บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลงานวิจัย

ในการทำงานวิจัยการตรวจสอบเชื้อ *Vibrio*ทั้ง 3 ชนิดคือเชื้อ*V. harveyi, V. parahaemolyticus*และ *V. vulnificus*ในตัวอย่างหอยทะเลทั้งสามชนิดคือ หอยแครง, หอยลาย และหอยแมลงภู่ ในบริเวณเขตกรุงเทพมหานคร พบการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสามชนิดในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ซึ่งเชื้อทั้งสามชนิดเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดในมนุษย์และสัตว์ทะเลโดยเฉพาะกุ้งกลุ่มตระกูล penaeidsและหอยทะเล(Izumiya et al. 2011)ซึ่งพบว่าหอยทะเลเป็นสัตว์ทะเลหน้าดินจำพวกกรองกินที่อาศัยฝังตัวอยู่หรือขุดรูอยู่ภายใต้พื้นทราย โคลนและ ดินเลน จึงเป็นแหล่งสะสมของเชื้อในปริมาณมากโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrios* (Suthirak. 2009) จากการสังเกตบริโภคหอยทะเลของมนุษย์จะมีการบริโภคแบบสุกๆ ดิบๆ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเลือกใช้หอยทะเลทั้งสามชนิดที่เป็นที่นิยมในการบริโภคของมนุษย์มาเป็นตัวอย่างในการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล จากการศึกษาก่อนหน้านี้การใช้วิธี Multiplex PCR ในหลายการศึกษาได้มีการออกแบบไพรเมอร์สำหรับ *V.parahaemolyticus*เพื่อตรวจสอบในสัตว์ทะเลจำพวกกุ้งและหอยโดยใช้ยีน *tdh*(thermostable direct hemolysin), *trh* (thermostable direct hemolysin-related hemolysin) และ*tlh* (thermolabilehemolysin) (Bej et al. 1999) สำหรับการพยายามหายีนของ *V. harveyi*จากการศึกษาของ Thongkao et al. (2013) ได้ประสบความสำเร็จในการออกแบบไพรเมอร์ต่อยีน *vhhP2*และคาดว่ายีนนี้เป็นยีนที่สามารถระบุสายพันธุ์ *V. harveyi* ได้อย่างแม่นยำครอบคลุมหลากหลายสายพันธุ์และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกชนิดอื่น ๆ รวมทั้งแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกันมากอย่าง *V. campbellii*ส่วนการศึกษาการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *rpoS*ในเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus*ให้ผลบวกกับ *V. vulnificus* ในทุกไอโซเลต และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีความพยายามหายีนที่สามารถบ่งชี้สายพันธุ์ของ *V. vulnificus* ได้แก่ยีน*vvhA*แต่พบว่าไม่สามารถตรวจได้ครบทุกไอโซเลต (Kim et al. 2008)

การศึกษาครั้งนี้จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบได้ครอบคลุมทั้งสามสปีชีส์ของ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยใช้ยีนที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ ได้แก่ ยีน *vhhP2, tlh* และ *rpoS* เพื่อประยุกต์ใช้ในการนำไปตรวจในตัวอย่างจริงเพื่อทำการคัดแยกและจำแนก*Vibrio*ทั้งสามสปีชีส์จากหอยทะเลชนิดต่างๆ แล้วมาประเมินหาค่าปริมาณเชื้อที่พบและปริมาณการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย เพื่อดูแนวโน้มความเสี่ยงของการที่ผู้บริโภคอาจมีความเสี่ยงจากการรับประทานอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะได้ โดยเฉลี่ยพบการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีค่าประมาณ 1.2×10^{7}-2×10^{6} CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่แบคทีเรียสามารถทำให้เกิดการก่อโรคอาหารเป็นพิษหรืออาจติดเชื้อในกระแสเลือดได้ (เกียรติคุณ.2553)

จากนั้นทำการประเมินประสิทธิภาพความแม่นยำของวิธีการโดยเปรียบเทียบกันระหว่าง

วิธีการตรวจสอบแบบมาตรฐานหรือวิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีกับวิธีการตรวจสอบด้วยวิธี Multiplex PCR จากการตรวจสอบทั้ง 2 วิธีเราพบว่าการตรวจสอบทั้ง 2 วิธีมีความจำเพาะอย่างสูงถึง 100% แต่การประเมินความถูกต้องหรือความแม่นยำของแต่ละวิธีจะแตกต่างกันไปเราพบว่าการตรวจสอบด้วยวิธีแบบมาตรฐานมีความถูกต้องของวิธีที่91.67% เทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธี MultiplexPCR ซึ่งมีความถูกต้องสูงถึง 96% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความถูกต้องที่สูงจำเป็นอย่างมากในการประยุกต์ใช้วิธีการที่จะนำมาตรวจสอบกับเชื้อ *Vibrio*ทั้งสามชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ(PAYDAR. 2013) จากการทดสอบแสดงให้เห็นได้ว่าการตรวจสอบด้วยวิธี Multiplex PCR จะมีความแม่นยำสูงกว่าและใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบสั้นกว่าและสามารถตรวจได้โดยไม่ต้องผ่านการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ(enrichment)ในการตรวจสอบโดยวิธี MultiplexPCRสามารถทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอได้เลย แต่ถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบก็สามารถเลี้ยงเชื้อ(enrichment)ต่อเป็นสามชั่วโมงหรือหกชั่วโมงเพื่อการตรวจแม่นยำและมีประสิทธิภาพที่มากยิ่งขึ้น

การศึกษาค่าความไวของ Multiplex PCR จากเชื้อบริสุทธิ์ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความไวของเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. harveyi* มีค่า 1.9 x 10^4, 1.53 x 10^4 และ 1.88 x 10^4CFU/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าความไวของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสปีชีส์ที่มีค่าประมาณ10^4 CFU/ml ซึ่งมีค่าความไวสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ สำหรับการตรวจเชื้อ *V. vulnificus* มีค่า 10^5 CFU/ml และ *V. parahaemolyticus* มีค่า 10^6 CFU/ml(Nhung et al. 2007) ส่วนการนำไพรเมอร์ทั้งสามคู่ไปใช้พบว่าสามารถที่จะนำไปตรวจสอบสภาวะติดเชื้อทั้งในมนุษย์และสัตว์ทะเลได้ แม้ว่าสภาวะการติดเชื้อเพียง 1 และ 2 สปีชีส์ก็สามารถตรวจสอบได้โดยไพรเมอร์ทั้งสามคู่อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียทั้งสามชนิดแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยดูผลจากการทดสอบการใช้ไพรเมอร์ทั้งสามคู่ มาใส่ในหลอด PCR reaction แล้วนำมาทดสอบกับแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ ตั้งแต่ 1,2 และ 3 สปีชีส์ พบว่าสามารถตรวจสอบได้ทุกรูปแบบในการผสมรวมกันของเชื้อแบคทีเรียในการทำ PCR และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้มีการทดสอบ Oxidase,Cellobiose,Mannose,Mannitol,Voges-Proskauer,Methyl red,Indole production,Ornithine decarboxylase,Lysine decarboxylase,Arginine decarboxylaseซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้สารหลายตัวในการทดสอบและใช้เวลานานกว่าที่จะพิสูจน์ทราบผลได้ เนื่องจาก *Vibrio*แต่ละสปีชีส์มีความใกล้เคียงกันทำให้การแยกและจำแนกสปีชีส์ค่อนข้างยากอาจทำให้เกิดความสับสนในการระบุสปีชีส์และเชื้ออื่นๆอาจจะเจริญได้ในอาหารที่ใช้ในการเพาะเชื้อบน TCBS เช่น *Salmonella typhimurium,Citrobacter sp.* (Buller. 2014)

จากการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหอยทะเลจำนวน 150 ตัวอย่าง พบว่าจากการคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียในหอยทะเลด้วยวิธีมาตรฐานพบเชื้อ *V. harveyi*คิดเป็น 93.33%ซึ่งพบมากจากหอยลายในทั้งห้าตลาดที่เป็นแหล่งเก็บตัวอย่าง,*V. parahaemolyticus*คิดเป็น33.33%พบมากที่สุดจากหอยแครงและหอยแมลงภู่แต่ไม่สามารถตรวจพบ *V. vulnificus*และ

จากการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Multiplex PCR พบเชื้อ *V. harveyi*100%ซึ่งพบมากจากหอยลาย*V. parahaemolyticus*46.67%พบมากที่สุดจากหอยแครงและหอยแมลงภู่**ใน**ทั้งห้าตลาดที่เป็นแหล่งเก็บตัวอย่าง ส่วน *V. vulnificus* 6.67%จากผลที่แสดงตามข้างต้นประเมินเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Multiplex PCR มีความแม่นยำสูงกว่าวิธีมาตรฐาน