สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การสำรวจเชื้อ Vibrio parahaemolyticus ในอาหารสดจากทะเล

บัญญัติ สุขศรีงาม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูประการ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมวงศ์ วัจนสุนทร อดีตรองอธิการบดีและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมาน วันชูเพลา รองคณบดี คณะวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยอย่างแท้จริง ขอขอบคุณแพทย์หญิง มล. รัตนสุดา พันธุ์อุไร และคณะแพทย์ของกองพยาธิวิทยาคลินิค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้ช่วยทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

บทนำ	๑
เอกสารอ้างอิงการวิจัย	๓
อุปกรณ์และวิธีการ	๑๒
ผลการทดลอง	๑๖
อภิปรายผล	๒๙
หนังสืออ้างอิง	๓๔

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสำรวจเชื้อ Vibrio parahaemolyticus ในอาหารสดจากทะเล

A Survey of Vibrio parahaemolyticus in Fresh Seafood

นายบัญญัติ สุขศรีงาม

บทนำ

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการดำรงชีวิตของมนุษย์ อาหารที่ดีย่อมมีประโยชน์ทำให้ร่างกายเจริญเติบโตสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนอาหารที่ไม่ดีนอกจากจะทำให้สุขภาพของร่างกายทรุดโทรมแล้ว ยังเป็นการสิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็นแต่ในสภาวปัจจุบันนี้ได้มีผู้ให้ความสนใจเกี่ยวกับอาหารน้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบริโภคอาหารในบ้านเรามุ่งคำนึงถึงรสชาติและปริมาณมากกว่าคุณภาพ จึงทำให้มิได้สนใจในด้านความสะอาด ความสุกดิบและคุณค่าทางอาหารเท่าที่ควร เป็นผลให้อาหารที่รับประทานไม่มีคุณค่าทางอาหารอย่างเพียงพอและบางครั้งอาหารที่รับประทานยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่าง ๆ อีกด้วย

อาหารโดยทั่วไปมักจะมีแบคทีเรียต่าง ๆ ปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะเป็นการบั่นทอนอนามัยของผู้บริโภค และถ้าหากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงทีก็อาจทำให้เสียชีวิตได้ สำหรับในเขตหาดบางแสน จังหวัดชลบุรีและบริเวณใกล้เคียงนั้นได้มีโรคในระบบทางเดินอาหารเกิดขึ้นเสมอ แต่มิได้มีรายงานหรือสถิติที่แน่นอน ทำให้เข้าใจว่าเกิดจากสาเหตุอื่นมากกว่า เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญได้แก่ Vibrio parahaemolyticus, Salmonella spp. และ Shigella spp. จากการศึกษาต่อมาพบว่าโรคท้องร่วงที่เกิดกับผู้ใหญ่ในประเทศไทยนั้น ประมาณ ๒๕ เปอร์เซนต์มีสาเหตุมาจากเชื้อ V.parahaemolyticus ซึ่งอัตราการเกิดโรคนี้จะสูงกว่าโรคท้องร่วงที่มีสาเหตุจาก Salmonella spp. และ Shigella spp. อีกด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

V.parahaemolyticus มีพบแพร่ระบาดทั่วไปตามชายฝั่งทะเลในประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน ฮ่องกง สิงคโปร์ เกาหลี ฮาวายและเนเธอร์แลนด์ (๑๑, ๑๒, ๓๖) สำหรับชายฝั่งทะเลของประเทศไทยและแถบชายฝั่งทะเลของประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้น ได้มีรายงานว่าพบเชื้อนี้แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และระยะการแพร่ระบาดจะมีมากในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม หรือจะพบระบาดมากในฤดูร้อนและลดต่ำลงในฤดูหนาว (๓๗, ๖๘) เนื่องจากเชื้อ V.parahaemolyticus เจริญได้ดีในน้ำทะเล ดังนั้นพาหะที่สำคัญในการแพร่ระบาดก็คืออาหารทะเลและผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเลนั่นเอง จากการศึกษาพบว่าโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก V.parahaemolyticus จะแพร่ระบาดจากสัตว์ทะเลต่าง ๆ เช่น ปลา หอย กุ้ง ปู ทำให้ประชากรในประเทศญี่ปุ่นประมาณ ๗๐ เปอร์เซนต์เป็นโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อนี้ (๑๙, ๓๗, ๔๔, ๖๘) หรือในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยมากถึง ๑๙,๐๐๐ ราย (๓๐) ส่วนในสหรัฐอเมริกานั้นพบว่าเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษตั้งแต่ปีค.ศ. ๑๙๗๑ เป็นต้นมา สำหรับในประเทศไทยนั้นได้มีการวิจัยโรคที่เกิดจากเชื้อนี้อย่างกว้างขวางเพราะประชากรส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารทะเลเช่นกัน เช่น หน่วยวิจัยทางการแพทย์ของ ส.ป.อ. ได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อนี้เป็นครั้งแรกและพบเชื้อนี้จากอุจจาระผู้ป่วยประมาณ ๓๗ เปอร์เซนต์ และจากอาหารทะเลชนิดต่าง ๆ ประมาณ ๙๒ เปอร์เซนต์ (๔๒) และในปีค.ศ. ๑๙๖๙ หน่วยวิจัยทางการแพทย์ของส.ป.อ.ได้รายงานว่า V.parahaemolyticus เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคในระบบทางเดินอาหารที่แพร่ระบาดในกรุงเทพมหานคร โดยมีผู้ป่วยจากเชื้อนี้ประมาณ ๒๕ เปอร์เซนต์ (๒๐) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า V.parahaemolyticus ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญสำหรับประเทศไทยด้วยเช่นกัน

เนื่องจากหาดบางแสน จังหวัดชลบุรีและบริเวณใกล้เคียงเป็นแหล่งที่มีการทำประมงและจำหน่ายอาหารทะเลรวมทั้งผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเลกันมาก โดยสัตว์ทะเลที่จับได้นี้นำไปจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี จังหวัดใกล้เคียง และผู้ที่มาท่องเที่ยวยังชายทะเลบางแสนอีกด้วย แต่การตรวจสอบเชื้อจากอาหารทะเลบริเวณนี้มีน้อยมาก ดังนั้นจึงน่าที่จะมีการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและเซรุ่มวิทยาบางประการของเชื้อ V.parahaemolyticus จากสัตว์ทะเลที่จับได้ เพื่อ

เป็นแนวทางในอันที่จะเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาควบคุมลักษณะของอาหารทะเล เพื่อให้ประชาชนได้บริโภคอาหารที่สะอาดและปราศจากเชื้อโรคนี้ด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะการณ์ของการแพร่กระจายของเชื้อ V. parahaemolyticus ในสัตว์ทะเลต่าง ๆ และความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะบางชนิด เพื่อจะนำผลที่ได้ไปใช้ปรับปรุงและแก้ไขการบริโภคอาหารทะเลของประชากรบริเวณชายหาด บางแสน จังหวัดชลบุรี และบริเวณใกล้เคียงให้มีความปลอดภัยในการบริโภคยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิงการวิจัย

V.parahaemolyticus พบครั้งแรกในปี ค.ศ. ๑๙๕๑ โดย Fujino และคณะ (๒๙) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์จากอุจจาระผู้ป่วยด้วยโรคในระบบทางเดินอาหารที่เมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น พบว่าประกอบด้วย Proteus morgani และแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งซึ่งยังไม่มีผู้พบมาก่อน ต่อมาจึงได้ตั้งชื่อว่า Pasteurella parahaemolyticus ทั้งนี้เพราะเมื่อนำไปย้อมสีแล้วจะเกิดลักษณะเป็น bipolar เช่นเดียวกับ Pasteurella อื่น ๆ

ในปี ค.ศ. ๑๙๕๖ Sakazaki (๕๐) รายงานว่าได้พบจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งจากอุจจาระผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ ณ. เมืองโยโกฮามา ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเชื้อมีลักษณะเหมือนกับ P.parahaemolyticus และดำรงชีวิตได้ดีในที่มีความเข้มข้นของเกลืออยู่ด้วย

ในปี ค.ศ. ๑๙๖๑ Miyamoto และคณะ (๔๓) ได้นำจุลินทรีย์ที่พบใหม่ซึ่งทำให้เกิดโรคในระบบลำไส้นี้มาจัดเป็น genus ใหม่ชื่อ Oceanomonas และให้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า O.enteritidis ซึ่งต่อมา Sakazaki (๕๑) ได้ศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้อีกครั้งหนึ่ง พบว่าเป็นพวกที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ โดยแพร่ระบาดจากอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์จากทะเล เชื้อนี้ดำรงชีวิตได้ดีในที่มีความเข้มข้นของเกลืออยู่ด้วยและมีลักษณะบางประการเหมือนกับเชื้อใน genus Vibrio จึงเรียกชื่อเชื้อนี้ว่า Vibrio parahaemolyticus สำหรับในปัจจุบันนี้ได้จัด V. parahaemolyticusอยู่ในตระกูล Vibrionaceae โดยมี ๒ biotype คือ

Biotype I (parahaemolyticus) กับ Biotype II (alginolyticus) ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันดังนี้ (๑๖, ๕๔)

คุณสมบัติ	Biotype I	Biotype II
๑. growth in ๑๐% NaCl	-	+
๒. V.P.	-	+
๓. methyl red	+	-
๔. acid from arabinose	d	-
๕. acid from sucrose	-	+
๖. Triple sugar iron	Alkaline/acid	Acid/acid

d หมายถึง มากกว่า ๑๐ เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์ที่พบเป็น + หรือ -

สัณฐานวิทยา

V.parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปท่อนสั้น ๆ หรือท่อนโค้ง(๑๙) มีความยาวตั้งแต่ ๑ - ๓ ไมครอน ความกว้าง ๐.๕ - ๐.๖ ไมครอน เคลื่อนที่ได้รวดเร็ว โดยใช้แฟลกเจลลา ๑ เส้นที่อยู่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซล เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ๓ เปอร์เซนต์ โดยจะมีโคโลนีแบบเป็นมัน ขอบเรียบ และทึบแสง นอกจากนี้จุดกลางโคโลนีจะมีสีเข้ม (๖๓) จากการศึกษาต่อมาพบว่าเชื้อนี้มีลักษณะโคโลนีแปรผันได้มากมาย จึงได้แบ่ง V.parahaemolyticus ออกเป็น ๖ กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะมีลักษณะโคโลนีขนาดเล็กคล้ายรูปโดม ขอบเรียบ เป็นมัน มีสีเหลืองอ่อน กลุ่มที่สองจะมีโคโลนีเป็นมัน มีสีน้ำเงินอ่อน กลุ่มที่สามจะมีโคโลนีสีดำเข้ม แห้ง ขอบเรียบ กลุ่มที่สี่มีโคโลนีโปร่งแสง กลุ่มที่ห้ามีโคโลนีขนาดเล็กมาก รูปโดม มีสีชมพูแกมเหลือง กลุ่มที่หกมีโคโลนีแบบขอบหยัก แต่จากการศึกษาทางเซรุ่มวิทยาพบว่าโคโลนีของเชื้อในกลุ่มที่หนึ่งและสองอาจ

จะมีโคโลนีแบบเรียบ ส่วนโคโลนีในกลุ่มที่สี่และหกจะเป็นแบบขรุขระ ส่วนในกลุ่มที่สองจะมีลักษณะของโคโลนีแบบเดียวกับกลุ่มที่สาม สำหรับในกลุ่มที่ห้านั้น อาจมีโคโลนีแบบเมือก (๕๑)

V.parahaemolyticus เจริญได้ในที่อุณหภูมิ ๕ - ๔๕ องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ ๓๗.๕ องศาเซลเซียส (๕๑, ๖๓) แต่มีรายงานว่าสามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิต่ำ ๆ จนถึง ๓ องศาเซลเซียส (๔๗) ส่วน pH ที่เจริญได้อยู่ในช่วง ๕ - ๑๑ แต่ที่เหมาะสมคือ ๗.๕ - ๘.๕ สำหรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่เจริญได้คือ ๑๐ เปอร์เซนต์ (๑๔) และต่ำสุดที่เจริญได้คือ ๐.๕ เปอร์เซนต์ (๕๑, ๖๒) แต่ที่เหมาะสมคือ ๒ - ๔ เปอร์เซนต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ๓ เปอร์เซนต์จะให้โคโลนีกลม ผิวโค้งนูน ผิวหน้าเรียบเป็นมัน ขนาดของโคโลนีประมาณ ๑ - ๓ มิลลิเมตร เชื้อนี้เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (๕๑, ๖๓)

การแพร่กระจาย

เชื้อ V.parahaemolyticus พบมากในน้ำทะเลและอาหารทะเล โดยเฉพาะอาหารทะเลนับว่าเป็นแหล่งสำคัญที่สุดในการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ จากการสำรวจของกรรณิการ์ วิสุทธิวรรณและคณะ (๑) พบว่าอาหารทะเลประเภท ปลา ปู กุ้งและหอยที่มีจำหน่ายในกรุงเทพมหานครทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา จะตรวจพบเชื้อ V.parahaemolyticus ทุกชนิด ต่อมาปราณี ศรีสมบูรณ์และคณะ (๘) ได้สำรวจเชื้อนี้ในอาหารทะเลแช่แข็งจำพวก กุ้งสด ปลาสด กั้งสด หอยสดและอาหารทะเลแห้งได้แก่ หมึกแห้ง กุ้งแห้ง หอยแห้ง ฯลฯ จากบริษัทและผู้ส่งอาหารทะเลออกต่างประเทศพบ V.parahaemolyticus ในปลาสดมากที่สุด รองลงมาได้แก่ หมึกสด กุ้งสด กั้งสด หอยสดและหมึกแห้งตามลำดับ สำหรับกุ้งแห้ง ปลาแห้ง หอยแห้งและแมงกะพรุนหมักเกลือจะไม่พบเชื้อนี้เลย

กองควบคุมโรคติดต่อ เทศบาลนครกรุงเทพฯและกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (๗) ได้ร่วมกันสำรวจเชื้อ V.parahaemolyticus และเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารอื่น ๆ จากอาหารสดและอาหารที่เตรียมไว้เพื่อจำหน่ายจำนวน ๔๕๑ ตัวอย่าง จำแนกเป็นอาหารสด ๑๘๐ ตัวอย่างและอาหารสุก ๒๗๑ ตัวอย่าง จะพบ V.parahaemolyticus

และ Salmonella spp. ในอาหารดิบ ๖๙ ตัวอย่าง หรือ ๓๙.๓ เปอร์เซนต์ และในอาหารสุก ๒๓ ตัวอย่าง หรือ ๘.๕ เปอร์เซนต์ ซึ่งในจำนวนนี้อาหารจำพวกปูเค็มจะพบเชื้อ V.parahaemolyticus มากที่สุด รองลงมาได้แก่ ปลาหางแข็งนึ่ง

จวงจันทร์ สุเมธากุลวัฒน์และคณะ (๒) ได้สำรวจหาเชื้อ V.parahaemolyticus ในอาหารทะเลที่ปรุงแล้วชนิดต่าง ๆ คือ หอยแครงลวก ปลาเผา ปูนึ่ง กุ้งขบเผาและยำหอยนางรม ที่มีจำหน่ายตามร้านอาหารและภัตตาคารในกรุงเทพมหานครจำนวน ๕๐ ตัวอย่าง จะพบเชื้อทั้งหมด ๒๓ ตัวอย่าง และเชื้อนี้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ โค-ไตรโมซาโซล (co-trimoxazole) เจนตาไมซิน คานาไมซิน อีรีโธรไมซินและเตตราไซคลิน

สุมณฑา วัฒนสินธุและคณะ (๑๐) ได้รายงานการสำรวจสุขลักษณะอาหารจากครัวสายการบินระหว่างประเทศและภัตตาคาร ณ ท่าอากาศยานกรุงเทพฯ ระหว่างเดือนธันวาคม ๒๕๑๕ ถึงธันวาคม ๒๕๑๗ จำนวน ๒๗๖ ตัวอย่าง พบ V.parahaemolyticus ๘ ตัวอย่าง และเชื้อนี้เป็นชนิด K-untypable

ประกอบ บุญไทยและคณะ (๖) ได้ศึกษาการระบาดวิทยาของโรคท้องร่วงเนื่องจาก V.parahaemolyticus จากผู้บริโภคอาหารทะเลปรากฏว่าปูแสมดองเค็มมีพบเชื้อนี้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ปลาทูและปูม้า สำหรับตัวอย่างอาหารทะเลที่พบเชื้อน้อยได้แก่ กุ้งทะเล หอยลายและหอยแมลงภู่

VanderzantและNickelson (๖๕) ได้แยกเชื้อ V.parahaemolyticus จากกุ้งที่จับได้จากอ่าวเมกซิโก พบว่า กุ้งสีน้ำตาล (Penacus aztecus) จะมีเชื้อนี้อยู่เป็นจำนวนมาก ส่วนในประเทศญี่ปุ่นนั้นจะพบเชื้อมากในกุ้งสีขาว (Penacus setiferus) และเชื้อนี้จะสร้าง exotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้

Fishbein และคณะ (๒๗) ได้แยกเชื้อ V.parahaemolyticus จากตัวอย่างปูสีน้ำเงินที่ได้จากอ่าว chesapeake ซึ่งนำมาประกอบเป็นอาหารชนิดต่าง ๆ ที่จำหน่ายในท้อง

ตลาด จำนวน ๖๐ ตัวอย่าง พบเชื้อนี้มากถึง ๕๖ ตัวอย่าง และเชื้อที่พบเป็น serotype ต่าง ๆ คือ K_3 , K_5 , K_{28} , K_{31} , K_{36} , K_{39} , K_{43} และ K_{44} แสดงให้ทีนว่ามีการแพร่ระบาดของ V.parahaemolyticus ในอ่าว chesapeake เป็นจำนวนมากด้วย

ได้มีผู้รายงานว่า (๒๘) อาหารทะเลหลายชนิด เช่น ปลา หอย (shell-fish) และ crustaceans ที่จับได้จากมหาสมุทรแอตแลนติกและแปซิฟิกกับอ่าวโคสท์ (Gulf coasts) จะพบเชื้อ V.parahaemolyticus จำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า (๒๙) การระบาดของเชื้อนี้ที่รัฐแมรีแลนด์ สหรัฐอเมริกาในฤดูร้อน ปีค.ศ. ๑๙๗๑ นั้น เกิดจากสลัดปูและปูนึ่ง

Chun และคณะ (๒๒ , ๒๓) ได้สำรวจเชื้อ V.parahaemolyticus จากอาหารทะเลในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงใต้ของเกาหลี พบเชื้อนี้เป็นจำนวนมากในปลาทะเลและหอย ต่อมาได้สำรวจเชื้อจากอาหารทะเลที่จำหน่ายในท้องตลาด พบเชื้อ V.parahaemolyticus ประมาณ ๒๖ เปอร์เซนต์ของตัวอย่างหอยทั้งหมด ซึ่งเชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษในเกาหลีเช่นเดียวกับประเทศอื่น ๆ

Kanekoและ Colwell (๓๗) ได้ศึกษานิเวศวิทยาของ V.parahaemolyticus พบว่าเชื้อนี้นอกจากจะพบในสัตว์ทะเลทั่วไปแล้ว ยังพบในพวกแพลงตันต่าง ๆ อีกด้วย เมื่อสัตว์ทะเลกินแพลงตันเหล่านี้เข้าไป จะทำให้เชื้อแพร่กระจายเข้าสู่สัตว์นั้นด้วย มีรายงานว่าในน้ำทะเลจะมีเชื้อนี้น้อยกว่า ๑๐ เซลต่อมิลลิลิตร สำหรับการพบเชื้อในแพลงตันนั้นจะเป็นวัฏจักรหมุนเวียนในทุก ๆ ปี โดยที่ในฤดูหนาวเชื้อนี้จะตกตะกอนและจะหลุดจากตะกอนเข้าสู่แพลงตันสัตว์ (zooplankton) ในปลายฤดูใบไม้ผลิหรือต้นฤดูร้อน เพราะในช่วงนี้อุณหภูมิของน้ำจะสูงถึง ๑๙-๒๐ องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อสามารถเจริญได้ (๕๙) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบเชื้อนี้ในแพลงตันพืช (phytoplankton) อีกด้วย โดยพบในไดอะตอมชนิดต่าง ๆ คือ Nitzschia, Coscinodiscus, Navicula และThalassiosira (๖๐)

Thompson และVanderzant (๕๗) ได้แยกเชื้อ V.parahaemolyticus จากตัวอย่างหอยนางรม น้ำทะเลและตะกอนจากน้ำทะเลจำนวน ๗๐๓ ตัวอย่าง พบเชื้อนี้

จำนวน ๓๑๙ ตัวอย่าง (๔๕ เปอร์เซนต์) เชื้อสามารถเจริญได้ในอาหาร trypticase soy broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ๑๐ เปอร์เซนต์ จากการศึกษาทางเซรุ่มวิทยาพบว่าเป็นชนิด typable ๗๒ ตัวอย่าง type ที่พบมากคือ $O_5:K_{17}$ และบางชนิดเป็น Kanagawa positive อีกด้วย

ผู้วิจัยและพิไลพรรณ พงษ์พูล (๔) ได้สำรวจหาเชื้อ V.parahaemolyticus จากอาหารทะเลประเภทกุ้ง กั้ง ปลา หอยแมลงภู่และหอยนางรม ที่ได้จากท่าเรือประมงแหลมแท่น เขาสามมุข อ่างศิลาและศรีราชา จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดจะพบเชื้อนี้ประมาณ ๓๕.๑๑ เปอร์เซนต์ และเมื่อจำแนกเป็นประเภทของตัวอย่างจะพบในกุ้ง ๒๖ เปอร์เซนต์ หอยแมลงภู่ ๗๕ เปอร์เซนต์ หอยนางรม ๔๔ เปอร์เซนต์ ปลา ๒๔ เปอร์เซนต์ หมึก ๒๕ เปอร์เซนต์และกั้ง ๒๙ เปอร์เซนต์ และเชื้อที่พบดังกล่าวนี้จะเป็น type K_4 , K_8 , K_9 , K_{13} , K_{17} , K_{18} , K_{28} , K_{33} และ K-untypable

สำหรับความสามารถในการดำรงชีวิตเพื่อการอยู่รอดของ V.parahaemolyticus นั้น ได้มีการศึกษากันมากเพราะเป็นแนวทางที่จะนำไปใช้กำจัดหรือทำลายเชื้อนี้ จากการศึกษาของ Vanderzant และ Nickelson (๖๕) โดยนำ V.parahaemolyticus ใส่ในกุ้งทั้งตัวและกุ้งที่ตีป่นกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ๓ เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิและความชื้นแตกต่างกันไปพบว่าเมื่อบ่มเชื้อนี้ไว้ที่อุณหภูมิ ๑๐ - ๑๘ องศาเซลเซียส เชื้อจะเริ่มตายภายใน ๒ วัน แต่ถ้านำเชื้อที่มีความเข้มข้น ๒๐๐,๐๐๐ เซลต่อมิลลิลิตร ไปให้ความร้อนที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียสนาน ๑ นาที เชื้อจะถูกทำลายหมด ในด้าน p^H นั้น เชื้อที่เลี้ยงใน p^H ๑ - ๔ จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วถ้า pH ๔ เชื้อจะถูกทำลายหมดภายใน ๑๕ นาที แต่ถ้า pH ๖- ๑๐ เชื้อจะไม่ถูกทำลาย

Ro และ Woodburn (๔๙) ได้ศึกษาการอยู่รอดของ V.parahaemolyticus ในหอยนางรมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ พบว่าหลังจากบ่มเชื้อในที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ๓ เปอร์เซนต์ นาน ๓ วัน เชื้อจะมีจำนวนลดน้อยลงและจะลดลงต่ำที่สุดเมื่อบ่มเชื้อนาน ๗ วัน ส่วนในที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ๖.๘ และ ๑๐.๖ เปอร์เซนต์

นั้น เชื้อนี้จะมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากบ่มเชื้อนาน ๑ วันและเมื่อบ่มเชื้อนาน ๘ วัน จะมีเชื้อเหลือรอดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Convert และWoodburn (๒๑) ได้ศึกษาการอยู่รอดของ V.parahaemolyticus พบว่าอัตราการอยู่รอดจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ๓ เปอร์เซนต์ และที่อุณหภูมิ ๕ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ วัน จำนวนของ V.parahaemolyticus จะลดลงจาก $๑๐^{๕}$ เซลต่อมล. เหลือ ๓๐ เซลต่อมล. แต่ถ้าหากในอาหารที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ ๕ องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อนี้จะมีจำนวนลดน้อยลงไม่เกิน ๓๐ เซลต่อมิลลิลิตรในเวลา ๔ วันเท่านั้น

Johnson และListon (๓๓) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ำต่อการเจริญของ V. parahaemolyticus สายพันธุ์ 17802 SM และ K_4SM_3 ในอาหารทะเล พบว่าที่อุณหภูมิ -๓๐ องศาเซลเซียสนาน ๔๑ วัน เชื้อสายพันธุ์ K_4SM_3 ยังมีชีวิตอยู่ได้ ส่วนสายพันธุ์ 17802SM จะทนอยู่ในสภาวะเดียวกันได้นาน ๓๕ วัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ทนต่อการทำลายในอุณหภูมิต่ำได้แตกต่างกันไป และต้องใช้เวลานานในการทำลาย จึงไม่เป็นที่นิยมในการฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้ วิธีที่ใช้กันมากคือการฆ่าด้วยความร้อนเพราะใช้ระยะเวลาสั้น ๆ มีรายงานว่า V.parahaemolyticus ที่เจริญในอาหาร peptone water ถูกทำลายที่อุณหภูมิ ๕๕ องศาเซลเซียสนาน ๑๐ นาที หรือที่อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียสนาน ๕ นาที (๔๒) หรือที่ ๗๕ - ๑๐๐ องศาเซลเซียสนาน ๑ นาที (๔๑, ๖๕)

ลักษณะทางเซรุ่มวิทยา

ลักษณะทางเซรุ่มวิทยาของ V.parahaemolyticus เริ่มศึกษาครั้งแรกโดย Sakazaki (๕๐) ในปีค.ศ. ๑๙๖๕ พบว่าเชื้อนี้มีคุณสมบัติทาง antigen ๓ ชนิดคือ O,K และ H - antigen โดยที่ O - antigen ทนต่อความร้อนได้ดี แม้จะให้ความร้อนถึง ๑๐๐ องศาเซลเซียสก็ยังคงคุณสมบัติเป็น antigen อยู่ นอกจากนี้ยังทนต่อแอลกอฮอล์เข้มข้น

๕๐ เปอร์เซนต์และ ๑ N.HCL ได้นาน ๒๔ ชั่วโมงที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ส่น K-antigen เป็น antigen ที่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน จะพบมากในเชื้อที่แยกได้ใหม่ ๆ และในขณะที่เชื้อนี้ยังมีชีวิตนั้น K-antigen จะไม่เกิดการตกตะกอนกับ O-antiserum จากการศึกษาของ Omori และคณะ (๔๖) พบว่า K-antigen ที่แยกออกมาจากเซลนั้นจะทนความร้อนที่อุณหภูมิ ๑๐๐ องศาเซลเซียสได้นาน ๒ ชั่วโมง สำหรับ H-antigen นั้นยังไม่ทราบคุณสมบัติที่แน่ชัด

จากการศึกษาต่อมาพบว่า O-antigen มี ๑๒ groups ส่วน K-antigen มี ๕๒ types (๕๔) โดยที่ K-antigen แต่ละ type จะมีอยู่ใน O-antigen เฉพาะกลุ่มที่ไม่ซ้ำกันเช่น K-antigen type ๒ และ ๓ จะพบเฉพาะใน O-antigen group ๒ เท่านั้น (๕๐) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า (๕๒) K-antigen type ๔ จะพบใน O-antigen ทั้งใน group ๓ และ ๔ อีกด้วย ดังนั้นการใช้คุณสมบัติของ O-antigen ในทางการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อทางเซรุ่มวิทยานั้น จึงไม่นิยมใช้ เพราะอาจทำให้การตรวจสอบที่ได้นั้นยังไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อได้อย่างถูกต้องแน่นอน

ได้มีผู้ศึกษา (๖๑) คุณสมบัติทางเคมีของ O-antigen พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส กลูโคซามีน เฮปโตส (heptose) ฟอสฟอรัส กรดไขมันและสารประกอบไนโตรเจน โดยที่สารประกอบเหล่านี้จะอยู่รวมกับสารโมเลกุลใหญ่ที่เรียกว่า lipo - polysaccharide เช่นเดียวกับที่พบในแบคทีเรียพวก Enterobacteriaceae

<u>ความสามารถในการทำให้เกิดโรค</u>

เชื้อ <u>V.parahaemolyticus</u> พบครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น จากผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วงเนื่องจากอาหารเป็นพิษ ต่อมาในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๑๔ หน่วยควบคุมโรคประจำสนามบินลอนดอน ประเทศอังกฤษ ได้รายงานว่ามีผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วงเนื่องจากรับประทานเนื้อปูและพบว่าสาเหตุของโรคเกิดจาก <u>V. parahaemolyticus</u> เช่นกัน (๔๘)

นิพนธ์ อุดมสันติสุขและคณะ แห่งแผนกจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (๓) ได้ตรวจอุจจาระจากผู้ป่วยโรคท้องร่วงจำนวน ๑๕ ราย พบว่าเป็นเชื้อ <u>V. parahaemolyticus</u> ทั้งหมด แต่ไม่สามารถแยกชนิด (untypable) ได้

นอกจากนี้มีรายงานว่า เชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของโรคท้องร่วงที่พบในวัยผู้ใหญ่ที่พบในประเทศไทย โดยเฉพาะพวกที่อาศัยตามชายฝั่งทะเลในเมืองใหญ่ และผู้ป่วยส่วนมากจะเคยรับประทานอาหารทะเลมาแล้ว ๑๒ ช.ม. ถึง ๕ วัน ก่อนปรากฏอาการของโรค (๑๒)

สำหรับความสามารถในการเกิดโรคของ V.parahaemolyticus เกิดจากการสร้างสารพิษพวก hemolysin เป็นสำคัญ และ hemolysin มี ๔ ชนิด กล่าวคือ สองชนิดแรกจะยึดเกาะติดกันเซลและมีกิจกรรมของเอนไซม์ phospholipase A และ lysophospholipase ส่วน hemolysin ที่เหลือนั้น ชนิดแรกทนต่อความร้อนได้ดี สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงของมนุษย์และกระต่ายได้ เรียกว่า Kanagawa positive สำหรับอีกชนิดหนึ่งนั้นไม่ทนต่อความร้อนและไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง เรียกว่า Kanagawa negative (54) ต่อมาได้มีผู้ทดลองนำ V.parahaemolyticus สายพันธุ์ที่เป็น Kanagawa positive และ Kanagawa negative ให้อาสาสมัครจำนวน 15 คน รับประทาน พบว่าพวกที่รับประทานสายพันธุ์ Kanagawa positive จะมีอาการปวดท้องและท้องร่วงภายในเวลา ๕ ช.ม. ส่วนพวกที่รับประทานชนิด Kanagawa negative จะไม่เกิดอาการของโรคแต่อย่างใด (๕๒) ซึ่งการทดลองดังกล่าวนี้ขัดแย้งกับรายงานของ Teramota และคณะ (๕๖) กับ Zen-Yoji และคณะ (๗๐) ที่พบว่า V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วงนั้นจะพบสายพันธุ์ที่เป็น Kanagawa positive ประมาณ ๘๘-๙๖ เปอร์เซนต์ ที่เหลือเป็นสายพันธุ์ Kanagawa negative และเมื่อนำสายพันธุ์ Kanagawa negative ให้กับอาสาสมัคร พบว่าทำให้เกิดโรคท้องร่วงได้เช่นกัน จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ V.parahaemolyticus ทั้งสายพันธุ์ Kanagawa positive และ Kanagawa negative พบว่าจะสร้าง lipase ,esterase,egg yolk factors, DNase, protease, amylase และ hemolytic factors ได้ด้วย และสารมารถทำลายเฉพาะเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ กระต่ายและไก่ได้เท่านั้น hemolysin ที่สร้างมานี้เป็นสารพวกโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล ๑๐,๐๐๐-๒๐,๐๐๐ ดาลิตัน สำหรับปริมาณของ hemolysin นี้จะสร้างได้เพียงเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูง ๆ (๖๗)

อาการของโรคท้องร่วงจาก V.parahaemolyticus นั้นโดยทั่วไปผู้ป่วยจะมีอาการท้องร่วง ถ่ายอุจจาระบ่อยครั้ง ปวดท้องลักษณะปั้นเกร็งเป็นระยะ ๆ คลื่นไส้ อาเจียน

เมื่อตรวจสภาพร่างกายจะพบมีอาการขาดน้ำ กระวนกระวาย ฟังได้ยินเสียงการบีบรัดของลำไส้เพิ่มขึ้น อาการของโรคมักจะปรากฏหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อประมาณ ๑๐-๒๐ ชั่วโมง ในบางกรณีอาจแสดงอาการภายใน ๒ - ๔๘ ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อที่ได้รับและความเป็นกรดเบสของระบบทางเดินอาหารในแต่ละบุคคล เชื้อนี้จะทวีจำนวนอย่างรวดเร็วโดยมีชั่วอายุ ๑๒ - ๑๔ นาที ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส การทวีจำนวนจะเกิดขึ้นที่ลำไส้และสร้างสารพิษทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการต่าง ๆ ขึ้นได้ (๔๘) แต่มีรายงานว่าอาการที่เกิดเนื่องจากกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบของผู้ป่วยจากเชื้อ V.parahaemolyticus นั้นเป็นผลมาจากการติดเชื้อมากกว่าเกิดจากสารพิษ ทั้งนี้เพราะเซลของแบคทีเรียมีคุณสมบัติเป็น antigen ได้เช่นเดียวกัน ส่วนสารพิษอาจจะเป็นเพียงช่วยให้เกิดอาการได้รวดเร็วขึ้น (๗)

อุปกรณ์และวิธีการ

๑. ตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์หาเชื้อ V.parahaemolyticus เป็นอาหารทะเลสดจำพวก กุ้ง และหมึก จากเกาะไผ่เกาะสีชัง เกาะล้าน แหลมฉบัง ฯลฯ ที่นำมาขึ้นยังท่าเรือประมงแหลมแท่น เขาสามมุข อ่างศิลาและศรีราชา จังหวัดชลบุรี ส่วนหอยแมลงภู่และหอยนางรมนั้นได้ตัวอย่างจากเขาสามมุขและอ่างศิลา

๒. อาหารเลี้ยงเชื้อ

๒.๑ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับตรวจหา V.parahaemolyticus มี ๒ ชนิด คือ

ก. Tryptic soy broth + 3 %NaCl ใช้เป็น enrichment media

ข. Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) ใช้เป็น Selective media

๒.๒ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ

ก. Triple Sugar Iron Agar (TSI) + 3 % NaCl

ข. Peptone broth + 3 % NaCl

ค. MR - VP medium + 3 % NaCl

ง. Simmon citrate agar + 3% NaCl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Burapha University

๓. วิธีดำเนินการทดลอง

๓.๑ นำตัวอย่างอาหารทะเลสดจำพวกกุ้งและหอย ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth+3% NaClส่วนตัวอย่างอาหารทะเลพวกหมึกนำไปตีปนรวมกับสารละลายโซเดี่ยมคลอไรด์เข้มข้น ๓ เปอร์เซนต์ ด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า หรือ swab เฉพาะส่วนที่ต้องการ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ อาศาเซลเซียส นาน ๒๔ ชั่วโมง

๓.๒ ถ่ายเชื้อจาก tryptic soy broth + 3 % NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar โดย streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ซึ่งถือว่าเป็นเชื้อบริสุทธิ์

๓.๓ เลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม สีเขียว ตรงกลางมีสีน้ำเงินทึบและมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๓ - ๕ มิลลิเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI และนำไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

๔. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

ถ่ายเชื้อจาก TSI ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสารเคมีที่ต้องการทดสอบ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสนาน ๒๔ - ๔๘ ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นดังนี้

๔.๑ indole test โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone broth + 3 % NaCl นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส นาน ๔๘ ช.ม. แล้วเติมสารละลาย Kovacs's indole reagent ลงไป เขย่าหลอดทดสอบและตั้งทิ้งไว้ ๕ - ๑๐ นาที ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่าได้ผลเป็นบวก เนื่องจากเชื้อสามารถเปลี่ยนกรดอมิโนทริฟโตแฟนใน peptone broth ให้เป็น indole group ได้ ถ้าผลเป็นลบจะไม่เกิดสีแดง

๔.๒ methyl red test (MR - test) โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR - VP broth + 3 % NaCl นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๔๘ ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย methyl red ลงไป ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่าเป็นบวก เนื่องจากเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเด็กโตสใน MR - VP broth ให้เป็นกรดได้ แต่ถ้าเกิดสีเหลืองให้ผลเป็นลบ

๔.๓ Voges - Proskaner test (VP-test) โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP broth + 3 % NaCl นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๔๘ ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย α - naphthol และสารละลาย KOH เข้มข้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๕๐ เปอร์เซนต์ลงไป ถ้าเกิดสีแดง จะให้ผลเป็นบวก เนื่องจากเชื้อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR - VR broth จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็น acetyl - methyl carbinol เมื่อเติมสารละลายลงไปสารนี้จะถูกออกซิไดซ์ให้เป็น diacetyl และ diacetyl จะรวมกับ KOH ได้สีแดง แต่ถ้าไม่เกิดสีแดง จะให้ผลเป็นลบ

๔.๔ citrate test โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ simmons citrate agar + 3 % NaCl นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑๘ - ๒๔ ชั่วโมง ถ้าได้ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งของคาร์บอนและให้กรดออกมา กรดจะเปลี่ยน brom - thymol blue เป็นสีน้ำเงิน แต่ถ้าได้ผลเป็นลบ อาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี

๔.๕ catalase test เป็นการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase โดยหยด H_2O_2 เข้มข้น ๓ เปอร์เซนต์ ลงบนสไลด์ ๑ หยด ใช้ loop แตะเชื้อบริสุทธิ์ลงบนหยด H_2O_2 ถ้ามีฟองแกสเกิดขึ้นมาก แสดงว่าเชื้อนี้สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ ผลการทดสอบเป็นบวก ทั้งนี้เพราะเอนไซม์นี้จะไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 แล้วให้แกสออกซิเจนออกมา แต่ถ้าผลการทดลองเป็นลบ จะไม่มีฟองแกสเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อนี้ไม่สร้างเอนไซม์ catalase

๕. การทดสอบการเคลื่อนที่

นำเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร nutrient broth + 3 % NaCl แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑๘ - ๒๔ ช.ม. และตรวจดูการเคลื่อนที่

๖. การทดสอบทางเซรุ่มวิทยา

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้ว ไปทดสอบหาคุณสมบัติทางเซรุ่ม-วิทยาที่หน่วยพยาธิวิทยาคลินิค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยทดสอบคุณสมบัติด้าน K - antiserum จากประเทศญี่ปุ่น

๗. การทดสอบการดื้อยา

นำเชื้อ V. parahaemolyticus ที่แยกได้จากอาหารทะเลมาทดสอบการดื้อยาโดยวิธีสุ่มตัวอย่าง ยาปฏิชีวนะที่ใช้ ได้แก่ penicillin 10 unit, neomycin 30 mcg, gentamicin 10 mcg, kanamycin 30 mcg และ tetracycline 30 mcg, การทดสอบการดื้อยาด้วยวิธี disc diffusion method ดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๗.๑ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar + 3 % NaCl เทใส่จานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้แข็ง

๗.๒ เตรียม suspension ของเชื้อให้มีความขุ่น คิดเป็นค่า optical density (OD) ที่มีความยาวคลื่น ๕๔๐ nm. เท่ากับ ๐.๘๕ ใช้ปิเปตดูด suspension ใส่จานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจานละ ๐.๒ มล.นำแท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ เกลี่ยให้เชื้อกระจายจนทั่วจานเพาะเชื้อ

๗.๓ นำ sensitivity disc ของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ วางในจานเพาะเชื้อ โดยยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดทำอย่างละ ๔ จานเพาะเชื้อ แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

๗.๔ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑๘-๒๔ ช.ม. แล้ววัด clear zone หรือ inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณที่ยาปฏิชีวนะแพร่กระจายไปยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อได้ จะเห็นส่วนของเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้เป็นบริเวณใส ๆ รอบ sensitivity discการที่จะจัดว่า V.parahaemolyticus จะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดใดนั้น ก็นำค่า clear zone ที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ zone interpretative chart ของ Kirby - Bauer method for determining bacterial sensitivity เช่น ในยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ๓๐ mcg นั้น ถ้ามี clear zone ตั้งแต่ ๑๘ มม. ขึ้นไปแสดงว่า เชื้อมีความไวต่อการถูกทำลายสูง (sensitive) ถ้ามี clear zone ตั้งแต่๑๕-๑๗ ม.ม. แสดงว่าเชื้อนั้นอยู่กึ่งกลางระหว่างการดื้อและความไวต่อการถูกทำลาย (interme - diate) ส่วนถ้ามี clear zone ตั้งแต่ ๑๓ มม. หรือน้อยกว่าจะดื้อต่อยาได้ดี (resistance)

ผลการทดลอง

๑. การวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบเชื้อ V. parahaemolyticus ในอาหารทะเลสด

จากการทดลองนำอาหารทะเลสดจากแหล่งต่าง ๆ มาทดสอบเพื่อหาเชื้อ V. parahaemolyticus ดังแสดงในตารางที่ ๑

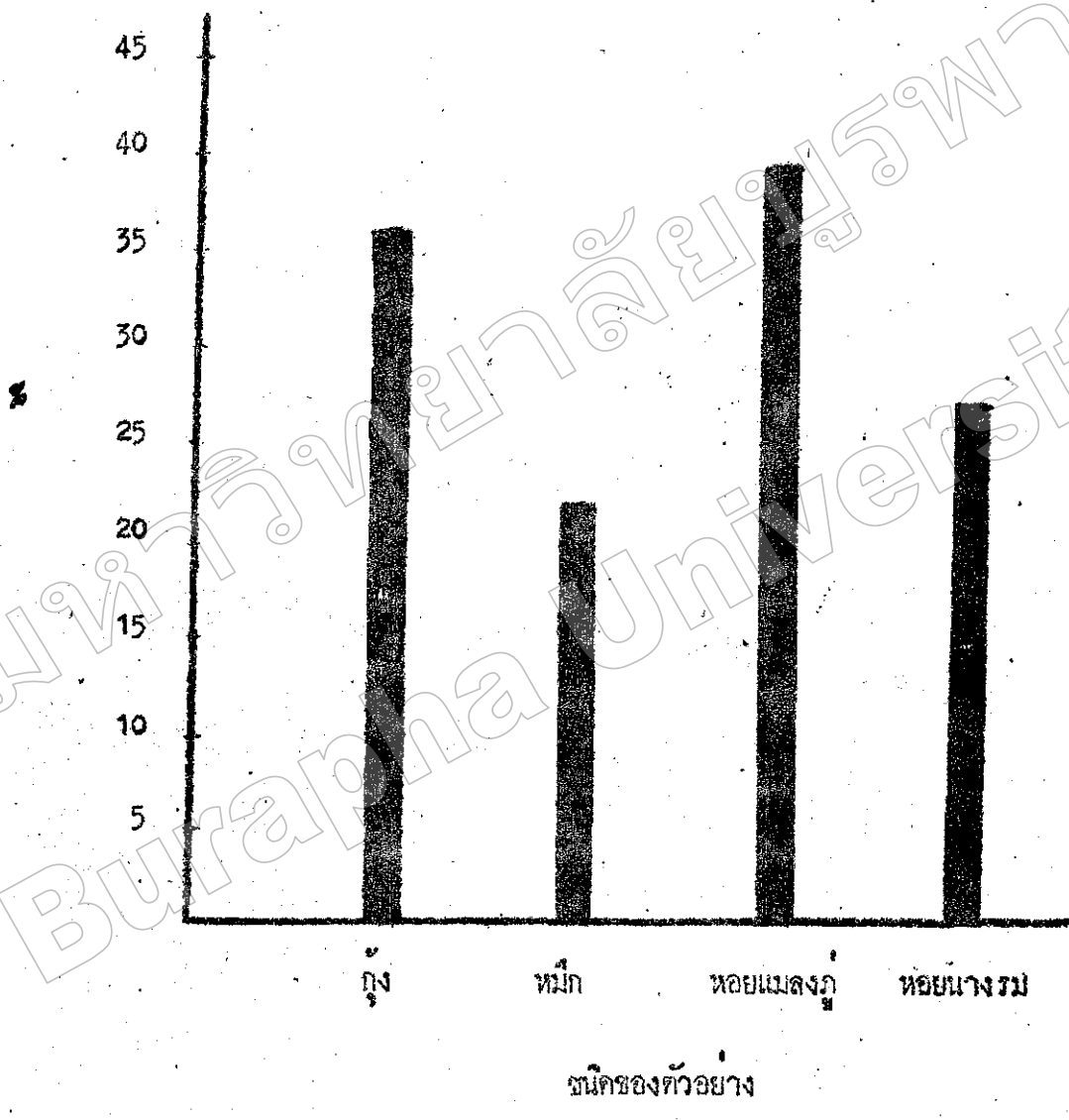
ตารางที่ ๑ แสดงการแพร่กระจายของ V. parahaemolyticus ที่พบในอาหารทะเลชนิดต่าง ๆ

ชนิดของอาหารทะเล	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละ
กุ้ง	๔๓๖	๑๕๗	๓๖.๐๑
หมึก	๒๐๘	๔๖	๒๒.๑๒
หอยแมลงภู่	๑๔๒	๕๖	๓๙.๔๔
หอยนางรม	๑๓๐	๔๒	๓๒.๓.
รวม	๙๑๖	๓๐๑	๓๒.๘๖

จากตารางที่ ๑ แสดงให้เห็นว่าอาหารทะเลสดจำพวกหอยแมลงภู่มีเชื้อ V. parahaemolyticus มากที่สุด รองลงมาได้แก่ กุ้ง หอยนางรมและหมึก ตามลำดับ

สำหรับปริมาณของ V. parahaemolyticus ที่พบในอาหารทะเลสดจะแตกต่างกันตามช่วงระยะเวลา ดังแสดงในตารางที่ ๒ - ๕

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 1 กราฟแสดงการแพร่กระจายของเชื้อในตัวอย่างสัตว์ทะเล

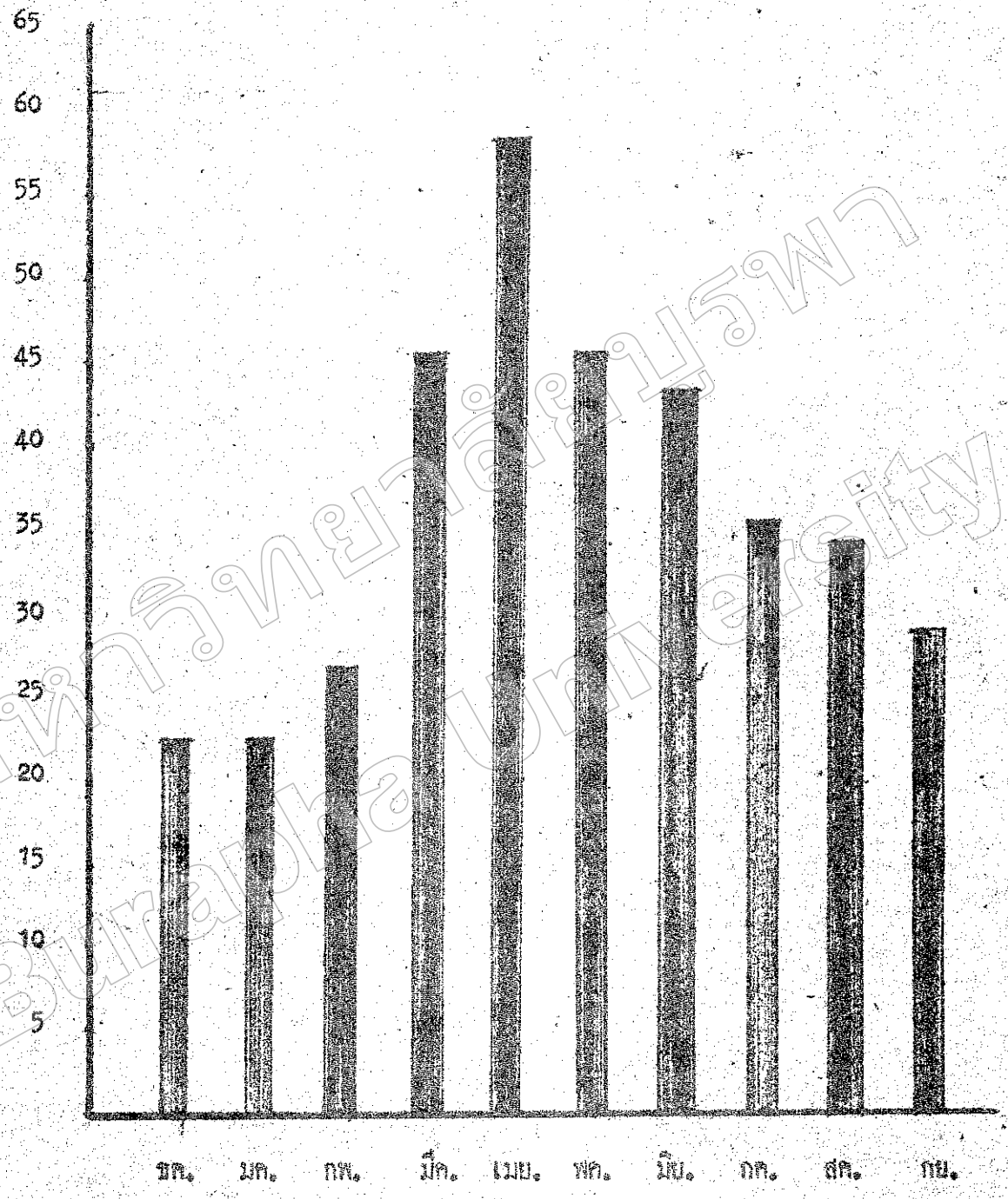
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ ๒. แสดงการแพร่กระจายของ V. parahaemolyticus ที่พบในกุ้งในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

เดือน	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละ
ธันวาคม	๓๕	๘	๒๒.๘๖
มกราคม	๗๐	๑๖	๒๒.๘๖
กุมภาพันธ์	๗๐	๑๙	๒๗.๑๔
มีนาคม	๔๘	๒๒	๔๕.๘๓
เมษายน	๕๘	๓๓	๕๘.๖๒
พฤษภาคม	๓๕	๑๖	๔๕.๗๑
มิถุนายน	๓๒	๑๔	๔๓.๗๕
กรกฎาคม	๒๘	๑๐	๓๕.๗๑
สิงหาคม	๒๖	๙	๓๔.๖๒
กันยายน	๓๔	๑๐	๒๙.๔๑
รวม	๔๓๖	๑๕๗	๓๖.๐๑

จากตารางที่ ๒ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus ในกุ้งจะพบแพร่ระบาดมากที่สุดในเดือนเมษายนและน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม และมกราคม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



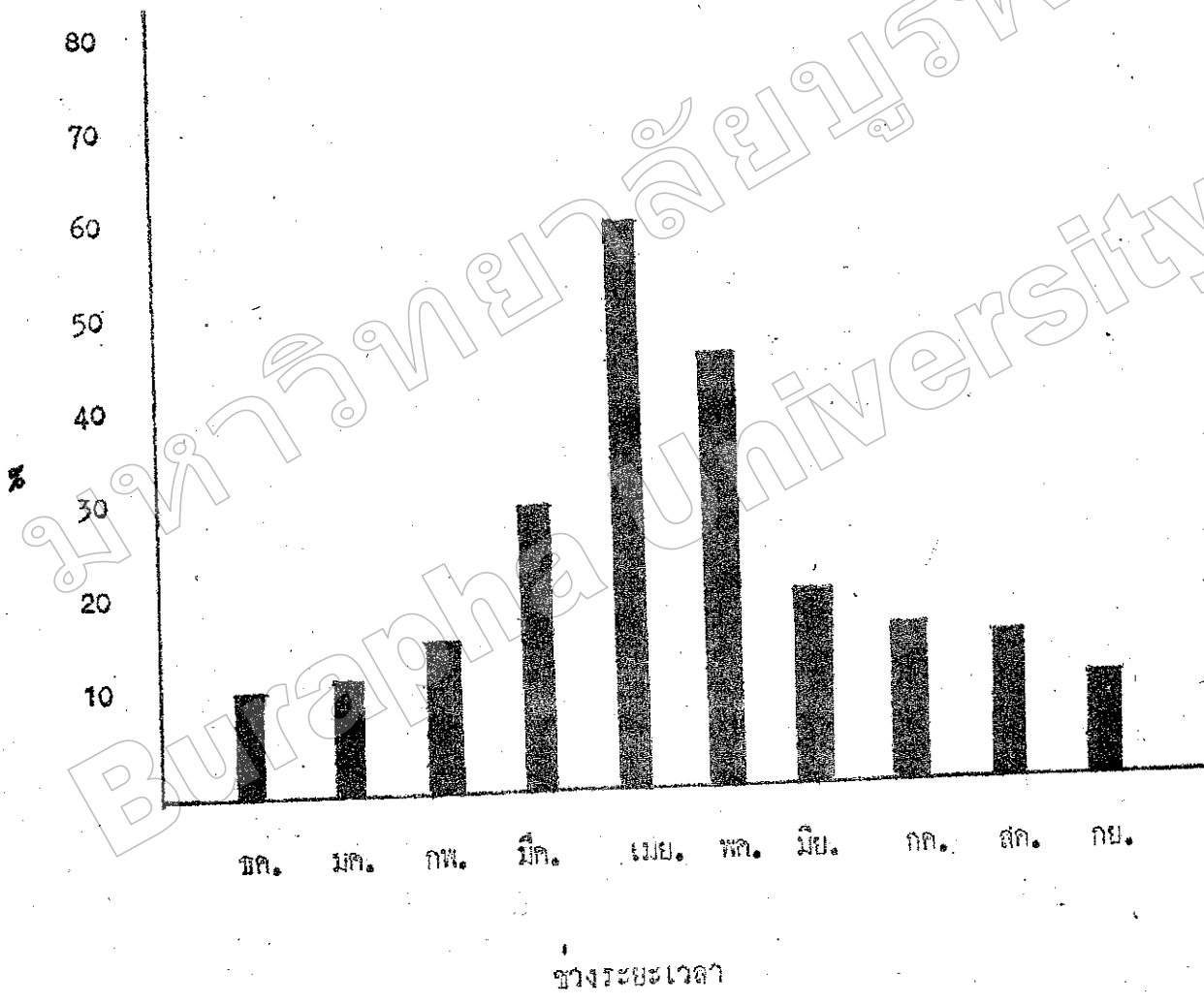
รูปที่ 2 กราฟแสดงการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ที่พบในกุ้ง

ตารางที่ ๓ แสดงการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ที่พบในหมึกในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

เดือน	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละ
ธันวาคม	๙	๑	๑๑.๑๑
มกราคม	๓๒	๔	๑๒.๕๐
กุมภาพันธ์	๓๑	๕	๑๖.๑๓
มีนาคม	๒๖	๘	๓๐.๗๗
เมษายน	๑๓	๘	๖๑.๕๔
พฤษภาคม	๑๓	๖	๔๖.๑๕
มิถุนายน	๒๔	๕	๒๐.๘๓
กรกฎาคม	๑๗	๓	๑๗.๖๕
สิงหาคม	๑๘	๓	๑๖.๖๗
กันยายน	๒๕	๓	๑๒.๐๐
รวม	๒๐๘	๔๖	๒๒.๑๒

จากตารางที่ ๓ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus ในหมึกจะพบแพร่ระบาดมากที่สุดในเดือนเมษายน และน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 3 กราฟแสดงการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ที่พบในหมึก

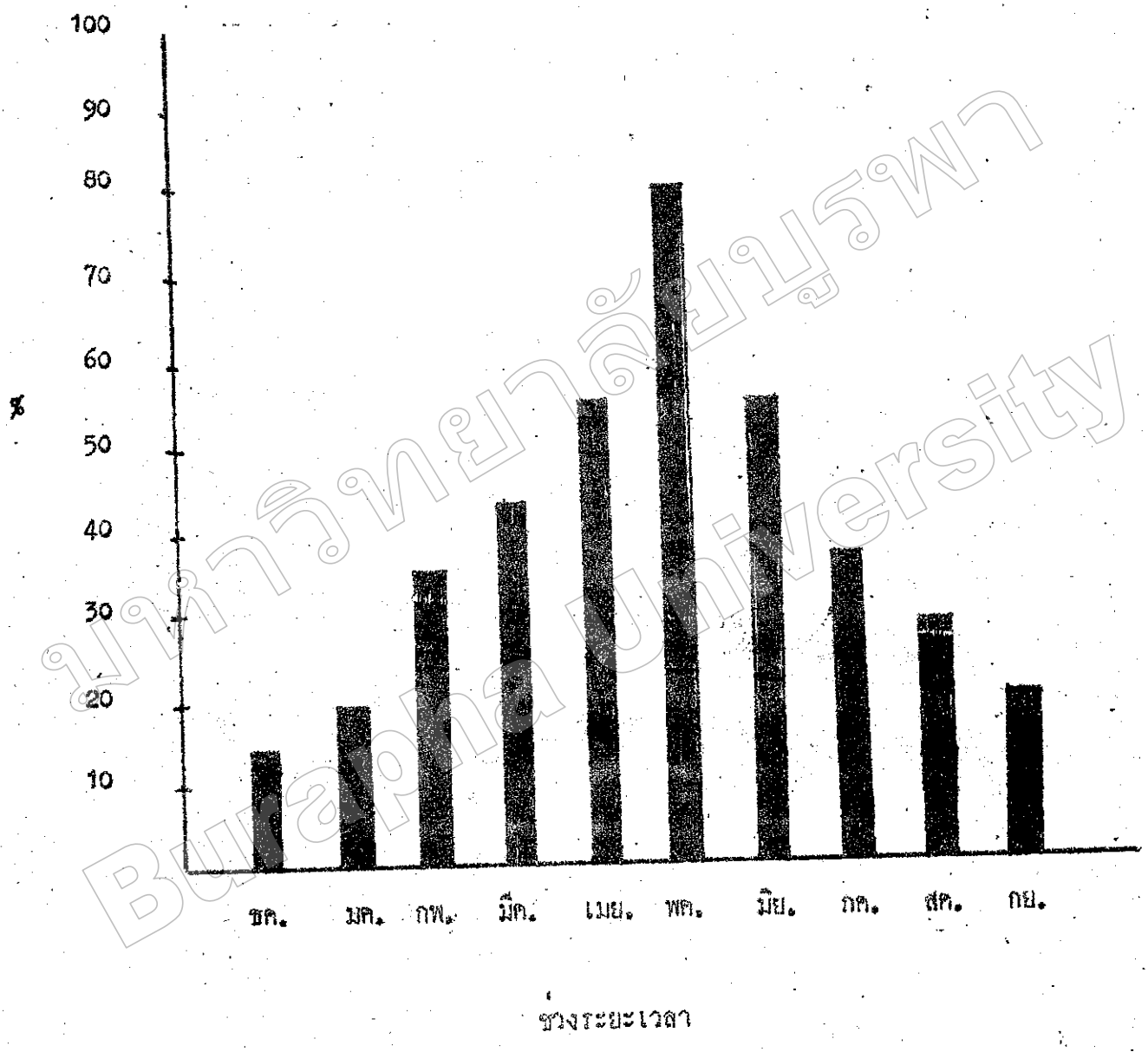
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ ๔ แสดงการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ที่พบในหอยแมลงภู่ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

เดือน	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละ
ธันวาคม	๑๕	๒	๑๓.๓๓
มกราคม	๑๖	๓	๑๘.๗๕
กุมภาพันธ์	๒๐	๗	๓๕.๐๐
มีนาคม	๑๕	๖	๔๒.๘๖
เมษายน	๓๑	๑๗	๕๔.๘๔
พฤษภาคม	๑๐	๘	๘๐.๐๐
มิถุนายน	๑๑	๖	๕๔.๕๕
กรกฎาคม	๘	๓	๓๗.๕๐
สิงหาคม	๗	๒	๒๘.๕๗
กันยายน	๑๐	๒	๒๐.๐๐
รวม	๑๔๒	๕๖	๓๙.๔๔

จากตารางที่๔ แสดงให้เห็นว่า V. parahaemolyticus ในหอยแมลงภู่จะพบแพร่ระบาดมากที่สุดในเดือน พฤษภาคมและน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4 กราฟแสดงการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ที่พบในหอยแมลงภู่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

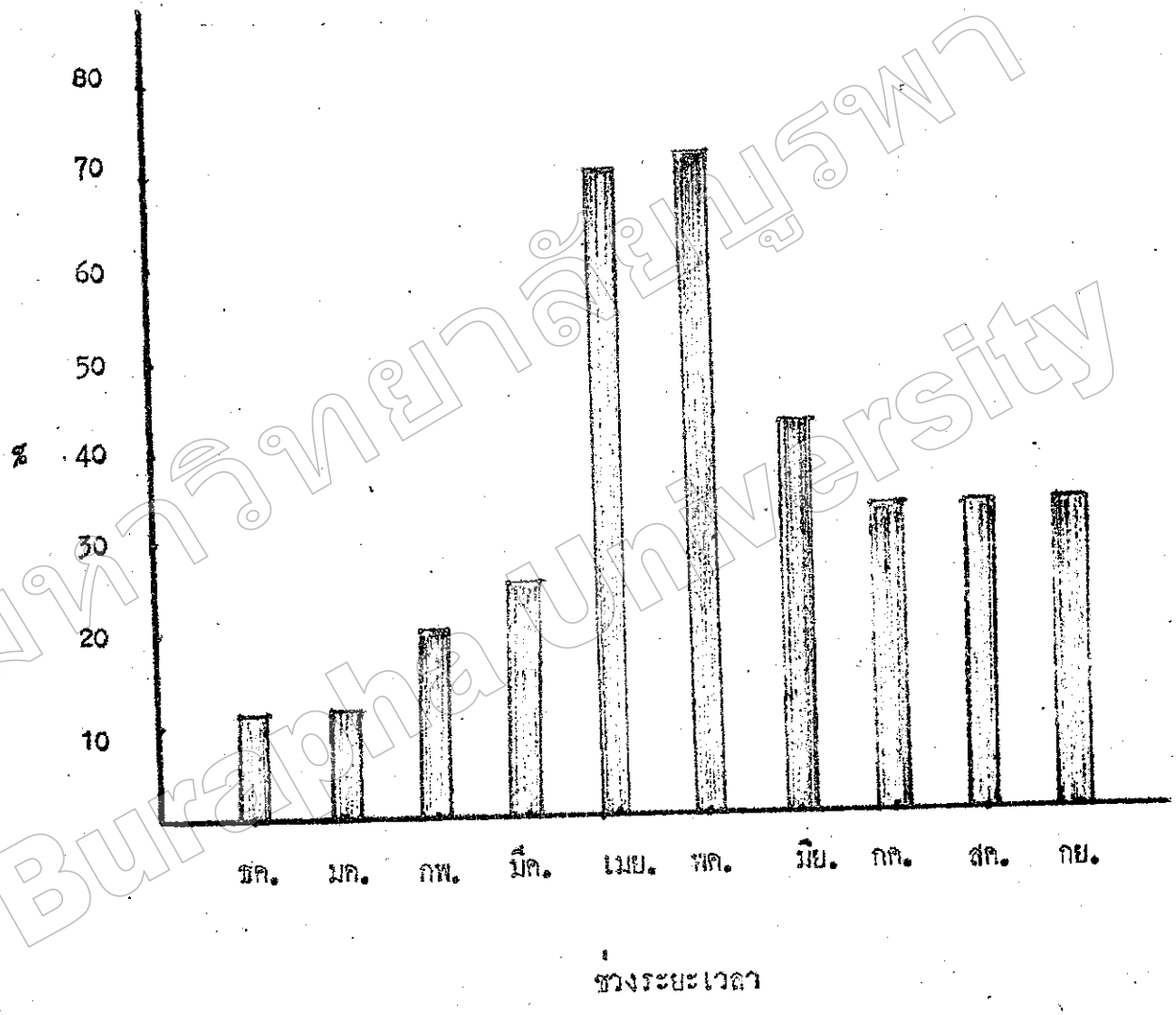
ตารางที่ ๕ แสดงการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ที่พบในหอยนางรมในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

เดือน	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละ
ธันวาคม	๑๘	๒	๑๑.๑๑
มกราคม	๒๖	๓	๑๑.๕๔
กุมภาพันธ์	๒๐	๔	๒๐.๐๐
มีนาคม	๑๔	๕	๓๕.๗๑
เมษายน	๒๐	๑๔	๗๐.๐๐
พฤษภาคม	๗	๕	๗๑.๔๓
มิถุนายน	๗	๓	๔๒.๘๖
กรกฎาคม	๖	๒	๓๓.๓๓
สิงหาคม	๓	๑	๓๓.๓๓
กันยายน	๙	๓	๓๓.๓๓
รวม	๑๓๐	๔๒	๓๒.๓๑

จากตารางที่ ๕ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus ในหอยนางรมจะพบแพร่กระบาดมากในช่วงระหว่างเดือน เมษายนและ พฤษภาคมและน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม

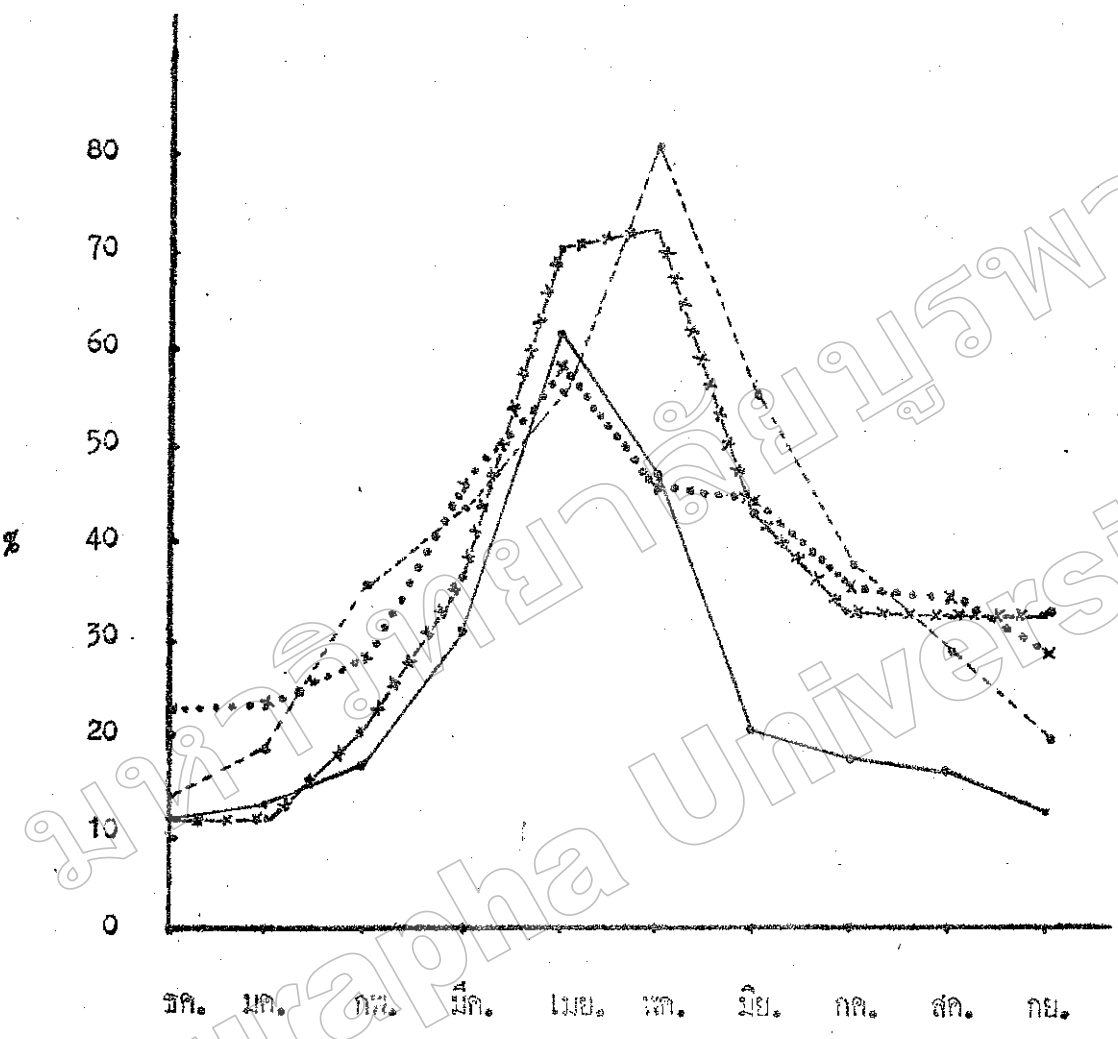
สำหรับการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ในกุ้ง หมึก หอยนางรม และหอยแมลงภู่ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ดังสรุปในรูปที่ ๖

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 5 กราฟแสดงการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ที่พบในหอยนางรม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 6 กราฟแสดงช่วงระยะเวลาในแต่ละเดือนที่พบ V.parahaemolyticus ในอาหารสดจากทะเล

———— หมึก

– – – – หอยแมลงภู่

—×—×— หอยนางรม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๒. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

คุณสมบัติทางเคมีของ V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากอาหารทะเลสดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ ๖

ตารางที่ ๖ แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของ V.parahaemolyticus ที่พบในอาหารทะเลสด

biochemical test	ผล
TCBS agar	โคโลนีสีเขียวและตรงกลางสีเข้ม
TSI	
- butt	acid
- slant	alkaline
- gas	-
- H_2S	-
Indole	+(-)
MR	+(-)
VP	-
Citrate	+(-)
Catalase	+
Motility	+(-)

+ หมายถึง positive result

- หมายถึง negative result

+(-)หมายถึง positive result มากกว่า negative result.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

๓. การทดสอบการดื้อยาของเชื้อ

จากการทดสอบการดื้อยาของ V.parahaemolyticus ในอาหารสดจากทะเล โดย การสุ่มตัวอย่างเชื้อที่พบจำนวน ๖๐ เชื้อ มาทดสอบกับยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ ๗ - ๑๐

ตารางที่ ๗ แสดงผลของยาปฏิชีวนะต่อการเจริญของ V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากกุ้ง

No	ยาปฏิชีวนะ				
	เพนนิซิลิน	กานาไมซิน	นีโอไมซิน	เจนตาไมซิน	เตตราไซคลิน
๑	R	S	S	R	R
๒	R	S	S	R	R
๓	R	S	S	R	I
๔	R	S	S	R	R
๕	R	S	I	R	R
๖	R	S	S	R	R
๗	R	S	S	R	I
๘	R	S	S	I	R
๙	R	S	S	I	R
๑๐	R	S	S	I	R
๑๑	R	S	S	R	R
๑๒	R	S	I	R	R
๑๓	R	S	I	R	R
๑๔	R	S	S	R	R
๑๕	R	S	S	R	R

R หมายถึง resistant

S หมายถึง sensitive

I หมายถึง intermediate

616.014
00393 ว ๒๕๕๑
ฉ.๒

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากตารางที่ ๗ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากกุ้งจะดื้อต่อยาเพนนิซิลินได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ เตตราไซลินและเจนตาไมซินตามลำดับ ส่วนกานาไมซินจะทำลายเชื้อได้ดีที่สุด

ตารางที่ ๘ แสดงผลของยาปฏิชีวนะต่อการเจริญของ V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากหมึก

No	ยาปฏิชีวนะ				
	เพนนิซิลิน	กานาไมซิน	นีโอไมซิน	เจนตาไมซิน	เตตราไซคลิน
๑	R	S	S	R	R
๒	R	S	S	R	S
๓	R	S	S	R	R
๔	R	S	S	I	R
๕	R	I	S	I	I
๖	R	S	I	R	R
๗	R	S	S	R	R
๘	R	S	S	R	R
๙	R	S	S	R	R
๑๐	R	S	I	R	I
๑๑	R	S	I	R	S
๑๒	R	S	S	R	R
๑๓	R	S	S	R	R
๑๔	R	S	S	I	R
๑๕	R	S	I	R	R

จากตารางที่ ๘ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากหมึกจะดื้อต่อยาเพนนิซิลินได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ เจนตาไมซินและเตตราไซคลินตามลำดับ ส่วนกานาไมซินจะทำลายเชื้อได้ดีที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ ๙ แสดงผลของยาปฏิชีวนะต่อการเจริญของ V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากหอยแมลงภู่

No	ยาปฏิชีวนะ				
	เพนนิซิลิน	กานาไมซิน	นีโอไมซิน	เจนตาไมซิน	เตตราไซคลิน
๑	R	S	S	R	S
๒	R	S	I	R	I
๓	R	S	I	R	I
๔	R	S	I	R	R
๕	R	I	I	R	R
๖	S	S	S	I	R
๗	R	S	S	I	R
๘	R	S	S	S	I
๙	I	S	S	R	R
๑๐	R	S	R	R	R
๑๑	R	S	S	R	R
๑๒	R	S	S	I	R
๑๓	R	S	S	R	R
๑๔	R	I	I	S	S
๑๕	R	I	S	R	R

จากตารางที่ ๙ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus ที่แยกได้หอยแมลงภู่จะดื้อต่อยาเพนนิซิลินได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ เตตราไซคลินและเจนตาไมซินตามลำดับ ส่วนกานาไมซินจะทำลายเชื้อได้ดีที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ ๑๐ แสดงผลของยาปฏิชีวนะต่อการเจริญของ V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากหอยนางรม

No	ยาปฏิชีวนะ				
	เพนนิซิลิน	กานาไมซิน	นีโอไมซิน	เจนตาไมซิน	เตตราไซคลิน
๑	R	S	I	I	R
๒	R	S	I	R	R
๓	R	S	S	I	R
๔	R	S	S	R	R
๕	R	S	S	R	I
๖	R	I	S	R	I
๗	R	I	S	R	I
๘	R	S	I	I	I
๙	R	S	S	R	R
๑๐	R	S	S	R	R
๑๑	R	I	I	R	R
๑๒	R	S	S	R	R
๑๓	R	S	S	R	R
๑๔	R	S	S	I	R
๑๕	R	S	S	I	R

จากตารางที่ ๑๐ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากหอยนางรมจะดื้อต่อยาเพนนิซิลินได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ เตตราไซคลินและเจนตาไมซิน ตามลำดับ ส่วนกานาไมซินจะทำลายเชื้อได้ที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๔. การทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาของ V.parahamolyticus ที่พบในอาหารสดจากทะเล ดังแสดงในตารางที่ ๑๑

ตารางที่ ๑๑ แสดง serotype ของ V.parahaemolyticus ที่พบในอาหารสดจากทะเล

ชนิดของอาหารทะเลสด	serotype
กุ้ง	O1 : K56, O3 : K58 O4 : K4 , O4 : K55 O5 : K15,
หมึก	O1 : K38, O5 : K29, O5 : K untypable, O untypable : K29
หอยแมลงภู่	O1 : K56, O5 : K15

จากการนำ V.parahaemolyticus ไปวิเคราะห์หา Kanagawa hemolysin หรือ β-hemolysin พบว่าเชื้อนี้บางสายพันธุ์จะให้ผล Kanagawa positive อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ ๑๒

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ ๑๒ แสดง Kanagawa haemolysin ของ V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากอาหารทะเลสด

ชนิดของอาหารทะเล	จำนวนเชื้อที่วิเคราะห์	Kanagawa positive	ร้อยละ
กุ้ง	๓๓	๑๓	๓๙.๓๙
หมึก	๓๖	๗	๑๙.๔๔
หอยแมลงภู่	๑๑	๓	๒๗.๒๗
รวม	๘๐	๒๓	๒๘.๗๕

จากตารางที่ ๑๒ แสดงให้เห็นว่า V.parahaemolyticus จากกุ้งจะแสดงคุณสมบัติเป็น Kanagawa positive มากที่สุด รองลงมาได้แก่หอยแมลงภู่และหมึกตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่าอาหารทะเลสดชนิดต่าง ๆ ที่นำมาศึกษา จำนวน ๙๑๖ ตัวอย่าง จะพบเชื้อ V. parahaemolytcus ทั้งสิ้น ๓๐๑ ตัวอย่างหรือประมาณ ๓๒.๘๖ เปอร์เซนต์ ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้จะพบ V.parahaemolyticus ในอาหารทะเลประเภทหอยแมลงภู่มากที่สุด รองลงมาได้แก่กุ้ง หอยนางรมและหมึกตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นเช่นกัน (๒๒, ๒๘, ๕๙, ๖๕) สำหรับช่วงระยะเวลาที่พบเชื้อแพร่ระบาดนั้น จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างสัตว์ทะเลที่นำมาศึกษาจะพบเชื้อมากในเดือนเมษายนและพฤษภาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อนจากนั้นเชื้อจะเริ่มมีปริมาณลดลงน้อยที่สุดในเดือน ธันวาคมและมกราคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว การทดลองนี้ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Kanebo และ Colwell (37) และ Word (68) ที่พบว่า V.parahaemolyticus มีแพร่ระบาดมากในฤดูร้อนและลดต่ำลงในฤดูหนาว ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่าการแพร่กระจายของเชื้อมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล กล่าวคือ ในช่วงฤดูหนาวอุณหภูมิของน้ำทะเลประมาณ ๕ องศาเซลเซียส (๓๙) ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวนี้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้น V.parahaemolyticus จึงตกตะกอน (๔๕,๕๙) ซึ่งการตกตะกอนนี้เป็นระยะปรับตัวเพื่อการอยู่รอดในช่วงฤดูหนาวเท่านั้น (๓๙) ต่อมาเชื้อจะหลุดจากตะกอนและแพร่กระจายเข้าสู่แพลงตันสัตว์ เช่น copepod ในช่วงปลายฤดูใบไม้ผลิหรือต้นฤดูร้อน ระยะนี้น้ำมีอุณหภูมิ ๑๙ - ๒๐ องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้ (๓๘,๕๙) นอกจากนี้ยังพบ V.parahaemolyticus ในแพลงตันพืชอีกด้วยเช่นกัน โดยเป็นพวกไดอะตอมชนิดต่าง ๆ คือ Nitzschia, Navicula, Coscinodiscus และ Thalassiosira (๖๐) แต่มีรายงานว่าเชื้อนี้จะพบในแพลงตันสัตว์มากกว่าพืช ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถในการดูดซับเชื้อของแพลงตันสัตว์ดีกว่าแพลงตันพืช เพราะมีพื้นที่ผิวในการดูดซับได้ดีกว่า จึงพบเชื้อมากกว่าด้วย (๓๙) และเชื้อ V.parahaemolyticus สามารถเจริญและทวีจำนวนในแพลงตันเหล่านี้อย่างรวดเร็ว (๓๘) เมื่อสัตว์ทะเล เช่น หอย หมึก กุ้ง ฯลฯ กินแพลงตันที่มีเชื้อเข้าไปทำให้เชื้อแพร่เข้าสู่สัตว์นั้นด้วย (๕๙) หรือเชื้ออาจปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายจากแพลงตันสัตว์จึงแพร่กระจายในน้ำทะเลและเข้าสู่แพลงตันหรือสัตว์ทะเลอื่น ๆ ได้เช่นกัน (๓๘) มีรายงานว่าในน้ำทะเลโดยทั่วไปมี V. parahaemolyticus น้อยกว่า ๑๐ เซลต่อมิลลิลิตร (๕๙) และ

เชื้อจะทวีจำนวนในน้ำทะเลได้ช้ามาก (๓๗) ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำลดลงในช่วงฤดูหนาว จึงไม่พบเชื้อในน้ำทะเลในช่วงต้นเดือนธันวาคม แต่เชื้อยังคงมีพบในแพลงตันบ้างเล็กน้อย แต่หลังจากนี้เป็นต้นมาจนหมดช่วงฤดูหนาว จะไม่พบเชื้อในแพลงตันเลย (๓๘) การที่มีพบเชื้อแพร่กระจายอยู่ในสัตว์ทะเล แพลงตันและตะกอนนั้นเป็นการหมุนเวียนเปลี่ยนแปลงที่ทำให้ V.parahaemolyticus สามารถมีต่อเนื่องอยู่ได้ตลอดปีนั่นเอง

สำหรับตัวอย่างอาหารทะเลสดในเขตบางแสนและบริเวณใกล้เคียงที่นำมาวิเคราะห์โดยพบ V.parahaemolyticus ดังกล่าวมาแล้วนี้ แสดงให้เห็นว่าทะเลบริเวณนี้มีการแพร่กระจายของเชื้อเกิดขึ้นและเมื่อนำเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาจะให้ปฏิกิริยา agglutination กับ V.parahaemolyticus เป็นส่วนใหญ่ (ยกเว้นพวกที่เป็น untypable) นั่นคือเชื้อสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีขึ้นต่อต้านได้ จากการทดสอบ Kanagawa hemolysin หรือ β-hemolysin พบว่าส่วนใหญ่จะเป็น Kanagawa negative แต่มีบางชนิดเป็น Kanagawa positive ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sakazaki,และเพื่อนร่วมงาน (๕๒) Barrow และ Miller (๑๘) และ Wagatsuma (๖๖) ที่พบว่า V.parahaemolyticus ที่ได้จากตัวอย่างอาหารทะเลจะเป็น Kanagawa positive เช่นกัน โดยทั่วไปแล้วเชื้อสายพันธุ์นี้จะพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วงหรือกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ การที่มีพบในตัวอย่างสัตว์ทะเลนั้นอาจเนื่องจากว่าเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น Kanagawa positive มีแพร่ระบาดอยู่ก่อนในน้ำทะเล ซึ่งอาจจะเกิดจากการเข้าปะปนของเชื้อจากบุคคลที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะนำโรคทั้งทางตรงและทางอ้อม แต่มีจำนวนน้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น Kanagawa negative (๑๘) สำหรับเชื้อสายพันธุ์ Kanagawa positive นั้น เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะทำให้เกิดการติดเชื้อที่บริเวณเซลเยื่อบุบริเวณผนังลำไส้, สร้าง β-hemolysin ทำลายเม็ดเลือดแดงและสร้างสารพิษทั้ง enterotoxin และ endotoxin ทำให้เกิดโรคได้ (๗,๕๔) มีรายงานว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วงจาก V.parahaemolyticus จำนวน ๕๙ ราย จะพบเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น Kanagawa negative ๑๐ serotype และเมื่อนำไปฉีดให้กับ อาสาสมัครพบว่าทำให้เกิดโรคได้เช่นเดียวกันเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น Kanagawa positive (๕๖) แสดงให้เห็นว่า V. parahaemolyticusที่แยกได้จากอาหารทะเลสามารถทำให้เกิดโรคต่อมนุษย์ได้เช่นเดียวกัน สำหรับการปรับตัวเพื่อให้ดำรงชีวิตในลำไส้มนุษย์ได้นั้นพบว่า ตามปกติเซลในร่างกายมนุษย์จะสร้าง superoxide radicle และ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ขึ้นมา สารนี้มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อ V.parahaemolyticus และแบคทีเรียอื่น ๆ แต่การที่เชื้อสามารถเจริญอยู่ได้นั้น เนื่องจากสามารถสร้าง เอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase มาทำลาย superoxide radicle และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อสูญเสียไปด้วย (๒๖,๓๔) เอนไซม์ดังกล่าวนี้ V.parahaemolyticus จะสร้างเป็นจำนวนมากในขณะเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนและจะลดต่ำลงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทั้งนี้เพราะออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้นการสร้างเอนไซม์นั่นเอง แสดงให้เห็นว่าการสร้างเอนไซม์นี้ของเชื้อก็เพื่อทำให้เกิดโรคได้ดีขึ้น และเป็นการปรับตัวให้สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจน (๒๔)

ส่วนการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะนั้นพบว่า V.parahaemolyticus จากตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้นั้นจะดื้อต่อยา เพนนิซิลินมากที่สุด รองลงมาได้แก่ เตตราไซคลินและเจนตาไมซิน ตามลำดับ ส่วนกานาไมซินจะทำลายเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่นีโอไมซิน ซึ่งการทดลองนี้ได้ผลใกล้เคียงกับรายงานของ Sizemore (๕๓) ที่พบ V.parahaemolyticus ที่แยกได้จากสัตว์ทะเลในอ่าว chesapeake จะดื้อต่อ เตตราไซคลิน สเตรพโตไมซินและคลอแรมฟีนิคอลมากที่สุด และจำนวนเชื้อที่ดื้อยาจะสูงมากในบริเวณของอ่าวที่เกิดมลภาวะหรือบริเวณใกล้ ๆ ฝั่งและตามท่าเรือต่าง ๆ การที่ V.parahaemolyticus ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้นั้นเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเซลหลายอย่างด้วยกัน โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงด้านสารพันธุกรรม (๓๑) ซึ่งจะเกิดขึ้นที่โครโมโซมหรือสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม (๔๐) การดื้อยาที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่โครโมโซมนั้นจะเนื่องมาจากการผ่าเหล่าโดยเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสของ DNA เป็นผลให้ DNA มีลำดับเบสผิดปกติไป (๒๕) ในธรรมชาติการดื้อยาในลักษณะนี้จะเกิดอย่างช้า ๆ และเกิดขึ้นเอง (spontaneous) สามารถถ่ายทอดไปสู่เชื้อในรุ่นต่อๆ ไปได้ (๓๑) สำหรับกลไกในการดื้อยานั้นอาจเกิดได้หลาย ๆ อย่าง เช่น การดื้อต่อเตตราไซคลินเกิดจากยีนส์ที่ควบคุมการดื้อยาไปเร่งให้เซลสร้างโปรตีนที่มีความเฉพาะมาจับกับหน่วยย่อย ๓๐S ของไรโบโซม ทำให้เตตราไซคลินไม่สามารถเข้าจับเกาะได้ เชื้อจึงเจริญได้ตามปกติ (๓๑) สำหรับการดื้อยา ที่เกิดจากสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมนั้นเกิดจาก plasmid เป็นสำคัญ มีรายงานว่าการดื้อยาของ V.parahaemolyticus เกิดเนื่องจากมี plasmid นั่นเอง (๔๓) ซึ่ง plasmid ที่สำคัญคือ R-factor โดยที่ R-factor มีส่วนประกอบ ๒ ส่วน คือ

ยีนส์ภูมิดื้อยา (resistance determinant) และปัจจัยถ่ายทอดการดื้อยา (resistance transfer factor) มีหน้าที่ควบคุมการจำลองตัวเองของ R-factor และควบคุมการถ่ายทอด R-factor โดยวิธี conjugation ระหว่างแบคทีเรียทั้งสองเซล (๖๙) การดื้อยาในลักษณะนี้มักจะเกิดในที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะค่อนข้างสูง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก R-factor จะกระตุ้นให้เซลสร้างเอนไซม์หลายชนิดขึ้นทำลายยา เช่น β-lactamase ทำลายเพนนิซิลิน, streptomycin phosphotransferase ทำลายสเตรปโตไมซิน และ gentamycin adenylate synthetase ทำลายเจนตาไมซิน (๒๕) นอกจากนี้มีรายงานว่า R-factor ยังอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่โครงสร้างของเซลเป็นผลให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลได้อีกด้วย (๙) เซลจึงเจริญได้ตามปกติส่วนกานาไมซินและนีโอไมซินที่ทำลายเชื้อได้ดีนั้นเนื่องจากจะไปจับกับหน่วยย่อย ๓๐S ของไรโบโซม จึงขัดขวางการจับของ aminoacyl-t RNA บน mRNA เซลไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้จึงตายในที่สุด (๑๗)

เนื่องจากตัวอย่างอาหารสดจากทะเลที่นำมาวิเคราะห์นี้ ได้มาจากอาหารที่ประชาชนทั่วไปจะต้องนำมาบริโภค ส่วนใหญ่ยังมิได้ผ่านกรรมวิธีทำความสะอาดอย่างดีพอ ประกอบกับการจัดเตรียมอาหารเหล่านี้เพื่อรับประทานจะมุ่งเน้นในด้านรสชาติเป็นสำคัญ โดยมิได้คำนึงถึงความสุกดิบเท่าที่ควร จึงอาจทำให้มีเชื้อ V.parahaemolyticus ปะปนเข้าสู่ร่างกายและเกิดโรคได้ ถ้าหากเชื้อที่ได้รับดื้อต่อยาปฏิชีวนะจะยากต่อการรักษา ขณะเดียวกันผู้ป่วยจะเป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อไปสู่บุคคลอื่น ๆ อีกด้วย มีรายงานว่าหอยนางรมที่มี V.parahaemolyticus อยู่ด้วยนั้น เชื้อจะมีชีวิตอยู่นาน ๒-๓ วัน ในที่อุณหภูมิ ๓๕ องศาเซลเซียส (๓๕) ดังนั้นผู้ที่รับประทานหอยนางรมสด จึงอาจได้รับเชื้อนี้เข้าไปด้วย สำหรับอาหารทะเลที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำนั้นไม่สามารถทำลายเชื้อได้หมด แต่จะทำให้เชื้อมีปริมาณลดน้อยลงโดยเฉพาะถ้าหากไม่มีโซเดียมคลอไรด์อยู่ด้วยแล้ว เชื้อจะมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว (๒๑) นอกจากนี้ขบวนการปรุงอาหารยังช่วยลดปริมาณเชื้อลงอีกด้วย (๕๘) เช่น เชื้อที่อยู่บริเวณผิวนอกจะถูกน้ำชะล้างออกไปหรือเชื้อที่อยู่บริเวณลำไส้และระบบทางเดินอาหารจะถูกแยกทิ้งไป ในอาหารที่มีเครื่องเทศหรือผลิตภัณฑ์ของเครื่องเทศบางชนิดอยู่ด้วยจะสามารถยับยั้งการเจริญของ V. parahaemolyitcus ได้โดยเฉพาะอาหารที่มีหัวหอมในสภาพที่เป็นผง (๑๕) หรือน้ำสกัดจากหัวหอม (๔๕) หรือน้ำมะนาว (๒๐) หรือกานพลู (๔) แต่ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจะเร็วหรือช้า

ขึ้นอยู่กับอำนาจการแทรกซึมของสารประกอบในเครื่องเทศเข้าสู่อาหารทะเลที่มีเชื้อ เช่น ถ้าหากมีเชื้ออยู่บริเวณผิวลำตัวของสัตว์ทะเล จะทำลายได้รวดเร็วกว่าเชื้อที่อยู่ในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ (๒๐) เนื่องจากประชากรไทยนิยมใช้เครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศดังกล่าวนี้ประกอบอาหารกันมาก ดังนั้นจึงช่วยให้อาหารทะเลที่รับประทานมีเชื้อลดน้อยลงหรือถูกทำลายได้หมด จึงปลอดภัยในการบริโภคมากยิ่งขึ้น

การทำลายเชื้อด้วยอุณหภูมิสูงนั้นมีรายงานว่า V.parahaemolyticus ถูกทำลายที่อุณหภูมิ ๕๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาทีหรือที่ ๖๐ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที (๑๓) หรือที่ ๗๕ องศาเซลเซียสนาน ๑ นาที (๔๑) หรือที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียส นาน ๒๐ วินาทีถึง ๑ นาที (๒๐,๖๕) แสดงให้เห็นว่าความร้อนจากการหุงต้มสามารถทำลายเชื้อนี้ได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ดังนั้นจึงควรได้มีการแนะนำให้ประชาชนได้มีการรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงสุกอยู่เสมอจะช่วยให้ปลอดภัยจากเชื้อนี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจะมีอัตราการเข้าปะปนในระดับสูง จึงมักพบในอาหารทะเลที่ปรุงสำเร็จแล้วอยู่เสมอ เช่น หอยแครงลวก ปูนึ่ง ปลาเผา ฯลฯ (๒) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงที่พบระบาดมากใน สหรัฐอเมริกา (๕๒) ดังนั้นจึงควรระมัดระวังการเข้าปะปนของเชื้อจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งทางตรงและทางอ้อมไปสู่อาหารสำเร็จรูปอันจะช่วยให้การบริโภคอาหารทะเลปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

๑. ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาเฉพาะการแพร่กระจายของ V.parahaemolyticus ในสัตว์ทะเลที่ได้จากท่าเรือประมงในจังหวัดชลบุรีเท่านั้น จึงควรจะได้มีการศึกษาในลักษณะเดียวกันนี้จากแหล่งอื่น ๆ ในแถบภาคตะวันออกเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง

๒. ควรศึกษา V.parahaemolyticus จากอาหารทะเลที่ปรุงสำเร็จและมีจำหน่ายบริเวณชายหาดบางแสนและพัทยา จะได้นำข้อมูลไปใช้ปรับปรุงคุณภาพของอาหารให้ดีขึ้นเพื่อความปลอดภัยของนักท่องเที่ยว

๓. ควรศึกษาปรากฏการณ์ดื้อยา V.parahaemolyticus ต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม เพื่อจะได้ทราบสภาวะการแพร่ระบาดของเชื้อที่ดื้อยา ซึ่งจะสะท้อนให้เห็นถึงสภาพการใช้ยาปฏิชีวนะในภูมิภาคนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หนังสืออ้างอิง

๑. กรรณิการ์ วิสุทธิวรรณและคณะ ๒๕๒๐ Vibrio parahaemolyticus ในอาหารทะเล วารสารเภสัชศาสตร์ ๔: ๕๕ - ๖๐

๒. จวงจันทร์ สุเมธากุลวัฒน์และคณะ ๒๕๒๑ การสำรวจหาเชื้อ Vibrio parahaemolyticus ในอาหารทะเลที่ปรุงสำเร็จ วารสารเภสัชศาสตร์ ๕ : ๑๑๑-๑๑๔

๓. นิพนธ์ อุตมสันติสุขและคณะ ๒๕๑๙ การระบาดของโรคท้องร่วงจากเชื้อ Vibrio parahaemolyticus จุฬาลงกรณ์เวชสาร ๒๐ : ๒๐๙ - ๒๑๑

๔. บัญญัติ สุขศรีงาม ๒๕๑๘ ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการเจริญของจุลินทรีย์ วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ๑๐๙ หน้า

๕. บัญญัติ สุขศรีงามและพิไลพรรณ พงษ์พูล ๒๕๒๑ การสำรวจเชื้อ Vibrio parahaemolyticus ในอาหารสดจากทะเล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน ๒๒ หน้า

๖. ประกอบ บุญไทยและคณะ ๒๕๑๖ การศึกษาระบาดวิทยาของโรคท้องร่วงจากเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัสที่สัมพันธ์กับการบริโภคอาหารทะเลบางชนิด วารสารกรมการแพทย์และอนามัย ๑ : ๒๘๗ - ๓๑๑

๗. ปานจิตต์ เอกะจัมปกะและคณะ ๒๕๑๕ การสำรวจเชื้อลำไส้ในอาหารชนิดต่าง ๆ จากร้านอาหารในเขตเทศบาลนครหลวง (กรุงเทพ) ปี ๒๕๑๔ วารสารวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๑๔ : ๕ - ๑๘

๘. ปราณี ศรีสมบูรณ์ ๒๕๑๙ Vibrio parahaemolyticus ในอาหารทะเล วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๑๘ : ๑๓ - ๑๙

๙. พิไลพรรณ พงษ์พูลและบัญญัติ สุขศรีงาม ๒๕๒๑ จุลชีววิทยาเล่ม ๑ สำนักพิมพ์โอเดียนบุคสโตร์, กรุงเทพมหานคร, ๔๑๒ หน้า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๑๐. สุมณฑา วัฒนสิทธิ์และคณะ ๒๕๑๘ รายงานการสำรวจลักษณะของอาหารจากครัวสายการบินระหว่างประเทศและภัต ราคาร ณ ท่าอากาศยานกรุงเทพ วิทยาศาสตร์การอาหาร ๘ : ๓๕ - ๔๙

๑๑. Baross, J. and J. Liston 1968 Isolation of V.parahaemolyticus from the Northwest Pacific Nature 217 : 1263 - 1264

๑๒. Baross, J. and J. Liston 1970 Occurrence of Vibrio parahaemolyticus and reated hemolytic vibrios in marine environments of Washington States Applied Microbiology 20 : 179 - 186

๑๓. Beuchat, L. R. 1973 Interacting Effects of pH, Temperature and Salt Concentration on Growth and Survival of Vibrio parahaemolyticus Applied Microbiology 25:844 - 846

๑๔. Beuchat, L.R. 1974 Combined effects of Water activity, solute and temperature on the growth of Vibrio parahaemolyticus Applied Microbiology 27 : 1,075

๑๕. Beuchat, L.R. 1976 Sensitivity of Vibrio parahaemolyticus to species and organic acids J. of Food Science 41 : 899 - 902

๑๖. Buchanan, R.E. and W.E. Ogbbons 1974 Bergey's manual of Determinative Bacteriolygy The William Wilkins Company, Baltimore, 1,268 pp

๑๗. Burrows, Williams 1973 Textbook of Microbiology W.B. Saunder Company, Philadelphia, 1,035 pp.

๑๘. Burrow G.I. and D.C. Miller 1974 Growth studies on Vibrio parahaemolyticus in relation to pathogenicity International Symposium on Vibrio parahaemolyticus, Saikon, Publishing Co., Tokyo.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๒๙. Clair, R.A.L. et al 1970 Isolation and Identification of Vibrio parahaemolyticus from Clinical Specimen J.of Conference of Public Health Laboratory Directors 28 : 82 - 92

๓๐. Chanpen, Wiwat and Udom Lexomboon 2518 Survival of Vibrio parahaemolyticus in seafood วารสารเภสัชศาสตร์ 2 : 130 - 140

๓๑. Convert D.and M. Woodburn 1972 Relation ship of temparature and NaCl concentration of the survival of Vibrio parahaemolyticus in broth and fish homogenate Applied Microbiology 23 : 321

๓๒. Chun, D. et at 1967 Isolation of Vibrio parahaemolyticus in Korea Korean Modern Med. 6 : 105

๓๓. Chun, D. 1974 Vibrio parahaemolyticus in the Repuclic of Korea Ann. J. Tropical Med. Hygiene 23 : 1125

๓๔. Daily, Otis P. 1978 Superoxide Dismutase and Catalase level in halophilic Vibrio J. of Bacteriology 134 : 375 - 380

๓๕. Davis, Bernard D. et al 1973 Microbiology Harper + Row. New York, 1,562 pp.

๓๖. De Chatelet, L.A. et al 1975 Bactericidal activity of super - oxide anion and of hydrogen peroxide : investigations employing dialuric acid, a superoxide - generating drug . Antimicrob, Agents Chemother. 8 : 146 - 153

๓๗. Fishbein, Morris et al 1970 Isolation of Vibrio parahaemolyticus from the Processed Meat of Chesapeake Bay Blue Crabs Applied Microbiology 20 : 176 - 178

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๒๘. Fishbein, Morris and Barry Wentz 1973 Vibrio parahaemolyticus methodology for isolation from seafoods and epidermic specimens J. Milk Food Technology 36 : 118 - 123

๒๙. Fujino, T. et al 1953 On the bacteriological examination of shirasu food poisoning Med. J. Osaka Univ. 4 : 299 - 304

๓๐. Haddock, Robert L. 1979 Vibrio parahaemolyticus Food Poisoning incidents in the territory of Guam, U.S.A J. of Environmental Health 41 : 329 - 330

๓๑. Jawets, Ernest et al 1974 Review of Medical Microbiology Lange Medical Puplication, California , 528 pp.

๓๒. Johnson, David E 1976 Pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus Dissertation Abstracts International 37 : 2675 B-2676 B

๓๓. Johnson,Howard C. and J. Liston 1973 Sensitivity of Vibrio parahaemolyticus ot cold in oysters, fish fillets and crabmeat J. of Food Science 38 : 437 - 441

๓๔. Johnson R.B. et al 1975 The role of superoxide bactericidal activity:Studies with normal and chronic granulomotous disease leukocytes J. Clin Invest. 55 : 1375 - 1372

๓๕ Johnson, W.G. et al 1973 Survival of Vibrio parahaemolyticus in oyster shellstock at two different storage temperature Applied Microbiology 26 : 122

๓๖. Kampelmacher, E.H. and L.N. Jansen 1972 A surrey of the occur - rence of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus on mussels and oysters and in estuarine water in the Netherlands J.Applied Bacteriology 35 : 431 - 438

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๓๗. Kaneko, T. and R. Colwell 1973 Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay J. of Bacteriology 113 :24 - 32

๓๘. Kaneko, Tatsuo 1978 Ecology of Vibrio parahaemolyticus Dissertation Abstract International 38 : 4069 B

๓๙. Kaneko, T. and R. Colwell 1975 Adsorption Vibrio parahaemolyticus onto chitin and copepeds Applied Microbiology 29 : 269

๔๐. Lacey, R.W 1975 Antibiotic resistance plasmid of Staphylococcus aureus and their clinical importance Bactereological Review 39 : 1

๔๑. Mazur. P. 1966 Physical and Chemical basis of injury in single celled microorgamisms subjected to freezing and thawing Academic Press p. 213

๔๒. M'c, Minn, M.t. et al 1972 Vibrio parahaemolyticus in Thailand SAETO Annual Report 167 - 175

๔๓. Miyamoto, Y.K. et al 1961 Pathogenic halophils Proposals of a new genus "Oceanomonas" and of the amemded species names Jap. J. Microbiology 5 : 477 - 486

๔๔. Miyamoto, Y.K. Nakamura and K. Takizawa 1962 Seasonal distribution of Oceanomonas spp. halophilic bacteria in the coastal sea. Its significance in epidemiology and marine inductry Jap.J.Microbiololgy 6 : 141 - 158

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๔๔. Noguchi M. and Y. Asakawa 1967 The Distribution of Vibrio parahaemolyticus in the natural environment In T. Fujino and H. Fukumi Nayashotem Tokyo, Japan., p 263 - 277

๔๖. Omori, G.H. et al 1966 Studies on K-antigen of Vibrio parahaemoluticus I. Isolation and purification of K-antigen from V. parahaemolyticus A 55 and some of its biological properties Biken J. 9 : 33-43

๔๗. Pasomore, Susan 1979 Bacterial Food Poisoning Nutrition and Food Science 56 : 7 - 11

๔๘. Peffers, A. et al 1973 Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis and international air trave Lancet 1 : 143 - 145

๔๙. Ro, Sookja and Margy Woodburn 1978 Survival of Vibrio parahaemolyticus in Korean - Style Salted Oysters J. of Food Science 41 : 1033 - 1035

๕๐. Sakazaki, R. 1965 Vibrio parahaemolyticus a noncholeragenic enteropathogenic vibrio.proceedings of Cholera Research Symposium V.S.D.H.E.W. 30-34

๕๑. Sakazaki, R. et al 1963 studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria. Vibrio parahaemolyticus I. Morchemical, Culturalits tasaonomical position Jap. J. Med, Sci Biol 16 : 161 - 188

๕๒. Sakazaki, R. et al 1968 Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria , Vibrio parahaemolyticus III. Enteropathogenicity Jap. J. Med.Sci.Biol.21 : 325 - 331

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๔๓. Sizemore, Ronald K. 1976 A Study of plasmids isolated from antibiotic resistant marine bacteria. Dissertation Abstracts International 36 : 4869 B

๔๔. Slack, John M. and Irvin S. Synder 1978 Bacteria and Human Disease Year Book Medical Publishers, Chicago, 484 pp

๔๕. Temmyo, R. 1966 Studies on the prev ention of outbreak of food poisoning caused by Vibrio parahaemolyticus .Bull Tokyo Med.Dent Univ. 13:489

๔๖. Teramoto, T et al 1971 On the case of food poisoning caused by presumptive Kanagawa phenomenon negative strain Media Circle 16 : 174

๔๗. Thompson, C.A. and C. Vanderzant 1976 Serological and Hemolytic of Vibrio parahaemolyticus from marine sources J. of Food Science 41 : 204 - 205

๔๘. Thompson, C.A. and C Vanderzant 1976 Effect of processing distribrtion and storage on Vibrio parahaemolyticus and bacterial count oysters (Crassostrea virginica) J. of Food Science

๔๙. Thompson, C.A. et al 1976 Relationship of Vibrio parahaemolyticus in oysters water and sediment and bacteriological and evironmental indicis J. of Food Science 41 : 117

๕๐. Thompson, C. A. and C. Vanderzant 1976 Zooplankton and Phytoplankton from Galveston Bay : Taxonomic,distribution and Coexistanee with Vibrio parahaemolyticus J. of Food Science 41:725-727

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๖๑. Torii, M. et al 1969 Immunological studies on an antigen of Vibrio parahaemolyticus I. preparation, Specificty and Chemical nature of the antigens Biken J. 12 : 77 - 84

๖๒. Troller J.A. 1973 The Water relations of food borns bacterial pathogens J. Milk Food Technology 36 : 276

๖๓. Twedt, R.H. et al 1969 Morphological, cultural, biochemical and serological comparison of Japanese strains of Vibrio parahaemolyticus with related cultures isolated in the United States J. of Bacteriology 98 : 511 -518

๖๔. Vanderzant, C. and R. Nickelson 1970 Isolation of Vibrio parahaemolyticus from gulf coast shrimp J. Milk Food Technology 33 : 161 - 162

๖๕. Vanderzant, C. and R. Nickelson 1972 Survival of Vibrio parahaemolyticus, in shrimp Tissue Under various envirommental condition. Applied Microbiology 23 : 34 - 37

๖๖. Wagatsuma, S. 1974 Ecological studies on Kanagawa phenomenon positive stain of Vibrio parahaemolyticus. International Symposium on Vibrio parahaemolyticus, Saikon Publishing Co., Tokyo.

๖๗. Walter, Marion 1977 Enteropathogenicity of Vibrio parahaemolyticus Dissertation Abstracts International 37 : 5533 - B

๖๘. Ward, B. Q, 1968 Isolations of organisms related of Vibrio parahaemolyticus from American estuarine sediments Applied Microbiology 16 : 543 - 546

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

๖๙. Watanabe, T. 1967 Evolutionary Relationship of R-factor with other episome and Plasmid Federation Proceedings 26 : 23

๗๐. Zen-Yoji, H. et al 1970 Antigenic schema and epidemiology of Vibrio parahaemolyticus Health Lab Science 7:100

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University