บทที่ 1
บทนำ

V. parahaemolyticus และ *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในน้ำทะเลและดินตะกอน แหล่งสะสมของเชื้อที่สำคัญได้แก่แพลงค์ตอนและสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในทะเล ดังนั้นแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้จึงสามารถปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ ซึ่งสามารถนำไปสู่การได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายของผู้บริโภคอาหารทะเลและเกิดพัฒนาการของโรคได้ แบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อหลังการบริโภคอาหารทะเล โดย *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบหรืออาหารเป็นพิษ (Park *et al.*, 2004) การได้รับเชื้อชนิดนี้มักมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารดิบ หรืออาหารที่ผ่านการให้ความร้อนไม่เพียงพอ หรืออาหารที่ปรุงสุกแล้วแต่มีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้เข้าไปอีก ผู้ได้รับเชื้อมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน และอุจจาระร่วงแบบเป็นน้ำจนถึงขั้นรุนแรงเป็นเลือดได้ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549) ส่วน *V. vulnificus* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) ผู้ป่วยอาจมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ การติดเชื้อเกิดขึ้นผ่านทางบาดแผล (wound infection) ที่สัมผัสกับน้ำทะเล หรือจากการบริโภคอาหารทะเลดิบ ๆ โดยเฉพาะหอยนางรม (Harwood, Gandhi, & Wright, 2004; Jackson, Murphree, & Tamplin, 1997; Strom & Paranjpye, 2000) โดยภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือดที่เกิดจากการบริโภคหอยนางรมดิบนั้นมีอัตราการเสียชีวิตมากกว่าร้อยละ 50 (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และ วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2551)

เนื่องจากความสำคัญในการทำให้เกิดโรคของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การแยกเชื้อและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี การทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา และการตรวจสอบโดยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ (Harwood *et. al.,* 2004) การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว จากรายงานการศึกษามีผู้ใช้ยีนเป้าหมายต่าง ๆ ได้แก่ ยีน 23S rRNA ซึ่งเป็นข้อมูลสำหรับการสร้าง 23S rRNA (Arias, Garay, & Aznar, 1995) ยีน *gyrB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ DNA gyrase (subunit B) (Venkateswaran, Dohmoto, & Harayama, 1998) และยีน *toxR* ซึ่งควบคุมการสร้าง transmembrane DNA-binding regulatory protein ซึ่งพบในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* (Provenzano, Schuhmacher, Barker, & Klose, 2000) นอกจากนี้ยังมียีน *tl*, *tdh* และ *trh* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง thermolabile hemolysin, thermostable direct hemolysin (TDH) และ

TDH-related hemolysin (TRH) ตามลำดับ (Bej *et al.*, 1999; Tada *et al.*, 1992) ซึ่งในกรณีของยีน *tdh* และ *trh* นั้นนิยมนำมาใช้ในการบ่งชี้ความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ในขณะที่การตรวจสอบ *V. vulnificus* มีการใช้ยีนต่าง ๆ เป็นยีนเป้าหมาย เช่น ยีน *vvhA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง hemolysin (Harwood *et al.*, 2004) ยีน *ToxR* (Takahashi, Hara-Kudo, Miyasaka, Kumagai, & Konuma, 2005) ยีน 16S rRNA (Kim & Jeong, 2001; Maugeri, Carbone, Fera, & Gugliandolo, 2006) ยีน *gyrB* (Kumar, Parvathi, Karunasagar, & Karunasagar, 2006) รวมถึงการใช้ยีน *viuB* (Panicker, Call, Krug, & Bej, 2004) เป็นต้น

การนำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้อาจทำในลักษณะมัลติเพล็กซ์ (multiplex PCR) กล่าวคือในแต่ละปฏิกิริยามีการใช้คู่ไพร์เมอร์ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายมากกว่า 1 ยีน ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อได้ทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ดังรายงานของ Bej *et al.* (1999) ซึ่งใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจ *V. parahaemolyticus* โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *tl*, *tdh* และ *trh* รวมทั้งรายงานของ Panicker *et al.* (2004) ซึ่งใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยมียีนเป้าหมายเป็น *vvh* และ *viuB* ซึ่งจนถึงปัจจุบันมีเพียงรายงานวิจัยเดียวเท่านั้นที่รายงานถึงการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอพร้อมกัน 5 ชนิด ในปฏิกิริยาเดียว คือ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* และ *V. mimicus* โดยมีขั้นตอนของการตรวจสอบเป็นลำดับ (sequential multiplex PCR) ระหว่างการตรวจสอบเชื้อทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวและการตรวจสอบการมีอยู่ของสายพันธุ์ก่อโรคของแบคทีเรียแต่ละชนิด (Espiñeria, Atanassova, Vieites, & Santaclara, 2010)

สำหรับการศึกษานี้สนใจนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมสดแกะเปลือก ที่เก็บจากร้านค้าบริเวณชายฝั่งทะเล ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยเป็นการตรวจเชื้อทั้งสองชนิดนี้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว เทคนิคนี้ถูกพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ (validation) ซึ่งมีค่าความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวอยู่ในช่วง 96-100% (สุดารัตน์ สวนจิตร, อภิรดี ปิลันธนภาคย์ และสุรีย์พร เอี่ยมศรี, 2552) อีกทั้งวิธีการยังสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ทำให้มีประสิทธิภาพของการตรวจสอบเชื้อดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม ข้อมูลที่ได้รับสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ซึ่งนำไปสู่ความปลอดภัยในการบริโภคหอยนางรมของผู้บริโภคต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมสดแกะเปลือก จากร้านค้าบริเวณชายฝั่งทะเล ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้ปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์
2. เพื่อคัดแยก *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมที่ตรวจพบการปนเปื้อน

ความสำคัญของการศึกษา

ปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สามารถใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมสดแกะเปลือกได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว ซึ่งสามารถทำให้นำข้อมูลไปใช้ในการประเมินความเสี่ยง รวมทั้งป้องกันการระบาดของโรคอันมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ได้อย่างทันท่วงที

สมมติฐานของการศึกษา

1. หอยนางรมเป็นแหล่งสะสมของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*
2. เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมสดแกะเปลือกได้อย่างจำเพาะและแม่นยำ
3. มีโอกาสคัดแยก *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมที่ตรวจพบการปนเปื้อนได้

ขอบเขตของการศึกษา

เก็บตัวอย่างหอยนางรมสดจากร้านค้าปลีก บริเวณชายฝั่งทะเล ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี จำนวน 20 ร้านค้า ระหว่างเดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2553 จากนั้นนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยปฏิกิริยา multiplex PCR ซึ่งใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *tl* และ *tdh* ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *vvh* ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* รวมทั้งคัดแยก*V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จากตัวอย่างหอยนางรมที่ตรวจพบการปนเปื้อน

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา