สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 5
อภิปราย สรุป และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อทำให้สามารถตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552) ในปี ค.ศ. 2004 องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (The U.S. Food and Drug Administration; FDA) ได้เสนอวิธีการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ คือ Most Probable Number (MPN) ตามด้วยการยืนยันด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การทดสอบทางชีวเคมี และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือพีซีอาร์ (Su & Liu, 2007) เทคนิค PCR ได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างมากและนำมาใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ (Bilung *et al.*, 2005; Maugeri *et al.*, 2006; Ottaviani *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ส่วนใหญ่มักเป็นการตรวจสอบแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว ถึงแม้ว่ามีการนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ในการตรวจสอบด้วยก็ตาม แต่ก็เป็นการตรวจสอบแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวเท่านั้น เช่น Bej *et al.* (1999) ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยใช้ยีนเป้าหมาย 3 ยีนคือ *tl*, *tdh* และ *trh* และเท่าที่มีรายงานวิจัยที่ผ่านมามีเพียงการศึกษาของ Espiñeria *et al.* (2010) เท่านั้นที่พัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ 5 ชนิดคือ *V. cholerae, V. alginolyticus, V. mimicus, V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยใช้ยีน *ctxA* เป็นเป้าหมายสำหรับ *V. cholera* ใช้ยีน *tl* สำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และใช้ยีน *dnaJ* สำหรับตรวจสอบ *V. vulnificus, V. alginolyticus* และ *V. mimicus* แต่ปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นมีหลายขั้นตอน โดยแบ่งแยกระหว่างขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อโดยรวม และขั้นตอนการตรวจสอบสายพันธุ์ก่อโรคออกจากกัน

สำหรับยีนเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือยีน *tl* สำหรับบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด ยีน *tdh* สำหรับบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่สร้าง TDH และยีน *vvh* ซึ่งบ่งชี้ *V. vulnificus* ทั้งหมด เทคนิคที่ใช้นี้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรม เท่ากับ 1 CFU ต่อกรัม หลังผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และผ่านการทดสอบการยอมรับได้ โดยมีความไวและความจำเพาะ 96 – 100 เปอร์เซนต์ และความแม่นยำเท่ากับ 98 เปอร์เซนต์ (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552)

การศึกษานี้สนใจนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างหอยนางรมสดแกะเปลือกที่

จำหน่ายบริเวณชายฝั่งทะเล ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี เนื่องจาก *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษอันเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่ปรุงโดยผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ส่วน *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อตามบาดแผลเมื่อสัมผัสกับน้ำทะเล รวมทั้งการบริโภคอาหารทะเลแบบสุก ๆ ดิบ ๆ ก็ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ อาการของโรคอาจรุนแรงจนถึงแก่ชีวิตได้ พื้นที่ชายฝั่งทะเลแถบบางแสนและอ่างศิลาเป็นพื้นที่ท่องเที่ยวทางทะเลที่สำคัญของจังหวัดชลบุรี อีกทั้งบริเวณอ่างศิลาเป็นพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรมที่สำคัญ ซึ่งนักท่องเที่ยวนิยมซื้อไปบริโภคเป็นอย่างมาก หอยนางรมเป็นแหล่งสะสมของแบคทีเรียที่สำคัญ ซึ่งหอยชนิดนี้เป็นที่นิยมบริโภค โดยเฉพาะบริโภคสด ดังนั้นจึงมีโอกาสเสี่ยงในการที่จะได้รับเชื้อได้สูงหากมีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวอยู่ โดยทั่วไปแล้วปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่สามารถทำให้เกิดโรค อยู่ที่ประมาณ 10^5 -10^7 เซลล์ขึ้นไป (European Commission, 2001) ในประเทศไทย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ออกเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ โดยระบุปริมาณของ *V. parahaemolyticus* ต้องน้อยกว่า 10^2 CFU ต่อกรัม (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ส่วนปริมาณเชื้อ *V. vulnificus* ที่สามารถทำให้เกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่า ปริมาณของเชื้อที่น้อยกว่า 10^2 เซลล์ก็สามารถทำให้เกิดอาการของโรคได้ (FDA, 2009)

ร้านค้าจำนวน 20 ร้านซึ่งจำหน่ายหอยนางรมสดแกะเปลือกบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลาถูกสุ่มขึ้นมาเพื่อการเก็บตัวอย่าง (จากจำนวนร้านค้าทั้งหมด 38 ร้าน) การเก็บตัวอย่างดำเนินการเป็นระยะเวลา 6 เดือน (เดือนมกราคม-มิถุนายน พ.ศ. 2553) รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 160 ตัวอย่าง หอยนางรมที่จำหน่ายในพื้นที่ดังกล่าวมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงในพื้นที่ชายฝั่งทะเลเทศบาลตำบลอ่างศิลา ซึ่งเป็นพื้นที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในจังหวัดชลบุรี พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ (94.4 เปอร์เซ็นต์) มีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* โดยการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้พบมากที่สุดในช่วงเดือนเมษายนและพฤษภาคม (100 เปอร์เซ็นต์) *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มฮาโลไฟล์ที่พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล โดยเชื้อสามารถสะสมได้ในสิ่งมีชีวิตในทะเล โดยเฉพาะหอยสองฝา เช่น หอยนางรม ปริมาณของเชื้อในธรรมชาติขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเล รวมถึงคุณภาพน้ำ บริเวณของการเก็บตัวอย่างมาศึกษาเป็นพื้นที่เดียวกับการเพาะเลี้ยงหอยนางรม ซึ่งนอกจากเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแล้ว ยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญของจังหวัดชลบุรี ทำให้มีการปล่อยของเสียจากบนฝั่งออกสู่ชายฝั่งบริเวณนี้ จึงส่งผลต่อคุณภาพของน้ำและการสะสมของแบคทีเรียในหอยนางรม ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเล และทำให้หอยนางรมมีการสะสมของเชื้อดังกล่าวในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย เนื่องจากหอยนางรมมีการกินอาหาร

โดยการกรอง (Filter feeder) เอาสิ่งต่าง ๆ ที่ละลายและแขวนลอยอยู่ในน้ำเข้าสู่ตัวมัน นอกจากนี้ การปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในหอยนางรมอาจมาจากขั้นตอนการแกะเปลือกและการบรรจุ เนื่องจากในกระบวนการแกะเปลือกหอยนางรม โดยมากแล้วพบว่าไม่มีการทำความสะอาดเปลือกหอยก่อนทำการแกะ และที่เปลือกหอยมีตะกอนจับอยู่มาก อุปกรณ์ที่ใช้ในการแกะเปลือกหอยจะใช้มีดเพื่อทำการเปิดเปลือกหอย และใช้มีดอันเดียวกันนี้ตัดเอ็นหอยแล้วเขี่ยเนื้อหอยนางรมสดที่แกะแล้วนั้น ลงในภาชนะที่มีน้ำสำหรับล้างเนื้อหอย ซึ่งมีดนั้นอาจจะมีการปนเปื้อนตะกอนจากเปลือกหอยและมีโอกาสที่จะสัมผัสกับเนื้อหอย นอกจากนี้การเก็บรักษาหอยนางรมที่แกะเปลือกแล้วหากมีการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม เช่นบรรจุในภาชนะที่ไม่สะอาดหรือไม่มิดชิดมากพอ ก็มีโอกาสที่เนื้อหอยนางรมจะสัมผัสกับวัสดุอื่น ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อ และสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้

Su and Liu (2007) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการคัดแยก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทะเลและหอยนางรมหรืออาหารทะเลชนิดอื่น ๆ จะประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ซึ่งโดยปกติอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ Alkaline peptone water (APW) จากรายงานวิจัยของ Raghunath, Karunasagar and Karunasagar (2009) นำเสนออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่สำหรับเพิ่มปริมาณเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย bile salt และ sodium taurocholate (ST broth) ใช้สำหรับการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคในตัวอย่างอาหารทะเล โดยได้เปรียบเทียบกับการใช้ alkaline peptone water (APW) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณเซลล์โดยทั่วไป จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ST สามารถตรวจและแยก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่มียีน *tdh* และ/หรือ *trh* จากตัวอย่างได้ในจำนวนที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ APW ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกันจากวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* 3 วิธี วิธีการเพาะเชื้อ วิธีโคโลนีไฮบริไดเซชัน (colony hybridization) และปฏิกิริยาพีซีอาร์ นอกจากนี้ Tyagi, Saravanan, Karunasagar and Karunasagar (2009) นำเทคนิค SYBR green real-time PCR มาใช้ประเมินประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่เติมลงในตัวอย่างกุ้งทะเลสดที่ตีปั่น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาประเมินประสิทธิภาพคือ APW, ST และ salt polymysin broth (SPB) เมื่อตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ด้วยอาหารทั้งสามชนิด โดยไม่ผ่านการเพิ่มปริมาณเซลล์ พบว่าความไวของการตรวจสอบยีน *tdh* จากเชื้อบริสุทธิ์อยู่ที่ระดับ 10 CFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับอาหาร ST และ 100 CFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับอาหาร APW และ SPB ในกรณีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งทะเลสดที่เติมเชื้อพบว่าสามารถตรวจสอบได้ที่ปริมาณเซลล์ 100 CFU ต่อกรัม ในทุกอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่

พบว่าค่า cycle threshold (Ct) ของการตรวจด้วยอาหาร ST ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการใช้อาหาร APW และ SPB จากรายงานวิจัยดังกล่าวนี้จะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ST มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เพิ่มปริมาณ *V. parahaemolyticus* โดยเฉพาะสายพันธุ์ก่อโรค และสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบความปลอดภัยของอาหารทะเลจากการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* เหตุผลที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ ST มีประสิทธิภาพดีในการเพิ่มปริมาณเชื้อและทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (*tdh*$^+$) คาดว่าเนื่องมาจากมีองค์ประกอบของ bile salt และมี pH ต่ำประมาณ 6 ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค โดยสภาวะดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับสภาวะที่เชื้อต้องเผชิญในกระเพาะอาหารเมื่อเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ (Pace, Chai, Rossi, & Jiang, 1997; Raghunath, *et al.*, 2009)

การศึกษานี้ใช้ APW เป็นอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ ซึ่งอาจยังไม่ใช่อาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคขึ้นมา โดยเฉพาะในกรณีที่เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวมีอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก Pace *et al.* (1997) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค เมื่ออยู่ในน้ำทะเลนั้น เซลล์ส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปที่มีชีวิต แต่ไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงให้เจริญขึ้นมาได้ (viable but non culturable, VBNC) อย่างไรก็ตามหากในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อมีการเติม bile salt ก็จะทำให้สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อขึ้นมาได้มากกว่าปกติ 0.5-1.0 log จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าถึงแม้ตัวอย่างหอยนางรมที่นำมาตรวจสอบมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ค่อนข้างสูงในแต่ละเดือน แต่กลับตรวจพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^+$ ในบางเดือนที่สำรวจเท่านั้น โดยพบในตัวอย่างจำนวนไม่มากนัก (5-22.5 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี PCR และการเพาะแยกเชื้อ อย่างไรก็ตามในกรณีของตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^+$ ด้วยเทคนิค PCR ตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ แต่ไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากหลายประการด้วยกัน ได้แก่

(1) ในการตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจสอบได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ทำให้มีโอกาสเกิดผลพีซีอาร์เป็นบวกแต่ไม่เพาะแยกเชื้อได้

(2) ในตัวอย่างมีจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^+$ ในปริมาณน้อย (แต่อยู่ในระดับที่ตรวจได้ด้วยพีซีอาร์) และส่วนใหญ่หรือทั้งหมดอาจอยู่ในรูปที่เป็น VBNC ทำให้ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้

(3) เชื้อที่เจริญเพิ่มจำนวนใน APW เมื่อนำมาขีดแยกเชื้อบนอาหาร TCBS อาจมีการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^+$ ค่อนข้างน้อยหรือไม่มีเชื้อสายพันธุ์นี้เจริญเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้เลย จึงทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์นี้มีโอกาส

เป็นไปได้น้อย และในกรณีที่มี *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^+$ เจริญอยู่บนอาหาร TCBS โดยปะปนอยู่ร่วมกับสายพันธุ์ *tdh*$^-$ นั้น ขั้นตอนของการสุ่มเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ขึ้นมานั้นอาจมีความเป็นไปได้ที่เลือกโคโลนีที่ *V. parahaemolyticus* ขึ้นมาได้ เนื่องจากมีเชื้อในกลุ่มวิบริโอสปีชีส์อื่น ๆ ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวและลักษณะอื่น ๆ เช่นเดียวกับ *V. parahaemolyticus*

(4) การปรากฏลักษณะโคโลนีที่ไม่ปกติ (atypical colony) ของ *V. parahaemolyticus* ทำให้โคโลนีเหล่านั้นไม่ถูกเลือกขึ้นมาตรวจสอบ เช่น ลักษณะโคโลนีสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาบางตัวอย่าง ที่พบว่าบางโคโลนีที่มีสีเหลืองบนอาหาร TCBS แต่เมื่อนำมาตรวจสอบยืนยันบนอาหาร CHROMagar ให้โคโลนีสีม่วงอมเทา รวมทั้งการตรวจสอบด้วย PCR ให้ผลเป็นบวก (*tl*$^+$) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้เนื่องจาก *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้ จึงปรากฏลักษณะโคโลนีสีเหลืองบน TCBS ดังรายงานการศึกษาของ Gopal *et al.* (2005) ที่ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้ง พบลักษณะโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร TCBS แต่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา PCR (*toxR*$^+$)

สิ่งที่ควรสังเกตของการศึกษาครั้งนี้คือการระบุการมีอยู่ของสายพันธุ์ก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ใช้ยีน *tdh* เป็นเครื่องหมายเท่านั้น ในความเป็นจริงการระบุความเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ นอกจากยีน *tdh* แล้ว ยังมีการใช้ยีน *trh* เป็นเครื่องหมายด้วย (Bej *et al.*, 1999; DePaolo *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Ottaviani *et al.*, 2005) ทำให้ผลที่ได้จากการศึกษานี้ยังไม่ครอบคลุมถึงการตรวจสายพันธุ์ก่อโรคทั้งหมด ยิ่งทำให้ต้องมีความระมัดระวังในการรายงานผลการตรวจสอบ โดยเฉพาะในกรณีของการตรวจไม่พบสายพันธุ์ *tdh*$^+$ ซึ่งอาจนำไปสู่การขาดความเอาใจใส่ในการประเมินความเสี่ยงเพื่อป้องกันอันตรายอันเกิดจากการบริโภคหอยนางรมหรืออาหารทะเลชนิดอื่น ๆ ที่มาจากพื้นที่เดียวกัน อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงระดับการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดที่พบในการตรวจสอบครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าหอยนางรมที่จำหน่ายจากร้านค้าในพื้นที่ชายทะเลอ่างศิลาเป็นแหล่งสะสมที่สำคัญของแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่งหากไม่มีความระมัดระวังเอาใจใส่ในปรุงให้สุกอย่างดีก่อนการบริโภค ก็อาจนำไปสู่การเกิดโรคอาหารเป็นพิษอันมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียชนิดนี้ได้

สำหรับ *V. vulnificus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่เป็นเป้าหมายของการตรวจสอบครั้งนี้ พบว่าจากการใช้เทคนิค multiplex PCR ตรวจสอบพร้อม ๆ กับ *V. parahaemolyticus* นั้น ไม่พบแบคทีเรียชนิดนี้ในหอยนางรมทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษาตั้งแต่เดือนมกราคมถึงพฤษภาคม แต่มา

ตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ในหอยนางรม 4 ตัวอย่างที่เก็บในช่วงเดือนมิถุนายน ซึ่งคิดเป็นการปนเปื้อน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด (160 ตัวอย่าง) *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มฮาโลไฟล์ที่พบได้ในสภาพแวดล้อมที่คล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* อุณหภูมิและความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 9-31 องศาเซลเซียส และ 5-25 ppt ตามลำดับ (Strom & Paranjpye, 2000) แหล่งสะสมที่สำคัญแหล่งหนึ่งของแบคทีเรียชนิดนี้คือหอยนางรม แบคทีเรียชนิดนี้ถือเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความร้ายแรง เนื่องจากบางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผล รวมทั้งการติดเชื้อในกระแสโลหิต ทำให้เกิดโลหิตเป็นพิษ ซึ่งอาจมีความรุนแรงจนทำให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิตได้ (Belkin & Cowel, 2006) การตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในตัวอย่างหอยนางรมที่นำมาศึกษาบ่งชี้ถึงความเสี่ยงในการได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายของทั้งคนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง เก็บเกี่ยว แกะเปลือก บรรจุและจำหน่ายหอยนางรม รวมทั้งผู้บริโภคด้วยเช่นกัน

มีรายงานว่าการคัดแยก *V. vulnificus* มีข้อจำกัดบางประการเนื่องจากเชื้อจำนวนหนึ่งที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมมักอยู่ในรูปที่ยังมีชีวิตและไม่สามารถที่จะเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ หรือ VBNC โดยมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงการเข้าสู่ระยะ VBNC ของ *V. vulnificus* ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากแบบแท่ง (Rod) เป็นแบบกลม (Cocci) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ และลดการเคลื่อนย้ายกรดอะมิโน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม คือมีอุณหภูมิสูงขึ้นและมีปริมาณสารอาหารมากพอเชื้อสามารถกลับเข้าสู่สภาวะปกติได้ (Strom & Paranjpye, 2000) ทำให้อาจเป็นเหตุผลหนึ่งและเป็นเหตุผลสำคัญที่นำมาอธิบายถึงการที่ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบเชื้อชนิดนี้นอกเหนือจากเหตุผลในเรื่องของการที่หอยนางรมที่เก็บมาศึกษามีเชื้อสะสมอยู่น้อยมากหรือไม่มีเชื้อชนิดนี้อยู่เลย เพราะหากมีเชื้ออยู่ในระดับต่ำ หากเชื้อสามารถเจริญได้ เมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วก็จะสามารถตรวจสอบได้เนื่องจากเทคนิค multiplex PCR ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบนี้มีความไวของการตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* ที่อยู่ในหอยนางรมได้ในระดับสูง โดยมีเชื้อในปริมาณ 100 CFU ต่อกรัม ก็สามารถตรวจสอบได้ (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552)

บริเวณชายทะเลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี เป็นแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงหอยนางรมที่สำคัญและมีร้านค้าที่จำหน่ายเป็นจำนวนมากซึ่งมักไม่มีการควบคุมคุณภาพของหอยนางรมก่อนการจำหน่าย ส่งผลให้มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เช่น *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคหอยนางรมโดยเฉพาะการบริโภคแบบดิบ การใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการศึกษาการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

ในหอยนางรม สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ทำให้มีประสิทธิภาพของการตรวจสอบเชื้อดีขึ้น และยังสามารถนำข้อมูลมาใช้เป็นแนวทางเพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ เพื่อก่อให้เกิดความปลอดภัยในการบริโภคหอยนางรมของผู้บริโภคต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในหอยนางรมสดแกะเปลือก จำนวน 160 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บในช่วงระหว่างเดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2553 โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ยีนเป้าหมายเป็นยีน *tl* สำหรับ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมด ยีน *tdh* สำหรับบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค (*tdh*$^+$) และยีน *vvh* สำหรับบ่งชี้ *V. vulnificus* ทั้งหมด พบว่าตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บมาศึกษาในแต่ละเดือน ส่วนใหญ่มีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* (*tl*$^+$) คิดเป็น 92.5-100 เปอร์เซนต์ โดยเดือนเมษายนและพฤษภาคมพบว่ามี หอยนางรมปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้ถึง 100 เปอร์เซนต์ จากหอยนางรมทั้งหมด 160 ตัวอย่าง ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคที่มียีน *tdh* (*tdh*$^+$) จำนวน 15 ตัวอย่าง (9.4 เปอร์เซนต์) รวมทั้งตรวจพบ *V. vulnificus* ในหอยนางรม 4 ตัวอย่าง (2.5 เปอร์เซนต์) การเพาะแยกเชื้อบนอาหาร TCBS ภายหลังการเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน APW ซึ่งยืนยันผลต่อโดยการใช้อาหาร CHROMagar^{TM} *Vibrio* (CHROMagar) T_1N_4 medium และการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิเดส รวมทั้งการยืนยันผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สามารถแยก *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมด 396 ไอโซเลท อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกไอโซเลทของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ *tdh*$^+$ รวมทั้ง *V. vulnificus* ได้จากตัวอย่างหอยนางรมที่ให้ผลพีซีอาร์ เป็นบวกต่อแบคทีเรียดังกล่าว

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ในเชิงปริมาณ
2. ควรมีการกำหนดช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างให้นานมากขึ้น โดยครอบคลุมทุกช่วงของฤดูกาล เพื่อให้เห็นความแตกต่างของปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในช่วงเวลา/ฤดูกาลต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน
3. ในกรณีของการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค ควรใช้ยีนเป้าหมายอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น *trh* เนื่องจาก *tdh* ไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่ทำให้เชื้อสามารถก่อโรคได้