



การเปรียบเทียบความรุนแรงและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*
ก่อโรคตับวายเฉียบพลันจากพื้นที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) ที่แตกต่างกันในประเทศไทย

Comparison of the Virulence and Antibiotic Resistant of *Vibrio*
parahaemolyticus Caused of Acute Hepatopancreatic Necrosis
Disease (AHPND) from Different Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) Cultured Area in Thailand

พรพิมล ทิวแพ
อรอนงค์ คงทวี
จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์

Pornphimon Tiewpair
Orn-anong Kongtawee
Julaiwan Roongkamnertwongsa

กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ

กรมประมง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Aquatic Animal Health Research and
Development Division

Department of Fisheries

Ministry of Agriculture and Cooperatives



การเปรียบเทียบความรุนแรงและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*
ก่อโรคตับวายเฉียบพลันจากพื้นที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) ที่แตกต่างกันในประเทศไทย

Comparison of the Virulence and Antibiotic Resistant of *Vibrio*
parahaemolyticus Caused of Acute Hepatopancreatic Necrosis
Disease (AHPND) from Different Pacific White Shrimp (*Litopenaeus*
vannamei, Boone 1931) Cultured Area in Thailand

พรพิมล ทิวแพ
อรอนงค์ คงทวี
จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์

Pornphimon Tiewpair
Orn-anong Kongtawee
Julaiwan Roongkamnertwongsa

ศูนย์วิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา

Songkhla Aquatic Animal Health Research
and Development Center

กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ

Aquatic Animal Health Research and
Development Division

กรมประมง

Department of Fisheries

๒๕๖๖

2023

รหัสทะเบียนวิจัย 62 1 0305 62012

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	4
วิธีดำเนินการ	5
1. สถานที่และระยะเวลาดำเนินการทดลอง	5
2. การรวบรวมและยืนยันผลการติดเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}	5
3. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ Vp_{AHPND} ต่อการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม	7
4. การทดสอบความไวและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ Vp_{AHPND} ต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Agar disk diffusion	10
5. การวิเคราะห์ข้อมูล	11
ผลการศึกษา	12
1. ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่าง	12
2. ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ต่ออัตราการตายของกุ้งขาวแวนนาไม	13
3. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อ Vp_{AHPND}	18
4. ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}	19
วิจารณ์ผลการศึกษา	21
สรุปผลการศึกษา	23
คำขอบคุณ	23
เอกสารอ้างอิง	24

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการยืนยันผลการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ด้วยวิธี Multiplex PCR	6
2	การแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ	11
3	จำนวนตัวอย่างแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่รวบรวมได้จากแต่ละจังหวัด	13
4	รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่ใช้ทดสอบความรุนแรงในกุ้งขาวของการศึกษารั้งนี้	13
5	ปริมาณของเชื้อไวรัสโอในน้ำของถังพลาสติกสำหรับแช่เชื้อทั้งก่อนและหลังการเติมเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ของแต่ละไอโซเลท	14
6	จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ของการศึกษานี้	20
7	ค่าดัชนีการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ต่อยาหลายชนิด (MAR index) ของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}	21
8	รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} (N=37)	21
 ตารางผนวกที่		
1	ผลการทดสอบความไวรับของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดด้วยวิธี Agar disk diffusion	28

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	จังหวัดที่เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> สำหรับการศึกษาครั้งนี้	5
2	ภาพถ่าย Agarose gel ของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> ส่วนหนึ่งที่ใช้ในการทดลอง	12
3	ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในกระเพาะอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> แต่ละไอโซเลท	15
4	ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> แต่ละไอโซเลท	16
5	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> แต่ละไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุม (Control)	17
6	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อ <i>Vp_{AHPND}</i> แต่ละไอโซเลทเมื่อสิ้นสุดการทดลอง	17
7	ภาพตัดตามยาว (Longitudinal section) ของตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมปกติ (กำลังขยาย 100 เท่า) ที่แสดงลักษณะเซลล์ตับและตับอ่อนแบบต่าง ๆ เมื่อย้อมด้วยสี Haematoxylin และ eosin (H&E)	18
8	ภาพตัดตามยาว (Longitudinal section) ของตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่พบการติดเชื้อตับวายเฉียบพลัน (<i>Vp_{AHPND}</i>) ในกลุ่มติดเชื้อแบบรวดเร็ว ที่แสดงลักษณะผนังเซลล์	18
9	ภาพตัดตามยาว (Longitudinal section) ของตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่พบการติดเชื้อตับวายเฉียบพลัน (<i>Vp_{AHPND}</i>) ในกลุ่มติดเชื้อแบบเรื้อรังแต่ละระยะ เมื่อย้อมด้วยสี H&E	19
10	การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> ด้วยวิธี Agar disk diffusion	20

การเปรียบเทียบความรุนแรงและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*
ก่อโรคตับวายเฉียบพลันจากพื้นที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) ที่แตกต่างกันในประเทศไทย

นางสาวพรพิมล ทิวแพ¹, นางสาวอรอนงค์ คงทวี², และ นางจุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์³

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา

³สำนักงานประมงจังหวัดยะลา

บทคัดย่อ

ศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ก่อโรคตับวายเฉียบพลัน (*Vp_{AHPND}*) จากพื้นที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่แตกต่างกันในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา ตรัง กระบี่ ภูเก็ต สมุทรสาคร และจันทบุรี ในระหว่างปี พ.ศ. 2562 – 2563 ซึ่งเมื่อยืนยันผลการทดสอบด้วยเทคนิค Multiplex PCR พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ทั้งสิ้น 37 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ที่รวบรวมได้จากแต่ละจังหวัด จำนวน 14 ไอโซเลท มาทดสอบความรุนแรงต่อกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีการแช่เชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^5 cfu/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีระดับความรุนแรงของเชื้อที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองส่งผลทำให้กุ้งขาวแวนนาไมมีอัตราการตายตั้งแต่ 37.5 - 82.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อไอโซเลท CG294 มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุดเท่ากับ 37.5 ± 9.57 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากผลการตรวจสอบปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในกระเพาะอาหาร ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อ *Vp_{AHPND}* พบว่าในระยะแรก (12 ชั่วโมงหลังการแช่เชื้อ) เป็นการติดเชื้อในกระเพาะอาหาร โดยพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในกระเพาะอาหารประมาณ 10^5 - 10^6 cfu/g หลังจากนั้นจึงพบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในตับและตับอ่อนเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 96 หลังจากการแช่เชื้อ โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อวิบริโอรวมทั้งหมดประมาณ 10^6 - 10^7 cfu/g ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน เช่น R cell ที่พบ B-cell และ F cell น้อยลง การพบเซลล์ตับและตับอ่อนเริ่มมีลักษณะ ลีบ ฝ่อ ผนังบาง และพบการหลุดของเซลล์เข้ามาในท่อตับและตับอ่อน เป็นต้น ส่วนการทดสอบความไวของเชื้อ *Vp_{AHPND}* ต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อ *Vp_{AHPND}* ทุกไอโซเลทมีความไวต่อยา Oxolinic acid และมีค่าดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) เท่ากับ 0.32 ± 0.34

คำสำคัญ: โรคตับวายเฉียบพลัน, ความรุนแรง, อัตราการตาย, รูปแบบการดื้อยา, ยาปฏิชีวนะ

ผู้รับผิดชอบ : 97/1 หมู่ 4 ต. ตะเคียนทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี 84160 โทร 0 7725 5288

E-mail: pornphimontew@gmail.com

Comparison of the Virulence and Antibiotic Resistant of *Vibrio parahaemolyticus* Caused of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) from Different Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) Cultured Area in Thailand

Pornphimon Tiewpair¹, Orn-anong Kongtawee² and Julaiwan Roongkamnertwongsa³

¹Suratthani Coastal Aquaculture Research and Development Center

²Songkhla Aquatic Animal Health Research and Development Center

³Yala Provincial Fisheries Office

Abstract

A comparative study was conducted to assess the virulence and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), from different whiteleg shrimp farming areas in Thailand. The study focused on Songkhla, Trang, Krabi, Phuket, Samut Sakhon, and Chanthaburi Provinces during 2019-2020. A total of 37 isolates of *Vp*_{AHPND} were confirmed by multiplex PCR technique. To evaluate the virulence of the isolates on white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), 14 isolates were selected and tested by immersion method at a concentration of 10^5 cfu/ml for 6 hours. The results showed variations in the virulence levels of the isolates, with shrimp mortalities ranging from 37.5% to 82.5%. Notably, the CG294 isolate exhibited the lowest survival rate at $37.5\% \pm 9.57\%$. Further examination of the bacterial load of *Vp*_{AHPND} in the shrimp's stomach and hepatopancreas revealed that colonization initially occurred in the stomach (12 hours after exposure), with bacterial loads ranging from 10^5 - 10^6 cfu/g. Subsequently, the bacterial load in the hepatopancreas increased significantly, reaching 10^6 - 10^7 cfu/g at 96 hours after exposure. These changes in bacterial colonization led to alterations in the histopathological characteristics of the hepatopancreas, including the presence of R cells, reduced B-cell and F-cell, thinning of the hepatopancreatic wall, and cellular infiltration into the hepatopancreatic tubules. Regarding drug resistance testing, all *Vp*_{AHPND} isolates showed sensitivity to oxolinic acid. The MAR index, indicating the level of resistance to multiple antibiotics was 0.32 ± 0.34 .

Keyword: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), Virulence, Survival rate, Antibiotic resistance pattern, Antibiotic

***Corresponding author:** 97/1 Moo 4, Thakian-thong Sub-district, Kanchanadit District, Surat Thani Province 84160. e-mail: pornphimontew@gmail.com

คำนำ

อาการตายด่วน (EMS) หรือโรคตับวายเฉียบพลัน (AHPND) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายให้แก่ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นวงกว้าง โดยมีรายงานการพบครั้งแรกที่ประเทศจีน ในปี พ.ศ. 2552 จากนั้นพบมีการแพร่กระจายในหลายประเทศ ได้แก่ เวียดนาม (พ.ศ. 2553) มาเลเซีย (พ.ศ. 2554) ไทย (พ.ศ. 2555) เม็กซิโก (พ.ศ. 2556) ฟิลิปปินส์ (พ.ศ. 2558) และอเมริกาใต้ (พ.ศ. 2559) (Tran *et al.*, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017; Kumar, 2020) โดยผลจากการระบาดของโรคตับวายเฉียบพลันส่งผลทำให้ภาพรวมของปริมาณผลผลิตกุ้งทะเลจากทวีปเอเชียลดลงราว 60 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นมูลค่าความเสียหายราว 43,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Shinn *et al.*, 2018; FAO, 2014) ซึ่งโรคนี้สามารถพบได้ในกุ้งหลายชนิดทั้งกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Lightner *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Tun *et al.*, 2017) รวมทั้งยังสามารถพบการติดเชื้อในอาร์ทีเมีย (*Artemia franciscana*) (Kumar, 2020; Hong *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2019) ได้อีกด้วย สำหรับความรุนแรงของโรคนี้ พบว่าทำให้กุ้งทะเลที่เลี้ยงในบ่อดินมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการปล่อยลงเลี้ยงประมาณ 20 - 30 วัน (Choi *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2021) ส่วนอาการของกุ้งที่ป่วยเป็นโรคตับวายเฉียบพลัน พบว่าจะวายน้ำฉ่ำ เชื่องซึม กินอาหารลดลง ตับและตับอ่อนมีลักษณะฝ่อและมีสีซีดไปจนถึงมีสีขาว เนื่องจากการสูญเสียเม็ดสีของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นอกจากนั้นยังพบมีอาการเปลือกนึ่มและอาหารไม่เต็มลำไส้ (Joshi *et al.*, 2013) โดยเมื่อกุ้งทะเลป่วยเป็นโรคตับวายเฉียบพลันในระยะแรก ๆ (Initial phase) พบว่าจะมีการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุ (Epithelial cell) ของตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) และเมื่อมีการติดเชื้อเป็นเวลานานจะพบการตายของเซลล์เยื่อบุตับและตับอ่อน รวมทั้งพบการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือด (Hemocytic infiltration) เป็นจำนวนมาก (Tran *et al.*, 2013; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014)

สำหรับผลการศึกษาการเกิดโรคตับวายเฉียบพลันในกุ้งทะเล พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีชื่อเฉพาะเรียกว่า *Vp_{AHPND}* (Zhang *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013; Soto Rodriguez *et al.*, 2015) โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะมีสารพันธุกรรมจำเพาะอยู่นอกโครโมโซม (Extrachromosomal plasmid) ที่มีขนาดประมาณ 63 - 69 kbp และมีคุณสมบัติเฉพาะที่สามารถสร้างสารพิษ (Toxin) ได้ โดยสารพิษที่สร้างขึ้นมี 2 ชนิด คือ toxin A และ toxin B (Tinwongger *et al.*, 2014) ทั้งนี้เมื่อมีการนำเชื้อ *Vp_{AHPND}* มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการ Sequencing พบว่าสารพิษดังกล่าวมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับกลุ่มยาฆ่าแมลง (*Photorhabdus* insect-related; Pir) ซึ่งเป็น Binary toxin gene ประกอบด้วย 2 subunit คือ PirA และ PirB (Han *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจวินิจฉัยการเกิดโรค *Vp_{AHPND}* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) (Lee *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015; Thitamadee *et al.*, 2016)

สำหรับการศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อ *Vp_{AHPND}* ที่ผ่านมา โดยพิจารณาจากอัตราการตายสะสมและระยะเวลาที่สร้างความเสียหายในกุ้งทะเลชนิดต่าง ๆ เป็นหลักพบว่าความรุนแรงของการเกิดโรคตับวายเฉียบพลันจะแตกต่างกัน เช่น จากการศึกษาของ Soto-Rodriguez *et al.* (2015) ซึ่งนำเชื้อ *Vp_{AHPND}* มาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ โดยการแช่เชื้อที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^4 CFU/ml เป็นระยะเวลา 15 นาที แล้วสังเกตอาการและอัตราการตายสะสมของกุ้งขาว พบว่าเชื้อ *Vp_{AHPND}* บางไอโซเลตมีผลทำให้กุ้ง

ตายภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง และทำให้กุ้งตาย 100 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 17 ชั่วโมงหลังจากแช่เชื้อ ในขณะที่บางไอโซเลทซึ่งใช้ระดับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากันกลับส่งผลทำให้กุ้งตายช้ากว่า และเมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดพบว่ามียัตราการตายเพียง 75 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับความรุนแรงของเชื้อยังขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับอีกด้วย (Soto-Rodriguez *et al.*, 2015) ส่วนผลการศึกษาของ Lai *et al.* (2015) ซึ่งทดลองแช่เชื้อ Vp_{AHPND} ในกุ้งขาวให้มีระดับความเข้มข้นของเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 10^4 CFU/ml โดยแช่เชื่อนาน 15 นาที พบว่าที่ระยะเวลาเท่ากันเชื้อแต่ละไอโซเลทมีการแสดงออกของยีน PirA^{VP} และ PirB^{VP} ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยบางไอโซเลท (5HP) สามารถตรวจพบยีนทั้งสองชนิดในกระเพาะอาหารตั้งแต่ 6 ชั่วโมงหลังการแช่เชื้อ แต่ในตับและตับอ่อนพบเฉพาะการแสดงออกของยีน PirB^{VP} ในขณะที่บางไอโซเลทพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลอง

ส่วนการใชยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาและกุ้ง พบว่ามีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในแง่ของการป้องกันและการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย (Cabello *et al.*, 2013) เช่น ยา Oxytetracycline, Quinolone และ Trimethoprim (Rico *et al.*, 2012; Yano *et al.*, 2014) จากการศึกษาของ Shaw *et al.* (2014) พบว่า *Vibrio* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะสูง ในขณะทีผลการศึกษา Al-Othrub *et al.* (2011) ซึ่งแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างอาหารทะเลและสิ่งแวดล้อมของประเทศมาเลเซีย พบว่าเชื้อดื้อต่อยา Ampicillin (25%), Cefalexin (52%) และ Ciprofloxacin (44%) สอดคล้องกับการศึกษาของ Yano *et al.* (2014) ที่แยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากกุ้งขาวที่เลี้ยงในพื้นที่ความเค็มต่ำของประเทศไทย จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่ามีการดื้อต่อยา Ampicillin (72%) และยา Oxytetracycline (3%) ส่วนการศึกษาของกมลชัยและคณะ (2540) พบว่าเชื้อ *Vibrio* sp. ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ Tetracycline (52%), Oxytetracycline (55 - 66%), Tetracycline (44 - 58%) และ Chlortetracycline (53-60%) และ Oxolinic acid (40-48%) (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2542) ต่างจากการศึกษาของมณีและจินตนา (2545) พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีความไวต่อยา Chloramphenicol, Tetracycline, Oxytetracycline, Penicillin G, Streptomycin, Spectinomycin และ Ampicillin จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่ารูปแบบการดื้อยาและความไวของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ต่อยาปฏิชีวนะมีการเปลี่ยนแปลงไปจากที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้

ด้วยเหตุนี้ การศึกษาเกี่ยวกับความรุนแรงของเชื้อ Vp_{AHPND} ที่รวบรวมจากแหล่งเลี้ยงกุ้งขาวในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ร่วมกับการศึกษาความไวและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อดังกล่าว จึงมีความสำคัญเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำมาใช้ในการวางแผนการบริหารจัดการต่างๆ เพื่อควบคุมการเกิดโรค AHPND และประเมินความเสี่ยงของการใช้ยาปฏิชีวนะ การดื้อยาและแนวโน้มของรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ Vp_{AHPND} ที่จำแนกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทยและหาแนวทางในการลดความรุนแรงของเชื้อ Vp_{AHPND} ได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความรุนแรงของเชื้อ Vp_{AHPND} จากพื้นที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่แตกต่างกันในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบของการดื้อยาของเชื้อ Vp_{AHPND} ที่แยกได้จากกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่แหล่งเลี้ยงต่าง ๆ ของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

1. สถานที่และระยะเวลาดำเนินการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ 130/2 ถนนติณสูลานนท์ ตำบลพะวง อำเภอเมืองสงขลา จังหวัดสงขลา ในระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - เดือนกรกฎาคม 2563

2. การรวบรวมและยืนยันผลการติดเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

2.1 การรวบรวมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

ดำเนินการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ซึ่งจำแนกได้จากตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมจากพื้นที่เลี้ยงกุ้งในจังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา ตรัง กระบี่ ภูเก็ต สมุทรสาคร และจันทบุรี (ภาพที่ 1) ในระหว่างปี พ.ศ. 2562 - 2563



ภาพที่ 1 จังหวัดที่เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} สำหรับการศึกษาครั้งนี้

โดยนำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) ของกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงเชื้อต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic soy agar (TSA) ที่เติมเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Cross streak โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อแบคทีเรียที่รวบรวมได้มายืนยันผลการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Tinwongger *et al.* (2014) จากนั้นจึง

เก็บเชื้อ *Vp_{AHPND}* แต่ละไอโซเลทที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient broth (NB) ที่ผสมด้วยกลีเซอรอล (Glycerol) 15 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตลอดการศึกษาในครั้งนี้

2.2 การยืนยันผลการติดเชื้อ *Vp_{AHPND}* ของตัวอย่างแบคทีเรียที่รวบรวมได้

ตรวจสอบผลการติดเชื้อ *Vp_{AHPND}* ของตัวอย่างแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่รวบรวมได้ทั้งหมด โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยทั่วไป จำนวน 1 คู่ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีการสร้างพลาสมิดที่มีความผิดปกติ จำนวน 1 คู่ และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Vp_{AHPND}* (*V. parahaemolyticus* ที่มีพลาสมิดที่สามารถสร้างสารพิษได้) จำนวน 1 คู่ แสดงในรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการยืนยันผลการติดเชื้อ *Vp_{AHPND}* ด้วยวิธี Multiplex PCR

Primer names	Nucleotide sequences (5' → 3')	Expected size (bp)	Targets	References
Vp-flaE-79F	GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT	897	<i>V. parahaemolyticus</i>	Tarr <i>et al.</i> , 2007
Vp-flaE-34R	ATTATCGATCGTGCCACTCAC			
TUMSAT-Vp1F	CGCAGATTTGCTTTTGTGAA	500	<i>V. parahaemolyticus</i> ที่มีพลาสมิดผิดปกติ	Tinwongger <i>et al.</i> (2014)
TUMSAT-Vp1R	AGAAGCTGGCCGAAGTGATA			
TUMSAT-Vp3F	GTGTTGCATAATTTTGTGCA	360	<i>V. parahaemolyticus</i> ที่มีพลาสมิดสร้างสารพิษ (Toxin)	Tinwongger <i>et al.</i> (2014)
TUMSAT-Vp3R	TTGTACAGAAACCACGACTA			

2.2.1 การสกัด Genomic DNA ของตัวอย่างแบคทีเรียด้วยวิธีการต้ม

คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA ที่เติมเกลือ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอายุประมาณ 18 - 24 ชั่วโมง ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ที่เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Vortex mixture เพื่อให้ตะกอนแบคทีเรียละลายจนหมด จากนั้นนำไปต้มด้วยเครื่องให้ความร้อนแบบแห้ง (Heating block) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วจึงดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสใส่ลงใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่ สำหรับนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในลำดับต่อไป หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

2.2.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

นำตัวอย่าง DNA template ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 มาเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย (Target DNA) ด้วยเครื่อง Thermocycler ตามวิธีการของ Tinwongger *et al.* (2014) โดยใช้ไพรเมอร์ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 และมีส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR cocktail) ของแต่ละตัวอย่าง ดังนี้

Distilled water	7.0	ไมโครลิตร
2x Multiplex mastermix	10.0	ไมโครลิตร
10 μ M Primer F/R Primer Mix (VpflaE, Vp1, Vp3)	1.0	ไมโครลิตร
DNA template	2.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.0	ไมโครลิตร

ใส่ส่วนผสมของสารทั้งหมดลงในหลอด PCR จากนั้นจึงนำหลอด PCR ดังกล่าวไปใส่ในเครื่อง Thermalcycler (Flex Cycler², Analytik Jena) เพื่อเพิ่มปริมาณของ Target DNA โดยกำหนดให้สภาวะการทำงานของเครื่อง Thermalcycler เป็นดังนี้ คือ ช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ช่วงที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 29 รอบ และช่วงที่สาม 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วจึงนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบการติดเชื่อ Vp_{AHPND} ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

2.2.3 การตรวจสอบการติดเชื่อ Vp_{AHPND} ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 2.2.2 มาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยแต่ละตัวอย่างใช้ PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ 6x Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบการขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel electrophoresis (1.5% agarose gel ใน 1X TBE buffer, 125 volt นาน 30 นาที) นำไปอ่านผลด้วยเครื่องอ่านเจล ชนิด Block LED transilluminator (GeneDirex รุ่น BK001) เพื่อเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) และขนาดของแถบดีเอ็นเอของตัวควบคุมผลบวก (Positive control) ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย Vp_{AHPND} และตัวควบคุมผลลบ (Negative control) ที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ Vp_{AHPND} ต่อการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม

3.1 การเตรียมกุ้งขาวแวนนาไม

เลี้ยงลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาร์ 20 (P20) ที่ปลอดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) หัวเหลือง (YHV) ไอเอชเอชเอ็น (IHNV) ทอราซินโดรม (TSV) และเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่หน่วยเลี้ยงสัตว์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา โดยเลี้ยงในบ่อปูนขนาดความจุ 20 ตันที่เติมน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน (ppt) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 30 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาว วันละ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว โดยแบ่งให้อาหารวันละ 4 มื้อ (8.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 น.) เปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ให้อากาศตลอดเวลา และเลี้ยงกุ้งจนมีขนาดประมาณ 3 - 4 กรัม จึงนำไปใช้ในการทดลอง

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

นำเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลานาน 16 - 18 ชั่วโมง จึงนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วจึงดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอนของแบคทีเรีย แล้วเติมน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้เครื่อง Vortex mixer เพื่อผสมตะกอนให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที อีกครั้ง ทำเช่นนี้ 2 รอบจึงละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 1.5

เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (บริษัท Thermo scientific รุ่น MULTISKAN G0) ที่ความยาวคลื่น (Optical density; OD) 640 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.10 ซึ่งจะมีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^8 cfu/ml สำหรับนำไปใช้เชื้อต่อไป

3.3 การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในน้ำก่อนและหลังการการแช่เชื้อ

3.3.1 ตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในน้ำก่อนการแช่เชื้อ

เก็บตัวอย่างน้ำจากแต่ละถังพลาสติกสำหรับแช่เชื้อปริมาตร 10 มิลลิตร แล้วดูดน้ำตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิตร ที่เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 900 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixture จากนั้นเจือจางตัวอย่างลงครึ่งละ 10 เท่า (10 fold dilution) ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ระดับความเข้มข้น (10^{-1} และ 10^{-2}) จำนวน 3 ซ้ำ นำตัวอย่างน้ำเริ่มต้นในถังพลาสติก และที่เจือจางแล้ว ปริมาณหลอดละ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง คัดเลือกจานเพาะเชื้อของระดับความเข้มข้นที่มีจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 30 - 300 โคโลนี เพื่อนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียไวรัสที่ได้ โดยแยกเป็นไวรัสที่มีโคโลนีสีเขียวและไวรัสโคโลนีสีเหลือง และนำมาคำนวณหาจำนวนไวรัสโดยรวมทั้งหมด มีหน่วยเป็น cfu/ml

3.3.2 ตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในน้ำภายหลังการเติมเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

หลังจากเติมเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลตลงในถังพลาสติกสำหรับแช่เชื้อ แล้วตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในน้ำแต่ละถัง โดยดูดตัวอย่างน้ำจากแต่ละถังปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร ที่เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 900 ไมโครลิตร แล้วผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixture จากนั้นเจือจางตัวอย่างครึ่งละ 10 เท่า (10 fold dilution) ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น (10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3}) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้ว ปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง คัดเลือกจานเพาะเชื้อของระดับความเข้มข้นที่มีจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 30 - 300 โคโลนี เพื่อนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียไวรัสที่ได้ โดยแยกเป็นไวรัสที่มีโคโลนีสีเขียวและไวรัสโคโลนีสีเหลือง และนำมาคำนวณหาจำนวนไวรัสโดยรวมทั้งหมด มีหน่วยเป็น cfu/ml

3.4 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลต

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) กำหนดให้กุ้งขาวที่นำมาใช้ทดสอบแต่ละครั้งเป็น block โดยทดลองในตู้กระจก ขนาด 23 x 60 x 28 เซนติเมตร ที่บรรจุน้ำทะเลฆ่าเชื้อความเค็ม 20 พีพีที ปริมาตร 30 ลิตร และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่รวบรวมได้จากแต่ละจังหวัดมาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ โดยแบ่งการทดลองเป็น 15 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่ด้วยน้ำเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ไอโซเลต SMK1
- ชุดการทดลองที่ 3 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ไอโซเลต SMK2
- ชุดการทดลองที่ 4 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ไอโซเลต SMK3
- ชุดการทดลองที่ 5 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ไอโซเลต AKB1

ชุดการทดลองที่ 6 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท AKB12
 ชุดการทดลองที่ 7 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท AKB17
 ชุดการทดลองที่ 8 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท CG152
 ชุดการทดลองที่ 9 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท CG282
 ชุดการทดลองที่ 10 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท CG294
 ชุดการทดลองที่ 11 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท TG08
 ชุดการทดลองที่ 12 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท G2205
 ชุดการทดลองที่ 13 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท G2269
 ชุดการทดลองที่ 14 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท SVP019
 ชุดการทดลองที่ 15 กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ไอโซเลท SVP026

นำเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ในแต่ละไอโซเลท (จำนวน 14 ไอโซเลท) ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาณ 80 มิลลิตร ใส่ในถังพลาสติก ขนาด 100 ลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 20 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 79.2 ลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อในน้ำเท่ากับ 10^5 CFU/ml ส่วนชุดควบคุมให้เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิตร จากนั้นใส่กุ้งขาวแวนนาไมจำนวน 250 ตัวต่อถัง พร้อมทั้งให้อาการตลอดเวลา แช่เชื่อนาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายกุ้งขาวไปใส่ตู้ทดลองที่เตรียมไว้จำนวน 2 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 สำหรับตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (histopathology) ใส่กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* แต่ละไอโซเลท จำนวน 35 ตัวต่อตู้ จำนวน 4 ตู้

ชุดที่ 2 สำหรับตรวจสอบอัตราการตายสะสม ใส่กุ้งขาวแวนนาไมที่แช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* แต่ละไอโซเลท จำนวน 10 ตัวต่อตู้ จำนวน 4 ตู้

โดยแต่ละตู้ทดลองให้อาหารกุ้งขาวแวนนาไมวันละ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว แบ่งให้อาหารวันละ 4 มื้อ ในเวลา 8.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 น. และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ วันเว้นวัน

3.5 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ผล

หลังจากแช่เชื้อเป็นเวลา 0, 12, 24, 72, 168, 240 และ 336 ชั่วโมง ให้สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมจำนวน 4 ตัวต่อตู้ (16 ตัวต่อชุดการทดลอง) เพื่อนำมาใช้สำหรับตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อน จำนวน 3 ตัวต่อตู้ และใช้สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพ จำนวน 1 ตัวต่อตู้ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

3.5.1 ตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อน

นำตัวอย่างกุ้งขาวที่ได้ของแต่ละตู้ทดลองมาแยกกระเพาะอาหาร ตับและตับอ่อน (จำนวน 3 ตัวต่อไอโซเลท) บดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.10 กรัม ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางตัวอย่างลงครั้งละ 10 เท่า ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TCBS จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader) กลยตัวอย่างให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง คัดเลือกจานเพาะเชื้อของระดับความเข้มข้นที่มีจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 30 - 300 โคโลนี เพื่อนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียไวรัสที่ได้ โดยแยกเป็น

วibriโอที่มีโคโลนีสีเขียวและวibriโอโคโลนีสีเหลือง และนำมาคำนวณหาจำนวนวibriโอรวมทั้งหมด มีหน่วยเป็น cfu/ml

3.5.2 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพ (Histology)

นำตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้ของแต่ละตู้ทดลองมารักษาสภาพในน้ำยา Davidson's fixative นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนไปเก็บรักษาในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) 70% แล้วนำตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อและศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Bell and Lightner (1988) โดยนำตัวอย่างมาเข้าชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟฟินบล็อก (Paraffin block) จากนั้นนำบล็อกเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (Microtome) แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ถูกตัดวางลงบนสไลด์ นำไปอุ่นบนเครื่องอุ่นสไลด์เพื่อให้เนื้อเยื่อติดบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Haematoxylin and eosin; H&E) และทำเป็นสไลด์ถาวร (Permanent slide) ด้วยน้ำยา Permount แล้วจึงนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์บันทึกผลและถ่ายภาพ

3.6 ตรวจสอบอัตราการรอดตายและอัตราการตายสะสมของกุ้งขาว

ตรวจนับและบันทึกจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายในแต่ละตู้ทดลองทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน และนำกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายมายืนยันการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ด้วยเทคนิค PCR โดยนำตัวอย่างกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้ม แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจเชื้อ Vp_{AHPND} ด้วยวิธี Multiplex PCR ตามวิธีการของ Tinwongger *et al.* (2014)

4. การทดสอบความไวและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ Vp_{AHPND} ต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Agar disk diffusion

ทดสอบความไวของเชื้อ Vp_{AHPND} ต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 4 ชนิด คือ ยา Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (OT30) ยา Sulphamethoxazole/trimethoprim ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม (SXT25) ยา Oxolinic acid ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม (OA2) และยา Streptomycin ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (S30) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Oxoid และทดสอบตามวิธีการของ CLSI (2014) โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่บริสุทธิ์ (Pure culture) ที่มีอายุประมาณ 24 - 28 ชั่วโมง ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ Cotton swab เชื้อจำนวน 2 - 3 โคโลนีใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเทียบความขุ่นให้ใกล้เคียงกับของ McFaland เบอร์ 0.5 แล้วนำ cotton swab ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใช้ไม้ cotton swab จุ่มเชื้อและเกลี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ muller hinton agar (MHA) ที่เตรียมไว้ให้ทั่ว จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นยา (antibiotic disc) แต่ละแผ่นวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 28 ชั่วโมง แล้วจึงวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียรอบแผ่นยา (inhibition zone) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อมาตรฐาน เป็นตัวควบคุมคุณภาพของการทดสอบ และรายงานผลการทดสอบเป็น Sensitive (ไวต่อยา) Intermediate (ไวต่อยาปานกลาง) หรือ Resistance (ดื้อต่อยา) เทียบกับตารางการแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งดัดแปลงจาก CLSI (2013a และ 2013b) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)		
		Sensitive (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
1. Oxolinic acid (OA)	2	≥30	25 - 29	≤24
2. Oxytetracycline (OT)	30	≥28	22 - 27	≤21
3. Sulphamethoxazole/ Trimethoprim (SXT)	25	≥16	11 - 15	≤10
4. Streptomycin (S)	10	≥15	12-14	<11

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 วิเคราะห์ข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

นำข้อมูลที่ได้จากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ของเชื้อ Vp_{AHPND} ต่อยาต้านปฏิชีวนะแต่ละชนิดมาคำนวณหาร้อยละของการดื้อยา (Resistant) การเริ่มพัฒนาการดื้อยา (Intermediate) และความไวต่อการต้านการดื้อยา (Sensitive) ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (Multiple antibiotic resistance index; MRI index) และรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ ดังนี้

4.1.1 การคำนวณหาร้อยละของการดื้อยา (%Resistance) การเริ่มพัฒนาการดื้อยา (%Intermediate) และร้อยละของความไวต่อการต้านการดื้อยา (%sensitive) ตามสูตร ดังนี้

$$\%Resistance = \frac{\text{จำนวนไอโซเลตของ } Vp_{AHPND} \text{ ที่ดื้อยา}}{\text{จำนวนไอโซเลตของ } Vp_{AHPND} \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100$$

$$\%Intermediate = \frac{\text{จำนวนไอโซเลตของ } Vp_{AHPND} \text{ ที่เริ่มพัฒนาการดื้อยา}}{\text{จำนวนไอโซเลตของ } Vp_{AHPND} \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100$$

$$\%Sensitive = \frac{\text{จำนวนไอโซเลตของ } Vp_{AHPND} \text{ ที่ไวต่อการต้านการดื้อยา}}{\text{จำนวนไอโซเลตของ } Vp_{AHPND} \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100$$

4.1.2 การคำนวณหาดัชนีการดื้อยาของเชื้อ Vp_{AHPND} ต่อยาหลายชนิด (Multiple antibiotic resistance (MAR) index) ตามวิธีการของ Krumpnerman (1983) ตามสูตร ดังนี้

$$MAR \text{ Index} = a/b$$

โดยที่ a คือ จำนวนการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย

b คือ จำนวนยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ

ทั้งนี้ หากค่าดัชนี MAR (MAR index) มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.2 แสดงว่าเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ไม่มีการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษา แต่ถ้ามีค่ามากกว่า 0.2 แสดงว่าสัตว์ที่ใช้ในการศึกษามีความเสี่ยงสูงในการได้รับยาปฏิชีวนะหลายชนิด

4.1.3 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ของรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ (%Pattern) ตามสูตร ดังนี้

$$\%Pattern = \frac{\text{จำนวนเชื้อ } Vp_{AHPND} \text{ ที่ดื้อยาแต่ละรูปแบบ}}{\text{จำนวนเชื้อ } Vp_{AHPND} \text{ ที่ดื้อยาทั้งหมด}} \times 100$$

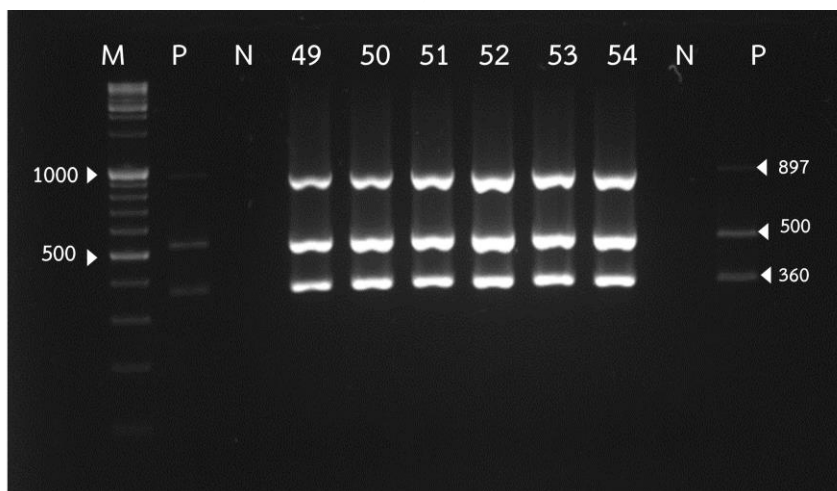
4.2 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลจำนวนกุ้งขาวที่ตายภายหลังการแช่เชื้อ Vp_{AHPND} ในแต่ละไอโซเลท มาหาค่าอัตราการตายสะสม เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการได้รับเชื้อ Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลท โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way ANOVA analysis และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษา

1. ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่าง

จากการรวบรวมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับวายเฉียบพลัน (Vp_{AHPND}) จากจังหวัดต่าง ๆ จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ สมุทรสาคร จันทบุรี สงขลา ภูเก็ต กระบี่ และตรัง ในระหว่างปี พ.ศ. 2562 - 2563 ได้จำนวนทั้งสิ้น 50 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อนำเชือดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์และยืนยันผลการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ด้วยวิธี Multiplex PCR ด้วยไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ ((Vp-flaE, TUMSAT-Vp1 และ TUMSAT-Vp3F) ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 897, 500 และ 360 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 2) พบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} รวมทั้งสิ้น 37 ไอโซเลท โดยรวบรวมได้จากจังหวัดจันทบุรี มากที่สุด (10 ไอโซเลท) รองลงมาคือ จังหวัดสมุทรสาคร และกระบี่ ซึ่งมีจำนวนเท่ากัน คือ 9 ไอโซเลท นอกจากนั้นได้มาจากจังหวัดภูเก็ต สงขลา และตรัง โดยมีจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 6, 2 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 2 ภาพถ่าย Agarose gel ของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ส่วนหนึ่งที่ใช้ในการทดลอง โดยที่ M คือ 100 bp DNA marker PC คือ Positive control NC คือ Negative control และตัวเลขอารบิก คือ รหัสของตัวอย่าง

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่รวบรวมได้จากแต่ละจังหวัด

จังหวัด	จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรีย (ไอโซเลท)	
	รวบรวมได้ทั้งหมด	ยืนยันผลการทดสอบเป็น Vp_{AHPND}
จันทบุรี	10	10
สมุทรสาคร	10	9
กระบี่	10	9
ภูเก็ต	10	6
สงขลา	2	2
ตรัง	8	1
รวมทั้งสิ้น	50	37

2. ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ต่ออัตราการตายของกุ้งขาวแวนนาไม

2.1 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ในถังสำหรับทดสอบการแช่เชื้อทั้งก่อนและหลังเติมเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่รวบรวมได้จากแต่ละจังหวัด (ตารางที่ 4) มาทดสอบความรุนแรงต่อกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งผลของการตรวจสอบปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในน้ำในถังพลาสติกสำหรับแช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} พบว่าก่อนการเติมเชื้อ Vp_{AHPND} ในน้ำของทุกถังพลาสติก พบเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่มีโคลิฟอร์มสีเหลือง แต่ไม่พบแบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่มีโคลิฟอร์มสีเขียว โดยมีปริมาณของเชื้อไวรัสโดยรวมทั้งหมดในน้ำอยู่ระหว่าง 40 - 173 cfu/ml ทั้งนี้ ภายหลังการเติมเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทลงในถังพลาสติกแต่ละถัง พบว่ามีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสโดยรวมทั้งหมดอยู่ระหว่าง 4.50×10^5 - 8.27×10^5 cfu/ml ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่มีโคลิฟอร์มสีเขียว โดยมีจำนวนอยู่ระหว่าง 4.47×10^5 - 8.27×10^5 cfu/ml (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่ใช้ทดสอบความรุนแรงในกุ้งขาวของการศึกษาครั้งนี้

จังหวัดที่รวบรวม	รายละเอียดเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	
	จำนวนไอโซเลท	ชื่อไอโซเลท
จันทบุรี	3	CG152, CG282 และ CG294
สมุทรสาคร	3	SMK1, SMK2 และ SMK3
กระบี่	3	AKB1, AKB12 และ AKB17
ภูเก็ต	2	G2205 และ G2269
สงขลา	2	SVP019 และ SVP026
ตรัง	1	TG08

ตารางที่ 5 ปริมาณของเชื้อไวรัสในน้ำของถังพลาสติกสำหรับแช่เชื้อทั้งก่อนและหลังการเติมเชื้อแบคทีเรีย V_{PAHPND} ของแต่ละไอโซเลท

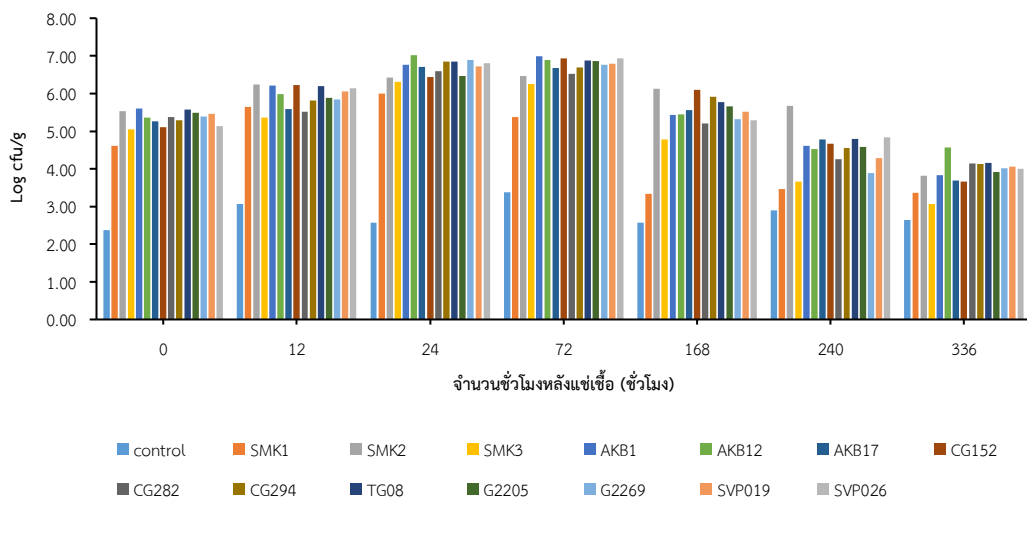
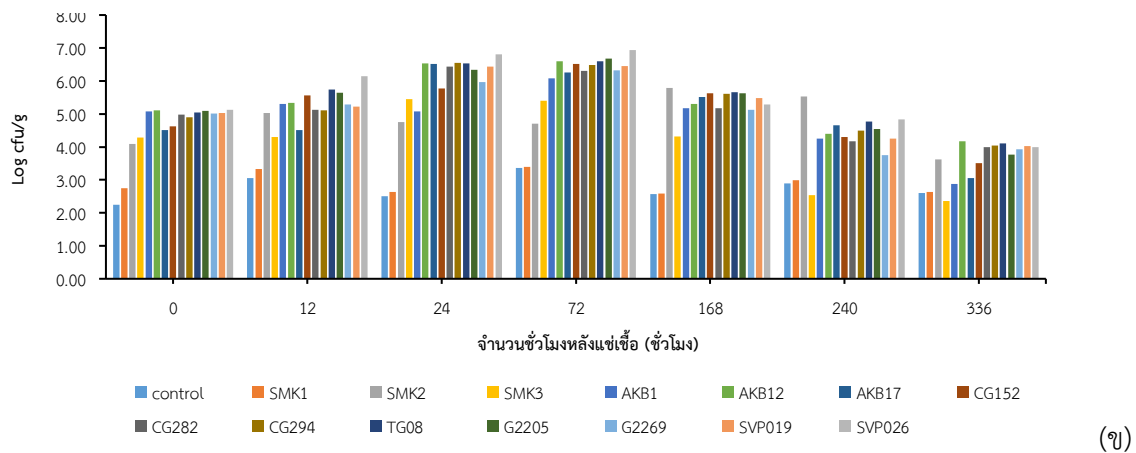
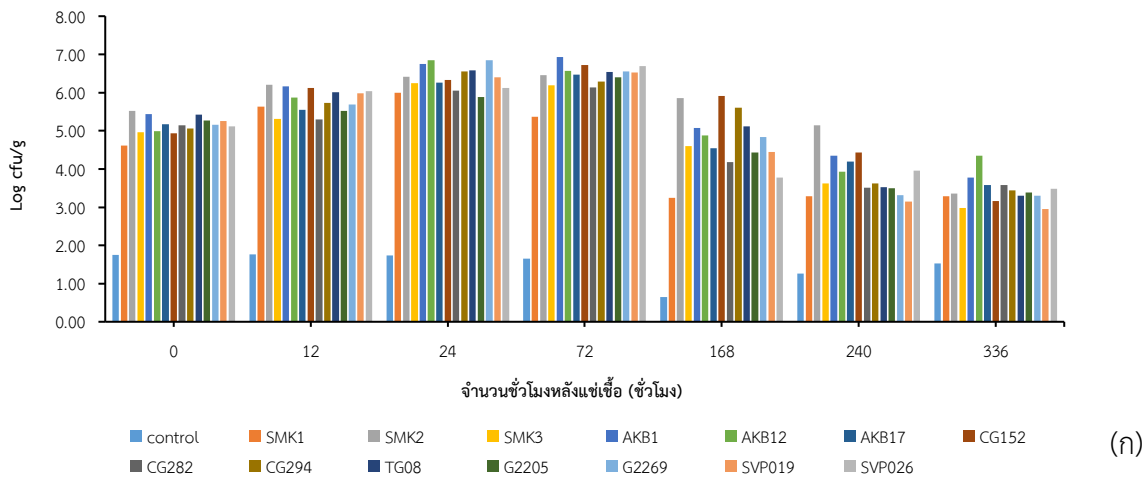
ลำดับ ที่	ชื่อ ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัส (cfu/ml) ในน้ำ					
		ก่อนเติมเชื้อ			หลังเติมเชื้อ		
		โคโลนี สีเขียว	โคโลนี สีเหลือง	ไวรัสรวม	โคโลนี สีเขียว	โคโลนี สีเหลือง	ไวรัสรวม
1	SMK1	0	110	30	7.67×10^5	6.67×10^3	7.73×10^5
2	SMK2	0	57	57	5.57×10^5	1.00×10^2	5.57×10^5
3	SMK3	0	60	60	5.03×10^5	0	5.03×10^5
4	AKB1	0	87	87	5.47×10^5	0	5.47×10^5
5	AKB12	0	123	123	4.47×10^5	3.33×10^3	4.50×10^5
6	AKB17	0	127	127	6.93×10^5	0	6.93×10^5
7	CG152	0	173	173	5.47×10^5	0	5.47×10^5
8	CG282	0	130	130	5.83×10^5	3.33×10^3	5.87×10^5
9	CG294	0	40	40	7.43×10^5	6.67×10^3	7.50×10^5
10	TG08	0	53	53	7.13×10^5	0	7.13×10^5
11	G2205	0	60	60	7.17×10^5	0	7.17×10^5
12	G2269	0	120	120	8.27×10^5	0	8.27×10^5
13	SVP019	0	97	97	6.07×10^5	3.33×10^3	6.10×10^5
14	SVP026	0	157	157	7.97×10^5	0	7.97×10^5

2.2 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อนของกิ้งก่า
แว่นนาไม่ภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย V_{PAHPND}

เมื่อนำกิ้งก่าแว่นนาไม่ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.08 ± 0.49 กรัม แช่ในเชื้อแบคทีเรีย V_{PAHPND} แต่ละไอโซเลทที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^5 cfu/ml เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง แล้วนำกิ้งก่าแว่นนาไม่ไปเลี้ยงในตู้กระจกใบใหม่และสุ่มเก็บตัวอย่างกิ้งก่าแว่นนาไม่แต่ละคู่ที่เวลา 0, 12, 24, 72, 168, 240 และ 336 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อนด้วยวิธี Plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบว่าในชั่วโมงแรก ๆ ภายหลังจากแช่เชื้อ (ชั่วโมงที่ 0 - 72) มีปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในกระเพาะอาหารสูงกว่าในตับและตับอ่อน โดยแบคทีเรียกลุ่มไวรัสส่วนใหญ่ที่พบในกระเพาะอาหารเป็นกลุ่มที่มีโคโลนีสีเขียว และมีแนวโน้มปริมาณเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 12, 24 และ 72 ภายหลังการ แช่เชื้อ โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสรวมทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ $10^5 - 10^6$ cfu/g จากนั้นจึงพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 168, 240 และ 336 ตามลำดับ โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วงประมาณ $10^3 - 10^4$ cfu/g โดยแบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่พบส่วนใหญ่มีโคโลนีสีเหลือง ในขณะที่ในกลุ่มควบคุมพบว่าตลอดการทดลองมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งหมดในกระเพาะอาหารอยู่ในช่วงประมาณ $10^2 - 10^3$ cfu/g โดยแบคทีเรียที่พบเป็นกลุ่มไวรัสที่มีโคโลนีสีเหลือง (ภาพที่ 3)

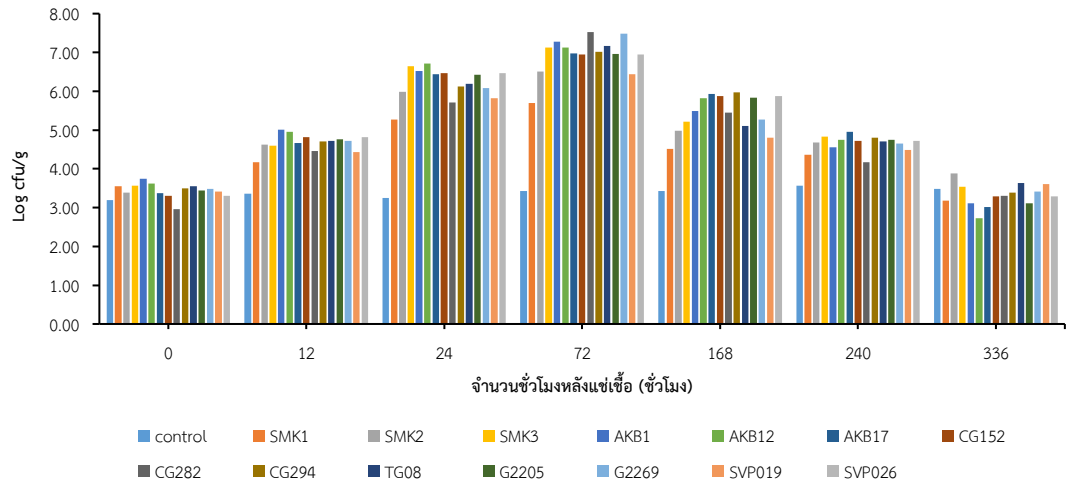
ส่วนปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่พบในตับและตับอ่อนภายหลังแช่เชื้อ V_{PAHPND} แต่ละไอโซเลท พบว่าปริมาณของเชื้อกลุ่มไวรัสรวมทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ภายหลังจากแช่เชื้อ โดยกลุ่มของไวรัสที่พบส่วนใหญ่เป็นไวรัสโคโลนีสีเขียว โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ

$10^6 - 10^7$ cfu/g จากนั้นพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลงจนอยู่ในช่วงประมาณ $10^3 - 10^4$ cfu/g ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบว่าตลอดการทดลองมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio รวมทั้งหมดในดับและดับอ่อนประมาณ 10^3 cfu/g (ภาพที่ 4)

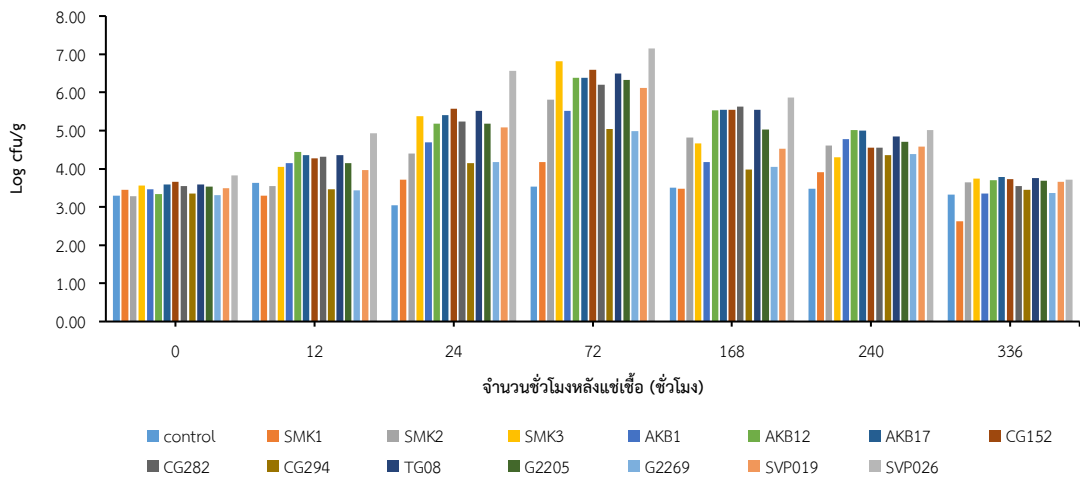


ภาพที่ 3 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในกระเพาะอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp*_{AHPND} แต่ละไอโซเลต

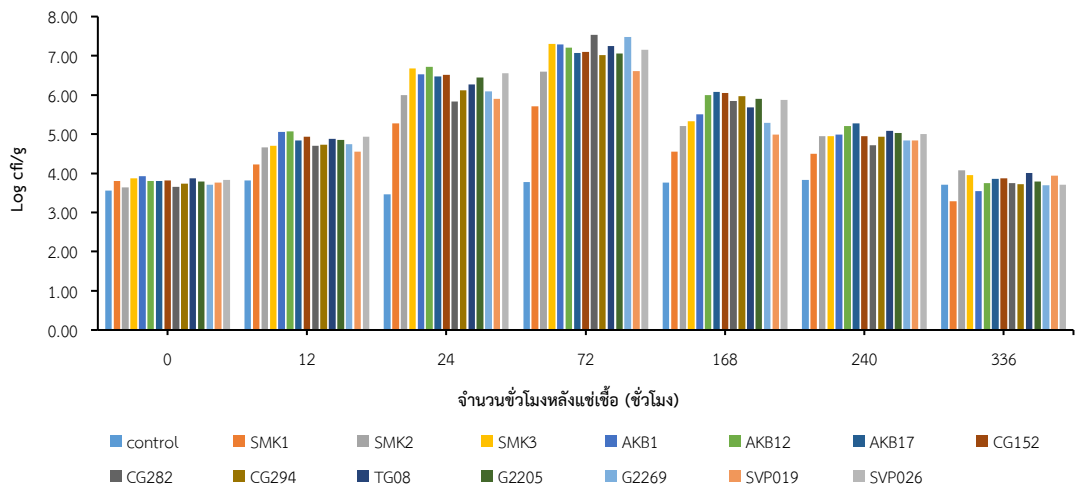
โดยภาพ ก คือ แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่มีโคลีนีสีเขียว ภาพ ข คือ แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่มีโคลีนีสีเหลือง และ ภาพ ค คือ แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ทั้งหมด



(ก)



(ข)

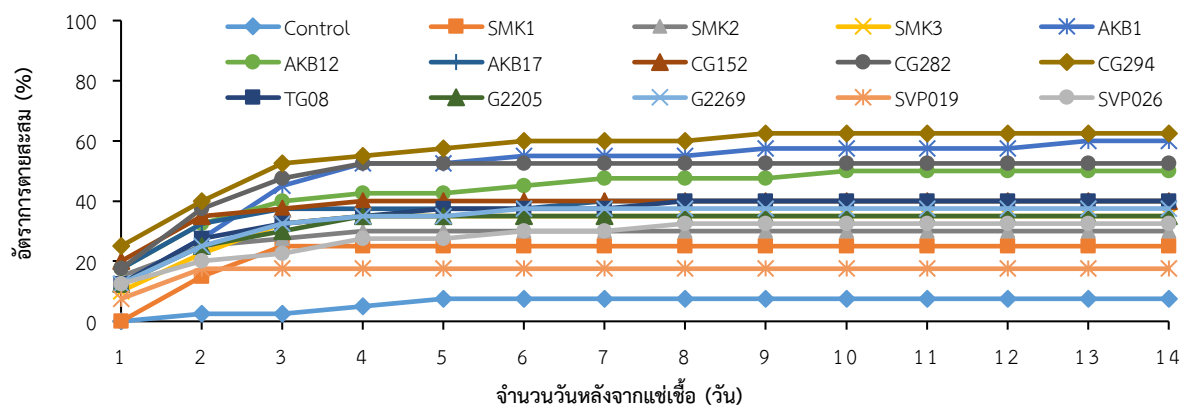


(ค)

ภาพที่ 4 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย *Vp*_{AHPND} แต่ละไอโซเลต โดยภาพ ก คือ แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่มีโคลีนีสีเขียว ภาพ ข คือ แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่มีโคลีนีสีเหลือง และ ภาพ ค คือ แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ทั้งหมด

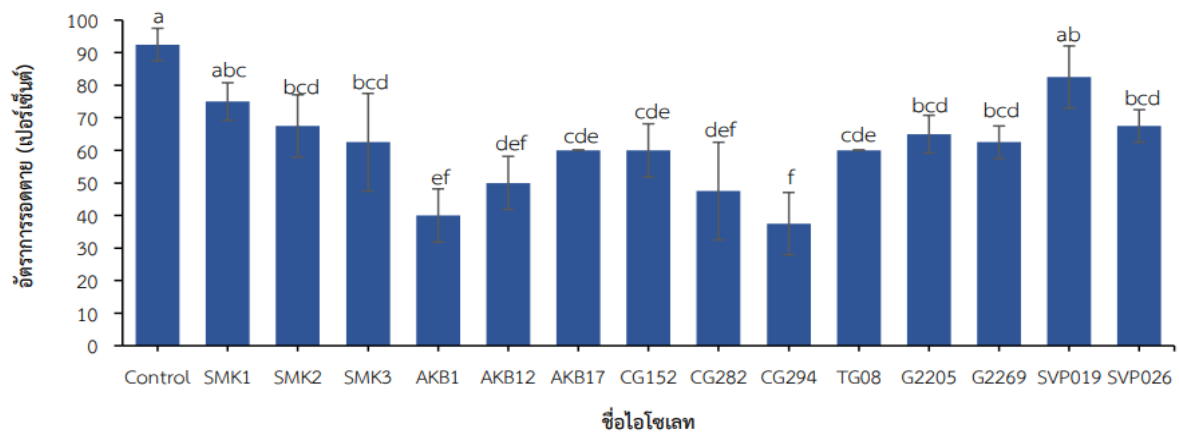
2.1 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

ภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทเป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมเริ่มมีการตายเมื่อได้รับเชื้อเป็นเวลา 1 วัน โดยมีอัตราการตายประมาณ 7.5 - 25 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 ภายหลังการแช่เชื้อ โดยมีอัตราการตายสะสมอยู่ระหว่าง 15 - 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตั้งแต่วันที่ 6 พบว่ามีอัตราการตายสะสมคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการศึกษา (วันที่ 14 ภายหลังการแช่เชื้อ) โดยมีอัตราการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ไอโซเลท คือ AKB1, AKB12, CG282 และ CG294 มีอัตราการตายสะสมอยู่ระหว่าง 20 - 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 9 ไอโซเลท คือ SMK1, SMK2, SMK3, AKB17, CG152, TG08, G2205, G2269, SVP026 และกลุ่มที่มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ไอโซเลท คือ SVP019 ส่วนชุดควบคุม (control) พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีอัตราการตายสะสม เท่ากับ 7.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวภายหลังการแช่เชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทเทียบกับชุดควบคุม (Control)

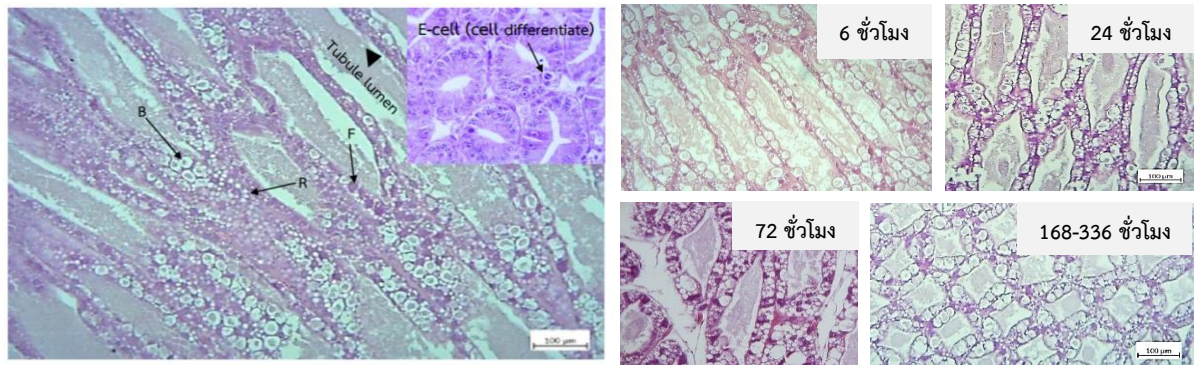
ทั้งนี้เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อ Vp_{AHPND} ทุกไอโซเลทมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งในชุดควบคุม ยกเว้น SMK1 และ SVP019 โดยกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อไอโซเลท CG294 มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุดเท่ากับ 37.5 ± 9.57 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อ Vp_{AHPND} ไอโซเลทอื่น ๆ พบว่ามีผลทำให้อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมอยู่ในช่วงประมาณ 47.5 ± 15 - 65 ± 5.77 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังการแช่เชื้อ Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

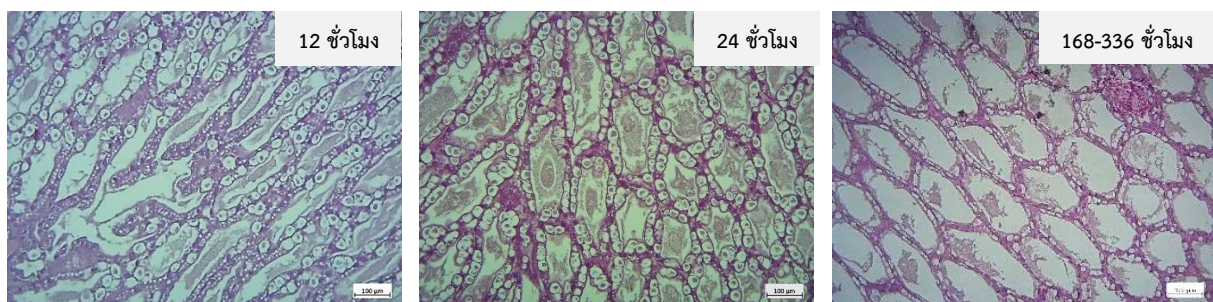
3. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนในภายหลังการติดเชื้อ Vp_{AHPND}

ภายหลังการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อ Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทที่เวลา 0, 12, 24, 72, 168, 240 และ 336 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยวิธี Histopathology และย้อมด้วยสี Hematoxylin and eosin (H&E) พบว่าลักษณะของตับและตับอ่อน (Hepatopancreatic lobe) ของกุ้งขาวในชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลอง (ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงวันที่ 14) มีขนาดปกติ และลักษณะทางพยาธิสภาพที่ปกติ โดยสามารถพบเซลล์ของตับและตับอ่อน ได้ทั้ง 4 แบบ ได้แก่ E-cells F-cells R-cell และ B-cell (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ภาพตัดตามยาว (Longitudinal section) ของตับและตับอ่อนกุ้งขาวแวนนาไมปกติ (กำลังขยาย 100 เท่า) ที่แสดงลักษณะเซลล์ตับและตับอ่อนแบบต่าง ๆ เมื่อย้อมด้วยสี Haematoxylin และ eosin (H&E) โดยที่ R คือ R-cell, B คือ B-cell, F คือ F-cell และภาพเล็ก แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของนิวเคลียส (Cell differentiate) ของเซลล์ตับและตับอ่อน

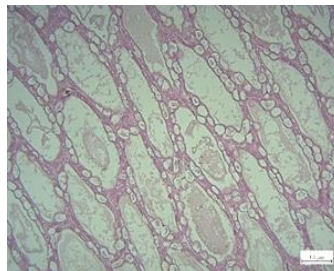
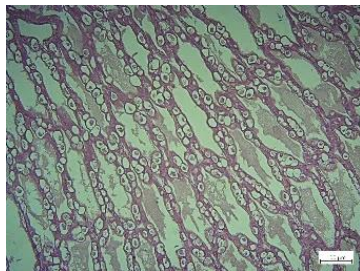
ส่วนกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อ Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลท พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ติดเชื้อแบบรวดเร็ว ได้แก่ ไอโซเลท CG294 กล่าวคือมีผลทำให้กุ้งเริ่มแสดงอาการความผิดปกติของลักษณะทางพยาธิสภาพตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ชั่วโมงของการติดเชื้อ โดยพบความผิดปกติของเซลล์ตับและตับอ่อน ได้แก่ พบ R cell น้อย แต่ยังพบ B-cell และ F cell จากนั้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 พบ R-cell น้อยมาก เซลล์ตับและตับอ่อนเริ่มมีลักษณะ ลีบ ฝ่อ ผ่นบาง (collapsed epithelia; CE) หลังจากชั่วโมงที่ 72 ยังพบ B-cell แต่ไม่พบ R-cell และแทบจะไม่พบ F-cell บางส่วนพบการหลุด (sloughing) ของเซลล์เข้ามาในท่อตับและตับอ่อน และคงลักษณะอย่างนี้จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 8)



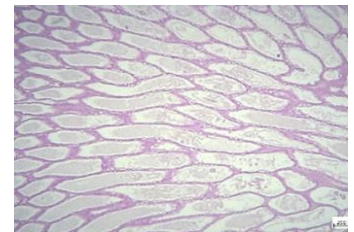
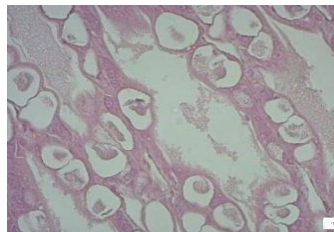
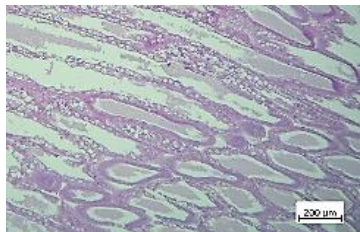
ภาพที่ 8 ภาพตัดตามยาว (Longitudinal section) ของตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่พบการติดเชื้อตัววายเฉียบพลัน (Vp_{AHPND}) ในกลุ่มติดเชื้อแบบรวดเร็ว ที่แสดงลักษณะผนังเซลล์บาง และมีการหลุดลอกของเซลล์เข้ามาในท่อตับและตับอ่อน เมื่อย้อมด้วยสี Haematoxylin และ eosin (H&E)

ส่วนการติดเชื้ออีกรูปแบบหนึ่ง พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมแสดงอาการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (Chronic infection) ซึ่งแบ่งการติดเชื้อเป็น 3 ระยะ คือ การติดเชื้อระยะที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยระยะที่ 1 เป็นระยะที่ยังพบ B cell, R cell และ F cell แต่ไม่พบการพัฒนาของเซลล์ (differentiated cells) ระยะที่ 2 เป็นระยะที่พบ R cell และ F-cell น้อยลง ส่วนระยะที่ 3 เป็นระยะที่พบเซลล์ตับและตับอ่อนมีลักษณะลึบ ฝ่อ บ้างบางส่วน แต่ไม่พบการหลุดของเซลล์อย่างรุนแรง (ภาพที่ 9) โดยผลจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน โดยที่ CG152 และ CG282 พบการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ระยะที่ 1 ภายหลังการแช่เชื้อ 12 ชั่วโมง ในขณะที่ AKB12, AKB17, TG08 และ AKB1 พบการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ระยะที่ 1 ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากแช่เชื้อ ส่วน G2269 พบการติดเชื้อระยะที่ 1 ภายหลังการแช่เชื้อนาน 2 วัน ในขณะที่ SMK2, SMK3, G2205, SVP019 และ SVP026 พบการติดเชื้อระยะที่ 1 ภายหลังการแช่เชื้อนาน 3 วัน ส่วน SMK1 พบว่ามีการติดเชื้อระยะที่ 1 ภายหลังการแช่เชื้อแล้ว 7 วัน จากนั้นทุกไอโซเลทจะพบการติดเชื้อในระยะที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

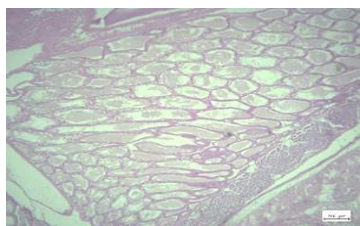
ระยะที่ 1



ระยะที่ 2



ระยะที่ 3



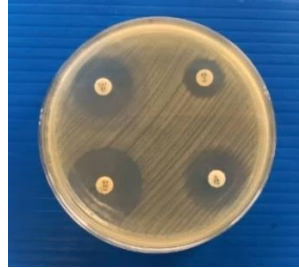
ภาพที่ 9 ภาพตัดตามยาว (Longitudinal section) ของตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อตัววยเฉียบพลัน (Vp_{AHPND}) ในกลุ่มติดเชื้อแบบเรื้อรังแต่ละระยะ เมื่อย้อมด้วยสี Haematoxylin และ eosin (H&E)

4. ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

3.1 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND}

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} มาทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility test) จำนวน 4 ชนิดคือ ยา Oxytetracycline (OT30) Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT25) Oxolinic acid (OA2) และ Streptomycin (S25) ด้วยวิธี Agar disk diffusion (ภาพที่ 10) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ทุกไอโซเลท (37 ไอโซเลท) มีความไวต่อยา Oxolinic acid รองลงมาคือมีความไวต่อยา Oxytetracycline (21 ไอโซเลท), Sulphamethoxazole/trimethoprim (19 ไอโซเลท) และ Streptomycin

(14 ไอโซเลท) โดยมีค่าร้อยละของความไว (Sensitivity) เท่ากับ 100.00, 56.76 และ 51.35 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ต่อยา sulphonamethoxazole/trimethoprim มากที่สุด (18 ไอโซเลท) รองลงมาคือ ยา Oxytetracycline (16 ไอโซเลท) และยา Streptomycin (14 ไอโซเลท) โดยมีค่าร้อยละของการดื้อยา เท่ากับ 48.65, 43.24 และ 37.84 ตามลำดับ และมีเชื้อ *Vp_{AHPND}* ที่เริ่มมีพัฒนาการดื้อยา Streptomycin จำนวน 9 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 24.32 (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 10 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ด้วยวิธี Agar disk diffusion

ตารางที่ 6 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}*

ชื่อยาปฏิชีวนะ	จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> (ร้อยละ)		
	Sensitivity (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
Oxytetracycline (OT30)	21 (56.76)	0 (0.00)	16 (43.24)
Sulphonamethoxazole/trimethoprim (SXT25)	19 (51.35)	0 (0.00)	18 (48.65)
Streptomycin (S25)	14 (37.84)	9 (24.32)	14 (37.84)
Oxolinic acid (OA2)	37 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

3.2 ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}*

สำหรับค่าดัชนีการดื้อยาของเชื้อ *Vp_{AHPND}* ต่อยาหลายชนิด (Multiple antibiotic resistance; MAR index) ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งคำนวณจากจำนวนของยาปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาต่อจำนวนยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ส่วนใหญ่ (19 ไอโซเลท) มีการดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิด (ร้อยละ 51.35) แบ่งเป็นกลุ่มที่ดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (Multiple antibiotic resistance; MAR) กล่าวคือมีค่า MAR index น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.2 จำนวน 2 ไอโซเลท และเป็นกลุ่มที่มีค่า MAR index มากกว่า 0.2 จำนวน 17 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 10.53 และ 89.47 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ทั้งนี้พบว่าค่าดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) ของเชื้อ *Vp_{AHPND}* มีค่าเท่ากับ 0.32 ± 0.34

ตารางที่ 7 ค่าดัชนีการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ต่อยาหลายชนิด (MAR index) ของเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}*

MAR index levels	จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรีย <i>Vp_{AHPND}</i> (จำนวนทั้งหมด)	ร้อยละของการพบ
น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.2	2 (19)	10.53
มากกว่า 0.2	17 (19)	89.47
รวม	19 (37)	51.35

3.3 เปอร์เซ็นต์ของรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}*

เมื่อพิจารณารูปแบบการดื้อยาของการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ที่มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะทั้งหมด 4 รูปแบบหลัก คือ ดื้อต่อยา 1, 2, 3 ชนิด และไวต่อยาทุกชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ (18 ไอโซเลท) พบว่ามีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดที่ทดสอบ คิดเป็น 48.65 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ มีการดื้อต่อยา 3 ชนิดร่วมกัน จำนวน 12 ไอโซเลท (32.43 เปอร์เซ็นต์) โดยทั้งหมดมีรูปแบบการดื้อยา Oxytetracycline (OT) Streptomycin (S) ร่วมกับ Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT) และพบการดื้อยาร่วมกัน 2 ชนิด จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งมีรูปแบบการดื้อยา Oxytetracyclin (OT) ร่วมกับ Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT) จำนวน 3 ไอโซเลท และดื้อยา Streptomycin (S) ร่วมกับ Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT) จำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็น 8.11 และ 5.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ที่ดื้อต่อยาเพียงชนิดเดียว โดยดื้อต่อยา Oxytetracyclin (OT) และ Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT) อย่างละ 1 ไอโซเลท คิดเป็น 2.70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์ของรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* (N=37)

รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์
1. ดื้อต่อยาชนิดเดียว	2	5.41
- Oxytetracycline (OT)	1	2.70
- Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT)	1	2.70
2. ดื้อต่อยา 2 ชนิด	5	13.51
- Oxytetracycline (OT) และ Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT)	3	8.11
- Streptomycin (S) และ Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT)	2	5.41
3. ดื้อต่อยา 3 ชนิด	12	32.43
- Oxytetracycline (OT), Streptomycin (S) ร่วมกับ Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT)	12	32.43
4. ไวต่อยาทั้ง 4 ชนิด	18	48.65

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ก่อโรคตัวลายเฉียบพลัน (*Vp_{AHPND}*) จากพื้นที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่แตกต่างกันในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดสงขลา ตรัง กระบี่ ภูเก็ต สมุทรสาคร และจันทบุรี ในระหว่างปี พ.ศ. 2562 - 2563 ซึ่งเมื่อยืนยันผลการทดสอบเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ทั้งสิ้น 37 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ที่รวบรวมได้จากแต่ละจังหวัด จำนวน 14 ไอโซเลทมาทดสอบความรุนแรงต่อกุ้งขาวแวนนาไม ขนาดเฉลี่ย 3.08 ± 0.49 กรัม โดยพิจารณาจากอัตราการรอดตาย ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่พบในกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่เวลา 0, 12,

24, 72, 168, 240 และ 336 ชั่วโมงหลังจากแช่เชื้อ Vp_{AHPND} แต่ละไอโซเลทที่ระดับความเข้มข้น 10^5 cfu/ml เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง ซึ่งพบว่ากุ้งขาวแวนนาไม่เริ่มมีการตายเมื่อได้รับเชื้อเป็นเวลา 1 วัน (อัตราการตาย ประมาณ 7.5 - 25 เปอร์เซ็นต์) และมีอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 ภายหลังจากแช่เชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อ Vp_{AHPND} ทุกไอโซเลทมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งในชุดควบคุม ยกเว้นไอโซเลท SMK1 และ SVP019 โดยที่กุ้งขาวแวนนาไม่ที่ได้รับเชื้อไอโซเลท CG294 มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุดเท่ากับ 37.5 ± 9.57 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อ Vp_{AHPND} ไอโซเลทอื่น ๆ พบว่ามีผลทำให้อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม่อยู่ในช่วงประมาณ $47.5 \pm 15 - 65 \pm 5.77$ เปอร์เซ็นต์ โดยที่ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในชั่วโมงแรก ๆ ภายหลังจากแช่เชื้อ (ชั่วโมงที่ 0 - 72) พบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในกระเพาะอาหารสูงกว่าในตับและตับอ่อน มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio รวมทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ $10^5 - 10^6$ cfu/g จากนั้นพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 168, 240 และ 336 ตามลำดับ โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วงประมาณ $10^3 - 10^4$ cfu/g ส่วนในกลุ่มควบคุมพบว่าตลอดการทดลองมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งหมดในกระเพาะอาหารอยู่ในช่วงประมาณ $10^2 - 10^3$ cfu/g ในขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่พบในตับและตับอ่อน พบว่าปริมาณของเชื้อกลุ่ม vibrio รวมทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ภายหลังจากแช่เชื้อ โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ $10^6 - 10^7$ cfu/g จากนั้นพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลงจนอยู่ในช่วงประมาณ $10^3 - 10^4$ cfu/g ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบว่าตลอดการทดลองมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งหมดในตับและตับอ่อนประมาณ 10^3 cfu/g ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Soto-Rodriguez *et al.* (2015) ซึ่งพบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่พบในกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม่ที่ติดเชื้อ Vp_{AHPND} จะอยู่ในช่วง $10^6 - 10^7$ cfu/g ขึ้นกับระยะของการติดเชื้อ และเป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Lai *et al.* (2015) ซึ่งพบว่าการศึกษาการติดเชื้อ Vp_{AHPND} เริ่มขึ้นที่กระเพาะอาหารของกุ้ง ภายหลังจากแช่เชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเริ่มมีการติดเชื้อที่ตับและตับอ่อนของกุ้ง ซึ่งเห็นได้จากการพบความผิดปกติของเซลล์ตับและตับอ่อน เช่น ปริมาณ R cell ที่พบ B-cell และ F cell น้อยลง การพบเซลล์ตับและตับอ่อนเริ่มมีลักษณะ ลีบ ฝ่อ ผนังบาง (collapsed epithelia; CE) และพบการหลุด (sloughing) ของเซลล์เข้ามาในท่อตับและตับอ่อน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พบว่าอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม่จากการศึกษารั้งนี้มีค่าเท่ากับ 25.0 - 62.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Soto-Rodriguez *et al.* (2015) ซึ่งมีอัตราการตายสะสมอยู่ในช่วง 75 - 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากแช่เชื้อเป็นเวลานาน 44 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้สามารถผลิตสารพิษชนิด PirA และ PirB ได้น้อยกว่า ซึ่งสารพิษดังกล่าวมีผลอย่างยิ่งต่อการทำลายเนื้อเยื่อเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งและส่งผลทำให้กุ้งมีระบบการดูดซึมอาหารที่ผิดปกติและตายได้ในที่สุด (Padilah *et al.*, 2022; Kuma *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2022)

ส่วนการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ Vp_{AHPND} ที่รวบรวมได้จากการศึกษารั้งนี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ทุกไอโซเลทมีความไวต่อยา Oxolinic acid รองลงมาคือมีความไวต่อยา Oxytetracycline, Sulphamethoxazole/trimethoprim และ Streptomycin โดยมีค่าร้อยละของความไว (Sensitivity) เท่ากับร้อยละ 56.76, 51.35 และ 37.84 ตามลำดับ โดยที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} มีการดื้อยา sulphamethoxazole/trimethoprim มากที่สุด (ร้อยละ 48.65) รองลงมาคือ ยา Oxytetracycline (ร้อยละ 43.24) และยา Streptomycin (ร้อยละ 37.84) ทั้งนี้ยังพบว่าเชื้อ Vp_{AHPND} ที่เริ่มมีพัฒนาการดื้อยา Streptomycin คิดเป็นร้อยละ 24.32 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Khan *et al.* (2007) ซึ่งทดสอบความไวของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากกุ้งทะเลของประเทศบังคลาเทศ จำนวน 10 ไอโซเลทซึ่ง

พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทมีความไวรับต่อยา Tetracycline (30 ug) และมีความดื้อต่อยา Streptomycin (10 ug) จำนวน 8 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 80 และให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Tan *et al.* (2020) ซึ่งพบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่จำแนกได้จากอาหารทะเลในเมือง Selangor ของประเทศมาเลเซียมีความไวต่อยา Tetracycline (30 ug) และยา Trimethoprim sulfamethoxazole (1.25/23.75 ug) เท่ากับร้อยละ 94.17 และ 95.00 ตามลำดับ ส่วนค่าดัชนีการดื้อยาของเชื้อ *Vp_{AHPND}* ต่อยาหลายชนิด (Multiple antibiotic resistance; MAR index) จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ซึ่งสามารถใช้ในการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพได้ โดยหากเชื้อแบคทีเรียมีค่า MAR index มากกว่า 0.2 แสดงว่ามีความเสี่ยงสูงที่จะมีแนวโน้มต่อการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Vp_{AHPND}* มีค่า MAR index เท่ากับ 0.32 ± 0.34 โดยมีจำนวนเชื้อที่มีค่า MAR index มากกว่า 0.2 คิดเป็นร้อยละ 89.47 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Vp_{AHPND}* มีความเสี่ยงของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ สอดคล้องกับการศึกษาของ Tan *et al.* (2020) ซึ่งพบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีค่า MAR index อยู่ในช่วงระหว่าง 0.04 - 0.71 โดยที่พบว่าส่วนใหญ่จะมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดคิดเป็นร้อยละ 90.83

สรุปผลการศึกษา

ผลจากการศึกษาการแช่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคตัวลายเฉียบพลัน (*Vp_{AHPND}*) ที่แยกได้จากกุ้งขาวแวนนาไมในแหล่งเลี้ยงต่าง ๆ ของประเทศไทย จำนวน 14 ไอโซเลท เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีระดับความรุนแรงของเชื้อที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองส่งผลทำให้กุ้งขาวแวนนาไมมีอัตราการตายตั้งแต่ 37.5 - 82.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อไอโซเลท CG294 มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุดเท่ากับ 37.5 ± 9.57 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากผลการตรวจสอบปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในกระเพาะอาหารและตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อ *Vp_{AHPND}* พบว่าในระยะแรก (12 ชั่วโมงหลังการแช่เชื้อ) เป็นการติดเชื้อในกระเพาะอาหาร โดยพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในกระเพาะอาหารประมาณ 10^5 - 10^6 cfu/g หลังจากนั้นจึงพบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในตับและตับอ่อนเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 96 หลังการแช่เชื้อ โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสรวมทั้งหมดประมาณ 10^6 - 10^7 cfu/g ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน เช่น R cell ที่พบ B-cell และ F cell น้อยลง การพบเซลล์ตับและตับอ่อนเริ่มมีลักษณะ ลีบ ฝ่อ ผ่นบาง และพบการหลุดของเซลล์เข้ามาในท่อตับและตับอ่อนเป็นต้น ส่วนการทดสอบความไวของเชื้อ *Vp_{AHPND}* ต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อ *Vp_{AHPND}* ทุกไอโซเลทมีความไวต่อยา Oxolinic acid และมีค่าดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) เท่ากับ 0.32 ± 0.34 และมีรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อ *Vp_{AHPND}* ส่วนใหญ่มีความไวต่อยา ยา Oxytetracycline (OT30), Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT25), Oxolinic acid (OA2) และ Streptomycin (S25) คิดเป็นร้อยละ 48.65

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งกระบี่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งภูเก็ต ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งตรังที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *Vp_{AHPND}* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย

ศูนย์วิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำสงขลาที่ให้การสนับสนุนทำให้การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จด้วยดี และ
สุดท้ายขอขอบพระคุณคณะกรรมการวิชาการของกองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำทุกท่านที่ให้คำแนะนำที่
เป็นประโยชน์และช่วยตรวจสอบแก้ไขงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กมลชัย ตรวงนิชนาม อรุณ ปางตระกูลนนท์ นพรัตน์ หมานริม สุมาลี บุญมา และ ชาดิชา ย หนุณภักดี. 2540.
การศึกษา Minimal inhibitory concentration ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำที่พบใน
ประเทศไทย โดยวิธี Etest. สัตวแพทยสาร. 48(3): 15-24.
- เกรียงศักดิ์ สายธนู เกรียงศักดิ์ พูนสุข ชาญณรงค์ รอดคำ และสุภาพ กำลังแพทย์. 2542. ความไวรับของ
แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคในกุ้งกุลาดำต่อยาปฏิชีวนะ. รายงานผลการวิจัย สำนักมาตรฐาน
ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. มีนาคม 2542. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- มณี กรรณรงค์ และจินตนา โสภากุล. 2545. การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *Vibrio parahaemolyticus* จาก
หอยตะไกรและแหล่งน้ำอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี. เอกสารวิชาการฉบับที่ 23/2545
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี กรมประมง. 20 หน้า.
- Ahmed, J., M. H. Khan, S. Unnikrishnan, and K. Ramalingam. 2022. Acute Hepatopancreases
Necrosis Diseases (AHPND) as Challenging Threat in Shrimp. *Biointerface Res. Appl.
Chem.* 12 (1): 978-991.
- Al-Othubi, S. M., H. Alfizah, R. Son, N. Humin and J. Rahaman. 2011. Rapid Detection and E-
Test Antimicrobial Susceptibility Testing of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from
Seafood and Environmental Sources in Malaysia. *Saudi Medic. J.* 32: 400-406.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology. World
Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Cabello, F. C., H. P. Godfrey, A. Tomova, L. Ivanova, H. Dölz, A. Millanao and A. H. Buschmann.
2013. Antimicrobial Use in Aquaculture Re-examined: Its Relevance to Antimicrobial
Resistance and to Animal and Human Health. *Environ. Microbiol.* 15 (7): 1917-1942.
- Choi, M., A. M. Stevens, S. A. Smith, D. P. Taylor and D. D. Kuhn. 2017. Strain and Dose
Infectivity of *Vibrio parahaemolyticus*: The Causative Agent of Early Mortality
Syndrome on Shrimp. *Aquac. Res.* 48 (7): 3719-3727.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013a. Performance standards for
antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals;
approved standard. 4th edition, VET01-A4, Vol 33 No.7, Wayne, PA. 80 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013b. Performance standards for
antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals;
second information supplement. VET01-S2, Vol 33 No.8, Wayne, PA. 70 p.

- CLSI. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, PA. 42 pp.
- Dong, X., D. Bi, H. Wang, P. Zou, G. Xie, X. Wan, Q. Yang, Y. Zhu, M. Chen, C. Guo, Z. Liu, W. Wang and J. Huang. 2017. PirAB^{VP}-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* Pathogens Isolated from the Same AHPND-Affected Pond Possess Highly Similar Pathogenic Plasmids. *Front. Microbiol.* 8 (1859): 1-9.
- FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, Volume 2014, ISBN 9789251072257.
- Han, J. E., K. F. Tang, L. H. Tran and D. V. Lightner. 2015. Phototransducin Insect-Related (Pir) Toxin-Like Genes in a Plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 113 (1): 33-40.
- Hong, X., L. Lu and D. Xu. 2016. Progress in Research on Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). *Aquacult Int* 24: 577-593.
- Joshi, J., J. Srisala, W. Sakaew, A. Prachumwat, K. Sritunyalucksana, T. W. Flegel and S. Thitamadee. 2013. Identification of Bacterial Agent(s) for Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome, A New Emerging Shrimp Disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* 21 (4): 315-320.
- Kumar, R., T. H. Ng and H. C. Wang. 2020. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Penaeid Shrimp. *Rev Aquac.* 12 (3): 1867-1880.
- Kumar, V., S. Roy, B. K. Behera, P. Bossier and B. K. Das. 2021. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins.* 13 (8): 524.
- Lai, H., T. H. Ng, M. Ando, C. Lee, I. Chen, J. Chuang, R. Mavichak, S. Chang, M. Yeh, Y. Chiang, H. Takeyama, H. Hamaguchi, C. Lo, T. Aoki and H. Wang. 2015. Pathogenesis of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 47: 1006-1014.
- Lee, C. T., I. T. Chen, Y. T. Yang, T. P. Ko, Y. T. Huang, J. Y. Huang, M. F. Huang, S. J. Lin, C. Y. Chen, S. S. Lin, D. V. Lightner, H. C. Wang, H. J. Wang, H. C. Wang, L. I. Hor and C. F. Lo. 2015. The Opportunistic Marine Pathogen *Vibrio parahaemolyticus* Becomes Virulent by Acquiring a Plasmid that Expresses a Deadly Toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (34): 10798-10803.
- Lightner, D. V., R. M. Redman, C. R. Pantoja, B. L. Noble and L. Tran. 2012. Early Mortality Syndrome Affects Shrimp in Asia. *Glob. Aquac. Advocate.* 15 (1): 40.
- Nunan, L., D. V. Lightner, C. R. Pantoja and S. Gomez-Jimenez. 2014. Detection of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Organ* 111 (1): 81-86.

- Padilah, B., Y. Rohaiza-Asmini, H. M. Gan, W. A. W. Rozana, W. M. H. W. Sajiri and B. C. Kua. 2022. Detection of PirA/B Toxin Genes for Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus vannamei* Culture from Major White Shrimp Producing Farms in Malaysia. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 45 (1): 171-186.
- Rico, A., K. Satapornvanit, M. M. Haque, J. Min, P. T. Nguyen, T. C. Telfer and P. J. Brink. 2012. Use of Chemicals and Biological Products in Asian Aquaculture and Their Potential Environmental Risks: A Critical Review. *Rev. Aqua.* 4 (2): 75-93.
- Roy, S., V. Kumar, P. Bossier, P. Norouzitalab and D. Vanrompay. 2019. Phloroglucinol Treatment Induces Transgenerational Epigenetic Inherited Resistance Against *Vibrio* Infections and Thermal Stress in a Brine Shrimp (*Artemia franciscana*) Model. *Front. Immunol.* 10 (2745): 1-25.
- Shaw K. S., R. E. Rosenberg Goldstein, X. He, J. M. Jacobs, B. C. Crump and A. R. Sapkota. 2014. Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* Recovered from Recreational and Commercial Areas of Chesapeake Bay and Maryland coastal Bay. *PLoS One.* 9 (2): e89616.
- Shinn, A. P., J. Pratoomyot, D. Griffiths, T. Q. Trong, N. T. Vu, P. Jiravanichpaisal and M. Briggs. 2018. Asian Shrimp Production and the Economic Costs of Disease. *Asian Fish Sci S.* 31: 29-58.
- Soto-Rodriguez, S. A., B. Gomez-Gil, R. Lozano-Olvera, M. Betancourt-Lozano and M. S. Morales-Covarrubias. 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 81 (5): 1689-1699.
- Tan, C. W., Y. Rukayadi, H. Hasan, T. Y. Thung, E. Lee, W. D. Rollon, H. Hara, A. Y. Kayali, M. Nishibuchi and S. Radu. 2020. Prevalence and Antibiotic Resistance Patterns of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Different Types of Seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi J Biol Sci* 27 (6): 1602-1608.
- Thitamadee, S., A. Prachumwat, J. Srisala, P. Jaroenlak, P. V. Salachan, K. Sritunyalucksana, T. W. Flegel and O. Itsathitphaisarn. 2016. Review of Current Disease Threats for Cultivated Penaeid Shrimp in Asia. *Aquaculture.* 452: 69-87.
- Tinwongger, S., P. Proespraiwong, J. Thawonsuwan, P. Sriwanayos, J. Kongkumnerd, T. Chaweeapack, R. Mavichak, S. Unajak, R. Nozaki, H. Kondo and I. Hirono. 2014. Development of PCR Diagnosis for Shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) Strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.* 49 (4): 159-164.
- Tran, L. H., L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohny, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons and D. V. Lightner. 2013. Determination of the Infectious Nature of the Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome Affecting Penaeid Shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 105 (1): 45-55.

- Tun K. L., S. Kanrar, K. M. Fitzsimmons, M. T. Oo, H. H. T. Kyi, M. T. Oo and A. K. Dhar. 2017. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*), Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*), and Fresh Water Shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). In: Asian Pacific Aquaculture 2017. July 25 - 27, 2017. Kuala Lumpur, Malaysia. p 209.
- Yang, Y. T., I. T. Chen, C. T. Lee and C. Y. Chen. 2014. Draft Genome Sequences of Four Strains of *Vibrio parahaemolyticus*, Three of Which Cause Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Shrimp in China and Thailand. *Genome Announc* 2: e00816-14.
- Yano, Y., K. Hamano, M. Satomi, I. Tsutsui, M. Ban and D. Aue-umneoy. 2014. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio* Species Related to Food Safety Isolated from Shrimp Cultured at Inland Ponds in Thailand. *Food Cont.* 38: 30-45.
- Zhang, B. C, F. Liu, H. H. Bian, J. Liu, L. Q. Pan and J. Huang. 2012. Isolation, Identification and Pathogenicity Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* Strain from *Litopenaeus vannamei*. *Fish. Sci. Prog.* 33 (2): 56-62.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการทดสอบความไวรับของเชื้อแบคทีเรีย *Vp*_{AHPND} ต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดด้วยวิธี Agar disk diffusion

ชื่อไอโซเลต	ผลการทดสอบความไวรับของเชื้อ <i>Vp</i> _{AHPND}			
	OT30	SXT25	S25	OA2
SMK1	S	S	S	S
SMK2	S	S	S	S
SMK3	S	S	S	S
AKB1	R	R	R	S
AKB12	R	R	R	S
AKB17	R	R	R	S
CG152	S	S	S	S
CG282	R	R	R	S
CG294	R	R	R	S
TG08	S	S	S	S
G2205	S	I	S	S
G2269	S	S	S	S
SVP019	R	I	R	S
SVP026	R	I	S	S

หมายเหตุ OT30 คือ Oxytetracycline 30 ug, SXT25 คือ Sulphamethoxazole/trimethoprim 25 ug
 OA2 คือ Oxolinic acid 2 ug และ S25 คือ Streptomycin 25 ug
 S คือ Susceptible, I คือ Intermediate และ R คือ Resistance