เรื่อง
ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบ proceeding		1 เรื่อง
ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบ poster		1 เรื่อง

การถ่ายทอดเทคโนโลยี

วิทยากร โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการชีวเวชศาสตร์เรื่อง “Basic molecular techniques: Multiplex loop mediated isothermal amplification and Multiplex polymerase chain reaction” ระหว่างวันที่ 23-24 กรกฎาคม 2558 ณ ห้องประชุมชั้น 1 และห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ (อาคารวิจัย รัตน์ ประธานราษฎร์นิกร) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การผลิตบัณฑิต

นักศึกษาปริญญาโท 1 คน

ทุนวิจัยต่อยอด

1. หัวหน้าโครงการ	Effects of concentrations of biocides on virulence function in *Acinetobacter baumannii* strains: insight in their biofilm adaptation
แหล่งทุน	สกว .ปี 2558
งบประมาณที่ได้รับ	600,000 บาท
ระยะเวลาโครงการ	2 ปี ตั้งแต่ กรกฎาคม 2560 ถึง มิถุนายน 2558
2. หัวหน้าโครงการ	Screening for a novel bacterial agent possessing antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*
แหล่งทุน	ทุนบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุ ปี 2558
งบประมาณที่ได้รับ	900,000 บาท
ระยะเวลาโครงการ	3 ปี ตั้งแต่ กันยายน 2559 ถึง สิงหาคม 2562