รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณลักษณะของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและปลาที่เป็นโรค

Characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from environments and diseased fish

คณะนักวิจัย

ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์

ศ.ดร.วราภรณ์ วุฒฑะกุล

ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร

ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ

ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ SCI560062S

ชื่อโครงการเดี่ยว

(ภาษาไทย) : คุณลักษณะของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและปลาที่เป็นโรค

(ภาษาอังกฤษ) : Characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from environments and diseased fish

คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด (คณะ/ภาควิชาหรือหน่วยงาน)

ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
ศ.ดร.วราภรณ์ วุฒฑะกุล	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ	สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง จ. สงขลา

สารบัญ

	Page
กิตติกรรมประกาศ	4
Abstract	5
บทคัดย่อ	6
Introduction	7
Objectives	8
Literature review	8
Materials and methods	13
Results and discussion	18
Table 1. PCR amplification results using collagenase, *tox*R, *omp*K and *gyr*B primers	20
Table 2. Biochemical and molecular identification of *V. alginolyticus* isolated from various sources	21
Table 3. Virulence test of *V. alginolyticus* isolated from diseased fish and environments in *G. mellonella* model	22
Table 4. Virulence types of *V. alginolyticus* isolated from diseased fish and environments	23
Figure 1. The dead larvae after injected with the pathogenic *V. alginolyticus* strain V10	24
Figure 2. Two-dimensional gel electrophoresis protein patterns of the strains KF2.4 (A) and W6.2 (B)	25
Conclusion	26
References	27
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสาหรับการวิจัยต่อไป ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะในส่วนที่ไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้ตามวัตถุประสงค์	35
Appendix I: Manuscript	36
Appendix II: Proceedings	67
Appendix III: Poster presentations	82

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินท์ ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านการวิจัย สถานที่ รวมถึงเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการวิจัย ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชา เจ้าหน้าที่และผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน โดยเฉพาะ ศ.ดร.วราภรณ์ วุฒฑะกุล ที่เป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ นางสาวสุพรรษา บุญพา นักศึกษาปริญญาเอกผู้ช่วยวิจัย ที่ขยันและอดทนในการทำวิจัยจนประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2556 (รหัสโครงการ SCI560062S) ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านการเงิน ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินไปได้จนแล้วเสร็จตามวัตถุประสงค์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดชา เสริมวิทยวงศ์ ที่คอยให้คำแนะนำปรึกษา รวมถึงแก้ไขร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณคุณแม่ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

Abstract

In this study, primers specific to the *gyr*B gene of *Vibrio alginolyticus* were developed. A total of 160 strains of *V. alginolyticus* were isolated from clinical (10), diseased fish (20) and environmental (130) samples using CHROMagar Vibrio and biochemical tests. PCR using *gyr*B, collagenase, *tox*R and *omp*K primers were performed on clinical strains. Nine out of 10 strains showed a positive result using *gyr*B and collagenase primers. Five out of 10 were positive using *tox*R primers. *Omp*K primers failed to identify *V. alginolyticus* isolated from clinical samples. Only 139 and 134 out of 160 strains were positive by PCR using *gyr*B and collagenase primers, respectively. Five environmental strains positive for *gyr*B gene but negative for collagenase gene were confirmed by 16S rRNA sequencing. The sequences were more than 99% homology to *V. alginolyticus.* Therefore, PCR using *gyr*B primers showed higher specificity and sensitivity than collagenase, *tox*R and *omp*K primers. These primers could be used to identify *V. alginolyticus* isolated from various sources. Virulence test of *V. alginolyticus* was performed on *Galleria mellonella* larvae. Eleven and 33 strains of *V. alginolyticus* isolated from diseased fish and environmental samples, respectively were selected for virulence test. They were classified into three virulence types. The high virulence strains were observed only in those isolated from diseased fish (5/11, 45.45%) with the death rates of 66.7 to 100%. The low virulence strains of *V. alginolyticus* were observed in both isolated from diseased fish (1/11, 9.10%) and environments (13/33, 39.39%). The nonvirulence strains were found in both diseased fish (5/11, 45.45%) and environments (20/33, 60.61%). This indicates that *V. alginolyticus* can be both true and opportunistic pathogens in fish. The differentially expressed proteins of the highest virulence strain KF2.4 and the nonvirulence strain W6.2 were observed using two-dimensional gel electrophoresis. At least 20 proteins were upregulated in the virulence strain KF2.4. These proteins may be the virulence factors which involved in the pathogenicity of the bacteria and need further identification and characterization. *V. alginolyticus* virulence factor determination will be the useful information for further development of pathogenic identification method and vaccine development against pathogenic *V. alginolyticus*.

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *Vibrio alginolyticus* เชื้อ *V. alginolyticus* ทั้งหมด 160 สายพันธุ์ แยกได้จากผู้ป่วย (10) ปลาเป็นโรค (20) และสิ่งแวดล้อม (130) โดยใช้อาหาร CHROMagar Vibrio และการทดสอบทางชีวเคมี ได้ทำการทดสอบเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ *gyr*B collagenase *tox*R และ *omp*K พบว่า 9 จาก 10 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ *gyr*B และ collagenase 5 จาก 10 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ *tox*R ส่วนไพรเมอร์ *omp*K ไม่สามารถจำแนกเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยได้ จากเชื้อทั้งหมดที่ใช้ทดสอบพบว่า ไพรเมอร์ *gyr*B และ collagenase ให้ผลบวกโดยเทคนิค PCR 139 และ 134 สายพันธุ์ตามลำดับ ทำการยืนยัน 5 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ *gyr*B แต่ให้ผลลบกับไพรเมอร์ collagenase โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความเหมือนกับ *V. alginolyticus* ร้อยละ 99 ดังนั้น เทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ *gyr*B จึงมีความจำเพาะและความไวมากกว่าไพรเมอร์ collagenase *tox*R และ *omp*K ซึ่งไพรเมอร์นี้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกมาจากแหล่งต่าง ๆ ได้ การทดสอบความรุนแรงของเชื้อได้ทำการทดสอบในตัวอ่อนของ *Galleria mellonella* โดยคัดเลือกเชื้อ *V. alginolyticus* ที่นำมาทดสอบจำนวน 11 สายพันธุ์จากปลาเป็นโรค และ 33 สายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อม สามารถจัดจำแนกเชื้อตามความรุนแรงในการก่อโรคได้ 3 กลุ่ม สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงสามารถพบได้ในเชื้อที่แยกได้จากปลาเป็นโรคเท่านั้น (5/11, ร้อยละ 45.45) โดยมีอัตราการตายร้อยละ 66.7 ถึง 100 สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำสามารถพบได้ทั้งในเชื้อที่แยกได้จากปลาเป็นโรค (1/11, ร้อยละ 9.10) และสิ่งแวดล้อม (13/33, ร้อยละ 39.39) สายพันธุ์ที่ไม่มีความรุนแรงสามารถพบได้ทั้งในเชื้อที่แยกได้จากปลาเป็นโรค (5/11, ร้อยละ 45.45) และสิ่งแวดล้อม (20/33, ร้อยละ 60.61) แสดงให้เห็นว่า *V. alginolyticus* สามารถเป็นได้ทั้งเชื้อสาเหตุของโรคและเชื้อฉวยโอกาสในปลาได้ การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อสายพันธุ์ KF2.4 ที่มีความรุนแรงสูงที่สุด กับเชื้อสายพันธุ์ W6.2 ที่ไม่มีความรุนแรง โดยเทคนิค two-dimensional gel electrophoresis พบว่ามีโปรตีนอย่างน้อย 20 ชนิดที่มีการแสดงออกที่สูงขึ้นในเชื้อสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูง KF2.4 โปรตีนเหล่านี้อาจเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียซึ่งจำเป็นที่จะต้องจำแนกและศึกษาลักษณะของโปรตีนเหล่านี้ต่อไป การศึกษาหาปัจจัยก่อความรุนแรงของ *V. alginolyticus* จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการพัฒนาวิธีจำแนกเชื้อสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงรวมถึงการพัฒนาวัคซีนต้านเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคต่อไป