



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินความเสี่ยงทางจุลชีววิทยาของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในกุ้งขาวเลี้ยง (*Penaeus vannamei*) ของไทย
Microbial Risk Assessment of *Vibrio vulnificus* in Thai
cultured shrimps (*Penaeus Vannamei*)

โดย

ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ

1 มกราคม 2561

สัญญาเลขที่ MRG5480137

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการประเมินความเสี่ยงทางจุลชีววิทยาของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในกุ้งขาวเลี้ยง (*Penaeus vannamei*) ของไทย
Microbial Risk Assessment of *Vibrio vulnificus* in Thai
cultured shrimps (*Penaeus Vannamei*)

ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480137

ชื่อโครงการ : การประเมินความเสี่ยงทางจุลชีววิทยาของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในกุ้งขาวเลี้ยง (*Penaeus vannamei*) ของไทย

ชื่อนักวิจัย : ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail Address : rattanaruji.p@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

Vibrio vulnificus เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงสุดใน foodborne disease และสามารถก่อภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 60% ภายใน 24 ชั่วโมง ในกลุ่มผู้ที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ประเทศไทยเป็นหนึ่งในผู้ส่งออกกุ้งแช่แข็งรายใหญ่ของโลก การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกุ้ง และ กุ้งแช่แข็งเป็นปัญหาของ ภาคเกษตร และ อุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งของชาติ โดย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในกุ้ง เลี้ยง ซึ่งส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน ของ *V. vulnificus* ตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการเลี้ยงกุ้ง จนถึง การขนส่งสู่โรงงาน และ จนถึง ผู้บริโภค โดยใช้วิธี most probable number (MPN) ร่วมกับการตรวจหา *Vibrio vulnificus hemolysin gene (vvhA)* โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) หลังจากนั้นนำข้อมูลไป วิเคราะห์ทางสถิติ ผลการแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำ ตะกอนดิน กุ้ง อาหารเลี้ยงกุ้ง ใน บ่อพัก บ่อเลี้ยง โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง การขนส่งสู่ตลาดและผู้บริโภค พบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 145 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 779 ตัวอย่าง คิดเป็น 18.6 % การหาความชุก ปริมาณของเชื้อ และความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* จะทำใน 3 ขั้นตอนคือ บ่อพัก บ่อเลี้ยง และโรงงานกุ้งแช่แข็ง ในบ่อพัก ค่าความชุกของการพบเชื้อ *V. vulnificus* สูงสุดอยู่ใน ระยะฟักตัวพันธุ์กุ้ง (25.0 %) โดยพบเชื้อ *V. vulnificus* เฉลี่ย 0.80 MPN/g และความน่าจะเป็น ในการพบเชื้อเท่ากับ 1 ในบ่อเลี้ยง ค่าความชุกสูงสุดในระยะบ่อดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือน (PE3) โดยพบ โดยพบเชื้อ *V. vulnificus* เฉลี่ย 0.53 MPN/gและความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ เท่ากันในทุกระยะ ซึ่งเท่ากับ 1 ในโรงงานกุ้งแช่แข็ง ค่าความชุกสูงสุดอยู่ในขั้นตอนแรกที่กุ้ง มาถึงโรงงาน (85.7 %) โดยพบเชื้อเฉลี่ย 2.78 MPN/g ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* เฉลี่ย จากผู้ผลิตถึงตลาด และ จากตลาดถึงผู้บริโภค มีค่าเท่ากับ 53.3% และ 43.3% ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยของเชื้อเท่ากับ 1.54 MPN/g และ 1.08 MPN/g ตามลำดับ การ

ประเมินความเสี่ยงของ *V. vulnificus* ในการบริโภคกุ้ง พบว่าหากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 4.2 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 4 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง หากบริโภคพล่ากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 4.2 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคพล่ากุ้ง 1 ครั้ง หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภคที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง และหากบริโภคพล่ากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภคที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน ไม่มีคนเกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคพล่ากุ้ง 1 ครั้ง การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นความน่าจะเป็น ความชุก และจำนวนของเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในกุ้ง ทุกขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่การเลี้ยง สุโรงงานกุ้งแช่แข็ง และสู่ผู้บริโภค การประเมินความเสี่ยงสามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวัง และควบคุมเชื้อเพื่อความปลอดภัยทางอาหารต่อไป

คำหลัก : *Vibrio vulnificus*, risk assesment, shrimp, MPN, PCR

Abstract

Project Code : MRG5480137

Project Title : Microbial Risk Assessment of *Vibrio vulnificus* in Thai cultured shrimps (*Penaeus Vannamei*)

Investigator : Dr. Rattanaarui Pomwised Prince of Songkla University

E-mail Address : rattanaarui.p@psu.ac.th

Project Period : 2 year

V. vulnificus is a natural inhabitant of estuarine water. *V. vulnificus* can infect human through wound infection and consumption of contaminated food especially contaminated seafood. The infection leads to septicemia with high mortality rate of 60% within few hours after infection in susceptible hosts, which is the highest fatality rate among foodborne pathogens. Thailand is the world's leading frozen shrimp exporters. Microbial contamination in shrimp and frozen shrimp is the serious problems of agriculture and food industry. The objectives of this research are to evaluate *V. vulnificus* present in shrimp cultivation in order to determine the origin of *V. vulnificus* that contaminate cultured shrimps from hatchery, pond, feed mill and harvest to factory and to consumers. The most probable number (MPN) method combined with the polymerase chain reaction (PCR) of *V. vulnificus* hemolysin gene (*vvhA*) was used to determine the prevalence concentrations and probability of *V. vulnificus* in order to assess the risk of *V. Vulnificus* infection in shrimp consumption. The result showed that *V. vulnificus* can be detected in 145 samples out of 779 samples (18.6%) from the environment, including water, food, sediment and shrimp (from food in hatchery, farms, factory, market and consumers). Prevalence, *V. vulnificus* concentration and probability were determined in 3 processes; hatcheries, shrimp farms and a shrimp-frozen factory. In hatcheries, highest prevalence was detected in broodstock (25.0%) with the average *V. vulnificus* concentration 0.80 MPN/g and the highest probability of *V. vulnificus* in hatchery equivalent to 1. In farms, highest prevalence was detected in harvest stage at 4.5 months culture (PE3) (34.1 %) with the average concentration 0.72 MPN/g The probability of *V. vulnificus* in farm was equivalent to 1 in every step of cultivation. In factory, highest prevalence was detected in shrimp of the first stage when shrimps

arrived the factory (85.7 %) with the average concentration 2.78 MPN/g Prevalence in markets and consumers was 53.3% and 43.3% with the average concentration 1.54 MPN/g and 1.08 MPN/g respectively. Quantitative microbial risk assessment of *V.vulnificus* in shrimp consumption was determined. Consumption of shrimp in fish sauce and in salad cooked from the frozen shrimps on the level of contamination of *V. vulnificus* 4.2 MPN / g. has a risk of illness 4 / 10,000 population / times and 1 / 10,000 population / times. Consumption of shrimp in fish sauce and in salad cooked from consumer on the level of contamination of *V. vulnificus* 1.08 MPN / g. has a risk of illness 1 / 10,000 population / times and 0 / 10,000 population / times. The results of the study reveal probability, prevalence and concentration of *V. vulnificus* contamination in each step of cultivation and factory processes from markets to customers. The models in this research can be applied in shrimp agriculture and frozen seafood industry in order to control *V. vulnificus* in the safety level

Keywords : *Vibrio vulnificus*, risk assesment, shrimp, MPN, PCR

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของโรคติดต่อทางอาหาร หรือ โรคอาหารเป็นพิษ (foodborne disease) ซึ่งเป็นผลมาจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ [Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)] และ องค์การอนามัยโลก [World Health Organization (WHO)] ได้ให้ความสำคัญเรื่องความปลอดภัยของอาหารที่ผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และส่งออกเพื่อการค้าระหว่างประเทศ ดังนั้น คณะกรรมาธิการเกณฑ์อาหาร [Codex Alimentarius Commission (CAC)] สร้างแนวทางปฏิบัติในการควบคุมความปลอดภัยของอาหาร โดยอาศัยการประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment) การจัดการความเสี่ยง (Risk Management) และ การสื่อสารความเสี่ยง (Risk Communication) โดย CAC จัด foodborne disease อยู่ในกลุ่ม อันตรายทางชีวภาพ (Biological Hazard)

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในผู้ส่งออกกุ้งแช่แข็งรายใหญ่ของโลก การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกุ้ง และ กุ้งแช่แข็งเป็นปัญหาของ ภาคเกษตร และ อุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งของชาติ เชื้อที่มักเกิดการปนเปื้อนคือ แบคทีเรียสกุล *Vibrio*

แบคทีเรียสกุล *Vibrio* ประกอบด้วยเชื้อประมาณ 69 สปีชีส์ เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในทะเล บริเวณชายฝั่ง ปากแม่น้ำ ในตะกอนดิน และพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก มีทั้งก่อโรคในคนและในสัตว์ สายพันธุ์ที่ก่อโรคในสัตว์ ได้แก่ *V. anguillarum* ก่อให้เกิดโรคในปลา และ *V. shiloi* ก่อโรคในประกัง สายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่พบบ่อยว่าทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่ปรุงไม่สุก หรือผ่านกระบวนการปรุงที่ไม่สะอาด ทำให้เกิดลำไส้อักเสบ การติดเชื้อทางบาดแผล และการติดเชื้อในกระแสโลหิต

V. vulnificus เป็นเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่งโค้ง มีแหล่งที่อยู่อาศัยในน้ำทะเล น้ำกร่อย ตะกอนใต้ทะเล แพลงตอนสัตว์และพืช และ สัตว์น้ำ (Thompson *et al.*, 2004) โดยเฉพาะหอย หอยนางรมถูกพบว่า เป็นแหล่งของเชื้อ (Kaysner *et al.*, 1989) แม้ว่าจะมีรายงาน อัตราการติดเชื้อ *V. vulnificus* ต่ำ เมื่อเทียบกับเชื้ออื่นใน Genus *Vibrio* แต่ *vulnificus* จัดเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงที่สุดใน foodborne disease (Todd, 1991) โดยสามารถก่อภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 60% ภายใน 24 ชั่วโมง ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ซึ่งได้แก่ ผู้ที่มีภาวะตับอักเสบเรื้อรัง ตับแข็ง ไวรัสตับอักเสบ และผู้ที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ (Linkous and Oliver, 1999)

WHO และ FAO ได้รายงานการประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยนางรม (Who/Fao, 2005) โดยอาศัย Risk Assessment Model ในการประเมินความเสี่ยง

ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอย (Fda, 2001) เป็นต้นแบบ การศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความกังวลของนานาชาติ ในเรื่องการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในอาหารทะเล เนื่องจาก กุ้ง เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศ ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงจึงมีความสำคัญที่ต้องนำมาใช้เพื่อยกระดับคุณภาพของกุ้งเลี้ยง โดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในกุ้งเลี้ยง ซึ่งส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการเลี้ยงกุ้ง จนถึงการขนส่งสู่โรงงาน และ จนถึงผู้บริโภค ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นแนวทางลดความเสี่ยงที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อน *V. vulnificus* ในการเลี้ยงกุ้ง ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลในการบริหารความเสี่ยงต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความชุกของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งเลี้ยงจากบ่อพัก บ่อเลี้ยง การขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง การขนส่งสู่ตลาด และ ผู้บริโภค
2. ศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งเลี้ยงจากบ่อพัก บ่อเลี้ยง การขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง การขนส่งสู่ตลาด และ ผู้บริโภค
3. ศึกษาความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งเลี้ยงจากบ่อพัก บ่อเลี้ยง
4. ประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสของเชื้อ *V. vulnificus* ในการบริโภคกุ้ง

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Agar	Difco
CHROMagar Vibrio	CHROM agar Microbiology
Luria Bertani (LB) broth	Novagen
Luria Bertani (LB) agar	Novagen
Nutrient broth (NB)	Difco
Peptone	Merck
Tryptic soy agar (TSA)	Novagen
Tryptic soy broth (TSB)	Novagen
Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS)	Difco

2.1.2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Ethidium bromide	Sigma
Glycerol	Sigma
Sodium chloride	LAB-SCAN
Sodium hydroxide	Sigma
Tris base	Promega

2.1.3 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

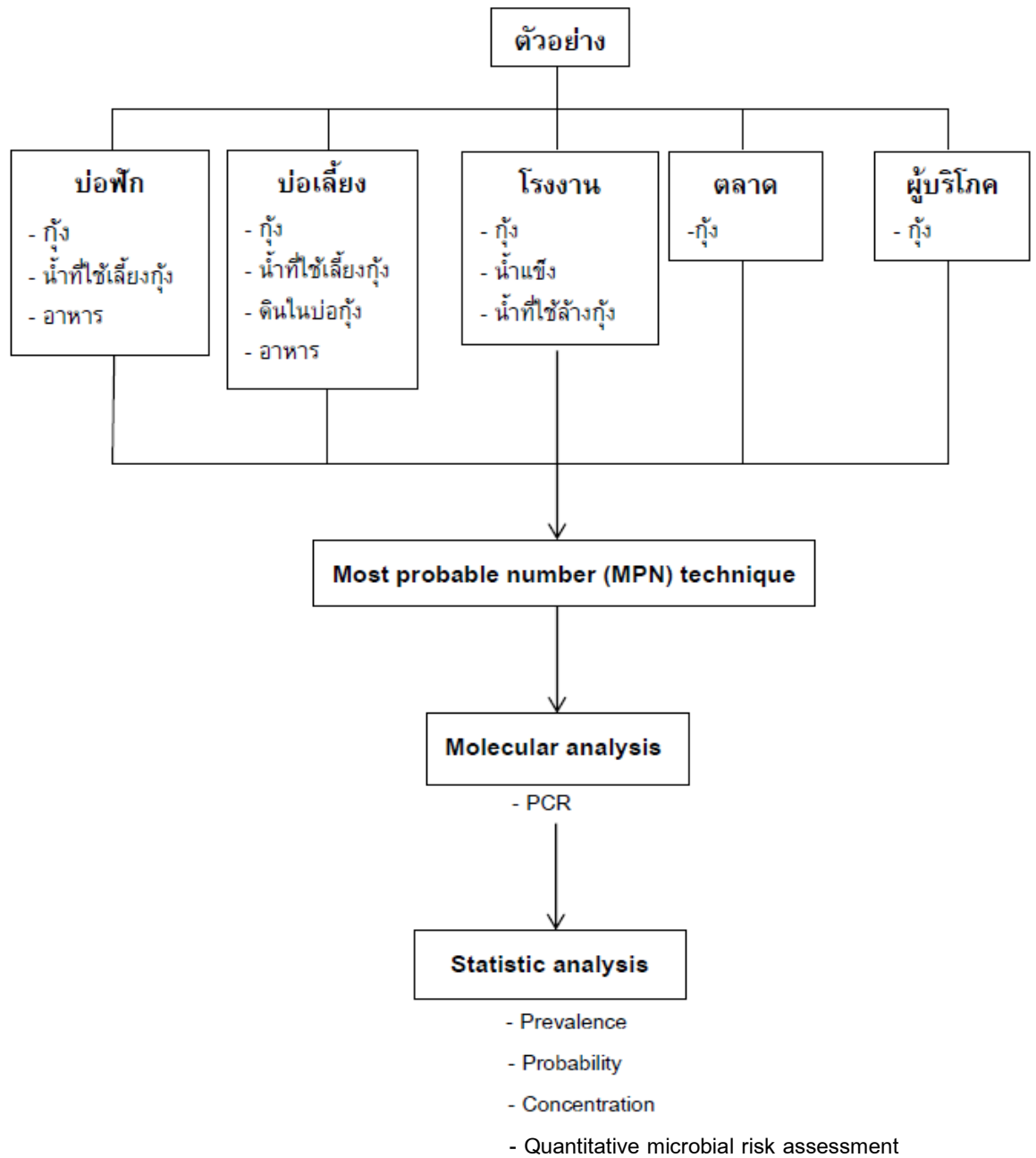
ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Agarose	Gibco
dNTP	Boehringer Mannheim 37
Taq DNA polymerase	Bioline,UK
Ex Taq polymerase	Takara

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด PCR ขนาด 1.5 ml
- Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 μ l (Gilson, France)
- ชุด Electrophoresis และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น 200/2.0 (Bio-Rad, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (MIKRO 22R, Germany)
- เครื่อง vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -20°C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็นแช่แข็ง 4°C (Sanyo, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaker incubator) (Labline Instrument Inc. , USA)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow carbinet) รุ่น ABS 1200A (ASTEC microflow, UK)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Metrohm, Switzerland)
- เครื่อง dry bath
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Perkin Elmer, UK และ ASTEC, Japan)
- เครื่อง Hot plate & Steirrer (Fisher Scientific, USA)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)

2.3 แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

V. vulnificus สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 27562

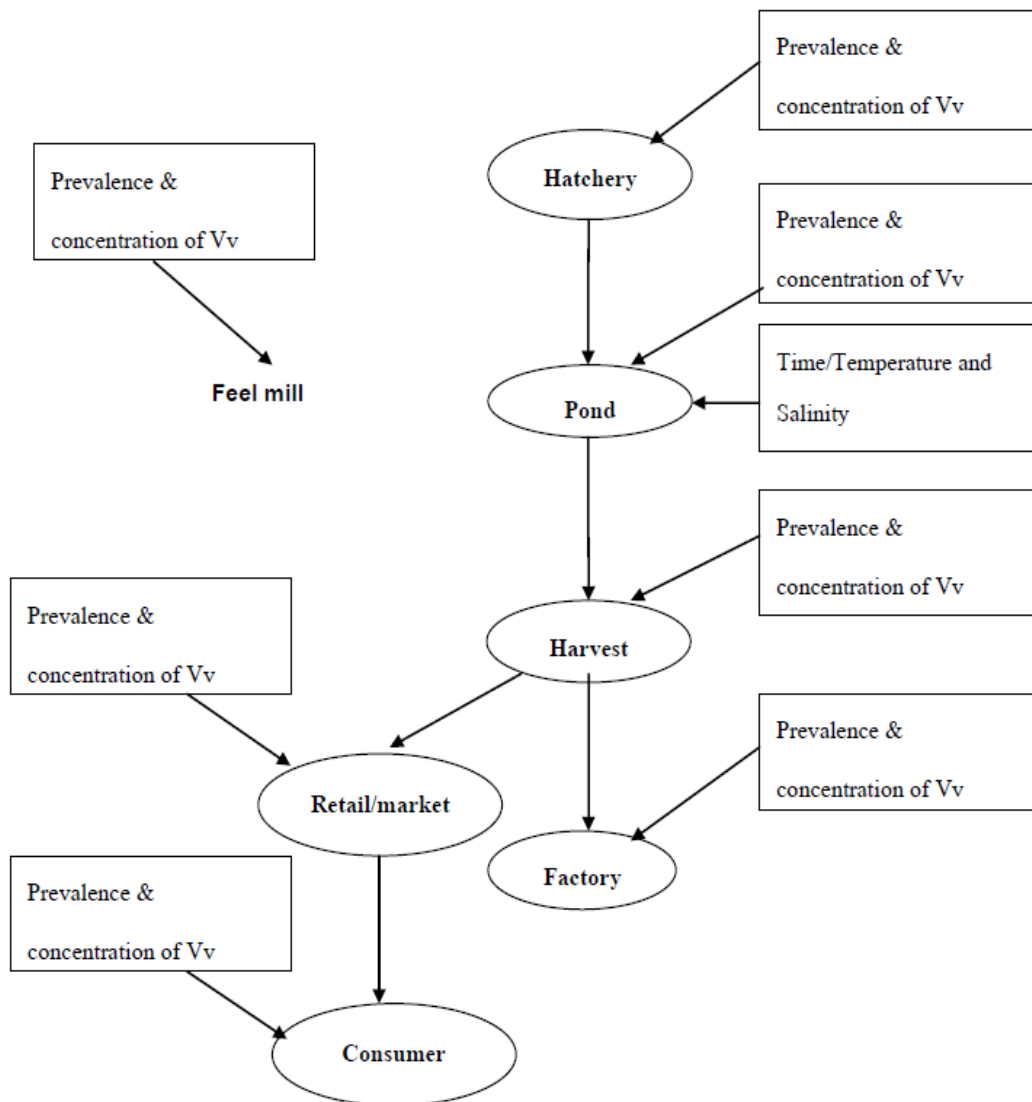


รูปที่ 2.1 แผนภูมิแสดงการทดลองทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างกุ้ง ดินนากุ้ง น้ำทะเลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และ อาหารกุ้ง (feed mill)

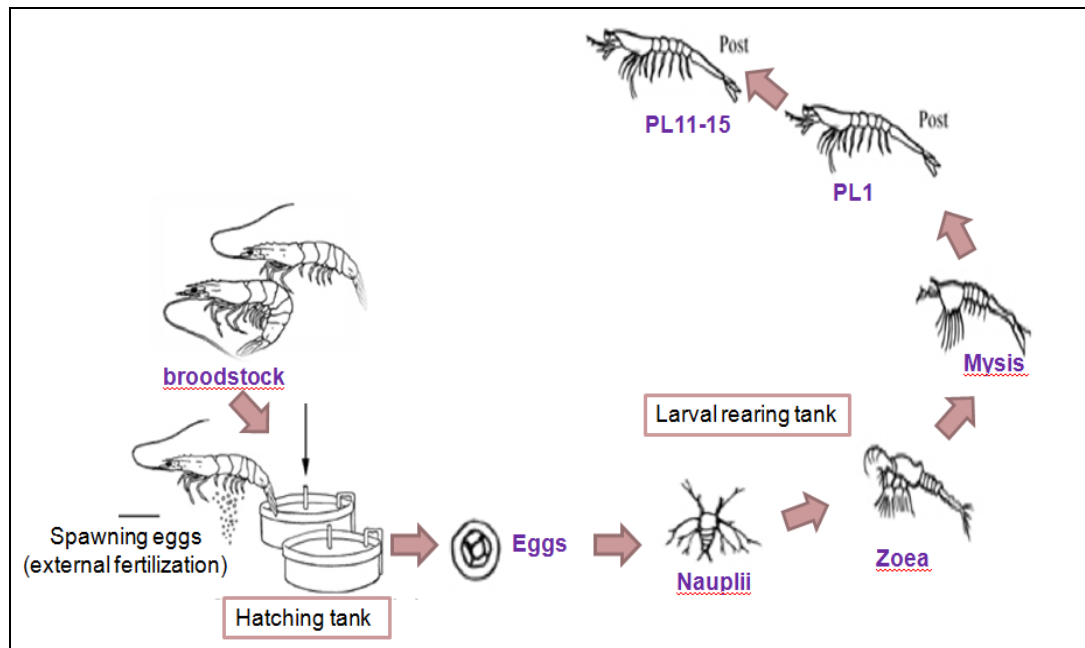
ตัวอย่าง กุ้ง ดินนากุ้ง น้ำทะเล และ อาหารกุ้ง จะถูกเก็บจากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะอยู่ใน จังหวัดสงขลา โดยหาปริมาณเชื้อ และความชุก ในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยง คือ บ่อพัก บ่อเลี้ยง บ่อที่พร้อมจับกุ้ง และการขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง การขนส่งสู่ตลาด จนถึงผู้บริโภค โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงการเก็บตัวอย่าง *V. vulnificus* (Vv) ในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงกุ้ง ตั้งแต่บ่อพัก จนถึง การขนส่งสู่โรงงานอาหารแช่แข็งและผู้บริโภค

การเก็บตัวอย่างสามารถแบ่งได้เป็น

1. Hatchery (บ่อพัก): บ่อพักถูกแบ่งออกเป็น 7 ระยะตามการเจริญเติบโตของกุ้งคือ ระยะพ่อแม่พันธุ์กุ้ง (BS), ระยะไข่กุ้ง(Egg), ระยะนอเพียส (Np), ระยะซุเอีย (Zo), ระยะไมซิส (My), ระยะลูกกุ้งอายุ 1 วัน (PL1) และระยะลูกกุ้งอายุ 11-15 วัน (PL11-15) ดังรูปที่ 2.3 โดยจะเก็บตัวอย่างกุ้ง ในระยะต่างๆ จำนวน 25 กรัม และน้ำที่ใช้ในการเลี้ยง จำนวน 25 มิลลิลิตร และ อาหารกุ้ง 25 กรัม



รูปที่ 2.3 ระยะต่างๆในบ่อพัก

2. Pond (บ่อเลี้ยงกุ้ง): บ่อเลี้ยงกุ้งถูกแบ่งออกเป็น 6 ระยะ คือ บ่อดินที่ตากไว้ (PA) (รูปที่ 2.4) บ่อดินที่กำลังเปิดน้ำใส่ (PB) บ่อดินที่กำลังตีน้ำ (PC) (รูปที่ 2.5) บ่อดินก่อนลงลูกกุ้ง (PD) บ่อดินที่ลง PL แล้ว 1.5 เดือน (PE1) บ่อดินที่ลง PL แล้ว 3 เดือน (PE2) และบ่อดินที่ลง PL แล้ว 4.5 เดือน (PE3)

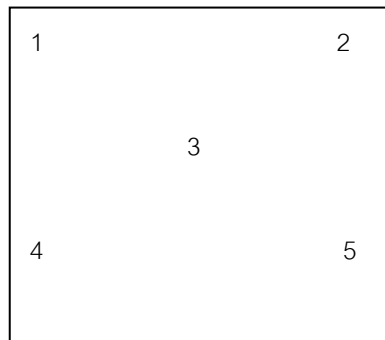


รูปที่ 2.4 ปอดินที่ตากไว้ (PA)

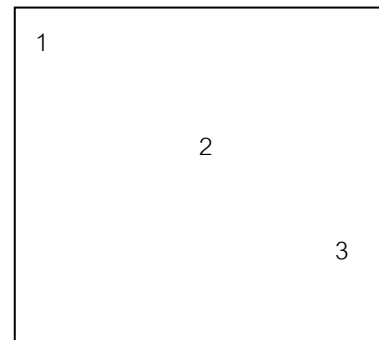


รูปที่ 2.5 ปอดินที่กำลังตีน้ำ(PC)

โดยจะเก็บตัวอย่างกุ้งในระยะต่างๆ 25 กรัม โดยสุ่มมา 3 ตัวอย่างต่อ 1 บ่อ น้ำที่ใช้ในการเลี้ยง จำนวน 25 มิลลิลิตร โดยสุ่มมา 5 จุดต่อ 1 บ่อ ดังรูปที่ 2.6 และดินในบ่อ จำนวน 25 กรัม โดยสุ่มมา 3 จุดต่อ 1 บ่อ ดังรูปที่ 2.7 และ อาหารกุ้ง (feed mill) 25 กรัม อุณหภูมิ และความเค็มของน้ำจะถูกรวต ทุกครั้งในการเก็บ โดยความเค็มของน้ำจะวัดโดยใช้เครื่อง refractometer



รูปที่ 2.6 ตำแหน่งในการเก็บน้ำในบ่อ



รูปที่ 2.7 ตำแหน่งในการเก็บดินในบ่อ

3. Factory (โรงงานกุ้งแช่แข็ง) : ขบวนการผลิตประกอบด้วย กุ้งมาถึงโรงงาน (F1) (รูปที่ 2.8), กุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 1 (F2) (รูปที่ 2.9), กุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 2 (F3) (รูปที่ 2.10), กุ้งตัดหัว ปอกเปลือก ดึงไส้ (F4) (รูปที่ 2.11), กุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 2 (F5) (รูปที่ 2.12), กุ้งก่อนแช่แข็ง (F6) (รูปที่ 2.13), กุ้งหลังจากแช่แข็ง (F7) (รูปที่ 2.14), กุ้งหลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุกุ้ง (F8) (รูปที่ 2.15) โดยจะเก็บตัวอย่างกุ้งในขั้นตอนต่างๆ จำนวน 25 กรัม อุณหภูมิจะถูกรวตทุกครั้งในการเก็บ

4. Retail/market and consumer (การขนส่งสู่ตลาด และผู้บริโภค) : เก็บตัวอย่างกุ้งในบ่อเลี้ยงกุ้งในระยะที่พร้อมจับกุ้งจำหน่าย และแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำกลับไปห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อทันที เพื่อเป็นการเลียนแบบการขนส่งสู่ตลาด (retail/market) ส่วนที่สอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อเพื่อเป็นการเลียนแบบการขายกุ้งในตลาด และเวลาที่ใช้ในการบริโภคอาหาร (consumer)



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนที่ 1 กุ้งมาถึงโรงงาน (F1)



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนที่ 2 กุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่หนึ่ง (F2)



รูปที่ 2.10 ขั้นตอนที่ 3 กุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่สอง (F3)



รูปที่ 2.11 ขั้นตอนที่ 4 กุ้งตัดหัว ปอกเปลือก ผ่าหลัง (F4)



รูปที่ 2.12 ขั้นตอนที่ 5 กุ้งหลังจากการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่สาม (F5)





รูปที่ 2.14 ขั้นตอนที่ 7 กุ้งหลังจากแช่แข็ง (F7)



รูปที่ 2.15 ขั้นตอนที่ 8 กุ้งหลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุถุง (F8)

ตารางที่ 2.1 จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในระยะบ่อพักที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
BS	
-กุ๊้ง	8
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ๊้ง	20
Egg	
-ไข่กุ๊้ง	4
Np	
-กุ๊้ง	4
Zo	
-กุ๊้ง	4
My	
-กุ๊้ง	4
PL1	
-กุ๊้ง	4
PL11-15	
-กุ๊้ง	4
รวม	52

ตารางที่ 2.2 จำนวนตัวอย่างอาหารทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
อาหารธรรมชาติ*	28
อาหารสด**	18
อาหารสำเร็จรูป	32
รวม	78

* อาร์ทีเมีย , สาหร่าย **เพรียงเลือด , เพรียงทราย , ปลาหมึก , หอย

ตารางที่ 2.3 จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในระยะบ่อเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
PA	
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	24
-ดินในบ่อกุ้ง	24
PB	
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	47
-ดินในบ่อกุ้ง	24
PC	
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	40
-ดินในบ่อกุ้ง	24
PD	
-กุ้ง	24
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	40
-ดินในบ่อกุ้ง	24
PE1	
-กุ้ง	24
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	40
-ดินในบ่อกุ้ง	24
PE2	
-กุ้ง	24
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	40
-ดินในบ่อกุ้ง	24
PE3	
--กุ้ง	24
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	40
-ดินในบ่อกุ้ง	24
รวม	535

ตารางที่ 2.4 จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในโรงงานกึ่งแช่แข็งที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
F1	
-กึ่ง	7
F2	
-กึ่ง	7
F3	
-กึ่ง	7
F4	
-กึ่ง	7
F5	
-กึ่ง	7
F6	
-กึ่ง	7
F7	
-กึ่ง	5
F8	
-กึ่ง	7
รวม	54

ตารางที่ 2.5 จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในขั้นตอนการขนส่งสู่ตลาด และสู่ผู้บริโภคที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
การขนส่งสู่ตลาด	
-กึ่ง	30
การขนส่งสู่ผู้บริโภค	
-กึ่ง	30
รวม	60

2. การหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี **most probable number (MPN) technique**

นำตัวอย่างทั้งหมด 779 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บขนาด 25 มิลลิลิตร หรือ 25 กรัม ผสมกับ alkaline peptone water (APW pH 8.6) ที่มี 1% NaCl 225 มิลลิลิตร (ความเจือจาง 1:10) (pre-enrichment) จากนั้นทำการหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี three-tube MPN โดยนำส่วนใสจากตัวอย่างที่เตรียม 1 มล. เจือจางด้วย APW 9 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 10^{-1}) และเจือจางลงแบบ serial dilution เป็น ความเข้มข้น 10^{-2} และ ความเข้มข้น 10^{-3} ตามลำดับ เพื่อดูการเจริญของเชื้อหลอดที่ขึ้นทุกหลอด จะมาทำ confirm test เพื่อยืนยันว่าเป็น เชื้อ *V. vulnificus* โดยใช้วิธี colony-isolation PCR method

3. การตรวจสอบหายีน **cytolysin gene (vvhA)** โดยวิธี **PCR**

3.1 การเตรียม DNA template

3.1.1 การเตรียมเชื้อสำหรับสกัด DNA

หลอด MPN ที่ขึ้นทุกหลอดจะถูกนำไป streak plate บนอาหาร CHROMagar Vibrio โดย colony สีฟ้าอมเขียว ซึ่งเป็นลักษณะของ *V. vulnificus* บน CHROMagar และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานของ *V. vulnificus* จะถูกนำมาเลี้ยงใน Luria-Bertani (LB) broth ที่มี ส่วนประกอบของ 1% NaCl ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.1.2 การสกัด DNA จากเชื้อแบคทีเรีย

การสกัด DNA โดยอาศัย boiling method สำหรับใช้ในการทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR โดยนำหลอดเชื้อที่เลี้ยงไว้ในขั้นตอนการเตรียมเชื้อ (ข้อ 3.1.1) มาต้ม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอหลุดออกจากเซลล์ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที เพื่อป้องกันดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาเข้าคู่กัน นำไปทำการปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เศษเซลล์ตกตะกอน ดูดเอาเฉพาะส่วน supernatant เก็บในหลอดใหม่ เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยก่อนใช้ต้องทำการเจือจางในอัตราส่วน 1: 10 เพื่อลดการรบกวนจากโปรตีนและสิ่งสกปรกอื่นๆ จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR ตรวจสอบหายีน cytolysin gene (*vvhA*) ซึ่งเป็น marker สำหรับ *V. vulnificus* ในการตรวจสอบยืนยัน ลำดับเบสของ primer ของยีนทั้งสอง แสดงในตารางที่ 2.6

ถ้าสามารถตรวจพบ *V. vulnificus* ด้วยวิธี PCR จากหลอด MPN หลอดใดหลอดหนึ่ง จะถือว่า MPN หลอดนั้น positive คือ มีเชื้อ *V. vulnificus*

ตารางที่ 2.6 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้

Target genes	Primers	ลำดับ nucleotide (5' to 3')	Amplicon size (bp)	References
<i>vvh</i>	F- <i>vvh</i>	TTCCAACCTTCAAACCGAACTATGA	205	(Panicker <i>et al.</i> , 2004)
	R- <i>vvh</i>	ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG		

3.2 การเตรียม PCR reaction mixture

3.2.1 การเตรียม PCR reaction mixture

เตรียม 20 ไมโครลิตรของ PCR mixture ซึ่งประกอบด้วย 1 ไมโครลิตร ของ DNA template ที่ dilute 1:10, 1X buffer (20 mM MgSO₄; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 1% Triton X-100; 1 mg/ml nuclease free BSA; 200 mM Tris-HCl, pH 8.8), 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM (primers – F/R *vvh* gene, และ 1 unit *Taq* DNA polymerase จากนั้นนำ reaction mixture เข้าเครื่อง PCR (Astec รุ่น PC818) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

ส่วนผสม	ปริมาตร(µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	9.5
10x buffer	2.0
2.5 mM dNTPs	1.0
1µM primer – Forward ยีน <i>vvh</i>	3.0
1µM primer – Reverse ยีน <i>vvh</i>	3.0
1unit <i>Taq</i> DNA polymerase	0.5
DNA	1.0
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot stat	96	5	1
2. Denature	94	1	} 30
3. Annealing	57	1	

4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

3.2.2 การตรวจดู PCR product โดยนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ตรวจหาผลผลิต PCR โดยการทำ electrophoresis เพื่อตรวจหายีน *cytolysin gene (vvhA)* ขนาด 205 bp โดยเตรียม 1% agarose gel โดยทำให้ละลายใน 0.5X TAE buffer จากนั้นเทเจล ลงบนแม่พิมพ์ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวางใน chamber ที่มีสารละลาย 0.5X TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล จากนั้นนำ PCR product มาใส่ลงในหลุมโดยผสมกับสารละลายสี (6X loading dye) ในอัตราส่วน PCR product 5 ไมโครลิตรต่อ 6X loading dye 1 μ l ทำการแยกแถบ DNA ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (10 μ g/ml) 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 15 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสง UV เปรียบเทียบกับ แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์มาตรฐาน

4.การวิเคราะห์ทางสถิติ

4.1 การศึกษาความชุก ปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนการเลี้ยงกุ้ง

แบบจำลองนี้ถูกสร้างขึ้นตามขั้นตอนกระบวนการเลี้ยงกุ้ง เริ่มตั้งแต่ระยะพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ระยะไข่กุ้ง ระยะนอเพียส ระยะชูเอีย ระยะไมซิส ระยะลูกกุ้งอายุ 1 วัน และระยะลูกกุ้งอายุ 11-15 วัน บ่อดินที่ตากไว้ (PA) บ่อดินที่กำลังเปิดน้ำใส่ (PB) บ่อดินที่กำลังตีน้ำ (PC) บ่อดินที่กำลังลงลูกกุ้ง (PD) บ่อดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 1.5 เดือน (PE1) บ่อดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 3 เดือน (PE2) และ บ่อดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือน (PE3)

ในแต่ละขั้นตอนจะตรวจหาความชุก และปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ การพบหรือไม่พบ *V. vulnificus* การประเมินผลในเชิงปริมาณแสดงเป็น geometric mean ของค่า MPN/g ของเชื้อ *V. vulnificus* ในการศึกษาตัวอย่างที่ให้ผลลบ (ไม่พบ *V. vulnificus*) จะใช้ตัวเลข 0.29 MPN/g ในการคำนวณ

4.2 การศึกษาความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนการเลี้ยงกุ้ง

P_c คือ ความน่าจะเป็นที่จะมีเชื้อ *V. vulnificus* ใน 1 หน่วยตัวอย่าง

P_s คือ ความชุกของตัวอย่างที่ปนเปื้อน *V. vulnificus*

ดังนั้น ความน่าจะเป็นในการพบเชื้อใน 1 ตัวอย่าง คือ P_e (Cassin *et al.*, 1998)

$$P_e = P_c \times P_s \quad (1)$$

ความน่าจะเป็นในการสัมผัสเชื้อ *V. vulnificus* ใน 1 หน่วยตัวอย่างขึ้นอยู่กับ ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อ *V. vulnificus* (C ; MPN/g) ในแต่ละชนิดตัวอย่างของแต่ละขั้นตอนการเพาะเลี้ยง และปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ (N ; g หรือ ml) โดยความน่าจะเป็นตามสมมุติฐานการแจกแจงแบบปัวซอง (Poisson distribution) (Shu Geng *et al.*, 1983) ดังต่อไปนี้

$$P_c = 1 - e^{(-NC)} \quad (2)$$

ความชุก (P_s) ของตัวอย่างที่ปนเปื้อน *V. vulnificus* จะขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อน (s) และจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ (k) การคำนวณค่าความชุกจะใช้การแจกแจงแบบเบต้า (Beta distribution) (Murray, 2004) ซึ่งสามารถครอบคลุมค่าความเป็นได้ทั้งหมด โดย 2 พารามิเตอร์หาการแจกแจงแบบเบต้า คือ α ($\alpha = s + 1$) และ β ($\beta = k - s + 1$)

$$P_s = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \quad (3)$$

เมื่อ k คือจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ ดังนั้นความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ ในตัวอย่างทดสอบ (P_+) คือ (Shu Geng *et al.*, 1983)

$$P_+ = 1 - (1 - P_e)^k \quad (4)$$

ดังนั้นความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในแต่ละขั้นตอนการเพาะเลี้ยงที่มีหลากหลายชนิดตัวอย่าง คือ

$$P_+ = 1 - \prod_{i=1}^j (1 - P_{e_i})^{k_i} \quad (5)$$

4.3 การหาความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนการผลิตกุ้งแช่แข็ง

การหาความชุก และปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนการผลิตกุ้งแช่แข็ง เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนกุ้งมาถึงโรงงาน (F1) กุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่หนึ่ง (F2) กุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่สอง (F3) กุ้งตัดหัว ปอกเปลือก ผ่าหลัง (F4) กุ้งหลังจากการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่สาม (F5) กุ้งก่อนแช่แข็ง (F6) กุ้งหลังจากแช่แข็ง (F7) และ กุ้งหลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุถุง (F8) ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ การพบหรือไม่พบ *V. vulnificus* การประเมินผลในเชิงปริมาณแสดงเป็น geometric mean ของค่า MPN/g ของเชื้อ *V. vulnificus* ในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างที่ให้ผลลบ (ไม่พบ *V. vulnificus*) ใช้ตัวเลข 0.29 MPN/g ในการคำนวณ

4.2 การหาความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนขนส่งจากบ่อเลี้ยงสู่ตลาด และสู่ผู้บริโภค

การหาความชุก และปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนขนส่งจากบ่อเลี้ยง สู่ตลาด และสู่ผู้บริโภค ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ การพบหรือไม่พบ *V. vulnificus* การประเมินผลในเชิงปริมาณ แสดงเป็น geometric mean ของค่า MPN/g ของเชื้อ *V. vulnificus* ในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างที่ให้ผลลบ (ไม่พบ *V. vulnificus*) ใช้ตัวเลข 0.29 MPN/g ในการคำนวณ

5. การประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *V. vulnificus* ในการบริโภคกุ้ง

5.1 การระบุอันตราย (Hazard identification)

การระบุถึงอันตรายเป็นการแสดงให้เห็นถึงอันตรายเนื่องจากเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในกุ้งแช่แข็งซึ่งมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคกุ้งแช่แข็ง การระบุถึงอันตรายสามารถทำได้โดย เก็บรวบรวมข้อมูลทุติยภูมิ จากรายงานการวิจัย หนังสือ และวารสาร ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาและข้อมูลการก่อให้เกิดโรค กระบวนการก่อให้เกิดโรค การระบาด และการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งแช่แข็งในประเทศไทย

เชื้อ *V. vulnificus* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิด foodborne disease และ wound infection แม้ว่าจะมีการอัตราการติดเชื้อนี้ต่ำ เมื่อเทียบกับเชื้ออื่นใน Genus *Vibrio* แต่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงที่สุดใน foodborne disease (Todd, 1989)

1. เชื้อบุกรุกเข้าสู่กระแสโลหิต ก่อให้เกิดอาการ โลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการไข้ หนาวสั่น อ่อนเพลีย ความดันต่ำ อาเจียน และเสียชีวิตในที่สุด ซึ่งพบประมาณร้อยละ 45 ของการติดเชื้อ อัตราการตายจะสูงถึงร้อยละ 60 ภายใน 24 ชั่วโมง (Linkous and Oliver, 1999)

2. เชื้อสามารถก่อให้เกิดโรค กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งพบประมาณ 12% ของการติดเชื้อ พบอัตราการตายต่ำ และสามารถหายเองได้ (Strom and Paranjpye, 2000)

3. เชื้อก่อให้เกิด การติดเชื้อที่บาดแผล (wound infection) เนื่องจากบาดแผลมีการสัมผัสเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเล หรือน้ำทะเล พบการติดเชื้อชนิดนี้ประมาณร้อยละ 25 และอัตราการตายสูงถึง ร้อยละ 45 (Linkous and Oliver, 1999) การติดเชื้อที่บาดแผลอาจนำไปสู่ ภาวะโลหิตเป็นพิษได้หากเชื้อบุกรุกเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจะทำให้มีอัตราการตายสูงขึ้น

5.1.1 การแพร่ของเชื้อ *V. vulnificus*

จากรายงาน 459 กรณีในสหรัฐอเมริกาโดยองค์การอาหารและยาระหว่างปี 1992 ถึง 2007 (Jones and Oliver, 2009) เปิดเผยว่า มีผู้ป่วยเสียชีวิตร้อยละ 51.6 , เป็นเพศชายร้อยละ 85.6 ใน 180 กรณีในปี 2002 ถึง 2007 พบว่ามีผู้ป่วยถึงร้อยละ 92.8 ที่มีการบริโภคหอยนางรมดิบก่อนที่จะมีอาการแสดงอาการ มีการรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงปี 1988 ถึง 1996 ว่ามีการตรวจพบเชื้อปนเปื้อนในหอยนางรม อาหารทะเล โดยมีรายงานการติดเชื้อ 422 ราย มีการติดเชื้อทางบาดแผลร้อยละ 45 มีอาการโลหิตเป็นพิษร้อยละ 43 กระเพาะและลำไส้อักเสบร้อยละ 5 และไม่ทราบแน่ชัดร้อยละ 7 (Shapiro *et al.*, 1998) นอกจากนี้มีการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำทะเล น้ำกร่อย และสัตว์ทะเลต่างๆ ในทวีปยุโรป ได้แก่ สเปน (Torres *et al.*, 2002) นอร์เวย์ เดนมาร์ก (Arias *et al.*, 1999; Dalsgaard and Hoi, 1997) สาธารณรัฐเยอรมัน (Frank *et al.*, 2006) เนเธอร์แลนด์ (Veenstra *et al.*, 1993) มีการรายงานการพบเชื้อในทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (Ghinsberg *et al.*, 1999) ในตะวันออกกลางเมื่อปี 1996 มีรายงานการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อ ในตะวันออกกลางในหมู่คนงานในตลาดอาหารทะเล (Paz *et al.*, 2007) ในทวีปเอเชีย มีการพบเชื้อในไต้หวัน ทั้งในน้ำทะเล และอาหารทะเล โดยผู้ที่ประกอบอาชีพที่มีโอกาสสัมผัสกับทะเล หรืออาหารทะเล มีรายงานการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น (Hsueh *et al.*, 2004) ในประเทศญี่ปุ่น มีการพบเชื้อในน้ำทะเล ปลา และหอย (Mahmud *et al.*, 2008) ในสาธารณรัฐประชาชนจีน ได้ศึกษาหาความชุกของเชื้อ *V. vulnificus* โดยทำการสำรวจอาหารทะเลสดๆ ในตลาดในเมืองแถบชายฝั่งทะเล พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อสูงสุด 3.4 log CFU/g ในตัวอย่างหอยหลอด และ 4.9 log CFU/g ในตัวอย่างกุ้ง (Yano *et al.*, 2004)

5.1.2 การแพร่ระบาดของเชื้อในประเทศไทย

ข้อมูลในประเทศไทยจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ระหว่างปี 2544-2549 พบผู้ป่วยจากการติดเชื้อ *V. vulnificus* แบบ septicemia ถึง 56 คน พบผู้ป่วยมากใน ช่วงอายุ 46-55 ปี จำแนกรายปีดังนี้ ปี2544, 2545, 2546, 2547, 2548 และ 2549 พบผู้ป่วย 12, 9, 8, 10, 11 และ 6 ราย ตามลำดับ พื้นที่ภาคกลางพบผู้ป่วยมากที่สุด 34 ราย (ร้อยละ 60.7) รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ พบผู้ป่วย

เท่ากัน 9 ราย (ร้อยละ 16.1) และภาคเหนือพบผู้ป่วย 4 ราย (ร้อยละ 7.1) (ศรียรรณา และคณะ ,2549)

ภาคกลาง พบผู้ป่วยมากที่สุดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร 12 ราย รองลงมาคือจันทบุรี 11 ราย ราชบุรี 4 ราย สระบุรี 3 ราย ฉะเชิงเทรา 2 ราย สระแก้วและเพชรบุรี พบผู้ป่วยจังหวัดละ 1 ราย

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดอุบลราชธานี พบผู้ป่วยมากที่สุด 5 ราย อำนาจเจริญ และอุดรธานี พบผู้ป่วยจังหวัดละ 2 ราย

ภาคใต้ จังหวัดสงขลาและพังงา พบผู้ป่วยมากที่สุดจังหวัดละ 3 ราย ชุมพร ยะลา และตรัง พบผู้ป่วยจังหวัดละ 1 ราย

ภาคเหนือ จังหวัดลำปางและเพชรบูรณ์ พบผู้ป่วยจังหวัดละ 2 ราย

ตารางที่ 2.7 จำนวนผู้ป่วยติดเชื้อ *V. vulnificus* จำแนกตามภาค ตั้งแต่ปี 2544 – สิงหาคม 2549

ภาค	จำนวนผู้ป่วย (คน)	ร้อยละที่พบ
ภาคกลาง	34	60.7
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	9	16.1
ภาคใต้	9	16.1
ภาคเหนือ	4	4

ตารางที่ 2.8 จำนวนผู้ป่วยติดเชื้อ *V. vulnificus* จำแนกตามกลุ่มอายุ ตั้งแต่ปี 2544 – สิงหาคม 2549

กลุ่มอายุ	จำนวนผู้ป่วย (คน)	ร้อยละที่พบ
35- 44 ปี	10	17.7
45-54ปี	12	21.5
55-64ปี	5	9.0
มากกว่า 65 ปี	7	12.5
ไม่ระบุอายุ	22	39.3

ตารางที่ 2.9 จำนวนผู้ป่วยติดเชื้อ *V. vulnificus* จำแนกรายเดือน ตั้งแต่ปี 2544 – สิงหาคม 2549

เดือน	จำนวนผู้ป่วย (คน)	ร้อยละที่พบ
มกราคม	2	3.6
กุมภาพันธ์	5	8.9

มีนาคม	6	10.7
เมษายน	2	3.6
พฤษภาคม	6	10.7
มิถุนายน	9	16.1
กรกฎาคม	3	5.4
สิงหาคม	5	8.9
กันยายน	1	1.8
ตุลาคม	5	8.9
พฤศจิกายน	2	3.6
ธันวาคม	10	17.9

2. การอธิบายอันตราย (Hazard characterization) เป็นการประเมินความน่าจะเป็นหรือจำนวนการเจ็บป่วยต่อเนื่องจากการสัมผัสกับเชื้อ *V. vulnificus* แบบจำลอง Dose-response model ที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแบบจำลองแบบ Beta-Poisson (ศุภชัย และคณะ, 2555)

$$P_i(N) = 1 - \left[1 + \frac{0.01065 N}{0.3681} \right]^{-0.3681} \quad (4)$$

โดยที่ $P_i(N)$ คือ ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยต่อเนื่องจากการสัมผัสกับเชื้อ *V. vulnificus*

N คือ จำนวน *V. vulnificus* ที่ร่างกายได้รับต่อครั้งในการกิน

$N = \text{concentration} \times \text{consumption}$

โดยที่

concentration คือ ปริมาณของ *V. vulnificus* ในขั้นตอนกึ่งหลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุถุง (F8) และขั้นตอนสู่ผู้บริโภค (การศึกษาค้างนี้)

Sani และคณะ (2013) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะเพิ่ม 1 log ในระหว่างที่ตั้งกึ่งละลายที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 3 ชั่วโมง

consumption คือ ปริมาณการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาและพริก 1 กรัม/คน/ครั้ง เพ็ญศรี และคณะ (2552)

3. การประเมินการสัมผัส (Exposure assessment) เป็นการประเมินโอกาสในการรับสัมผัส

ความน่าจะเป็นในการสัมผัส (Probability of exposure ; P_E)

ความน่าจะเป็นในการสัมผัส (P_E) เป็นการอธิบายโอกาสหรือความเป็นไปได้ที่ร่างกายจะได้รับสัมผัส *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ ซึ่ง P_E เป็นค่าที่เป็นตัวแทนอธิบายโอกาสการเกิดเหตุการณ์การรับสัมผัสกับ *V. vulnificus* เข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคกุ้ง โดยใช้แบบจำลอง (Shu Geng *et al.*, 1983) การประเมินการสัมผัส ในการศึกษาจะประเมินใน 2 ขั้นตอน คือ ประเมินการสัมผัสจากกุ้งที่ออกจากโรงงานกุ้งแช่แข็ง และประเมินการสัมผัสจากกุ้งที่พร้อมจำหน่ายจากบ่อเลี้ยง

$$P_E = P(1-e^{-N}) \quad (5)$$

โดยที่ P คือ ความชุกของ *V. vulnificus* ในกุ้งระยะที่ออกจากโรงงานกุ้งแช่แข็ง(F8) หรือ กุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค

N คือ จำนวน *V. vulnificus* ที่ร่างกายได้รับต่อครั้งในการกิน

โดยที่

N = concentration x consumption

4. การอธิบายความเสี่ยง (Risk characterization) เป็นการประเมินโอกาสในการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* ดังนั้น ขั้นตอนนี้จึงเป็นการบูรณาการเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนที่ 3 ตามด้วย ขั้นตอนที่ 2 กล่าวคือ เป็นการพิจารณาความน่าจะเป็นต่อเนื่องของ 2 เหตุการณ์หลัก คือ 1.เหตุการณ์ในการสัมผัสกับ *V. vulnificus* ปริมาณหนึ่ง (dose) ตามมาด้วย 2.เหตุการณ์การเกิดโรค (response) อันเกิดจากปริมาณ *V. vulnificus* ที่ได้รับ ดังนั้นจึงใช้แบบจำลองในการประเมินความเสี่ยงรวมทั้ง 2 เหตุการณ์ต่อเนื่องกัน (Ross *et al.*, 2005)

$$P_S = P_E \times P_I(N) \quad (6)$$

โดยที่

P_S = ค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการสัมผัสกับกุ้งเพียง 1 ครั้ง

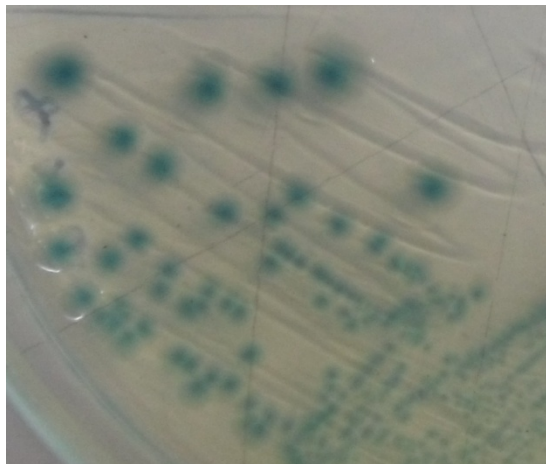
P_E = ความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับสัมผัส *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 cell

$P_I(N)$ = ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากบ่อพัก บ่อเลี้ยง การจับ และขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง การขนส่งสู่ตลาดและผู้บริโภค

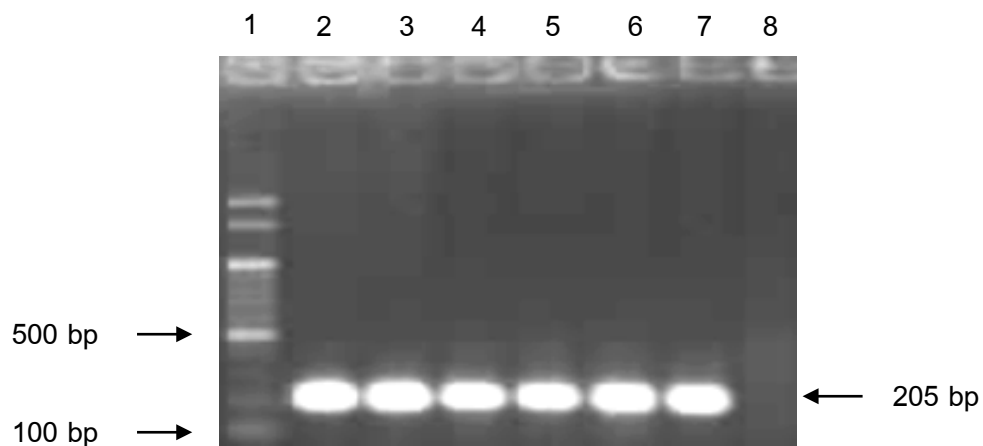
ทำการแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่าง 779 ตัวอย่าง จาก น้ำ ตะกอนดิน กุ้งระยะต่างๆ อาหารเลี้ยงกุ้ง ในบ่อพัก บ่อเลี้ยง การจับ และขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง การขนส่งสู่ตลาดและผู้บริโภค ในจังหวัดสงขลา ด้วยวิธี most probable number (MPN) technique โดยหลอดที่ขึ้นทุกหลอด นำมาลงในอาหาร CHROMagar™ Vibrio ซึ่งให้โคโลนีสีฟ้าอมเขียว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.1) ซึ่งคาดว่าจะน่าจะเป็นเชื้อ *V. Vulnificus* มีจำนวน 153 ตัวอย่าง



รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของ *V. vulnificus* บน CHROMagar™ Vibrio ซึ่งให้โคโลนีสีฟ้าอมเขียว

2. การบ่งชี้เชื้อที่แยกได้จากบ่อพัก บ่อเลี้ยง การจับ และขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง การขนส่งสู่ตลาดและผู้บริโภค ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

นำเชื้อที่แยกได้บนอาหาร CHROMagar™ Vibrio (CV) ซึ่งให้โคโลนีสีฟ้าอมเขียว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.1) มาทดสอบทางชีวโมเลกุลโดยการทำ PCR ตรวจหายีน cytotoxin gene (*ctxA*) ซึ่งเป็น marker สำหรับ *V. vulnificus* ซึ่งจะได้ผลผลิต PCR ขนาด 205 bp (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 ผลผลิต PCR *vvh* gene ของเชื้อ *V. vulnificus*

ช่องที่ 1	100 bp DNA ladder
ช่องที่ 2	<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562
ช่องที่ 3-7	เชื้อที่แยกได้จากน้ำ ตะกอนดิน กุ้ง
ช่องที่ 8	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ในการตรวจสอบยืนยัน พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 153 ตัวอย่างให้ผลบวก 145 ตัวอย่าง จากผลการศึกษา พบว่าการคัดแยกเชือบน CHROMagar™ *Vibrio* ให้ความถูกต้องเพียงแค่ 94.7 %

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพบเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำ ตะกอนดิน กุ้ง อาหารเลี้ยงกุ้ง น้ำแข็ง น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ในบ่อพัก บ่อเลี้ยง การจับ และขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง การขนส่งสู่ตลาดและผู้บริโภค ทั้งหมด 145 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 779 ตัวอย่าง (18.6%)

3.การศึกษาความชุกของเชื้อ *V. vulnificus* ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

การหาค่าความชุกของเชื้อ (prevalence) พบว่าในบ่อพัก ค่าความชุกสูงสุดอยู่ในระยะพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งพบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง (25.0%) หลังจากนั้นไม่พบเชื้อทั้งในระยะไข่กุ้ง ระยะนอเพียส ระยะชูเอีย ระยะไมซิส ระยะลูกกุ้งอายุ 1 วัน และระยะลูกกุ้งอายุ 11-15 วัน (ตารางที่ 3.1) ในบ่อเลี้ยง พบว่าค่าความชุกสูงสุดอยู่ในระยะบ่อดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือนพบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 88 ตัวอย่าง (34.1%) และค่าความชุกต่ำสุดอยู่ในระยะบ่อดินที่พร้อมลงลูกกุ้ง พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 112 ตัวอย่าง (2.7%) พบว่าในช่วงระยะการเตรียมบ่อความชุกของเชื้อ *V. vulnificus* ลดลงเรื่อยๆ โดยในระยะบ่อดินที่ตากไว้พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (14.6%) ระยะบ่อดินที่กำลังเปิดน้ำใส่พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 71 ตัวอย่าง (8.5%) ระยะบ่อดินที่กำลังดีน้ำพบ *V. vulnificus*

ในตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 64 ตัวอย่าง (7.8%) และระยะบอดินที่พร้อมลงลูกกุ้ง พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 111 ตัวอย่าง (2.7%) แต่จะพบเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงระหว่างกุ้งเจริญเติบโต โดยในระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 1.5 เดือน พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 19 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 88 ตัวอย่าง (21.6%) ระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 3 เดือน พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 22 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 88 ตัวอย่าง (25.0%) ระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือนพบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 88 ตัวอย่าง (34.1%) (ตารางที่ 3.3) และไม่พบเชื้อในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 3.2)

4.การศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

การศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้ง ในบ่อพัก พบว่าในระยะฟอแมพันธุ์กุ้ง พบเชื้อเฉลี่ย 0.80 MPN/g หลังจากนั้นไม่พบเชื้อทั้งในระยะไข่กุ้ง ระยะนอเพียส ระยะชูเอีย ระยะไมซิส ระยะลูกกุ้งอายุ 1 วัน และระยะลูกกุ้งอายุ 11-15 วัน แต่จะพบเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงระหว่างกุ้งเจริญเติบโตในบ่อเลี้ยง โดยในระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 1.5 เดือน พบเชื้อเฉลี่ย 0.53 MPN/g ระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 3 เดือน พบเชื้อเฉลี่ย 0.69 MPN/g ระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือนพบเชื้อเฉลี่ย 0.72 MPN/g (รูปที่ 3.3)

การศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ ในบ่อเลี้ยง พบว่าในระยะบอดินที่ตากไว้ ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 0.43 MPN/g และ 0.42 MPN/ml ตามลำดับ ในระยะบอดินที่กำลังเปิดน้ำใส่ ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 0.40 MPN/g และ 0.35 MPN/ml ตามลำดับ ในระยะบอดินที่กำลังตีน้ำ ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 0.43 MPN/g และ 0.31 MPN/ml ตามลำดับ ในระยะบอดินที่พร้อมลงลูกกุ้ง ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 0.32 MPN/g และ 0.33 MPN/ml ตามลำดับ ในระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 1.5 เดือน ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 0.41 MPN/g และ 0.58 MPN/ml ตามลำดับ ในระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 3 เดือน ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 0.43 MPN/g และ 0.55 MPN/ml ตามลำดับ และในระยะบอดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือน ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 1.00 MPN/g และ 0.59 MPN/ml ตามลำดับ (รูปที่ 3.4)

ตารางที่ 3.1 ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในบ่อพัก

ระยะการเลี้ยงกุ้ง	ความชุกของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (%)	ปริมาณเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (min-max)
BS		
- กุ้ง	3/8 (37.5)	(3.6 – 6.1)
- น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	4/20 (20.0)	(3 – 3.6)
รวม	7/28 (25.0)	(3 – 6.1)
Egg		
- ไข่กุ้ง	0/4 (0)	-
Np		
- กุ้ง	0/4 (0)	-
Zo		
- กุ้ง	0/4 (0)	-
My		
- กุ้ง	0/4 (0)	-
PL1		
- กุ้ง	0/4 (0)	-
PL11-15		
- กุ้ง	0/4 (0)	-

ตารางที่ 3.2 ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหาร

ตัวอย่าง	ความชุกของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (%)	ปริมาณเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (min-max)
อาหารธรรมชาติ*	0/28 (0)	-
อาหารสด**	0/18 (0)	-
อาหารสำเร็จรูป	0/32 (0)	-

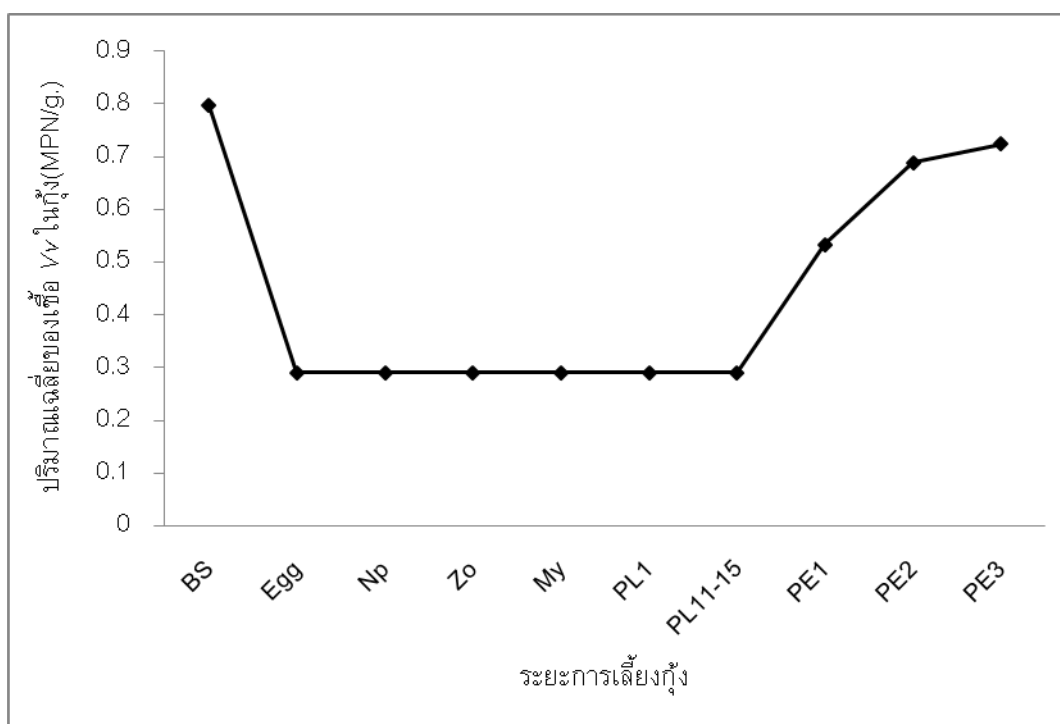
* อาร์ทีเมีย , สาหร่าย **เพรียงเลือด , เพรียงทราย , ปลาหมึก , หอย

ตารางที่ 3.3 ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในบ่อเลี้ยง

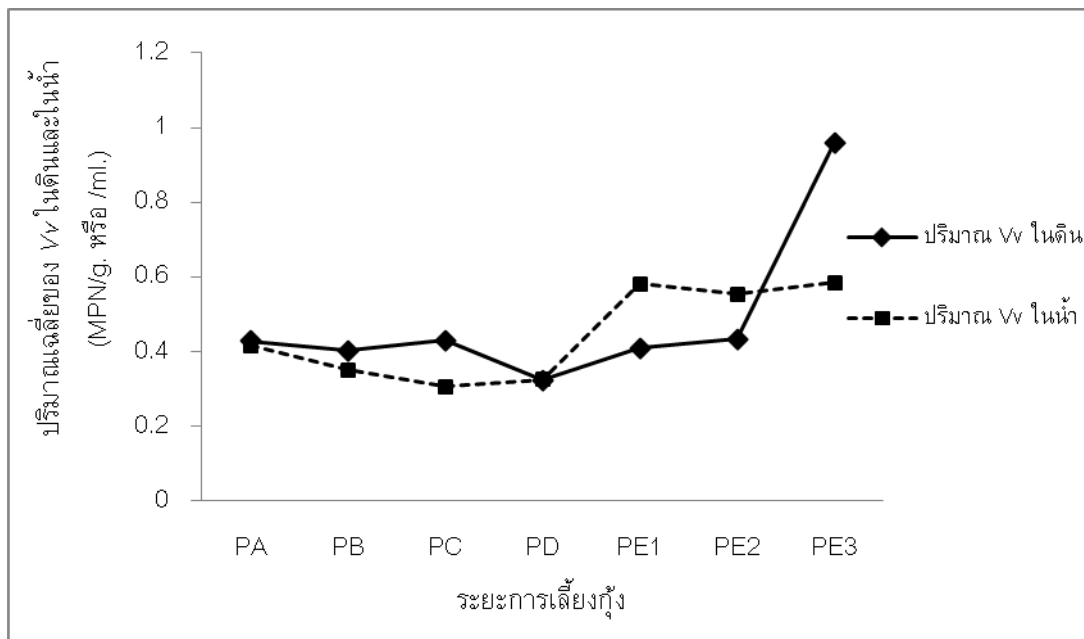
ระยะการเลี้ยงกุ้ง	ความชุกของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (%)	ปริมาณเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (min-max)
PA		
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	3/24 (12.5)	(3.6 – 11)
-ดินในบ่อกุ้ง	4/24 (16.7)	(3)
รวม	7/48 (14.6)	(3 – 11)
PB		
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	3/47 (6.4)	(3)
-ดินในบ่อกุ้ง	3/24 (12.5)	(3 – 7.4)
รวม	6/71 (8.5)	(3 – 7.4)
PC		
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	1/40 (2.5)	(3)
-ดินในบ่อกุ้ง	4/24 (16.7)	(3 – 3.6)
รวม	5/64 (7.8)	(3 – 3.6)
PD		
-กุ้ง	0/24 (0)	-
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	2/40 (5.0)	(3)
-ดินในบ่อกุ้ง	1/24 (4.3)	(3.6)
รวม	3/112 (2.7)	(3 - 3.6)
PE1		
-กุ้ง	5/24 (20.8)	(3 - 11)
-น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	11/40 (27.5)	(3 – 6.1)
-ดินในบ่อกุ้ง	3/24 (12.5)	(3 - 11)
รวม	19/88 (21.6)	(3 - 11)

ตารางที่ 3.3 ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในบ่อเลี้ยง (ต่อ)

ระยะการเลี้ยงกุ้ง	ความชุกของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (%)	ปริมาณเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (min-max)
PE2		
- กุ้ง	8/24 (33.3)	(3 – 6.1)
- น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	10/40 (25.0)	(3 – 9.2)
- ดินในบ่อกุ้ง	4/24 (16.7)	(3 – 3.6)
รวม	22/88 (25.0)	(3 – 9.2)
PE3		
- กุ้ง	9/24 (37.5)	(3 – 7.4)
- น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	11/40 (27.5)	(3 – 7.4)
- ดินในบ่อกุ้ง	10/24 (41.7)	(3 – 28)
รวม	30/88 (34.1)	(3 – 28)



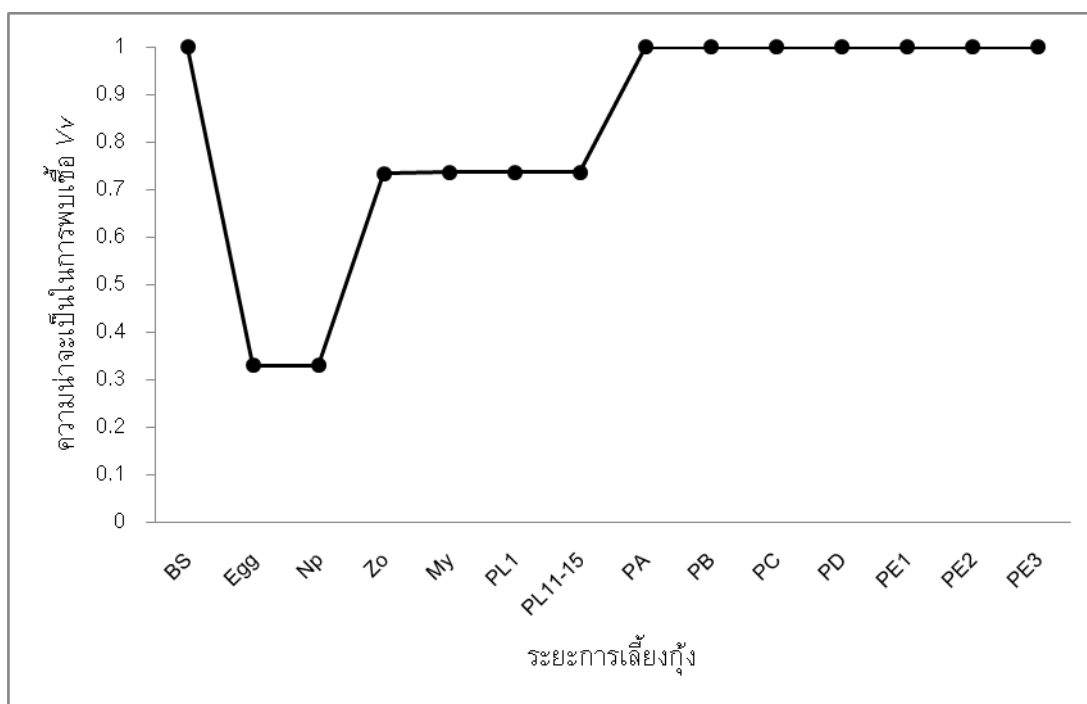
รูปที่ 3.3 ปริมาณเชื้อของเชื้อ *V. vulnificus* (MPN/g) ในบ่อเลี้ยง



รูปที่ 3.4 ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อ *V. vulnificus* (MPN/g, MPN/ml) ในดินและน้ำในบ่อเลี้ยง

5.การศึกษาความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

การศึกษาความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* (probability) พบว่าในบ่อพัก ค่า probability สูงสุดอยู่ในระยะพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งเท่ากับ 1 ค่า probability ในระยะไข่กุ้ง และ ระยะนอเพียส มีค่าเท่ากัน ซึ่งเท่ากับ 0.3347 ค่า probability ในระยะชูเอีย เท่ากับ 0.7332 และค่า probability ในระยะไมซิส ระยะลูกกุ้งอายุ 1 วัน และระยะลูกกุ้งอายุ 11-15 วัน มีค่าเท่ากัน ซึ่งเท่ากับ 0.7365 ในบ่อเลี้ยง พบว่าค่า probability เท่ากันในทุกระยะ ซึ่งเท่ากับ 1 (รูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.5 ความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งเลี้ยง

6.การศึกษาความชุกของเชื้อ *V. vulnificus* ในโรงงานกุ้งแช่แข็ง

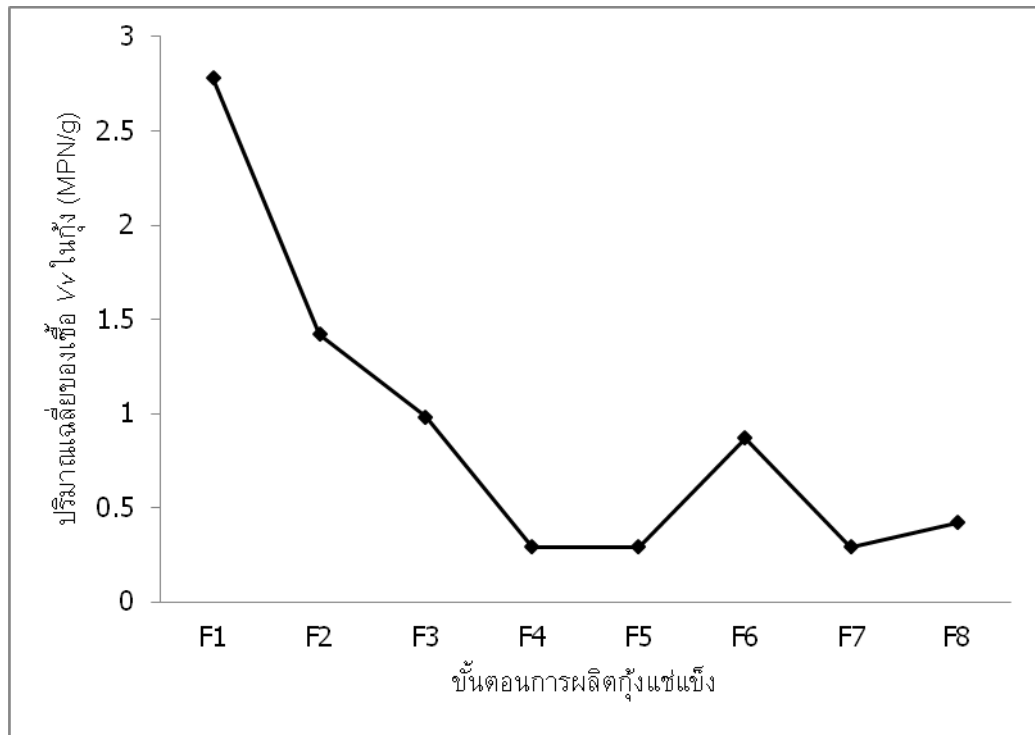
การหาค่าความชุกของเชื้อ (prevalence) พบว่าค่าความชุกสูงสุดอยู่ในขั้นตอนกุ้งมาถึงโรงงาน ซึ่งพบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (85.7%) ปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ลดลงเรื่อยๆ เมื่อผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยคลอรีน โดยขั้นตอนกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 1 พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (57.1%) และในขั้นตอนกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 2 พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (42.9%) จนไม่พบเชื้อในขั้นตอนการกุ้งตัดหัว ปอกเปลือก ดึงไส้ และกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 3 แต่จะพบเชื้อเพิ่มขึ้นในขั้นตอนกุ้งก่อนแช่แข็ง พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (42.9%) และไม่พบเชื้อในขั้นตอนกุ้งหลังจากแช่แข็ง อย่างไรก็ตามพบเชื้อเพิ่มขึ้นอีกครั้งในขั้นตอนกุ้งหลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุถุง พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (14.3%) (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งแช่แข็ง

ระยะเวลาเลี้ยงกุ้ง	ความชุกของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (%)	ปริมาณเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (min-max)
F1		
-กุ้ง	6/7 (85.7)	(3 – 6.2)
F2		
-กุ้ง	4/7 (57.1)	(3 – 7.4)
F3		
-กุ้ง	3/7 (42.9)	(3 – 3.6)
F4		
-กุ้ง	0/7 (0)	-
F5		
-กุ้ง	0/7 (0)	-
F6		
-กุ้ง	3/7 (42.9)	(3 – 6.1)
F7		
-กุ้ง	0/5 (0)	-
F8		
-กุ้ง	1/7 (14.3)	(3.6)

7.การศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในโรงงานกุ้งแช่แข็ง

การศึกษาปริมาณเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนต่างๆของการผลิตกุ้งแช่แข็ง พบว่าปริมาณเชื้อสูงสุดอยู่ในขั้นตอนกุ้งมาถึงโรงงาน พบปริมาณเชื้อเฉลี่ย 2.78 MPN/g ปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ลดลงเรื่อยๆ เมื่อผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยคลอรีน โดยขั้นตอนกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 1 พบปริมาณเชื้อเฉลี่ย 1.42 MPN/g และในขั้นตอนกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 2 พบปริมาณเชื้อเฉลี่ย 0.98 MPN/g จนไม่พบเชื้อในขั้นตอนการกุ้งตัดหัว ปอกเปลือก ดึงไส้ และกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 3 แต่จะพบเชื้อเพิ่มขึ้นในขั้นตอนกุ้งก่อนแช่แข็ง พบปริมาณเชื้อเฉลี่ย 0.87 MPN/g และไม่พบเชื้อในขั้นตอนกุ้งหลังจากแช่แข็ง อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นอีกครั้งในขั้นตอนกุ้งหลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุถุง พบปริมาณเชื้อเฉลี่ย 0.42 MPN/g (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งแช่แข็ง (MPN/g)

8. การศึกษาความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนขนส่งจากบ่อเลี้ยง สู่ตลาด และ สู่ผู้บริโภค

การหาค่าความชุก ปริมาณของเชื้อขั้นตอนขนส่งจากบ่อเลี้ยง สู่ตลาด พบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 16 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (53.3%) โดยพบเชื้อ *V. vulnificus* เฉลี่ย 1.54 MPN/g การหาค่าความชุก ปริมาณของเชื้อขั้นตอนขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค พบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 13 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (43.3%) โดยพบเชื้อ *V. vulnificus* เฉลี่ย 1.08 MPN/g (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนขนส่งจากบ่อเลี้ยง สู่ตลาด และ สู่ผู้บริโภค

ขั้นตอน	ความชุกของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (%)	ปริมาณเชื้อ <i>V. vulnificus</i> (min-max)
การขนส่งสู่ตลาด		
- กุ้ง	16/30 (53.3)	(3 – 16)
การขนส่งสู่ผู้บริโภค		
- กุ้ง	13/30 (43.3)	(3 – 75)

9. การประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในการบริโภคกุ้ง

1. การระบุอันตราย (Hazard identification)

เก็บรวบรวมข้อมูลทุติยภูมิ จากรายงานการวิจัย หนังสือ และวารสาร ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาและข้อมูลการก่อให้เกิดโรค กระบวนการก่อให้เกิดโรค การระบาด และการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งแช่แข็งในประเทศไทย พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลสามารถก่อให้เกิดอัตราการตายสูงที่สุดใน foodborne disease โดยก่อให้เกิดอาการ โลหิตเป็นพิษ จากรายงาน 459 กรณีในสหรัฐอเมริกา โดยองค์การอาหารและยาระหว่างปี 1992 ถึง 2007 (Jones and Oliver, 2009) เปิดเผยว่า มีผู้ป่วยเสียชีวิตร้อยละ 51.6 (Paz *et al.*, 2007) ในทวีปเอเชีย มีการพบเชื้อในได้หวน ทั้งในน้ำทะเล และอาหารทะเล โดยผู้ที่ประกอบอาชีพที่มีโอกาสสัมผัสกับทะเล หรืออาหารทะเลในประเทศไทย จากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ระหว่างปี 2544-2549 พบผู้ป่วยจากการติดเชื้อ *V. vulnificus* แบบ septicemia ถึง 56 คน พบผู้ป่วยมากใน ช่วงอายุ 46-55 ปี

2. การอธิบายอันตราย (Hazard characterization)

เป็นการประเมินความน่าจะเป็นหรือจำนวนการเจ็บป่วยต่อเนื่องจากการสัมผัสกับเชื้อ *V. vulnificus* แบบจำลอง Dose-response model ที่ได้ในการศึกษารั้งนี้ เป็นแบบจำลองแบบ Beta-Poisson (ศุภชัย และคณะ, 2555)

$$P_i(N) = 1 - \left[1 + \frac{0.01065 N}{0.3681} \right]^{-0.3681} \quad (2)$$

โดยที่ $P_i(N)$ คือ ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ

N คือ จำนวน *V. vulnificus* ที่ร่างกายได้รับต่อครั้งในการกิน

$$N = \text{concentration} \times \text{consumption}$$

โดยที่ concentration = 0.42 MPN/g (จากการศึกษาข้อที่ 5.2.การหาความชุกและปริมาณของเชื้อในขั้นตอนกระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็งในขั้นตอน F8) Sani และคณะ (2013) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะเพิ่ม 1 log ในระหว่างที่ดองกุ้งละลายที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 3 ชั่วโมง

ดังนั้น

$$\begin{aligned} \log(0.42) &= -0.377 \\ \text{เมื่อเชื้อเพิ่มขึ้น 1 log} &= -0.377 + 1 &= 0.623 \\ \text{ทำให้อยู่ในรูปของ MPN/g} &= 10^{0.623} &= 4.2 \text{ MPN/g} \end{aligned}$$

ดังนั้น concentration = 4.2 MPN/g
 consumption (กุ้งแช่น้ำปลา) = 0.1544 g/คน/ครั้ง (เพ็ญศรี และคณะ, 2552)
 consumption (ปลากุ้ง) = 0.0554 g/คน/ครั้ง (เพ็ญศรี และคณะ, 2552)

ดังนั้น
 N กุ้งแช่น้ำปลา = 4.2 MPN/g x 0.1544 g/คน/ครั้ง = 0.6485 MPN/คน/ครั้ง
 N ปลากุ้ง = 4.2 MPN/g x 0.0554 g/คน/ครั้ง = 0.2327 MPN/คน/ครั้ง

ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากเชื้อ *V. vulnificus* อันเนื่องมาจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่ง
 ได้ทำมาจากกุ้งแช่แข็ง

$$P_i(N)_{\text{(กุ้งแช่น้ำปลา)}} = 1 - \left[1 + \frac{0.01065(0.6485)}{0.3681} \right]^{-0.3681}$$

$$= 0.0068$$

ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากเชื้อ *V. vulnificus* อันเนื่องมาจากการบริโภคปลากุ้งซึ่งได้ทำ
 มาจากกุ้งแช่แข็ง

$$P_i(N)_{\text{(ปลากุ้ง)}} = 1 - \left[1 + \frac{0.01065(0.2327)}{0.3681} \right]^{-0.3681}$$

$$= 0.0025$$

โดยที่ concentration = 1.08 MPN/g (จากการศึกษาข้อที่ 5.3 การศึกษาความชุกและ
 ปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ขึ้นตอนขนส่งจากป่อเล้ง สู่ตลาด และ สู่ผู้บริโภค)

consumption (กุ้งแช่น้ำปลา) = 0.1544 g/คน/ครั้ง (เพ็ญศรี และคณะ, 2552)
 consumption (ปลากุ้ง) = 0.0554 g/คน/ครั้ง (เพ็ญศรี และคณะ, 2552)

ดังนั้น
 N กุ้งแช่น้ำปลา = 1.08 MPN/g x 0.1544 g/คน/ครั้ง = 0.1624 MPN/คน/ครั้ง
 N ปลากุ้ง = 1.08 MPN/g x 0.0554 g/คน/ครั้ง = 0.0599 MPN/คน/ครั้ง

ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากเชื้อ *V. vulnificus* อันเนื่องมาจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งได้ทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค

$$P_i(N)_{\text{(กุ้งแช่น้ำปลา)}} = 1 - \left[1 + \frac{0.01065(0.1624)}{0.3681} \right]^{-0.3681}$$

$$= 0.0017240$$

ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากเชื้อ *V. vulnificus* อันเนื่องมาจากการบริโภคปลากุ้งซึ่งได้ทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค

$$P_i(N)_{\text{(ปลากุ้ง)}} = 1 - \left[1 + \frac{0.01065(0.0599)}{0.3681} \right]^{-0.3681}$$

$$= 0.0006372$$

3. การประเมินการสัมผัส (Exposure assessment)

ความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับสัมผัส *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ (P_E) (Geng *et al.*, 1983)

$$P_E = P(1 - e^{-N}) \quad (3)$$

โดยที่ ความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ จากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา ซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็ง

$$P_E \text{ (กุ้งแช่น้ำปลา)} = 1/8 (1 - e^{-(0.6485)}) = 0.0596$$

โดยที่ ความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ จากการบริโภคปลากุ้ง ซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็ง

$$P_E \text{ (ปลากุ้ง)} = 1/8 (1 - e^{-(0.2327)}) = 0.0260$$

โดยที่ ความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ จากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา ซึ่งได้ทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค

$$P_E \text{ (กุ้งแช่น้ำปลา)} = 13/30 (1 - e^{-(0.1624)}) = 0.0644$$

โดยที่ ความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ จากการบริโภคพล่า กุ้ง ซึ่งได้ทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค

$$P_{E(\text{พล่ากุ้ง})} = 13/30 (1 - e^{-(0.0599)}) = 0.0250$$

4. การอธิบายความเสี่ยง (Risk characterization)

เป็นการประเมินโอกาสในการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อน ด้วย *V. vulnificus* (Ross *et al.*, 2005)

$$P_S = P_E \times P_I(N) \quad (4)$$

โดยที่

P_S = ค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการสัมผัสกับกุ้งเพียง 1 ครั้ง ต่อ ประชากร 1 คน

P_E = ความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับสัมผัส *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์

$P_I(N)$ = ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ

หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการ บริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* เท่ากับ

$$\begin{aligned} P_{S(\text{กุ้งแช่น้ำปลา})} &= P_{E(\text{กุ้งแช่น้ำปลา})} \times P_I(N)_{(\text{กุ้งแช่น้ำปลา})} \\ &= 0.0596 \times 0.0068 \\ &= 0.000405 \end{aligned}$$

หากบริโภคพล่ากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้ง ที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* เท่ากับ

$$\begin{aligned} P_{S(\text{พล่ากุ้ง})} &= P_{E(\text{พล่ากุ้ง})} \times P_I(N)_{(\text{พล่ากุ้ง})} \\ &= 0.0260 \times 0.0025 \\ &= 0.000065 \end{aligned}$$

หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค ค่าประมาณความเสี่ยงการ เจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* เท่ากับ

$$\begin{aligned} P_{S(\text{กุ้งแช่น้ำปลา})} &= P_{E(\text{กุ้งแช่น้ำปลา})} \times P_I(N)_{(\text{กุ้งแช่น้ำปลา})} \\ &= 0.0644474 \times 0.0017240 \end{aligned}$$

$$= 0.0001111$$

หากบริโภคปลากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค ค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* เท่ากับ

$$\begin{aligned} P_{S(\text{ปลากุ้ง})} &= P_{E(\text{ปลากุ้ง})} \times P_I(N)_{(\text{ปลากุ้ง})} \\ &= 0.0250293 \times 0.0006372 \\ &= 0.0000160 \end{aligned}$$

ดังนั้น หากคำนวณค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการสัมผัสกุ้งเพียง 1 ครั้งต่อประชากร 10,000 คน เท่ากับ

$$\text{ค่าประมาณความเสี่ยงต่อประชากร 10,000 คน} = P_S \times 10^4$$

หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* ในประชากร 10,000 คน คือ

$$\begin{aligned} \text{ค่าประมาณความเสี่ยงต่อประชากร 10,000 คน} &= P_S \times 10^4 \\ &= 0.00041 \times 10^4 \\ &= 4.1 \end{aligned}$$

หากบริโภคปลากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* ในประชากร 10,000 คน คือ

$$\begin{aligned} \text{ค่าประมาณความเสี่ยงต่อประชากร 10,000 คน} &= P_S \times 10^4 \\ &= 0.00006 \times 10^4 \\ &= 0.6 \end{aligned}$$

หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค ค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* ในประชากร 10,000 คน คือ

$$\begin{aligned} \text{ค่าประมาณความเสี่ยงต่อประชากร 10,000 คน} &= P_S \times 10^4 \\ &= 0.00011 \times 10^4 \\ &= 1.1 \end{aligned}$$

หากบริโภคปลากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค ค่าประมาณความเสี่ยงการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* ในประชากร 10,000 คน คือ

$$\begin{aligned}\text{ค่าประมาณความเสี่ยงต่อประชากร 10,000 คน} &= P_s \times 10^4 \\ &= 0.00002 \times 10^4 \\ &= 0.2\end{aligned}$$

ตารางที่ 3.6 การประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *V. vulnificus* ในการบริโภคกุ้ง

ขั้นตอน	กุ้งแช่แข็ง		กุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค	
	กุ้งแช่น้ำปลา	พล่ากุ้ง	กุ้งแช่น้ำปลา	พล่ากุ้ง
การอธิบายอันตราย	$0.00680 = 68 \times 10^4$ ในประชากรหมื่นคน จะมี 68 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 0.42 MPN/g	$0.00250 = 25 \times 10^4$ ในประชากรหมื่นคน จะมี 25 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 0.42 MPN/g	$0.00172 = 17.2 \times 10^4$ ในประชากรหมื่นคน จะมี 17 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 1.08 MPN/g	$0.00064 = 6.4 \times 10^4$ ในประชากรหมื่นคน จะมี 6 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 1.08 MPN/g
การประเมินการสัมผัส	$0.05960 = 5.9 \times 10^2$ ในการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 100 ครั้งจะมี 6 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ <i>V. vulnificus</i> อย่างน้อย 1 เซลล์	$0.02600 = 2.6 \times 10^2$ ในการบริโภคพล่ากุ้ง 100 ครั้งจะมี 3 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ <i>V. vulnificus</i> อย่างน้อย 1 เซลล์	$0.06444 = 6.4 \times 10^2$ ในการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 100 ครั้งจะมี 6 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ <i>V. vulnificus</i> อย่างน้อย 1 เซลล์	$0.02502 = 2.5 \times 10^2$ ในการบริโภคพล่ากุ้ง 100 ครั้งจะมี 3 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ <i>V. vulnificus</i> อย่างน้อย 1 เซลล์
การอธิบายความเสี่ยง	$0.00041 = 4.1 \times 10^5$ หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ <i>V. vulnificus</i> 0.42 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 4 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง	$0.00006 = 0.6 \times 10^4$ หากบริโภคพล่ากุ้งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ <i>V. vulnificus</i> 0.42 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคพล่ากุ้ง 1 ครั้ง	$0.00011 = 1.1 \times 10^4$ หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ <i>V. vulnificus</i> 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง	$0.00002 = 0.2 \times 10^4$ หากบริโภคพล่ากุ้งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ <i>V. vulnificus</i> 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน ไม่มีคนเกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคพล่ากุ้ง 1 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง

V. vulnificus เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงที่สุดใน foodborne disease (Todd, 1989) โดยสามารถก่อภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 60% ภายใน 24 ชั่วโมง ในกลุ่มผู้ที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ซึ่งได้แก่ ผู้ที่มีภาวะตับอักเสบเรื้อรัง ตับแข็ง ไวรัสตับอักเสบ และผู้ที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ (Linkous and Oliver, 1999) *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม halophile สามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* ได้จากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทะเล ตะกอนใต้ทะเล สัตว์น้ำหลายชนิด กุ้ง ปู ปลา และหอย (Hlady and Klontz, 1996) การศึกษาในครั้งนี้ได้ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้ง ดิน น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง จากการเพาะเลี้ยง ในบ่อพัก บ่อเลี้ยง โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง ในตลาดและผู้บริโภค ในจังหวัดสงขลา ตั้งแต่มีถุนายน 2553 ถึง ธันวาคม 2555 จำนวน 773 ตัวอย่าง ด้วยวิธี most probable number (MPN) technique ตรวจสอบคัดแยกเชื้อในขั้นตอนแรกด้วย CHROMagarTM Vibrio ซึ่งให้โคโลนีสีฟ้าอมเขียว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร ผลการศึกษาพบตัวอย่างที่น่าจะเป็นเชื้อ *V. vulnificus* ทั้งหมด 153 ตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงยืนยันเชื้อโดยการทำ PCR ตรวจหายีน cytolsin gene (*vvhA*) ซึ่งเป็น marker สำหรับ *V. vulnificus* (Harwood *et al.*, 2004; Panicker *et al.*, 2004) ซึ่งวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการใช้วิธีทางชีวเคมี ผลการศึกษาพบเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างน่าจะเป็นเชื้อ *V. vulnificus* ทั้งหมด 153 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 145 ตัวอย่าง (18.6 %) จากผลการศึกษา พบว่าการคัดแยกเชื้อบน CHROMagarTM Vibrio ให้ความถูกต้อง 94.7 % ทั้งนี้ CHROMagarTM Vibrio ซึ่งเป็นอาหารที่มี substrate สำหรับเอนไซม์ β -galactosidase ทำให้สามารถคัดแยกเชื้อ *Vibrio* โดย *V. parahaemolyticus* จะให้โคโลนีสีม่วง ส่วน *V. vulnificus* จะให้โคโลนีสีเขียวอมฟ้า ซึ่งเป็นสีที่ใกล้เคียงกับโคโลนี *V. cholerae* บนอาหาร CHROMagarTM Vibrio (Harwood *et al.*, 2004) และขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้ทำการทดลอง ดังนั้น การยืนยันเชื้อ ต้องนำไปทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) หรือนำไปทดสอบทางอณูชีววิทยาจึงสามารถวินิจฉัยชนิดของเชื้อได้ เช่น การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *V. vulnificus* มีการใช้ API 20E ซึ่งเป็นชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูปในการบ่งชี้เชื้อ *V. vulnificus* แต่จากการศึกษาของ Palmer และคณะ (Biosca *et al.*, 1993; Palmer and Colwell, 1991) พบว่า วิธีนี้อาจจะปรากฏผลลบปลอมได้ จึงเป็นข้อเสียเปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น จึงมีการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* โดยใช้วิธีทางอิมมูโน ซึ่ง Parker และคณะ (Parker and Lewis, 1995) ได้พัฒนาวิธี sandwich ELISA โดยหา antibody ต่อเชื้อ *V. vulnificus* เนื่องจากวิธีทางชีวเคมี จะใช้เวลานาน ।

78

ความใกล้เคียงกันระหว่างเชื้อ *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ดังนั้น จึงมีการยืนยัน โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา อันได้แก่ PCR, DNA hybridization เป็นต้น โดยใช้ส่วนของยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. vulnificus* เป็น marker ได้แก่ cytolsin gene (*vvhA*), *rpoS*

gene, *gyrB* gene และ *toxR* gene โดย *cytolysin* gene (*vvhA*) เป็นยีนอนุรักษ์ (conserved sequence) จึงพบในเชื้อ *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ (Bang *et al.*, 1999; Wright, Morris *et al.*, 1985) จึงมีการใช้ gene นี้มาเป็นตัวบ่งชี้เชื้อ *V. vulnificus* ออกจากเชื้อ *Vibrio* spp. โดยการใช้เทคนิค PCR (Morris Jr *et al.*, 1987; Wright, Morris Jr *et al.*, 1985)

การศึกษาหาค่าความชุกของเชื้อ และปริมาณของเชื้อในกุ้งเลี้ยง พบว่าในบ่อพัก ค่าความชุก และปริมาณของเชื้อสูงสุดอยู่ในระยะพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งพบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง (25.0 %) โดยพบเชื้อในกุ้งเฉลี่ย 0.80 MPN/g หลังจากนั้นไม่พบเชื้อทั้งในระยะไข่กุ้ง ระยะนอเพียส ระยะชูเอีย ระยะไมซิส ระยะลูกกุ้งอายุ 1 วัน และระยะลูกกุ้งอายุ 11-15 วัน จากผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่ามีการจัดการเลี้ยงที่ดีสำหรับโรงอนุบาลลูกกุ้ง การเตรียมบ่อ และเตรียมน้ำ ส่งผลให้ไม่พบเชื้อในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้ง จากรายงานของ ชลอ, 2555 (ชลอ, 2555) ในบ่อพัก ต้องทำความสะอาดบ่อให้สะอาดก่อนและหลังการใช้งาน โดยใช้น้ำยาล้างจานทำความสะอาดคราบสารอินทรีย์ที่เกาะติดกับผนังด้านในของบ่อ แล้วล้างด้วยน้ำจืดหลายๆ ครั้งจนสะอาด หรือใช้ร่วมกับเครื่องฉีดน้ำร้อนแรงดันสูงช่วยในการทำสะอาดให้ถึงบริเวณซอกหลืบของบ่อ ตากให้แห้งเป็นเวลา 2-3 วัน แล้วปิดบ่อให้มิดชิดด้วยผ้าใบหรือกระเบื้อง ก่อนใช้งานทุกครั้งต้องล้างบ่อด้วยน้ำจืดที่สะอาด น้ำที่ใช้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยมี 3 แนวทาง คือ ด้วยคลอรีน ความเข้มข้นประมาณ 25 พีพีเอ็ม ด้วยโอโซน ใช้เครื่องผลิตโอโซนผลิตแก๊สโอโซนใส่เข้าไปในระบบปั๊มลมที่ให้อากาศในบ่อพักน้ำ ซึ่งหลังจากฆ่าเชื้อแล้วต้องทิ้งน้ำไว้ 2-3 วัน เพื่อให้โอโซนสลายตัว และมีการให้อากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำ และด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยให้น้ำไหลเป็นฟิล์มบางๆ ผ่านเครื่องผลิตรังสีอย่างช้าๆ เพื่อให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตทำงานได้ดีในการฆ่าเชื้อโรค

การศึกษาหาค่าความชุกของเชื้อ และปริมาณของเชื้อในกุ้งเลี้ยง พบว่าค่าความชุกสูงสุดและปริมาณของเชื้อ อยู่ในระยะบ่อดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือนพบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 88 ตัวอย่าง (34.1 %) พบเชื้อเฉลี่ย 0.72 MPN/g จากผลการทดลองพบว่าเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงระหว่างกุ้งเจริญเติบโต เนื่องจากเชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เนื่องจากได้รับสารอาหารจากอาหารกุ้ง และมูลกุ้ง ระยะเวลาที่กุ้งสัมผัสกับเชื้อมีมากขึ้น และกุ้งมีขนาดที่โตขึ้น ส่งผลให้เชื้อ *V. vulnificus* มีโอกาสปนเปื้อนเข้าไปในตัวกุ้งมากขึ้นด้วย โดยเชื้อที่เกิดขึ้น เกิดจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน และในน้ำ โดยจากการศึกษาปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในดินและน้ำ พบว่าปริมาณเชื้อเฉลี่ยสูงสุดอยู่ในระยะบ่อดินที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือน ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อในดิน และน้ำ เท่ากับ 1.00 MPN/g และ 0.59 MPN/g ตามลำดับ ซึ่งเป็นปัจจัยสนับสนุนว่า เชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในกุ้ง เกิดจากการปนเปื้อนในดิน และในน้ำ ทั้งความชุกและปริมาณของเชื้ออาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมด้วย

การศึกษาคำนวณจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* พบว่าในบ่อพัก ค่าความน่าจะเป็นสูงสุดอยู่ในระยะพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งเท่ากับ 1 ค่าความน่าจะเป็นในระยะไข่กุ้ง และ ระยะนอเพียส มีค่าเท่ากัน ซึ่งเท่ากับ 0.3347 ค่าความน่าจะเป็นในระยะชูเอีย เท่ากับ 0.7332 และค่า

ความน่าจะเป็นในระยะไมซิส ระยะลูกกุ้งอายุ 1 วัน และระยะลูกกุ้งอายุ 11-15 วัน มีค่าเท่ากัน ซึ่งเท่ากับ 0.7365 ในบ่อเลี้ยง พบว่าค่าความน่าจะเป็นเท่ากันในทุกระยะ ซึ่งเท่ากับ 1 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สามารถพบเชื้อในทุกขั้นตอนการเลี้ยงกุ้ง โดยในระยะพ่อแม่พันธุ์กุ้ง และในช่วงที่กุ้งเจริญเติบโตในบ่อเลี้ยงมีโอกาสพบเชื้อได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับค่าความชุก และปริมาณของเชื้อ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Karunasagar และคณะ (Otta and Karunasagar, 2001) ซึ่งได้ทำการตรวจหาเชื้อในบ่อพัก พบว่า สามารถพบเชื้อ *Vibrio* spp. 50 – 73 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียที่พบทั้งหมด และจากรายงานของ Otta และคณะ (Otta et al., 1999) ถือว่า *Vibrio* spp. เป็นเชื้อประจำถิ่นของกุ้งเลี้ยงโดยจะพบเชื้อทั้งในระยะบ่อพัก และระยะบ่อเลี้ยง จากการศึกษาในครั้งนี้ ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นแนวทางลดความเสี่ยงที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* ในการเลี้ยงกุ้งต่อไป

การศึกษาความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งแช่แข็ง พบว่าค่าความชุกสูงสุดอยู่ในขั้นตอนกุ้งมาถึงโรงงาน ซึ่งพบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (85.7 %) พบเชื้อเฉลี่ย 2.78 MPN/g เนื่องจากเป็นขั้นตอนเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็ง กุ้งยังไม่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยคลอรีน ส่งผลให้เชื้อมีจำนวนมากปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ลดลงเรื่อยๆ เมื่อผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยคลอรีน โดยขั้นตอนกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 1 พบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (57.1 %) พบเชื้อเฉลี่ย 1.42 MPN/g และในขั้นตอนกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 2 พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (42.9 %) พบเชื้อเฉลี่ย 0.98 MPN/g ไม่พบเชื้อในขั้นตอนการกุ้งตัดหัว ปอกเปลือก ดึงไส้ และกุ้งหลังจากผ่านการล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 3 ในการล้างจะด้วยน้ำเย็นผสมคลอรีน จะใช้ความเข้มข้นของคลอรีนที่แตกต่างกัน และความเข้มข้นของคลอรีนที่ใช้ในขั้นตอนเริ่มต้นไปจนถึงขั้นตอนสุดท้ายจะลดลงเรื่อยๆ เพื่อลดปัญหาการตกค้างของคลอรีนในกุ้ง การล้างด้วยคลอรีนครั้งที่ 1 ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ใช้ความเข้มข้นของคลอรีน 150 พีพีเอ็ม 75 พีพีเอ็ม และ 30 พีพีเอ็มตามลำดับ เชื้อเพิ่มขึ้นในขั้นตอนกุ้งก่อนแช่แข็ง พบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (42.9 %) พบเชื้อเฉลี่ย 0.87 MPN/g พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากขั้นตอนก่อนหน้านี้ เนื่องจากมีการจุ่มสารละลายฟอสเฟตเพื่อเคลือบผิวก่อนนำกุ้งไปแช่แข็ง โดยมีการใช้สารละลายฟอสเฟตซ้ำๆ กันหลายครั้ง จึงทำให้มีการปนเปื้อนสะสมเชื้อ *V. vulnificus* ในสารละลายฟอสเฟต ส่งผลให้ปริมาณเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในขั้นตอนนี้สูงขึ้น และไม่พบเชื้อในขั้นตอนกุ้งหลังจากแช่แข็ง โดยอุณหภูมิในการแช่แข็ง เท่ากับ -20°C อย่างไรก็ตามพบเชื้อเพิ่มขึ้นอีกครั้งในขั้นตอนกุ้งหลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุถุงการเคลือบน้ำแข็ง (glazing) พบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (14.3 %) พบเชื้อ 0.42 MPN/g โดยการพ่นด้วยน้ำ หรือจุ่มในน้ำสะอาดผสมคลอรีนความเข้มข้น 0.1-0.2 พีพีเอ็ม อุณหภูมิไม่เกิน 5°C หลังจากจุ่มน้ำเกรสและพร้อมส่งบรรจุถุงการเคลือบน้ำแข็ง (glazing) พบว่าเชื้อเพิ่มขึ้นเนื่องจาก อาจเนื่องมาจากโรงงานมีการ

ใช้น้ำเกรสซ้ำหลายครั้งโดยไม่ได้เปลี่ยนน้ำ จึงทำให้มีการปนเปื้อนสะสมของเชื้อ *V. vulnificus* ในน้ำ และความเข้มข้นของคลอรีนในน้ำเกรสต่ำ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไม่ดี

จากรายงานของ Pelczar (1986) คลอรีนและสารประกอบคลอรีน มีคุณสมบัติที่ดีในการทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จึงมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่าง ๆ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chaiyakosa และคณะ (Chaiyakosa et al., 2007) โดยศึกษาผลของคลอรีนต่อการอยู่รอดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจนำมาผ่านสารประกอบคลอรีนแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม ปลอ่ยให้เชื้อสัมผัสกับคลอรีนเป็นเวลา 1 และ 5 นาที พบว่า ที่ความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับ 25 พีพีเอ็ม ระยะเวลา 1 และ 5 นาที มีประสิทธิภาพในการทำให้ฆ่าเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยลดลงจากเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 log CFU/ml ให้ผลเช่นเดียวกันที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม เมื่อทดสอบกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนผิวของกุ้ง จะต้องใช้คลอรีนที่มีความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ที่ระยะเวลา 60 นาที จึงจะสามารถกำจัดเชื้อได้ (ประสิทธิภาพในการทำให้ฆ่าเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์) และสอดคล้องกับงานวิจัยของหัสยานี (2556) พบว่าการล้างด้วยสารประกอบคลอรีนที่มีความเข้มข้น 250 พีพีเอ็ม ไม่สามารถกำจัดเชื้อ *V. vulnificus* ได้ทั้งหมด แต่สามารถลดปริมาณเชื้อลง 6.33 log cfu/g จากเชื้อเริ่มต้น (7.62 log cfu/g) จากการศึกษาของ Cook และคณะ (Cook and Ruple, 1992) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *V. vulnificus* จะไม่เพิ่มจำนวนในหอยที่ถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส และจากรายงานของ Kasper และคณะ พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยจะลดลง 10 เท่า หลังจากเก็บไว้ในที่ 2 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และจะลดลง 100 เท่า เมื่อเก็บไว้ใน 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (Kasper and Tamplin, 1993) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาเรื่องผลของอุณหภูมิต่ำต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Chae et al., 2009) และสอดคล้องกับการศึกษาของ (Cook and Ruple, 1992) ข้างต้นว่า เชื้อจะไม่เพิ่มจำนวนในหอยที่ถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษา การล้างกุ้งด้วยคลอรีน และการแช่แข็งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในการแปรรูปกุ้งแช่แข็ง โดยอุณหภูมิและคลอรีนมีผลต่อการเหลือรอดของเชื้อ *V. vulnificus* ซึ่งเป็นประโยชน์ในแง่ของความปลอดภัยทางอาหารและการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหารทะเล เพื่อประโยชน์ต่อสุขอนามัยประชาชนโดยรวม และ อุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งต่อไป

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าคลอรีนและความเย็นมีผลทำให้ปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ลดลง แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด ดังนั้นทางผู้ประกอบการควรมีการเฝ้าระวังในขั้นตอนการล้าง การจุ่มสารละลายฟอสเฟต และขั้นตอนการจุ่มน้ำเกรสเป็นพิเศษ เพื่อลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* ในการผลิตภัณฑืกุ้งแช่แข็ง

การประเมินความเสี่ยงของ *V. vulnificus* ในการบริโภคกุ้ง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ การระบุอันตราย การอธิบายอันตราย การประเมินการสัมผัส และการอธิบายความเสี่ยง ในขั้นตอนที่ 1.การระบุอันตราย พบว่า *V. vulnificus* จัดเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอัตราการตาย

สูงที่สุดใน foodborne disease (Todd, 1989) โดยสามารถก่อภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 60% ภายใน 24 ชั่วโมง ในกลุ่มผู้ที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ซึ่งได้แก่ ผู้ที่มีภาวะตับอักเสบเรื้อรัง ตับแข็ง ไวรัสตับอักเสบ และผู้ที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ (Linkous and Oliver, 1999) โดยจะก่อให้เกิดโรคเมื่อได้รับเชื้อปริมาณ 10^3 เซลล์ในอาหาร 1 กรัม (Martinez-Urtaza *et al.*, 2010; Strom and Paranjpye, 2000) ในขั้นตอนที่ 2 การอธิบายอันตราย เป็นการประเมินความน่าจะเป็นของการเจ็บป่วยต่อเนื่องจากการสัมผัสกับเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งแช่น้ำปลา และปลากุ้งซึ่งเป็นเมนูที่ใช้กุ้งสุกๆดิบๆ ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ *V. vulnificus* ในการหาความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากการสัมผัสกับเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 4.2 MPN/g ซึ่งเป็นปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนกระบวนการผลิตกุ้งแช่น้ำปลาในขั้นตอน F8 และ 1.08 MPN/g ซึ่งเป็นปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนสู่ผู้บริโภค ซึ่งได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าความน่าจะเป็นของการเจ็บป่วยในการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำจากกุ้งแช่น้ำแข็ง เท่ากับ 68×10^{-4} อธิบายได้ว่า ในประชากรหมื่นคน จะมี 68 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 4.2 MPN/g และความน่าจะเป็นของการเจ็บป่วยในการรับประทานปลากุ้งซึ่งทำจากกุ้งแช่น้ำแข็ง เท่ากับ 25×10^{-4} อธิบายได้ว่า ในประชากรหมื่นคน จะมี 25 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 4.2 MPN/g และพบว่าความน่าจะเป็นของการเจ็บป่วยในการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำจากที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภคเท่ากับ 17.2×10^{-4} อธิบายได้ว่า ในประชากรหมื่นคน จะมี 17 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 1.08 MPN/g และความน่าจะเป็นของการเจ็บป่วยในการรับประทานปลากุ้งซึ่งทำจากที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค เท่ากับ 6.4×10^{-4} อธิบายได้ว่า ในประชากรแสนคน จะมี 6 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการสัมผัสเชื้อ จำนวน 1.08 MPN/g ในขั้นตอนที่ 3 การประเมินการสัมผัส เป็นการประเมินความน่าจะเป็นที่ร่างกายได้รับสัมผัสเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ ในกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งแช่น้ำแข็ง คือ 0.06 หมายความว่าในการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 100 ครั้ง จะมี 6 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ และในปลากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งแช่น้ำแข็ง คือ 0.03 หมายความว่าในการบริโภคปลากุ้ง 100 ครั้ง จะมี 3 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ ในกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภคคือ 0.06 หมายความว่าในการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 100 ครั้งจะมี 6 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ และในปลากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภคคือ 0.03 หมายความว่าในการบริโภคปลากุ้ง 100 ครั้งจะมี 3 ครั้งที่มีโอกาสได้รับเชื้อ *V. vulnificus* อย่างน้อย 1 เซลล์ และขั้นตอนที่ 4 การอธิบายความเสี่ยง เป็นการประเมินโอกาสในการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา และปลากุ้งที่ทำมาจากกุ้งแช่น้ำแข็ง และจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภคที่มีการปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* พบว่าหากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งแช่น้ำแข็งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 4.2 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 4 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง หากบริโภคปลากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งแช่น้ำแข็งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 4.2 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคปลากุ้ง 1 ครั้ง หากบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจาก

ตลาดผู้บริโภคระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง และหากบริโภคปลากุ้งซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดผู้บริโภคระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรแสนคน ไม่มีคนเกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคปลากุ้ง 1 ครั้ง การศึกษาของ Wearukanjana และคณะ (Wearukanjana *et al.*, 2003) พบว่าเมื่อรับประทานกุ้งแช่แข็งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในระดับ 300 cfu ขึ้นไป จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค ร้อยละ 6.3 จากการศึกษาของ (Yamamoto *et al.*, 2008) แสดงให้เห็นว่าสามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ ขั้นตอนการจับ และขาย แต่จะไม่พบเชื้อหากปรุงให้มีอุณหภูมิภายในหอยสูงกว่า 64 °C ผลการประเมินยังแสดงให้เห็นว่าเวลา และอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้จำนวนเชื้อเพิ่มมากขึ้น และ แสดงถึงโอกาสที่ผู้บริโภคจะป่วยจาก *V. parahaemolyticus* เป็น 5.6×10^{-4} /คน/ปี หรือ โดยประมาณคือ ทุก 6 ใน 10,000/คน/ปี ผู้ที่ไม่ปรุงอาหารให้สุกจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงพบผู้ป่วย และจากการศึกษาของ (Hlady and Klontz, 1996) พบการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในรัฐฟลอริดาทั้งหมด 690 ราย ในระหว่างปี 1981-1993 (4.3 ผู้ป่วย / 1,000,000 คน/ ปี)

จากการประเมินความเสี่ยงพบว่า การบริโภคกุ้งที่ขนส่งจากตลาดผู้บริโภคซึ่งเป็นกุ้งจากบ่อเลี้ยง มีความเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยน้อยกว่าการบริโภคกุ้งจากโรงงานกุ้งแช่แข็ง เนื่องจากในการบริโภคกุ้งแช่แข็งต้องตั้งกุ้งให้ละลาย ซึ่งเชื้อจะเพิ่มขึ้น 1 log ส่งผลทำให้ปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ซึ่งปนเปื้อนในกุ้งแช่แข็ง มากกว่ากว่ากุ้งจากบ่อเลี้ยง และจากการประเมินความเสี่ยงพบว่าว่าการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลามีความเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยมากกว่าการบริโภคปลากุ้ง เนื่องจากมีการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลามากกว่าปลากุ้ง และพิจารณาจากลักษณะการบริโภค พบว่า การบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา เป็นแบบดิบ ส่วนการบริโภคปลากุ้ง เป็นแบบดิบ กึ่งสุกกึ่งดิบ เกือบสุก และดิบ ส่งผลให้กุ้งแช่น้ำปลาปริมาณเชื้อมากกว่าในปลากุ้ง

จากผลงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นความน่าจะเป็น ความชุก และจำนวนของเชื้อ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในกุ้ง ทุกขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่การเลี้ยง ผู้โรงงานกุ้งแช่แข็ง และผู้บริโภค จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนโรงงานกุ้งแช่แข็ง ซึ่งเป็นประโยชน์ในแง่ของความปลอดภัยทางอาหารและการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหาร เพื่อประโยชน์ต่อสุขอนามัยประชาชนโดยรวม และ อุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็งต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการแยกเชื้อพบเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำตะกอนดิน กุ้ง อาหารเลี้ยงกุ้ง น้ำแข็ง น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ในบ่อพัก บ่อเลี้ยง การจับ และขนส่งสู่โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง รวมทั้ง การขนส่งสู่ตลาดและผู้บริโภค ทั้งหมด 145 ตัวอย่าง (18.6%)

2. ในบ่อพักค่าความชุก และปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งสูงสุดอยู่ในระยะฟักตัวแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งพบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง (25.0%) โดยพบเชื้อเฉลี่ย 0.80 MPN/g

3. ในบ่อเลี้ยงค่าความชุก และปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในในกุ้งสูงสุดอยู่ในระยะบ่อเลี้ยงที่ลงลูกกุ้งแล้ว 4.5 เดือนพบ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 88 ตัวอย่าง (34.1%) พบเชื้อเฉลี่ย 0.80 MPN/g

4. ความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *V. vulnificus* พบว่าในบ่อพัก ความน่าจะเป็นในการพบเชื้อสูงสุดอยู่ในระยะฟักตัวแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งเท่ากับ 1 ในบ่อเลี้ยง พบว่าความน่าจะเป็นในการพบเชื้อเท่ากันในทุกระยะ ซึ่งเท่ากับ 1

5. ค่าความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในกุ้งแช่แข็ง สูงสุดอยู่ในขั้นตอนกุ้งมาถึงโรงงาน ซึ่งพบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (85.7%) พบเชื้อเฉลี่ย 2.78 MPN/g

6. ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนการขนส่งจากบ่อเลี้ยงสู่ตลาด พบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (75.0%) พบเชื้อเฉลี่ย 0.42 MPN/g

7. ความชุกและปริมาณของเชื้อ *V. vulnificus* ในขั้นตอนการขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภค พบเชื้อ *V. vulnificus* ในตัวอย่าง 13 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (43.3%) พบเชื้อเฉลี่ย 1.08 MPN/g

8. การบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 4.2 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน จะมี 4 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง และหากบริโภคปลาซึ่งทำมาจากกุ้งแช่แข็งที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 4.2 MPN/g พบว่าในประชากรแสนคน จะมี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคปลา 1 ครั้ง

9. การบริโภคกุ้งแช่น้ำปลาซึ่งทำมาจากกุ้งที่ขนส่งจากตลาดสู่ผู้บริโภคที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน มี 1 คน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคกุ้งแช่น้ำปลา 1 ครั้ง และหากบริโภคปลาซึ่งทำมาจากกุ้งที่พร้อมจำหน่ายที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อ *V. vulnificus* 1.08 MPN/g พบว่าในประชากรหมื่นคน ไม่มีคน เกิดการเจ็บป่วยจากการบริโภคปลา 1 ครั้ง

เอกสารอ้างอิง

- กลิ่นคำสอน, ส. 2554. สถานการณ์และแนวโน้มอุตสาหกรรมอาหาร. อุตสาหกรรมสาร
- กัลยาณี ดีประเสริฐวงศ์ และจารุณี อินทรสุข. 2554. การบริหารจัดการความเสี่ยงกรณีอาหาร
ส่งออกที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio vulnificus*. วารสารอาหารและยา. 2 (18):4-7.
- খনอมจิต สิริภคพร. 2555. อุตสาหกรรมกุ้งไทยปี 2555 และแนวโน้มปี 2556.
<http://www.bot.or.th/Thai/EconomicConditions/Thai/South/EconomicPapers/Reasearch Paper/ShrimplIndustry.pdf> (สืบค้นเมื่อ 8 ตุลาคม 2556)
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2555. ทางรอดกุ้งไทยปี 2556.
- ฐะปะนีย์ เครื่องประดิษฐ์ . 2555. สานักนโยบายและยุทธศาสตร์การค้าสินค้าเกษตร.
http://pcoc.moc.go.th/wappPCOC/57/upload/File_IPD_FILE57193486.pdf (สืบค้น
เมื่อ 8 ตุลาคม 2556)
- เพ็ญศรี รอดมา, อุราวัลย์ วุฒิกรภรณ์ และอัชนา ฐานานุวัฒน์. 2530. การศึกษาคุณภาพของกุ้ง
น้ำจืดและ กุ้งทะเลแช่แข็งตลอดฤดูกาลผลิตเพื่อการส่งออก. ข้าวประมง. 13(11): 41-
44.
- มาลินี วิชชาวุธ และสมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรม
ประมง. วารสารการประมง. 58(2): 170
- ศรัทธา หัตยานานนท์, กรองแก้ว ศุภวัฒน์ และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ. 2549. มหันตภัยจาก
เชื้อ *Vibrio vulnificus*. weekly epidemiological surveillance report. 37(45): 797-801
- ศุภชัย เนื่อนวลสุวรรณ, สุวรรณ เทพสุนทร และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์. 2555. รายงานการ
วิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์ Hazard Characterization of *Salmonella*
spp. and *Vibrio parahaemolyticus*
- Amaro, C. and Biosca, E. G. 1996. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is
also an opportunistic pathogen for humans. Applied and environmental
microbiology. 62 (4):1454-1457.

- Amaro, C., Fouz, B., Biosca, E. G., Marco-Noales, E. and Collado, R. 1997. The lipopolysaccharide O side chain of *Vibrio vulnificus* serogroup E is a virulence determinant for eels. *Infect Immun.* 65 (6):2475-2479.
- Arias, C., Maci n, M., Aznar, R., Garay, E. and Pujalte, M. 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *Journal of applied microbiology.* 86 (1):125-134.
- Bang, Y. B., Lee, S. E., Rhee, J. H. and Choi, S. H. 1999. Evidence that expression of the *Vibrio vulnificus* hemolysin gene is dependent on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. *Journal of bacteriology.* 181 (24):7639-7642.
- Biosca, E., Amaro, C., Esteve, C., Alcaide, E. and Garay, E. 1991. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases.* 14 (1):103-109.
- Biosca, E., Esteve, C., Garay, E. and Amaro, C. 1993. Evaluation of the API 20E system for identification and discrimination of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2. *Journal of Fish Diseases.* 16 (1):79-82.
- Biosca, E. G., Fouz, B., Alcaide, E. and Amaro, C. 1996. Siderophore-mediated iron acquisition mechanisms in *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl Environ Microbiol.* 62 (3):928-935.
- Biosca, E. G., Oliver, J. D. and Amaro, C. 1996. Phenotypic characterization of *Vibrio vulnificus* biotype 2, a lipopolysaccharide-based homogeneous O serogroup within *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology* 62. (3):918-927.
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D. N., Wykstra, D. L., Swerdlow, D. L. and Farmer, J. J., 3rd. 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel Vibrio Study Group. *Lancet.* 354 (9188):1421-1424.

- Bisharat, N. and Raz, R. 1996. *Vibrio* infection in Israel due to changes in fish marketing. Lancet. 348 (9041):1585-1586.
- Bogard, R. W. and Oliver, J. D. 2007. Role of iron in human serum resistance of the clinical and environmental *Vibrio vulnificus* genotypes. Applied and environmental microbiology. 73 (23):7501-7505.
- Bondad-Reantaso, M. G., Arthur, J. R. and Subasinghe, R. P. 2008. Understanding and applying risk analysis in aquaculture: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Brayton, P., West, P., Russek, E. and Colwell, R. 1983. New selective plating medium for isolation of *Vibrio vulnificus* biogroup 1. Journal of Clinical Microbiology. 17 (6):1039.
- Chae, M., Cheney, D. and Su, Y. C. 2009. Temperature Effects on the Depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American Oyster (*Crassostrea virginica*). Journal of food science. 74 (2):62-66.
- Chaiyakosa, S., Charernjiratragul, W., Umsakul, K. and Vuddhakul, V. 2007. Comparing the efficiency of chitosan with chlorine for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. Food Control. 18 (9):1031-1035.
- Chan, K. Y., Woo, M. L., Lo, K. W. and French, G. L. 1986. Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of Hong Kong. Appl Environ Microbiol. 52 (6):1407-1411.
- Chang, A. K., Kim, H. Y., Park, J. E., Acharya, P., Park, I. S., Yoon, S. M., You, H. J., Hahm, K. S., Park, J. K. and Lee, J. S. 2005. *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. Journal of bacteriology. 187 (20):6909-6916.
- Chatzidaki-Livanis, M., Jones, M. K. and Wright, A. C. 2006. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon. Journal of bacteriology. 188 (5):1987-1998.

- Chen, C. Y., Wu, K. M., Chang, Y. C., Chang, C. H., Tsai, H. C., Liao, T. L., Liu, Y. M., Chen, H. J., Shen, A. B. T. and Li, J. C. 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Research*. 13 (12):2577-2587.
- Chiang, S. R. and Chuang, Y. C. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 36 (2):81-88.
- Colodner, R., Raz, R., Meir, I., Lazarovich, T., Lerner, L., Kopelowitz, J., Keness, Y., Sakran, W., Ken-Dror, S. and Bisharat, N. 2004. Identification of the emerging pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 3 by commercially available phenotypic methods. *Journal of clinical microbiology*. 42 (9):4137-4140.
- Cook, D. and Ruple, A. 1992. Cold storage and mild heat treatment as processing aids to reduce the numbers of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. *Journal of food protection (USA)*.
- Dalsgaard, A. and Hoi, L. 1997. Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from shrimp products imported into Denmark. *Journal of Food Protection*. 60 (9):1132-1134.
- Daniels, N. A. 2011. *Vibrio vulnificus* oysters: pearls and perils. *Clinical Infectious Diseases*. 52 (6):788-792.
- FDA. 2001. Draft Risk Assessment on the Public Health Impacts of *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Molluscan Shellfish.
- Frank, C., Littman, M., Alpers, K. and Hallauer, J. 2006. *Vibrio vulnificus* wound infections after contact with the Baltic Sea, Germany. *Euro Surveill*. 11 (8): 60817.
- Ghinsberg, R., Dror, R. and Nitzan, Y. 1999. Isolation of *Vibrio vulnificus* from sea water and sand along the Dan region coast of the Mediterranean. *Microbios*. 97 (386):7-17.

- Goo, S. Y., Han, Y. S., Kim, W. H., Lee, K. H. and Park, S. J. 2007. *Vibrio vulnificus* IlpA-induced cytokine production is mediated by Toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*. 282 (38):27647-27658.
- Goo, S. Y., Lee, H. J., Kim, W. H., Han, K. L., Park, D. K., Kim, S. M., Kim, K. S., Lee, K. H. and Park, S. J. 2006. Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis. *Infection and immunity*. 74 (10):5586-5594.
- Grau, B. L., Henk, M. C. and Pettis, G. S. 2005. High-frequency phase variation of *Vibrio vulnificus* 1003: isolation and characterization of a rugose phenotypic variant. *Journal of bacteriology*. 187 (7):2519-2525.
- Gray, L. D. and Kreger, A. S. 1986. Detection of anti-*Vibrio vulnificus* cytolysin antibodies in sera from mice and a human surviving *V. vulnificus* disease. *Infection and immunity*. 51 (3):964.
- Gulig, P. A., Bourdage, K. L. and Starks, A. M. 2005. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J. Microbiol.* 43:118-131.
- Han, F. and Ge, B. 2010. Multiplex PCR assays for simultaneous detection and characterization of *Vibrio vulnificus* strains. *Letters in applied microbiology*. 51 (2):234-240.
- Harwood, V. J., Gandhi, J. P. and Wright, A. C. 2004. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *Journal of microbiological methods*. 59 (3):301-316.
- Harwood, V. J., Gandhi, J. P. and Wright, A. C. 2004. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *Journal of microbiological methods*. 59 (3):301-316.
- Hilton, T., Rosche, T., Froelich, B., Smith, B. and Oliver, J. 2006. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology*. 72 (11):6986-6993.

- Hlady, W. G. and Klontz, K. C. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *Journal of Infectious Diseases*. 173 (5):1176-1183.
- Hoi, L., Larsen, J., Dalsgaard, I. and Dalsgaard, A. 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Applied and environmental microbiology*. 64 (1):7-13.
- Hollis, D., Weaver, R., Baker, C. and Thornsberry, C. 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 3 (4):425.
- Hor, L. I., Chang, Y. K., Chang, C. C., Lei, H. Y. and Ou, J. T. 2000. Mechanism of high susceptibility of iron-overloaded mouse to *Vibrio vulnificus* infection. *Microbiology and immunology*. 44 (11):871.
- Hsueh, P. R., Lin, C. Y., Tang, H. J., Lee, H. C., Liu, J. W., Liu, Y. C. and Chuang, Y. C. 2004. *Vibrio vulnificus* in Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 10 (8):1363-8.
- Hsueh, P. R., Lin, C. Y., Tang, H. J., Lee, H. C., Liu, J. W., Liu, Y. C. and Chuang, Y. C. 2004. *Vibrio vulnificus* in Taiwan. *Emerging infectious diseases*. 10 (8):1363.
- Jacobson, M. F. a. P., D. W. . 2012. U.S. Department of health and human services food and drug administration, Center for Science in the Public Interest, Washington, D.C.
- Ji, H., Chen, Y., Guo, Y., Liu, X., Wen, J. and Liu, H. 2011. Occurrence and characteristics of *Vibrio vulnificus* in retail marine shrimp in China. *Food Control*. 22 (12):1935-1940.
- Jones, M. K. and Oliver, J. D. 2009. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infection and immunity*. 77 (5):1723-1733.
- Kang, M. K., Jhee, E. C., Koo, B. S., Yang, J. Y., Park, B. H., Kim, J. S., Rho, H. W., Kim, H. R. and Park, J. W. 2002. Induction of Nitric Oxide Synthase Expression by *Vibrio vulnificus* Cytolysin. *Biochemical and biophysical research communications*. 290 (3):1090-1095.

- Karunasagar, I., Venugopal, M. and Segar, K. 1986. Evaluation of methods for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. Applied and environmental microbiology. 52 (3):583.
- Kashimoto, T., Ueno, S., Hanajima, M., Hayashi, H., Akeda, Y., Miyoshi, S., Hongo, T., Honda, T. and Susa, N. 2003. *Vibrio vulnificus* induces macrophage apoptosis in vitro and in vivo. Infection and immunity. 71 (1):533-535.
- Kaspar, C. and Tamplin, M. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. Applied and Environmental Microbiology. 59 (8):2425.
- Kaysner, C. A., Abeyta, C., Jr., Wekell, M. M., DePaola, A., Jr., Stott, R. F. and Leitch, J. M. 1987. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. Appl Environ Microbiol. 53 (6):1349-1351.
- Kaysner, C. A., Tamplin, M. L., Wekell, M. M., Stott, R. F. and Colburn, K. G. 1989. Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery. Appl Environ Microbiol. 55 (12):3072-3079.
- Kim, B. S. and Kim, J. S. 2002. Cholesterol induce oligomerization of *Vibrio vulnificus* cytolysin specifically. Experimental and molecular medicine. 34 (3):239-242.
- Kim, C. M., Park, R. Y., Choi, M. H., Sun, H. Y. and Shin, S. H. 2007. Ferrophilic characteristics of *Vibrio vulnificus* and potential usefulness of iron chelation therapy. Journal of Infectious Diseases. 195 (1):90-98.
- Kim, C. M., Park, R. Y., Park, J. H., Sun, H. Y., Bai, Y. H., Ryu, P. Y., Kim, S. Y., Rhee, J. H. and Shin, S. H. 2006. *Vibrio vulnificus* vulnibactin, but not metalloprotease VvpE, is essentially required for iron-uptake from human holotransferrin. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29 (5):911-918.

- Kim, I. H., Lee, K. E., Kim, I. J. and Kim, K. S. 2008. Nonribosomal Peptide Synthase is Responsible for the Biosynthesis of Siderophore in *Vibrio vulnificus* MO6-24/O. *Journal of microbiology and biotechnology*. 18 (1):35-42.
- Kim, Y. R., Lee, S. E., Kook, H., Yeom, J. A., Na, H. S., Kim, S. Y., Chung, S. S., Choy, H. E. and Rhee, J. H. 2007. *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. *Cellular microbiology*. 10 (4):848-862.
- Kothary, M. H. and Kreger, A. S. 1987. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Journal of general microbiology*. 133 (7):1783-1791.
- Lammerding, A. M. and Fazil, A. 2000. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *International journal of food microbiology*. 58 (3):147-157.
- Lee, J. H., Rho, J. B., Park, K. J., Kim, C. B., Han, Y. S., Choi, S. H., Lee, K. H. and Park, S. J. 2004. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity*. 72 (8):4905-4910.
- Lhafi, S. K. and Kuhne, M. 2007. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *International journal of food microbiology*. 116 (2):297-300.
- Linkous, D. A. and Oliver, J. D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett*. 174 (2):207-214.
- Linkous, D. A. and Oliver, J. D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS microbiology letters*. 174 (2):207-214.
- Litwin, C. M. and Byrne, B. L. 1998. Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infection and immunity*. 66 (7):3134-3141.
- Litwin, C. M., Rayback, T. W. and Skinner, J. 1996. Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infection and immunity*. 64 (7):2834-2838.

- Maeda, H. and Yamamoto, T. 1996. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 377 (4):217.
- Mahmud, Z. H., Neogi, S. B., Kassu, A., Mai Huong, B. T., Jahid, I. K., Islam, M. S. and Ota, F. 2008. Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS microbiology ecology*. 64 (2):209-218.
- Martinez-Urtaza, J., Bowers, J. C., Trinanes, J. and DePaola, A. 2010. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*. 43 (7):1780-1790.
- Massad, G. and J. D. Oliver. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (53):2262-2264.
- McPherson, V. L., Watts, J. A., Simpson, L. M. and Oliver, J. D. 1991. Physiological effects of the lipopolysaccharide of *Vibrio vulnificus* on mice and rats. *Microbios*. 67 (272-273):141.
- Messelhusser, U., Colditz, J., Thirgen, D., Kleih, W., Hüller, C. and Busch, U. 2010. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. *International journal of food microbiology*.
- Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K. and Hara-Kudo, Y. 2006. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic birds in Japan. *Epidemiol Infect.* 134 (4):780-785.
- Morris Jr, J. G., Wright, A. C., Simpson, L. M., Wood, P. K., Johnson, D. E. and Oliver, J. D. 1987. Virulence of *Vibrio vulnificus*: association with utilization of transferrin-bound iron, and lack of correlation with levels of cytotoxin or protease production. *FEMS microbiology letters*. 40 (1):55-59.

- Mueller, R. S., McDougald, D., Cusumano, D., Sodhi, N., Kjelleberg, S., Azam, F. and Bartlett, D. H. 2007. *Vibrio cholerae* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic surface colonization. *Journal of bacteriology*. 189 (14):5348-5360.
- Nascimento, S. M. M., Vieira, R. H. S. F., Theophilo, G. N. D., Rodrigues, D. P. and Vieira, G. H. F. 2001. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de S o Paulo*. 43 (5):263-266.
- Nishibuchi, M. and Seidler, R. J. 1985. Demonstration of a common antigen in sonicated cells for identification of *Vibrio vulnificus* serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 21 (1):97.
- Nomura, I. 2009. *Fishery and Aquaculture Statistics 2007*
- Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Oliver, J. 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiology and Infection*. 133 (03):383-391.
- Oliver, J. D., Nilsson, L. and Kjelleberg, S. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and environmental microbiology*. 57 (9):2640-2644.
- Otta, S. and Karunasagar, I. 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *Journal of Applied Ichthyology*. 17 (2):59-63.
- Otta, S., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 1999. Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Penaeus monodon* in India. *Journal of Aquaculture in the Tropics*.
- Palmer, L. M. and Colwell, R. R. 1991. Detection of luciferase gene sequence in nonluminescent *Vibrio cholerae* by colony hybridization and polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology*. 57 (5):1286.

- Panicker, G., Vickery, M. C. and Bej, A. K. 2004. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. Canadian journal of microbiology. 50 (11):911-922.
- Park, N. Y., Lee, J. H., Kim, M. W., Jeong, H. G., Lee, B. C., Kim, T. S. and Choi, S. H. 2006. Identification of the *Vibrio vulnificus* wbpP gene and evaluation of its role in virulence. Infection and immunity. 74 (1):721-728.
- Parker, R. W. and Lewis, D. H. 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio vulnificus* hemolysin to detect *V. vulnificus* in environmental specimens. Applied and Environmental Microbiology. 61 (2):476.
- Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O. and Cohen, D. 2007. Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. Environmental research. 103 (3):390-396.
- Radu, S., Elhadi, N., Hassan, Z., Rusul, G., Lihan, S. and Fifadara, N. 1998. Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles (*Anadara granosa*): antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. FEMS microbiology letters. 165 (1):139-143.
- Ran Kim, Y. and Haeng Rhee, J. 2003. Flagellar basal body operon as a virulence determinant of *Vibrio vulnificus*. Biochemical and biophysical research communications. 304 (2):405-410.
- Roberts, I. S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annual Reviews in Microbiology. 50 (1):285-315.
- Ross, S. M., Shanthikumar, J. G. and Zhu, Z. 2005. On increasing-failure-rate random variables. Journal of Applied Probability. 797-809.
- Sani, N. A., Ariyawansa, S., Babji, A. S. and Hashim, J. K. 2012. The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in cooked black tiger shrimps *Penaeus monodon* in Malaysia. Food Control. 31:546-552

- Sanjun, E. and Amaro, C. 2007. Multiplex PCR assay for detection of *Vibrio vulnificus* biotype 2 and simultaneous discrimination of serovar E strains. *Applied and environmental microbiology*. 73 (6):2029-2032.
- Saoud, I. P., Davis, D. A. and Rouse, D. B. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture*. 217 (1):373-383.
- Shapiro, R., Altekruze, S., Hutwagner, L., Bishop, R., Hammond, R., Wilson, S., Ray, B., Thompson, S., Tauxe, R. and Griffin, P. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988–1996. *Journal of Infectious Diseases*. 178 (3):752.
- Shu Geng, R. N. Campbell, M. Carter and Hills, F. J. 1983. Quality -Control Programs for Seedborne. *Plant Disease*. 67 (2):236-239.
- Simpson, L. M. and Oliver, J. D. 1983. Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity*. 41 (2):644-649.
- Starks, A. M., Bourdage, K. L., Thiaville, P. C. and Gulig, P. A. 2006. Use of a marker plasmid to examine differential rates of growth and death between clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in experimentally infected mice. *Molecular microbiology*. 61 (2):310-323.
- Strom, M. S. and Paranjpye, R. N. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*. 2 (2):177-188.
- Tamplin, M., Specter, S., Rodrick, G. and Friedman, H. 1983. Differential complement activation and susceptibility to human serum bactericidal action by *Vibrio* species. *Infection and immunity*. 42 (3):1187-1190.
- Tamplin, M., Specter, S., Rodrick, G. and Friedman, H. 1985. *Vibrio vulnificus* resists phagocytosis in the absence of serum opsonins. *Infection and immunity*. 49 (3):715-718.

- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. and Polz, M. F. 2004. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol.* 70 (7):4103-10.
- Tison, D. L., Nishibuchi, M., Greenwood, J. and Seidler, R. 1982. *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels. *Applied and Environmental Microbiology.* 44 (3):640.
- Todd, E. C. 1989. Costs of acute bacterial foodborne disease in Canada and the United States. *International journal of food microbiology.* 9 (4):313-326.
- Torres, L., Escobar, S., Lopez, A., Marco, M. and Pobo, V. 2002. Wound infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 21 (7):537-538.
- Veenstra, J., Rietra, P., Coster, J., Slaats, E. and Dirks-Go, S. 1994. Seasonal variations in the occurrence of *Vibrio vulnificus* along the Dutch coast. *Epidemiology and Infection.* 112 (02):285-290.
- Veenstra, J., Rietra, P., Coster, J., Stoutenbeek, C., Laak, E. A., Haenen, O., Gier, H. H. W. and DIRKS GO, S. 1993. Human *Vibrio vulnificus* infections and environmental isolates in the Netherlands. *Aquaculture Research.* 24 (1):119-122.
- Venkateswaran, K., Nakano, H., Okabe, T., Takayama, K., Matsuda, O. and Hashimoto, H. 1989. Occurrence and distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp., and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland Sea of Japan. *Appl Environ Microbiol.* 55 (3):559-67.
- Wearukanjana, P., Tuitemwong, P., Kerdsinchai, W. and Tuitemwong, K. 2003. Quantitative Risk Assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in Thai Frozen Shrimp.
- Webster, A. C. D. and Litwin, C. M. 2000. Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vibriobactin receptor. *Infection and immunity.* 68 (2):526-534.

WHO/FAO. 2005. Risk Assessment of *Vibrio vulnificus* in Raw Oysters: Interpretative summary and technical report.

Wright, A., Simpson, L., Oliver, J. and Morris Jr, J. 1990. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. Infection and immunity. 58 (6):1769.

Wright, A. C., Hill, R. T., Johnson, J. A., Roghman, M. C., Colwell, R. R. and Morris Jr, J. G. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology. 62 (2):717.

Wright, A. C. and Morris, J. 1991. The extracellular cytotoxin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice. Infection and immunity. 59 (1):192-197.

Wright, A. C., Morris, J., Maneval, D., Richardson, K. and Kaper, J. B. 1985. Cloning of the cytotoxin-hemolysin gene of *Vibrio vulnificus*. Infection and immunity. 50 (3):922-924.

Wright, A. C., Morris Jr, J. G., Maneval Jr, D., Richardson, K. and Kaper, J. B. 1985. Cloning of the cytotoxin-hemolysin gene of *Vibrio vulnificus*. Infection and immunity. 50 (3):922.

Wright, A. C., Simpson, L. M. and Oliver, J. D. 1981. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. Infection and immunity. 34 (2):503-507.

Yamamoto, A., Iwahori, J., Vuddhakul, V., Charernjiratragul, W., Vose, D., Osaka, K., Shigematsu, M., Toyofuku, H., Yamamoto, S., Nishibuchi, M. and Kasuga, F. 2008. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand. Int J Food Microbiol. 124 (1):70-78.

Yano, Y., Yokoyama, M., Satomi, M., Oikawa, H. and Chen, S. S. 2004. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. Journal of Food Protection. 67 (8):1617-1623.

Yoshida, S., Ogawa, M. and Mizuguchi, Y. 1985. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. Infection and immunity. 47 (2):446-451.

Zaidenstein, R., Sadik, C., Lerner, L., Valinsky, L., Kopelowitz, J., Yishai, R., Agmon, V., Parsons, M., Bopp, C. and Weinberger, M. 2008. Clinical characteristics and molecular subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel. Emerging infectious diseases. 14 (12):1875.