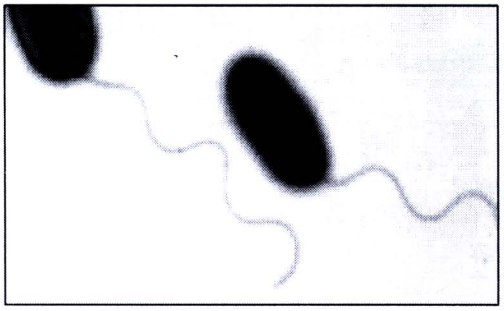
บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

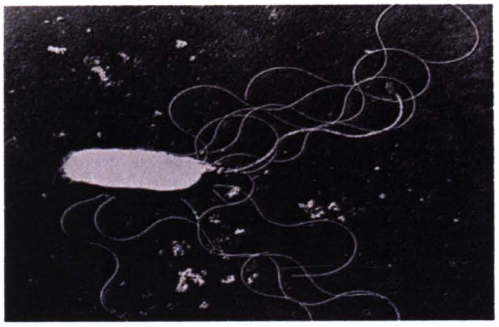
1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Vibrio parahaemolyticus*

1.1 ลักษณะทั่วไปของ *V. parahaemolyticus*

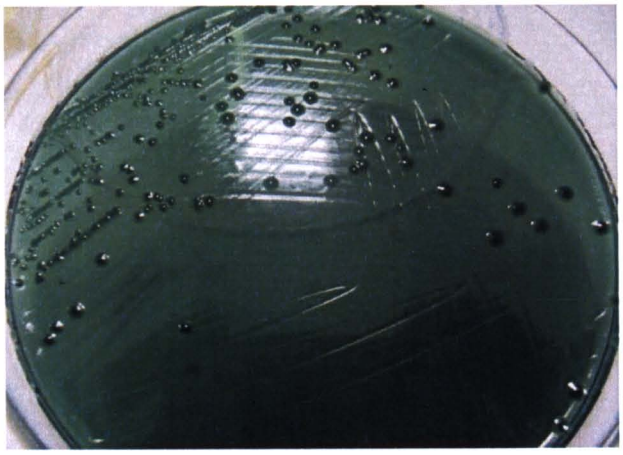
V. parahaemolyticus อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนตรงหรือโค้ง ขนาดประมาณ 0.5-1.3 x 1.0-3.2 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ปลายเซลล์ (ภาพที่ 1)ไม่สร้างสปอร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีค่าพีเอชมากกว่าหรือเท่ากับ 8.5 จะสร้างแฟลกเจลลาเส้นเดียว (ภาพที่ 2-1) แต่จะสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (ภาพที่ 2-2) *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 10-44 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญ (halophilic bacteria) โดยระดับความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 2-4 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชที่สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 7.6-9.0 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar ให้โคโลนีสีเขียว เนื่องจากไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครส (ภาพที่ 2-3) โคโลนีมีลักษณะกลม แบนราบ ขอบเรียบ คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus* แสดงในตารางที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 ลักษณะของ *V. parahaemolyticus* (แฟลกเจลลาเส้นเดียว)
(ที่มา: The University of Lowa Department of microbiology, 1984)



ภาพที่ 2-2 ลักษณะของ *V. parahaemolyticus* (แฟลกเจลลารอบเซลล์)
(ที่มา: The University of Lowa Department of microbiology, 1984)



ภาพที่ 2-3 ลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*

ลักษณะทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Motility	+
Growth in :	
0% NaCl	-
3% NaCl	+
6% NaCl	+
8% NaCl	+
10% NaCl	-
Acid production form :	
Lactose	-
Arabinose	+
Cellobiose	-
Mannose	+
Sucrose	-
Decarboxylase :	
Lysine	+
Arginine	-
Growth at 42°C	+
Oxidase	+
ONPG	-
Voges-Proskauer	-
Sensitivity to	
10 µg 0/129	Resistant
150 µg 0/129	Susceptible
Gelatinase	+
Urease	variable

(ที่มา: Kaysner & DePaola, 2001, p. 530)

1.2 การแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* ในสิ่งแวดล้อม

V. parahaemolyticus ถือว่ามีความสำคัญเนื่องจากเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteristis) มีการศึกษาถึงการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ในมนุษย์ในประเทศแถบเอเชียพบว่ามีการระบาดมากในญี่ปุ่น ซึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน (Lee *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีประเทศในเอเชียอีกหลายประเทศที่มีการระบาดของ *V. parahaemolyticus* เช่น มาเลเซีย ฮ่องกง เวียดนาม รวมถึงประเทศไทย เป็นต้น (Bliung *et al.*, 2005)

การแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทะเลหรือปากแม่น้ำ พบว่าเมื่ออุณหภูมิของน้ำทะเลสูงกว่า 15 องศาเซลเซียสขึ้นไป จะตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ได้มาก ได้มีการศึกษาถึงการแพร่ระบาดของแบคทีเรียชนิดนี้บริเวณอ่าวเชคสเปียร์ (Chesapeake) ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า *V. parahaemolyticus* ที่อาศัยอยู่ในดินตะกอนสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในฤดูหนาว แต่เมื่อใดที่อุณหภูมิสูงกว่า 14 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* จะออกมาอาศัยในน้ำทะเลในช่วงปลายฤดูใบไม้ผลิหรือฤดูร้อน ในช่วงปี 1984-1985 มีการสำรวจชายฝั่งทะเลของสหรัฐอเมริกา พบว่าเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียส พบการแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ (4 เซลล์ต่อ 100 มิลลิลิตร) แต่เมื่ออุณหภูมิสูงประมาณ 25 องศาเซลเซียสจะพบว่ามีการแพร่กระจายเพิ่มขึ้น (1,000 เซลล์ต่อ 100 มิลลิลิตร) นอกจากนี้มีการศึกษาการแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่เลี้ยงตามธรรมชาติในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2002 ถึงเดือนตุลาคม 2003 ในรัฐโอริกอน (Oregon) พบว่าการแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล โดยจะตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุดในช่วงฤดูร้อน (Su & Liu, 2007)

การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* พบได้มากในสัตว์ทะเลและมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล สัตว์ทะเลที่พบว่ามีการปนเปื้อนได้บ่อยคือ หอยนางรม โดยจะตรวจพบ *V. parahaemolyticus* มากในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อนมากกว่าในฤดูหนาว ปกติแล้วหอยนางรมมีการปนเปื้อนของเชื้อประมาณ 10^3 CFU/กรัม แต่ถ้าอุณหภูมิของน้ำทะเลสูงขึ้นจะพบการปนเปื้อนของเชื้อมากกว่าปริมาณดังกล่าว แสดงว่าเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยได้มีการศึกษาปริมาณของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่ไม่ได้แช่เย็น (อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส) พบว่ามีปริมาณของ *V. parahaemolyticus* เพิ่มขึ้น 50-790 เท่าภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ในช่วงเดือนมิถุนายน 1998 ถึงเดือนกรกฎาคม 1999 ได้มีการสำรวจตัวอย่างหอยนางรมจากร้านอาหาร และตลาดที่มีการขายอาหารทะเลในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในปริมาณสูง (มากกว่า 1,000 MPN/กรัม) (Su & Liu, 2007)

ในประเทศไทยได้มีการรายงานว่าพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงแม่พันธุ์กุ้งแชบ๊วยธรรมชาติ (*Penaeus merguiensis*) บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก โดยแบคทีเรียจะเข้าไปอาศัยในตัวของกุ้งในฤดูหนาว เนื่องจากกุ้งจะมีภูมิคุ้มกันต่ำในฤดูนี้ ทำให้สามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้น้อยลง (ธิดา ฉวีภักดิ์, ลิลา เรืองแป้น และวริษฐา หนูปิ่น, 2550)

1.3 การทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus มักพบในอาหารทะเลจำพวก กุ้ง หอย ปู ปลา ดังนั้นถ้าบริโภคอาหารที่มีการสะสมของเชื้อดังกล่าว สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งมีอาการท้องเสีย ปวดท้อง บางรายมีอาการคลื่นไส้ หรืออาจมีไข้และปวดศีรษะร่วมด้วย ปริมาณเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคได้อยู่ที่ประมาณ 1-1,000 ล้านเซลล์ต่อกรัม อาการจะปรากฏภายหลังจากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้ออยู่ 10 – 12 ชั่วโมง อาการจะรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับภูมิต้านทานโรคของแต่ละบุคคล วิธีการแพร่เชื้อเกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ ๆ เช่น หอยนางรม เป็นต้น

1.4 ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

โดยมากแล้ว *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมนั้นพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค ส่วน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค ซึ่งการที่จะระบุว่าเป็นสายพันธุ์ก่อโรคหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับการปรากฏลักษณะฟีโนไทป์บางประการหรือการมีอยู่ของปัจจัยในการก่อโรค (Virulence factors) บางชนิด ได้แก่

(1) Thermostable direct hemolysin (TDH)

TDH (Thermostable direct hemolysin) เป็นโปรตีนที่ควบคุมโดยยีน *tdh* บนโครโมโซม (DePaola *et al.*, 2003) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46 กิโลดาลตัน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ Kanagawa phenomenon จะมียีน *tdh* 2 ชุด คือ *tdh1* และ *tdh2* ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน (97 เปอร์เซ็นต์) (Belkin & Cowel, 2006) TDH มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบเบต้า (β-type hemolysis) เมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagasuma agar ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมากกว่าตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (Su & Liu, 2007)

(2) TDH-releated hemolysin (TRH)

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ก่อโรคสามารถสร้าง TRH (TDH-releated hemolysin) แยกได้ครั้งแรกที่เกาะมัลดีฟ (Maldive Island) ซึ่งพบใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ให้ผลลบกับการทดสอบ Kanagawa phenomenon โดยพบว่ามีการสร้าง TRH แต่ไม่พบ TDH (Belkin & Cowel, 2006) TRH โปรตีนที่เป็นปัจจัยก่อโรคอีกชนิดหนึ่งที่ถูกควบคุมโดยยีน *trh* โดยยีนดังกล่าวมี 2 ชุด คือ *trh1* และ *trh2* (DePaola *et al.*, 2003) สายพันธุ์ที่มีการสร้างโปรตีนชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบได้ (Su & Liu, 2007)

(3) การสร้างเอนไซม์ยูริเอส (Urease Production)

ในช่วงปี 1963-1974 มีรายงานว่าน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของ *V. parahaemolyticus* ที่มีการสร้างเอนไซม์ยูริเอส ส่วนสายพันธุ์ที่มีการสร้างนั้นส่วนมากแยกได้จากผู้ป่วยแถบทวีปเอเชีย อเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Urease สัมพันธ์กันกับการแสดงออกของยีน *trh* อีกด้วย (Belkin & Cowel, 2006)

(4) Serine Protease (Protease A)

Serine Protease (Protease A) เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 กิโลดาลตัน อาจพบได้ในสายพันธุ์ก่อโรคที่ไม่สร้าง TDH หรือ TRH ถือเป็นปัจจัยก่อโรคอีกชนิดหนึ่งซึ่งทำให้สามารถผลิตสารพิษที่เป็นอันตราย เมื่อฉีดเข้าทางเส้นเลือดของหนูแฮมสเตอร์ พบว่าทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูแตกและหนูตายในที่สุด (Su & Liu, 2007)

1.5 การตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ (Molecular-based Method)

เนื่องจากวิธีมาตรฐาน (Standard conventional method) ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานาน และมีความยุ่งยาก สิ้นเปลือง และอาจจะเกิดการผิดพลาดจากการทดลองหรือการอ่านผลการทดสอบ ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นและพัฒนาวิธีทางชีววิทยาในระดับโมเลกุล เพื่อให้ผลที่แม่นยำ เชื่อถือได้และรวดเร็ว ซึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมได้แก่ DNA Hybridization และ Polymerase Chain Reaction (PCR) เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ดังกล่าวนี้เป็นการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโดยมียีนเป้าหมายที่เฉพาะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ ยีนที่นิยมในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ *tl*, *tdh*, *trh* เป็นต้น

(1) ไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอ (DNA Hybridization)

หลักการของเทคนิคนี้คืออาศัยการจับคู่ของเบสที่เป็นเบสคู่สมกันของกรดนิวคลิอิกสายเดี่ยวสองสายที่มาจากต่างแหล่งกัน โดยที่กรดนิวคลิอิกสายหนึ่งเป็นโมเลกุลเป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบ ในขณะที่อีกสายหนึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลติดตาม (probe) ซึ่งถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลเป้าหมาย (สุดารัตน์ สวนจิตร, 2547) โมเลกุลของโพรบอาจถูกติดฉลากไว้ด้วยรังสี เช่น P^{32} และออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* (Lee *et al.*, 1992; Nishibuchi *et al.*, 1985, 1986) นอกจากนี้ได้มีการออกแบบโพรบให้มีความจำเพาะกับยีน *tdh* และ *trh* ของ *V. parahaemolyticus* โดยติดฉลากด้วยเอนไซม์ หรือใช้สารปลอดรังสี เช่นอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และดิโกซิจินิน (digoxigenin) ในการติดฉลากโพรบเพื่อใช้ในการตรวจยีน *tl* ของ *V. parahaemolyticus* (McCarthy *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1992) นอกจากนี้ Banerjee *et al.* (2002) ได้พัฒนา Rapid DNA probe เพื่อใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ด้วย hydrophobic grid membrane filters (HGMF) โดยมีการติดฉลากโพรบให้มีความจำเพาะกับยีน *tl* วิธีนี้สามารถรายงานผลได้ภายใน 1 วัน ภายหลังจากที่ผ่านขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณเชื้อแล้ว แต่ต้องมีการเตรียมการในเรื่องของการแยกดีเอ็นเอ การติดฉลากโพรบและไพรเมอร์ รวมถึงการทำ Colony Hybridization (Su & Liu, 2007)

(2) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

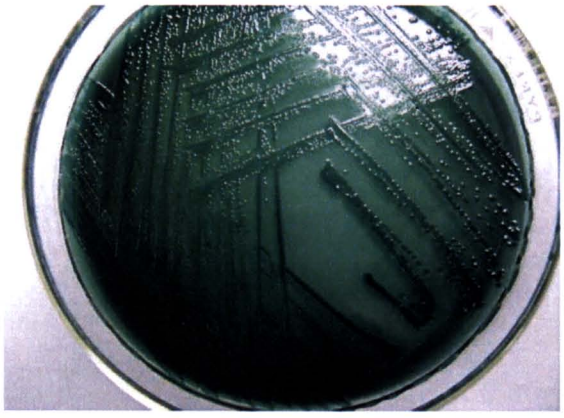
เทคนิคพีซีอาร์มีเป้าหมายเพื่อเพิ่มขยายดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการให้มีปริมาณมากกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยอาศัยไพร์เมอร์ (primer) ที่จำเพาะในการลงเกาะกับจุดเริ่มต้นในสายดีเอ็นเอต้นแบบ และมีเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสช่วยให้เกิดการต่อของสายดีเอ็นเอ การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่แบบ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ไพร์เมอร์อย่างน้อย 1 คู่ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) แมกนีเซียม และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

การนำเทคนิคพีซีอาร์ มาใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* นั้นพบว่ามีหลายงานวิจัย ซึ่งใช้ยีนเป้าหมายแตกต่างกัน เช่น การใช้ยีน *tdh* ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้เทคนิค real time PCR (Backstone *et al.*, 2003) การใช้ยีน *tl, tdh* และ *trh* ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่ในประเทศอิตาลี (Ottaviani *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีนอื่น ๆ ในการตรวจสอบ เช่น *toxR* และ *gyrB* เป็นต้น (Su & Liu, 2007)

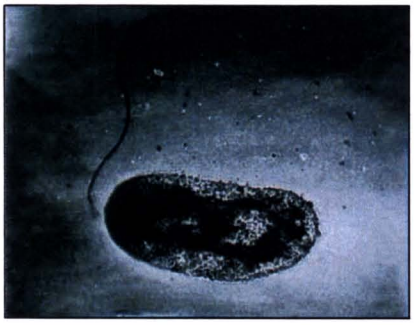
2. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Vibrio vulnificus*

2.1 ลักษณะทั่วไปของ *V. vulnificus*

V. vulnificus อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญ ไม่หมักย่อยน้ำตาลซูโครส โดยให้โคโลนีสีเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (ภาพที่ 2-4) สามารถพบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเค็มตามธรรมชาติในเขตร้อนและเขตอบอุ่น มีรูปร่างท่อนตรงหรือท่อนโค้งไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ปลายเซลล์ (ภาพที่ 2-5) สร้างแคปซูลที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ (Capsular polysaccharide, CPS) ซึ่งมักพบในสายพันธุ์ก่อโรค *V. vulnificus* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อเนื่องจากการบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อดังกล่าว โดยเฉพาะหอยนางรม (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549) คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. vulnificus* แสดงในตารางที่ 2-2



ภาพที่ 2-4 ลักษณะโคโลนีของ *V. vulnificus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar



ภาพที่ 2-5 ลักษณะของ *V. vulnificus*

(ที่มา: Division of Molecular and Genomic Medicine (NHRI), 2007)

ตารางที่ 2-2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. vulnificus*

ลักษณะทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Motility	+
Growth in :	
0% NaCl	-
3% NaCl	+
6% NaCl	+
8% NaCl	-
10% NaCl	-
Acid production form :	
Lactose	+
Arabinose	-
Cellobiose	+
Mannose	+
Sucrose	-
Decarboxylase :	
Lysine	+
Arginine	-
Growth at 42°C	+
Oxidase	+
ONPG	+
Voges-Proskauer	-
Sensitivity to	
10 μg 0/129	Susceptible
150 μg 0/129	Susceptible
Gelatinase	+
Urease	-

(ที่มา: Kaysner & DePaola, 2001, p. 530)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.2 การแพร่กระจายของ *V. vulnificus* ในสิ่งแวดล้อม

V. vulnificus สามารถดำรงชีวิตได้อย่างอิสระ โดยมักจะพบที่บริเวณปากแม่น้ำหรือในน้ำทะเล โดยมากแล้วสามารถแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้ที่อุณหภูมิของน้ำทะเลอยู่ในช่วง 9 – 31 องศาเซลเซียส โดยแหล่งสะสมของเชื้อที่สำคัญคือ สัตว์ทะเลต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยนางรม ในสหรัฐอเมริกาพบว่ามีการแพร่ระบาดของ *V. vulnificus* ที่บริเวณอ่าวเม็กซิโก ได้มีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของ *V. vulnificus* ดังนี้

(1) ความเค็ม (Salinity)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของ *V. vulnificus* ในสภาพแวดล้อมคือ ความเค็มและอุณหภูมิของน้ำทะเล แบคทีเรียชนิดนี้เป็นฮาโลไฟล์ โดยพบได้ในน้ำที่มีความเค็มอย่างน้อย 5 ppt จากการศึกษาในบริเวณอ่าวเม็กซิโก พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถตรวจพบได้ที่ช่วงความเค็มของน้ำทะเลประมาณ 7 – 16 ppt นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในหอยนางรมที่บริเวณชายฝั่งแอตแลนติก พบว่าความเค็มมีผลต่อปริมาณ *V. vulnificus* ในหอยนางรม โดยที่ความเค็มระดับ 5 – 25 ppt พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้สูงที่สุด (มากกว่า 10^3 /กรัม) (Belkin & Cowel, 2006)

(2) อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *V. vulnificus* อยู่ระหว่าง 9 – 31 องศาเซลเซียส แต่จะพบมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 18 องศาเซลเซียส Strom and Paranjpye (2000) รายงานว่า เมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ปริมาณของ *V. vulnificus* ลดลง อาจถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ ทั้งนี้เนื่องมาจาก *V. vulnificus* จะปรับตัวเข้าสู่ระยะที่รอดชีวิตแต่ไม่มีการเจริญ (Viable but nonculturable, VBNC) โดยจะอาศัยอยู่ในดินตะกอน แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน แบคทีเรียชนิดนี้จะกลับเข้าสู่ระยะปกติได้อีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงการเข้าสู่ระยะ VBNC ของ *V. vulnificus* ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากแบบแท่ง (Rod) เป็นแบบกลม (Cocci) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ และลดการเคลื่อนย้ายกรดอะมิโน

(3) ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)

มีการรายงานว่า *V. vulnificus* สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างในช่วง 5 – 10 โดยได้มีการตรวจสอบในอาหารทะเลสำเร็จรูปของประเทศอังกฤษ พบว่าตัวอย่างอาหารที่มีค่าพีเอชน้อยกว่า 5 ไม่พบเชื้อในกลุ่มวิบริโอ รวมไปถึง *V. vulnificus* ด้วย (European Commission, 2001)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 01 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247388
เลขเรียกหนังสือ

(4) สารอาหารและสารแขวนลอย (Nutrients and suspended solids)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของปริมาณ *V. vulnificus* และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น สารแขวนลอย อุณหภูมิ ความเค็ม และสารอาหารที่ละลายอยู่ในน้ำ (พวกสารอินทรีย์คาร์บอน และคลอโรฟิลด์เอ) ที่บริเวณปากแม่น้ำของสหรัฐอเมริกา พบว่าปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวมีผลต่อปริมาณของ *V. vulnificus* แต่ยกเว้นค่าของสารแขวนลอยที่ไม่มีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียชนิดนี้ (European Commission, 2001)

(5) แพลงค์ตอน (Plankton)

ในประเทศอิตาลี สามารถแยก *V. vulnificus* จากแพลงค์ตอนสัตว์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 200 ไมครอนขึ้นไป จากในแหล่งน้ำที่อุดมสมบูรณ์ และพบว่าปริมาณของแพลงค์ตอนที่มากนั้นสัมพันธ์กับปริมาณของแบคทีเรียดังกล่าว (European Commission, 2001) สัตว์ทะเลจำพวกหอย เช่น หอยนรางรม ถ้าได้รับปริมาณแพลงค์ตอนเข้าไปก็จะเกิดการสะสมของเชื้อ *V. vulnificus* ในเนื้อเยื่อ ซึ่งโดยปกติแล้วหอยนางรมจะมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดนี้ประมาณ $10^3 - 10^6$ CFU ต่อกรัมของเนื้อหอยนางรม (Strom & Paranjpye, 2000)

2.3 การก่อโรคของ *V. vulnificus*

V. vulnificus สามารถทำให้เกิดโรคในคน โดยการติดเชื้อมักพบได้ในฤดูร้อนที่เชื้อเพิ่มจำนวนได้ดี สามารถแบ่งลักษณะการก่อโรคของ *V. vulnificus* ได้ 3 ลักษณะ (Strom & Paranjpye, 2000) คือ

(1) การติดเชื้อที่บาดแผล (Wound Infection)

การติดเชื้อทางบาดแผลอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการสัมผัสกับน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ หรืออาจถูกของมีคมเช่น เปลือกหอย หรือโขดหินแถวชายฝั่งทะเลบาด จนเกิดบาดแผล ซึ่งเป็นช่องทางที่สามารถทำให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายได้ ลักษณะอาการคือจะปวด บวมแดงบริเวณรอบบาดแผล (สามารถทำการแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากบริเวณบาดแผลได้) เชื้อจะแพร่กระจายลึกลงไปในเนื้อเยื่อ และอาจส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด บางรายบริเวณผิวหนังอาจกลายเป็นตุ่มและเกิดอาการเนื้อตาย (necrosis) ได้ (Belkin & Cowel, 2006)

(2) การเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (Septicemia)

การติดเชื้อ *V. vulnificus* ในกระแสเลือด มักเกิดจากการบริโภคหอยนางรมดิบโดยไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน ปี 2000-2003 ในประเทศสหรัฐอเมริกา มี 113 ราย ที่เกิดอาการติดเชื้อในกระแสเลือด 96 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยทั้งหมดนี้คือผู้ที่บริโภคหอยนางรมดิบ และมีเพียง 4 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่บริโภคโดยการทำให้สุก และในช่วงปีเดียวกันนี้ ผู้ที่ติดเชื้อใน

กระแสเลือดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นผู้ที่ติดแอลกอฮอล์ เนื่องจากแอลกอฮอล์เป็นปัจจัยที่ทำให้ระดับของเหล็กในเลือดเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ *V. vulnificus* สามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น การติดเชื้อในกระแสเลือดมักพบในเพศชายอายุกว่า 50 ปี ทั้งนี้มีการศึกษาพบว่า ฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) ในเพศหญิง ช่วยป้องกันการแสดงออกของสารพิษจาก *V. vulnificus* แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Belkin & Cowel, 2006) การติดเชื้อในกระแสเลือดจาก *V. vulnificus* มีอัตราการตายสูงและมากกว่าร้อยละ 50 ของคนที่เกิดอาการนี้จะเสียชีวิต ลักษณะอาการขั้นแรกคือ มีไข้หนาวสั่น อาเจียน ท้องเสีย และปวดท้องอย่างรุนแรง และมักจะมีอาการช็อคเนื่องจากความดันต่ำ

(3) กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gestroenteritis)

ได้มีการศึกษาถึงอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ อันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารทะเล (โดยเฉพาะหอยนางรมดิบ) ครั้งแรก โดย Johnston *et al.* ในปี 1986 รายงานว่าลักษณะอาการคือ ท้องเสีย ปวดท้อง (เป็นอาการขั้นแรก) หลังจากนั้นจะมีอาการคลื่นไส้ และอาเจียน นอกจากนี้ผู้ที่ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ จะมีโอกาสที่จะแสดงอาการสูง เนื่องมาจากแอลกอฮอล์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแสดงอาการของโรค การเกิดโรคลักษณะนี้พบว่ามีอาการไม่รุนแรง สามารถหายเองได้ มีอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างต่ำ (Belkin & Cowel, 2006)

V. vulnificus แบ่งได้เป็น 3 ไบโอไทป์ ได้แก่ 1, 2 และ 3 ตามผลทดสอบการใช้ซิเทรต อินโดล และการทดสอบอื่น ๆ โดย *V. vulnificus* ไบโอไทป์ 1 พบว่าก่อโรคในมนุษย์เป็นส่วนใหญ่ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551) ส่วนไบโอไทป์ 2 พบว่าก่อโรคในปลาไหล (Belkin & Cowel, 2006)คุณสมบัติของ *V. vulnificus* ทั้ง 3 ไบโอไทป์ แสดงดังตารางที่ 3-3

ไบโอไทป์ 1

V. vulnificus ไบโอไทป์ 1 มีการรายงานครั้งแรกในปี 1976 เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์เท่านั้น ไบโอไทป์นี้ให้ผลบวกกับการหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส (Lactose) แต่พบว่ามี 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ผลลบกับการหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสและซูโครส (Sucrose) ส่งผลให้เกิดปัญหาเมื่อทำการแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Belkin & Cowel, 2006)

ไบโอไทป์ 2

V. vulnificus ไบโอไทป์ 2 มีการรายงานครั้งแรกในปี 1991 โดยพบว่าก่อโรคในปลาไหลแถบทวีปยุโรป (Belkin & Cowel, 2006) ไบโอไทป์นี้ไม่ก่อโรคในมนุษย์ และมีลักษณะที่แตกต่างจากไบโอไทป์ 1 คือ การทดสอบ Indole Production, Ornithine decarboxylase และการหมักย่อยน้ำตาล D-Manitol (Garrity, 2005)

ไบโอไทป์ 3

V. vulnificus ไบโอไทป์ 3 มีการรายงานครั้งแรกในปี 1999 โดยแยกได้จากผู้ป่วยที่เกิดบาดแผลหลังจากที่สัมผัสกับปลานิล ที่ประเทศอิสราเอล (Belkin & Cowel, 2006) ไบโอไทป์นี้แตกต่างจากไบโอไทป์ 1 และ 2 คือ การทดสอบ Citrate, ONPGE test, การหมักย่อย Cellubiose, Lactose, D-Manitol, Salicin และ D-Sorbitol (Garrity, 2005)

ตารางที่ 2-3 คุณสมบัติบางประการของ *V. vulnificus* ทั้ง 3 ไบโอไทป์

การทดสอบ	ไบโอไทป์ 1	ไบโอไทป์ 2	ไบโอไทป์ 3
Citrate (Simmons)	+	+	-
Indole Production	+	-	+
ONPGE test	+	+	-
Ornithine decarboxylase	+	-	+
Fermentation of;			
Cellubiose	+	+	-
Lactose	+	+	-
D-Manitol	+	-	-
Salicin	+	+	-
D-Sorbitol	-	+	-

(ที่มา; ดัดแปลงจาก Garrity, 2005, p. 545)

2.4 ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *V. vulnificus*

(1) Polysaccharide capsule

การมีแคปซูลที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ ทำให้ *V. vulnificus* สามารถป้องกันตนเองจากกระบวนการฟาโกซัยโตซีสของเซลล์โฮสต์ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่มีการสร้างแคปซูล จะมีลักษณะโคโลนีทึบแสง ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูลโคโลนีจะโปร่งแสง ที่น่าสนใจคือโคโลนีทึบแสงอาจเปลี่ยนเป็นโปร่งแสงได้ ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะที่ใช้เลี้ยงและสายพันธุ์ของเชื้อ (Belkin & Cowel, 2006) แคปซูลที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ถือเป็นปัจจัยสำคัญของการก่อโรคอีกรูปแบบหนึ่ง (Strom & Paranjpye, 2000)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

(2) Lipopolysaccharide (LPS)

ถือเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของ *V. vulnificus* ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำ Tumor necrosis factor (TNF) ที่มากเกินไป ส่งผลให้เกิดการช็อคและการตายได้ในที่สุด (Strom & Paranjpye, 2000)

(3) Pili

V. vulnificus เข้าสู่เซลล์โฮสต์โดยการใช้พิไลเกาะบนผิวเนื้อเยื่อของเซลล์โฮสต์ตรงบริเวณที่รับเฉพาะ (Specific host surface receptor) (Strom & Paranjpye, 2000)

(4) Hemolysin

Hemolysin เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและทำลายเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงได้ ยีนที่ควบคุมการสร้างคือ ยีน *vvhA* ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อม (Linkous & Oliver, 1999)

(5) Metalloprotease

Metalloprotease จัดเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่เซลล์สร้างและหลั่งออกนอกเซลล์ เอนไซม์ชนิดนี้ต้องการธาตุสังกะสีเพื่อช่วยในการเร่งปฏิกิริยา เมื่อทำการทดสอบโดยการฉีดเข้าทางเส้นเลือดของหนูพบว่า มีอาการบวมน้ำและหลอดเลือดเกิดการขยายตัว ถ้าทดลองโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนูพบว่ามีอาการรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Strom & Paranjpye, 2000)

2.5 การตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาได้เสนอวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในตัวอย่างอาหาร โดยให้มีการนำเทคนิคทางด้านโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบ โดยเฉพาะตัวอย่างที่เป็นอาหารทะเล เช่นหอยนางรม ที่พบว่ามีการปนเปื้อนจาก *V. vulnificus* ค่อนข้างมาก ซึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม คือ Polymerase Chain Reaction หรือ PCR และ DNA Hybridization ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีการใช้ยีนเป้าหมายที่จำเพาะกับแบคทีเรียแตกต่างกันไป ยีนเป้าหมายที่นิยมใช้ในการตรวจ *V. vulnificus* ได้แก่ *vvh*, *viuB*, 16S rRNA เป็นต้น

(1) ไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอ (DNA Hybridization)

มีการออกแบบโพรบที่จำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมาย ที่นิยมใช้แบบแรกคือการติดฉลากด้วยสารรังสี P^{32} มียีนเป้าหมายคือ *vvhA* สามารถตรวจสอบ *V. vulnificus* ได้ทั้งสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีการติดฉลากโพรบด้วย Alkaline

phosphatase หรือ Oligonucleotide probe (VVAP) ซึ่งไม่ใช่สารรังสี โดยสามารถตรวจสอบ *V. vulnificus* ได้ทั้งสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน

(2) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

มีรายงานการวิจัยมากมายที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* ซึ่งจะใช้ยีนเป้าหมายแตกต่างกัน เช่น รายงานของ Panicker *et. al.* (2004) ซึ่งใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* โดยมียีนเป้าหมายเป็น *vvh* และระบุสายพันธุ์ที่ก่อโรคโดยใช้ยีนเป้าหมาย *viuB* นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีน 16S rRNA ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* จากตัวอย่างน้ำทะเลและแพลงตอนสัตว์ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียนในปี 2002-2003 (Maugeri *et al.*, 2006)

3. รายงานการวัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Bej *et al.* (1999) ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในหอยทะเล โดยมียีนเป้าหมายคือ *tl*, *tdh* และ *trh* ในเบื้องต้นมีการทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์กับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย (27 ไอโซเลท) อาหารทะเล (43 ไอโซเลท) สิ่งแวดล้อม (15 ไอโซเลท) หอยนางรม (19 ไอโซเลท) และห้องปฏิบัติการ (7 ไอโซเลท) รวมทั้งหมด 111 ไอโซเลท ผลการศึกษาพบว่า *V. parahaemolyticus* ทุกไอโซเลทให้ผลบวกกับยีน *tl* รวมทั้งพบการปรากฏอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ในเชื้อจำนวน 42 ไอโซเลท ส่วนเชื้อที่ตรวจพบเฉพาะยีน *tdh* หรือ *trh* มีจำนวน 18 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ และ 50 ไอโซเลทของเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมดตรวจไม่พบทั้ง *tdh* และ *trh* เมื่อมีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ลงไปในหอยนางรม พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงในตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 10^2 CFU ต่อ 10 กรัมของตัวอย่าง ภายหลังจากที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

Blackstone *et al.* (2003) พัฒนาเทคนิค real-time PCR สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* โดยใช้ *tdh* เป็นยีนเป้าหมายสำหรับการตรวจสอบสายพันธุ์ก่อโรค ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์ได้น้อยที่สุดถึง 1 CFU ต่อปฏิกิริยา รวมทั้งความไวดังกล่าวยังสามารถตรวจสอบได้ในหอยนางรมที่เติมเชื้อและผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อใน alkaline peptone water (APW) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมจำนวน 131 ตัวอย่าง ที่เก็บจากรัฐ Alabama ประเทศสหรัฐอเมริกา ในช่วงระหว่างเดือนมีนาคม 1999 ถึงเดือนกันยายน 2000 พบว่าหอยนางรม 61 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการตรวจสอบ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีการตรวจสอบด้วยการขีดเพาะเชื้อร่วมกับเทคนิค

ไฮบริไดเซชัน พบว่าสามารถตรวจพบยีน *tdh* ได้เพียง 15 ตัวอย่างเท่านั้น ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค real-time PCR ไม่เกิน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ถ้าใช้วิธีขีดเพาะเชื้อร่วมกับไฮบริไดเซชันต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน

Campbell and Wright (2003) พัฒนาเทคนิค real-time PCR สำหรับตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* โดยใช้ยีนเป้าหมายคือ *vvhA* พบว่าความไวของเทคนิคในการตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์เท่ากับ 10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่าจีโนมิกดีเอ็นเอ 72 เฟมโตกรัมต่อปฏิกิริยา ส่วนความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างหอยนางรมเท่ากับ 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร

DePaolo *et al.* (2003) ตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* จำนวน 178 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย (ที่เกิดโรคจากการบริโภคหอยนางรม) และตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอาหาร (ส่วนใหญ่เป็นหอยนางรม) จากพื้นที่ในบริเวณแปซิฟิก แอตแลนติก และ Gulf Coast ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยผู้วิจัยนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ในการยืนยันชนิดของเชื้อและการมีอยู่ของยีน *tdh* และ *trh* ซึ่งพบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) ให้ผลบวกกับยีน *tdh* และ *trh*

Panicker *et al.* (2004) พัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* ในหอยทะเล โดยใช้ยีนเป้าหมายคือ *vvhA* และใช้ยีน *viuB* ในการตรวจสอบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค พบว่าทุกไอโซเลทที่แยกได้จากทางการแพทย์ (22 ไอโซเลท) ให้ผลบวกกับยีน *viuB* ส่วนสายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมมีเพียง 8 ไอโซเลท จากทั้งหมด 33 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกกับยีน *viuB* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความไวของเทคนิคในการตรวจสอบกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์ พบว่ามีความไวเท่ากับ10 พิโคกรัม ส่วนความไวของเทคนิคในการตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์โดยที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อคือ 10^2-10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบเชื้อในตัวอย่างหอยนางรมหลังจากผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง และใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ร่วมกับการทำไฮบริไดเซชันบนไมโครแอเรย์ (microarray hybridization) พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อปนเปื้อนเริ่มต้นได้ที่ 1 CFU ต่อกรัม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังนำเทคนิคดังกล่าวนี้มาใช้ตรวจสอบ *Vibrio* spp. ในหอยนางรมจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากบริเวณอ่าวเม็กซิโกในช่วงฤดูร้อน (เดือนมิถุนายน-สิงหาคม 2003) พบว่าตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมดมีการปนเปื้อน *V. vulnificus* โดย 20 เปอร์เซ็นต์ให้ผลบวกต่อยีน *viuB* นอกจากนี้ยังตรวจพบ *V. parahaemolyticus* จำนวน 25 ตัวอย่าง (83.3 เปอร์เซ็นต์) และมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และ *trh* จำนวน 4 ตัวอย่าง (13.3 เปอร์เซ็นต์) และ 6 ตัวอย่าง (20 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

Ottaviani *et al.* (2005) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) จากบริเวณ Adriatic Sea ในประเทศอิตาลี โดยใช้วิธีมาตรฐาน (การแยก

เชื้อและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี) และใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมียีนเป้าหมายเป็น *tdh* และ *trh* และมีการตรวจสอบการเกิด Kanagawa phenomenon ซึ่งเป็นเครื่องหมายของการสร้างโปรตีน TDH (thermostable direct hemolysin) และตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ยูเรเอส (Urease) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการมีอยู่ของยีน *trh* นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถบ่งชี้ถึงความสามารถในการก่อโรค ได้แก่กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส และคุณสมบัติการก่อพิษต่อเซลล์ จากตัวอย่างหอยแมลงภู่จำนวน 144 ตัวอย่าง สามารถแยกได้เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 35 ไอโซเลท โดยมี 1 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และมีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท ให้ผลบวกต่อยีน *trh* นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลททั้งหมดที่แยกได้นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ที่นำมาทดสอบคือ CHO และ Vero

Bilung *et al.* (2005) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค ในหอยแครง (*Anadara granosa*) ที่เก็บจาก Tanjong Karang, Kuala Selangor ประเทศมาเลเซีย ในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน 2003 จำนวน 100 ตัวอย่าง ในการตรวจสอบโดยใช้วิธี most probabla number (MPN) พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 62 ตัวอย่างมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* โดยมีค่า MPN มากกว่า 3.0 (มากกว่า 1,100 MPN ต่อกรัม) นอกจากนี้ยังนำเทคนิคพีซีอาร์ มาใช้ในการตรวจสอบด้วย โดยใช้ยีนเป้าหมายคือ *toxR*, *tdh* และ *trh* ซึ่งยีน *toxR* บ่งชี้ถึง *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด ส่วนยีน *tdh* และ *trh* บ่งชี้ถึง *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค จากผลการศึกษาพบว่ามีหอยแครง 2 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อยีน *tdh* และ 11 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับยีน *trh*

Maugeri, Carbone, Fera and Gugliandolo (2006) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในตัวอย่างน้ำทะเล และแพลงค์ตอน บริเวณชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอิตาลี ระหว่างเดือนมีนาคม 2002 ถึงเดือนตุลาคม 2003 ผู้วิจัยนำตัวอย่างมาแยกเชื้อ *V. vulnificus* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จากนั้นทำการยืนยันผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA และยีน cytotoxin/hemolysin ของ *V. vulnificus* ผลจากการใช้ไพร์เมอร์ดังกล่าวในการตรวจสอบพบว่า *V. vulnificus* ส่วนใหญ่ที่แยกได้นั้นเป็น 16S rRNA type B โดยการใช้คู่ไพร์เมอร์ที่มียีนเป้าหมายเป็น 16S rRNA มีความไวของการตรวจสอบมากว่าการใช้ยีน cytotoxin/hemolysin โดยจากตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาศึกษาสามารถตรวจพบ *V. vulnificus* 79.1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนชุดของยีน 16S rRNA ซึ่งมีอยู่มากกว่าภายในเซลล์

Lee *et al.* (2008) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. และ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมดิบ 72 ตัวอย่าง ที่เก็บจากตลาดสด กรุงโซล ประเทศเกาหลี ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนธันวาคม ปี 2005 พบว่าสามารถตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยนางรมที่นำมาศึกษาตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุด (ประมาณ 3 log MPN ต่อกรัม) ในเดือนสิงหาคมและกันยายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อน นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างหอยนางรม โดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *tl, tdh* และ *trh* ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับยีน *tdh* แต่มี 1 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกกับยีน *trh*

Cañigral, Moreno, Alonsa, Gonzãlez, and Ferrús (2010) ตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่างน้ำทะเล (22 ตัวอย่าง) น้ำเสีย (42 ตัวอย่าง) และอาหารทะเล (40 ตัวอย่าง) จากบริเวณชายฝั่งใกล้ทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (วาเลนเซีย ประเทศสเปน) โดยใช้เทคนิค Real-time PCR มีตัวอย่างน้ำทะเล 7 ตัวอย่าง อาหารทะเล 4 ตัวอย่าง และน้ำเสีย 6 ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก โดยสามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* ได้จากอาหารทะเล (หอยนางรม) 2 ตัวอย่าง และจากน้ำทะเล 3 ตัวอย่าง ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วเป็นเวลา 20 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังสามารถแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้โดยตรงจากน้ำเสีย 2 ตัวอย่าง โดยไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อน

Espiñeria, Atanassova, Vieites, and Santaclara (2010) พัฒนาและตรวจสอบการยอมรับได้ของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรค ได้แก่ *V. cholera, V. alginolyticus, V. mimicus, V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในอาหารทะเล ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนี้มีประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังและลดความเสี่ยงของผู้บริโภคที่อาจเกิดการติดเชื้อก่อโรคเหล่านี้ที่มากับอาหารทะเล