

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

1. ลักษณะอาการและเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยเป่าฮือป่วย

จากการศึกษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในหอยเป่าฮือในครั้งนี้ พบว่าหอยมีอาการป่วยอยู่เสมอๆ ในแหล่งเลี้ยง 2 แหล่ง แต่เป็นอาการป่วยที่ไม่รุนแรงมากนักและมีอัตราการตายต่ำ โดยทยอยตายครั้งละประมาณ 1-2 ตัว ในระยะเวลาห่างกัน ส่วนอีก 1 แหล่งเลี้ยงแสดงอาการป่วยรุนแรงมาก และทยอยตายอย่างรวดเร็วจนแทบหมดบ่อในระยะเวลาอันสั้น

จากการเก็บตัวอย่างหอยป่วยที่มีอาการและอัตราการตายไม่รุนแรง มาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนั้นพบว่าเชื้อที่แยกได้จากหอยป่วยส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อไวรัส แต่จากการทดสอบหาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคโดยแท้จริงโดยฉีดเชื้อเข้าสู่หอยปกติพบว่า มีเพียง 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรง คือ *V. splendidus* I และ *V. alginolyticus* ส่วน *V. nereis* นั้นแม้สามารถก่อให้เกิดแผลหนองแต่หอยสามารถมีชีวิตได้ตามปกติจนสิ้นสุดการทดลอง และแผลหนองที่เคยปรากฏกลับหายตามปกติ ซึ่งแสดงว่าเชื้อชนิดนี้อาจจะเป็นเชื้อที่ไม่รุนแรง ส่วนเชื้อที่แยกได้จากหอยเป่าฮือที่แสดงอาการป่วยอย่างรุนแรงที่หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ไม่สามารถทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีจนถึงระดับที่จะแยกชนิดได้ เนื่องจากเชื้อตายในระหว่างเก็บรักษา แต่ทราบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แท่งสั้น ปฏิกริยาออกซิเดสให้ผลบวกและเจริญได้ดีบนอาหาร TCBS ซึ่งเป็นอาหารที่จำเพาะ (selective media) สำหรับการเจริญของเชื้อไวรัส ให้โคโลนีสีเขียว (ไม่หมักย่อยน้ำตาลซูโครส) แทบทั้งหมด ทั้งที่แยกได้จากเลือดและจากคุ่มหนองของหอยป่วย แม้จะมีเชื้อไวรัสที่ให้โคโลนีสีเหลืองบ้างเล็กน้อย แต่ไม่น่าจะเป็นชนิดที่ก่อโรค ส่วนลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร TSA นั้น มีลักษณะเดียวกันและเด่นมาก คือ โคโลนีขุ่น ขนาดเล็ก และเมื่อนำมาทดสอบบนอาหาร TCBS ก็ให้โคโลนีสีเขียวเช่นเดียวกับที่แยกได้จากหอยป่วยในการแยกเชื้อเริ่มต้นบนอาหาร TCBS ดังนั้นจึงน่าจะเป็นเชื้อไวรัสชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดอาการของโรคอย่างรุนแรงในครั้งนี้ และถึงแม้จะไม่ได้ทดสอบการก่อให้เกิดโรค แต่หากสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ชนิดเดียวกันเกินกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนหอยป่วยทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าเชื่อนั้นน่าจะเป็นสาเหตุของโรค (Prof. K. Muroga, personal communication) และกิจการ และคณะ (2539) กล่าวว่าเชื้อกลุ่มไวรัสโอมักจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อยและน้ำเค็ม นอกจากนี้ สสภาพ และคณะ (2529) รายงานว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคไวรัสในปลากระพงขาวนั้น เป็นกลุ่มของเชื้อไวรัสโอเช่นเดียวกัน

เช่น *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ส่วนเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคนก
เช่น *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V.*
anguillarum, *V. fluvialis* เป็นต้น (Jiravanichpaisal and Miyazaki, 1994) สำหรับเชื้อที่ก่อโรคใน
หอยส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสเช่นกัน เช่น *V. anguillarum* และ *V. alginolyticus* ซึ่งก่อให้เกิด
เกิดการตายในลูกหอยวัยอ่อนของหอยเชลล์ (*Argopecten purpuratus*) (Riquelme et al., 1996)
V. tubiashii และ *V. anguillarum* ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยวัยอ่อนในโรงเพาะฟักที่ชายฝั่ง
ประเทศสเปน (Lodeiros et al., 1987) เป็นต้น

สำหรับอาการของหอยเป่าอื้อที่ป่วยรุนแรงที่หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ ของคณะวิทยา
ศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คือ ส่วนใหญ่กล้ามเนื้อฝ้ามัวมีแผลหนอง
หลายบริเวณ กล้ามเนื้อเท้าอ่อนแอ หดตัวลีบลง เมื่อวางหอยไม่สามารถใช้กล้ามเนื้อเท้าดันพลิก
กลับตัวได้เหมือนหอยปกติทั่วไป มีการตายอย่างรุนแรงเช่นเดียวกับการรายงานการเกิดโรคเท้าเปื่อย
ในหอยเป่าอื้อ *H. asinina* ที่ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ อันมีสาเหตุจาก
การติดเชื้อ *Vibrio* sp. (นันทริกา, 2541) และอาการลักษณะนี้ก็เกิดขึ้นในหอยเป่าอื้อ *H. rufescens*
ที่เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* (Elston, 1983a) และพบว่ามีแผลที่เป็นหนองเกิดขึ้นในหอยเป่าอื้อ
H. discus hannai ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *V. fluvialis* II เช่นกัน ซึ่งสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย
ชนิดนี้ได้จากกล้ามเนื้อเท้าของหอยป่วย (Taiwu et al., 1996) นอกจากนี้การเกิดแผลที่มีสาเหตุจาก
การทำลายโดยเชื้อแบคทีเรียสามารถพบได้ในหอยมุก *Pinctada maxima* ที่ติดเชื้อ *V. harveyi* (Pass
et al., 1987) ส่วนหอยที่ป่วยไม่รุนแรงแม้จะไม่ปรากฏแผลหนองและมีอัตราการตายไม่รุนแรง แต่
เมื่อทดสอบการทำให้ติดเชื้อโดยการฉีดพบว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค 2 ชนิด คือ *V. splendidus* I และ *V.*
alginolyticus สามารถก่อให้เกิดอาการและการตายที่รุนแรงได้เช่นเดียวกัน อาจเนื่องจากในหอยป่วย
ไม่รุนแรงขณะนั้นมีปริมาณเชื้อที่ก่อโรคในหอยป่วยขณะนั้นน้อยอยู่ ในการทดลองฉีดเชื้อ 8 ชนิด
ที่แยกได้ทั้งจากเลือดและทางเดินอาหารของหอยป่วยกลับเข้าสู่หอยปกติ การเกิดผลเช่นเดียวกับการ
รายงานของ (Elston, 1983a) กล่าวว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวหนังกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป่าอื้อ
H. rufescens ที่ติดเชื้อได้ 6 ชนิด แต่ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมียังชนิดเดียว คือ *V.*
alginolyticus

ในการทดลองครั้งนี้เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทำให้หอยตายเพียงบางส่วน โดยแต่ละเชื้อทำให้
หอยตายเพียง 2 ใน 3 ตัว และสังเกตอาการได้ในวันที่ 2 และ 3 หลังจากได้รับเชื้อ โดยพบอาการเริ่ม
แรกเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในหอยที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงในบ่อเลี้ยง คือ กล้ามเนื้อเท้าหดลีบ อ่อน
แอ มีแผลหนองที่ฝ่าเท้า และมักขึ้นมาเกาะที่บริเวณผิวหนัง เมื่อวางหอยไม่สามารถดันพลิกตัวเอง
กลับได้ ส่วนหอยที่ไม่มีอาการของโรคและมีชีวิตรอดตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือนนั้น

เป็นหอยที่มีขนาดใหญ่ อาจเนื่องจากเชื้อที่ฉีดเข้าไปมีความรุนแรงต่ำลงเพราะผ่านการถ่ายเชื้อหลายครั้ง และประกอบกับหอยขนาดใหญ่จะมีความต้านทานโรคได้ดีกว่า เพราะหอยที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ล้วนมีความแข็งแรงทั้งสิ้น ซึ่งการเกิดผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Pass และคณะ (1987) พบว่าในการทดสอบการก่อให้เกิดโรคของเชื้อที่แยกได้จากหอยมุกปวย โดยให้เชื้อ *V. harveyi* 10^8 cfu/ml ปริมาณ 0.1 ml/ ตัว เข้าไปในช่องผนังหุ้มลำตัวของหอยมุกปกติ พบว่าหอยบางตัวเท่านั้นที่พัฒนาอาการของโรคโดยแสดงอาการภายใน 3 วันหลังจากได้รับเชื้อ ส่วนที่ไม่แสดงอาการสามารถมีชีวิตรอดตลอดการทดลองในเวลา 32 วัน ซึ่งโดยปกติแล้วในหอยทั่วไปจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย โดยเม็ดเลือดจะเกิดการเข้ามาล้อมรอบและทำลายเซลล์แปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) (Lane and Birkbeck, 1999) และจากการศึกษาในหอยเป่าชื่อ *H. discus hannai* พบกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่สำคัญ คือ เซลล์เม็ดเลือด (leukocytes) 3 ชนิด ทำหน้าฟาโกไซโตซิส ร่วมกับปฏิกิริยา agglutination (Taiwu et al., 1997) ดังนั้นหอยที่แข็งแรงจึงสามารถที่จะมีชีวิตรอดได้

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. alginolyticus* จะมีความแตกต่างของคุณสมบัติทางชีวเคมีจากเอกสารเทียบเคียงที่ใช้แยกชนิดเชื้ออยู่บางประการคือ ไม่เจริญที่ 40 องศาเซลเซียส, 10 เปอร์เซ็นต์ NaCl และผลของ VP เป็นลบ ซึ่งเป็นข้อบกพร่องของวิธีการแยกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ที่มีความไม่แน่นอนของบางคุณสมบัติเกิดขึ้นได้เสมอ ทำให้ไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัด ประกอบกับเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ (mutation) เกิดขึ้นอยู่เสมอ เนื่องจากการได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ แต่วิธีนี้ก็เป็วิธีที่ยังได้รับความนิยมอยู่เนื่องจากค่าใช้จ่ายต่ำและวิธีการไม่สลับซับซ้อน ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการพัฒนาเทคนิคการแยกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ (16S rRNA sequence) ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้แม่นยำยิ่งขึ้น แต่ก็ยังไม่แพร่หลายเนื่องจากค่าใช้จ่ายสูงมาก อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ที่แยกได้นั้นมีรายงานการก่อโรครุนแรงในหอยหลายชนิดดังที่กล่าวในส่วนการศึกษาจากเอกสาร สำหรับในหอยเป่าชื่อพบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ก่อโรคในลูกหอยเป่าชื่อวัยอ่อน (*H. rufescens*) (Anguiano et al., inpress อ้างโดย Lizarraga-Partida et al., 1998) และในระยะวัยอ่อนตอนปลาย (Elston, 1983a ; Elston, 1983b ; Anguiano et al. 1998) สำหรับ *V. splendidus* I ถึงแม้จะไม่เคยมีรายงานการก่อโรคในหอยเป่าชื่อ แต่เชื้อกลุ่มนี้ก็มียางานการก่อโรคในหอยชนิดอื่นๆ เช่น เชื้อ *V. splendidus* II ได้ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยนางรมวัยอ่อน (*C. gigas*) ในโรงเพาะฟักในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งจากการทดลองให้เชื้อ 10^7 cfu/ml ทำให้ลูกหอยวัยอ่อนตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (Sugumar et al., 1998) และกลุ่มของเชื้อ *V. splendidus* อีกชนิดหนึ่งคือ *V. pectinica* ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสชนิดใหม่ที่พัฒนามาจากเชื้อ

V. splendidus ได้ก่อโรคในหอยเชลล์วัยอ่อน (*Agopecten maximus*) (Lambert *et al.*, 1999) สำหรับเชื้อ *V. nereis* นั้น สามารถแยกเชื้อได้จากเลือดของหอยป่วยเช่นกัน แต่เมื่อทดสอบการเกิดโรคปรากฏว่าสามารถสังเกตเห็นแผลหนองในวันที่ 6 แต่คงจะมีการพัฒนาอาการมาก่อนแล้ว แต่ไม่ปรากฏรายงานการก่อโรคในหอยของเชื้อชนิดนี้มาก่อน อาจเนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่มีความรุนแรงมากนัก ประกอบกับหอยมีขนาดใหญ่และแข็งแรงจึงสามารถต่อต้านเชื้อได้ดี

อย่างไรก็ตามในหอยป่วยบางตัวที่ไม่สามารถแยกเชื้อที่ก่อโรคได้ โดยแยกได้เพียงแบคทีเรียประจำถิ่นจากเลือดและทางเดินอาหาร ซึ่งในสภาพจริงหอยปกติจะไม่พบแบคทีเรียในเลือด เนื่องจากหอยเปลือกจะมีระบบกำจัดสิ่งแปลกปลอมดังที่กล่าวมาข้างต้น เช่นเดียวกับการรายงานของ Pass และคณะ (1987) พบว่าในเลือดของหอยปกติจะไม่พบเชื้อแบคทีเรีย ส่วนในหอยที่ป่วยสามารถพบเชื้อแบคทีเรีย 75 เปอร์เซ็นต์ของหอยป่วยทั้งหมด และสามารถแยกเชื้อได้จากเลือดและทางเดินอาหารเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งในหอยเปลือกป่วยบางตัวที่พบเฉพาะแบคทีเรียประจำถิ่นในเลือดนั้น จากลักษณะทางพยาธิสภาพสามารถเห็นการเข้ามาล้อมรอบเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดเป็นลักษณะของโนดูล ฟอร์มชันเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงการมีสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อ ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ 2 กรณี คือ กรณีที่หนึ่ง ในหอยป่วยกลุ่มนี้แบคทีเรียประจำถิ่นอาจจะเป็นตัวก่อโรคเมื่อหอยเกิดความเครียดและอ่อนแอ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันขาดประสิทธิภาพเชื้อพวกนี้จึงเป็นพวกฉวยโอกาสในการก่อโรคได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Colwell และ Spark (1967) พบว่า *Pseudomonas* sp. คาดว่าเป็น *P. enalia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยนางรม *C. gigas* สามารถก่อให้เกิดการตายในหอยนางรมเต็มวัยได้เช่นกันเมื่อฉีดเชื้อเข้าไป 0.1 ml/ตัว ในหอยทั้งหมด 19 ตัว แต่มีอัตราการตายที่ไม่รุนแรง คือ มีการตายเพียง 2 ตัว โดยตัวที่ 1 ตายในวันที่ 4 และอีก 1 ตัว ตายในวันที่ 8 ส่วนที่เหลือมีชีวิตรอดตลอดการทดลอง แต่ลักษณะทางพยาธิสภาพของหอยที่ตายนั้นมีการถูกทำลายเนื้อเยื่ออย่างชัดเจน แต่ในการทดลองฉีดเชื้อประจำถิ่นในครั้งนี้พบว่าไม่ก่อให้เกิดการตายอาจเนื่องจากหอยมีขนาดใหญ่และมีความแข็งแรงสมบูรณ์ ประกอบกับเชื้อไม่มีความรุนแรง จึงไม่ก่อให้เกิดอาการ เพราะแม้แต่เชื้อที่มีความรุนแรงสูงนั้นยังไม่สามารถทำให้หอยที่มีขนาดใหญ่ตายได้ทั้งหมด กรณีที่สองคือ ไม่สามารถแยกเชื้อที่ก่อโรคโดยแท้จริงจากหอยป่วยบางตัวได้ เนื่องจากอาจจะมีเชื้อในปริมาณน้อยจึงแยกไม่พบ เช่นเดียวกับการรายงานของ Pass และคณะ (1987) กล่าวว่า ในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยปกติ *P. maxima* ที่ป่วยอันมีสาเหตุจากเชื้อ *V. harveyi* นั้น ไม่สามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากหอยป่วยทุกตัว

2. การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพ

จากการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อพบว่าในหอยที่ป่วยรุนแรงปรากฏเซลล์แบคทีเรียในเนื้อเยื่อ มีการเข้ามาล้อมรอบเซลล์สิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด เส้นใยกล้ามเนื้อถูกทำลาย และเม็ดเลือดที่เข้ามาทำลายเชื้อแบคทีเรียก็มีการตายเช่นกัน เนื้อเยื่อเริ่มมีการตายขยายวงกว้างขึ้นเรื่อยๆ และกลายเป็นโพรงหนอง ซึ่งลักษณะทางพยาธิสภาพเหล่านี้เกิดขึ้นทั้งในหอยป่วยในบ่อเลี้ยงและในการทดลอง ส่วนในหอยที่ติดเชื้อไม่รุนแรงนั้นมีการล้อมรอบเซลล์สิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดเช่นกัน แม้จะไม่มีการพัฒนาเป็นโพรงหนอง ซึ่งลักษณะการทำลายเนื้อเยื่อในครั้งนี้เช่นเดียวกับรายงานของ Elston (1983a) พบว่าลักษณะการทำลายเนื้อเยื่อของเชื้อ *V. alginolyticus* ในหอยเป่าชื่อ *H. rufescens* โดยพบเซลล์แบคทีเรียในเนื้อเยื่อและมีการตายของเนื้อเยื่อที่แบคทีเรียเจริญไปถึงและการติดเชื้อส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่บริเวณกล้ามเนื้อเท้า ส่วน Pass และคณะ (1987) พบว่าลักษณะเนื้อเยื่อของหอยมุก *P. maxima* ที่ติดเชื้อ *V. harveyi* นั้น เยื่อบุผิวของผนังหุ้มลำตัวถูกทำลายและมีการกักล้อมของ phagocytic cell ในขณะที่ลักษณะเนื้อเยื่อของหอยปกติจะไม่มีการกักล้อมรอบเซลล์ เนื้อเยื่อไม่มีการถูกทำลาย โดยเส้นใยกล้ามเนื้อเรียงตัวอยู่ตามปกติ เม็ดเลือดกระจายอยู่ทั่วไปและไม่ปรากฏการเกาะกลุ่ม

3. การศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่น

สำหรับการศึกษาเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยเป่าชื่อ พบว่าสามารถพบเชื้อไวรัสได้ในหอยทุกตัวอย่างและทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา เช่นเดียวกับการรายงานของ Montilla และคณะ (1994) กล่าวว่า สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ในหอยทุกตัวอย่างจากทั้งหมด 271 ตัว ซึ่งมีทั้งหอยนางรม หอยดัลลิ่ง และหอยแมลงภู บริเวณเหงือกของหอยเป่าชื่อส่วนใหญ่จะพบ Budding และ/หรือ Appendaged bacteria ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพวกนี้โดยธรรมชาติจะอาศัยอยู่เป็นอิสระและยึดเกาะทั้งสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตเนื่องจากมี stalk สำหรับยึดเกาะ (Staley and Fuerst, 1984) แต่ไม่ปรากฏรายงานว่าเคยก่อโรคในสัตว์น้ำมาก่อน เพียงแต่สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากแผลบริเวณผิวหนังลำตัวของปลาเทอร์บอทพร้อมกับ *Alteromonas haloplanktis* (Austin, 1983) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ Budding และ/หรือ Appendaged bacteria ที่ยึดเกาะอยู่ที่เนื้อเยื่อเหงือกของหอยเป่าชื่อเป็นจำนวนมาก ไม่ได้มีการผลิตสารพิษที่ยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นหรือทำลายเนื้อเยื่อเหงือกหอย แต่น่าจะอาศัยอยู่ในลักษณะเป็นปาราสิตภายนอก สำหรับในลำไส้มีปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าอวัยวะอื่นมาก (หากไม่เปรียบเทียบกับ Budding และ/หรือ Appendaged bacteria ในบริเวณเหงือก) คือ มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง 2×10^4 - 3.18×10^6 cfu/กรัม ในขณะที่ Sawabe และคณะ (1995) พบปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหาร (gut) หอยเป่าชื่อ *H. discus hannai* ในธรรมชาติ ทางตอน

เนื้อของประเทศญี่ปุ่นอยู่ระหว่าง 10^6 - 10^9 cfu/กรัม อาจเนื่องจากในธรรมชาติหอยกินสาหร่ายหลายชนิดและหากินตามโขดหิน แต่ในโรงเพาะฟักหอยกินอาหารเพียงชนิดเดียว คือ สาหร่ายผสมนาง และได้ผ่านการทำความสะอาดเป็นอย่างดีแล้ว ประกอบกับน้ำในโรงเพาะฟักเป็นน้ำสะอาดที่ได้ผ่านการบำบัดแล้ว ปริมาณเชื้อจึงมีน้อย ซึ่งเชื้อที่พบในทางเดินอาหารของหอยในธรรมชาติที่กล่าวมาส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส เคลื่อนที่ไม่ได้ (ไม่ได้แยกชนิด) และพบเชื้อ *Vibrio* 14.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษารุ่นนี้ส่วนใหญ่จะพบเชื้อ *Vibrio* ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 58 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นเป็นพวก *Alcaligenes* และ *Pseudomonas* สำหรับ *Pseudomonas* และ *Vibrio* นั้น เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ทั่วไปในหอยต่างๆ เช่นการรายงานของ Lodeiros และคณะ (1987) พบว่าแบคทีเรียที่พบในเนื้อเยื่อพ่อแม่พันธุ์และลูกหอยวัยอ่อนที่โรงเพาะฟักบริเวณชายฝั่งของประเทศสเปนส่วนใหญ่เป็น *Pseudomonas* ส่วน Colwell และ Spark (1967) กล่าวว่าแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยนางรม *C. gigas* คือ กลุ่ม *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter* และ *Flavobacterium* ซึ่งทั้ง *Vibrio* และ *Pseudomonas* มักเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ชอบฉวยโอกาสก่อโรคได้เสมอเมื่อหอยเข้าบ้านอ่อนแอ อย่างไรก็ตามในการศึกษารุ่นนี้ไม่พบแบคทีเรียที่ก่อโรคในหอยปกติ

4. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ในการศึกษารุ่นนี้โดยส่วนใหญ่แล้วเชื้อจะมีความไวต่อยาซัลฟาฯ ร่วมกับไตรเมโทพริม, ออกโซลิติก แอซิด, คลอแรมเฟนิคอล และ นอร์ฟลอกซาซิน ซึ่งจากการใช้ยาซัลฟาฯ ร่วมกับไตรเมโทพริมในการควบคุมโรคในแหล่งเลี้ยงจริงที่ฟาร์มเอกชน อำเภอชะอำ พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคได้ โดยทำให้ปริมาณการตายของหอยเป่าฮ้อลดลง (ฤดูหนาว, ข้อมูลส่วนตัว) สำหรับยาคลอแรมเฟนิคอลนั้นเป็นยาที่ห้ามมิให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค แต่สำหรับในสัตว์น้ำที่มิใช่เพื่อการบริโภค เช่น เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ น่าจะสามารถนำยาคลอแรมเฟนิคอลมาใช้ในการควบคุมโรคในโรงเพาะฟักได้หากไม่มีทางเลือกอื่น ซึ่งจากการใช้ยาต้านจุลชีพในการควบคุมโรคที่ผ่านมาสามารถที่จะควบคุมอย่างได้ผลดังรายงานต่างๆ เช่น Tubiash และคณะ (1965) พบว่าเชื้อที่มีความไวต่อยา 4 ชนิด คือ คลอแรมเฟนิคอล, โพลีไมซิน บี (polymycin B), อิริโทรมัยซิน (erythromycin) และ นีโอไมซิน (neomycin) เมื่อนำคลอแรมเฟนิคอล 50 มก./ลิตร มาใช้ในการฆ่าเชื้อสามารถที่จะป้องกันการเกิดโรคในโรงเพาะฟักได้ ส่วน Lodeiros และคณะ (1987) พบว่า เชื้อที่มีความไวต่อยาคลอแรมเฟนิคอลและไนโตรฟูแรนไดโอนั้น เมื่อเลือกใช้คลอแรมเฟนิคอล 50 มก./ลิตร สามารถควบคุมการตายของลูกหอยวัยอ่อน และใช้ควบคุมในถังพ่อแม่พันธุ์เพื่อป้องกันการติดเชื้อระหว่างวางไข่ได้ โดยใช้ควบคุมมิให้ปริมาณ *Vibrio* สูงกว่า 10^3 cfu/ml

ส่วน Quanzhen และ Youlu (1995) พบว่ายา 3 ชนิด คือ คลอแรมเฟนิคอลปริมาณ 0.5-5 กรัม/ลูกบาศก์เมตร, เทอราไมซิน (terramycin) 1-10 กรัม/ลูกบาศก์เมตร และ ไซโปรฟล็อกซาซิน ไฮโดรคลอไรด์ (ciprofloxacin HCl) 0.25-0.5 กรัม/ลูกบาศก์เมตร เมื่อใช้แช่ในถังลูกหอยวัยอ่อน 48 ชั่วโมง สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียและควบคุมการก่อโรคได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ยาต้านจุลชีพเป็นวิธีการที่ใช้ในการควบคุมโรคอย่างได้ผลมาเป็นระยะเวลานาน แต่อย่างไรก็ตามต้องขึ้นอยู่กับพื้นฐานในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพเพื่อให้การรักษาโรคได้ผลสูงสุด เพราะเชื้อจะมีความไวต่อยาแต่ละชนิดแตกต่างกัน และบางชนิดเมื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นเวลานาน อาจจะไม่ได้ออกผลเท่าที่ควร จะเห็นได้ว่าเชื้อบางชนิดมีการดื้อต่อยาออกซิเตตราซัยคลิน อาจเนื่องจากการใช้ยาชนิดนี้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาเป็นเวลานาน จึงทำให้เชื้อในสิ่งแวดล้อมเกิดการดื้อต่อยา เช่นเดียวกับการรายงานของ DiSalvo และคณะ (1978) กล่าวว่า ในการควบคุมโรคในลูกหอยวัยอ่อนในโรงเพาะฟักหอยนางรม *C. gigas* โดยใช้ยาเพนนิซิลลิน จี 50 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถลดปริมาณการตายของลูกหอยวัยอ่อนได้ แต่ต่อมาพบว่าเชื้อ *V. anguillarum* สามารถดื้อต่อยาชนิดนี้เมื่อใช้ไปเป็นระยะเวลานานๆ

5. ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ

สาเหตุการก่อโรคในครั้งนี้อาจเนื่องจากมีปริมาณเชื้อไวรัสสูงเกินไป ประกอบกับ pH น้ำค่อนข้างสูงซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่ง Jeffries (1982) กล่าวว่า ในโรงเพาะฟักที่มีปริมาณเชื้อไวรัสสูงเกินไปมักจะก่อโรคได้เสมอ แต่หากรักษาระดับปริมาณไวรัสให้มีเกินกว่า 10^2 cfu/มิลลิลิตร ได้ทุกขั้นตอนสามารถที่จะลดปัญหาการก่อโรคได้ ซึ่งในทุกแหล่งเลี้ยงพบว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสสูงกว่า 10^2 cfu/มิลลิลิตร ทั้งสิ้น ซึ่ง Elston (1983a) กล่าวว่า การตายของหอยเป่าชื่อ *H. rufescens* ที่เลี้ยงแบบหนาแน่นสัมพันธ์กับความเครียดและการมีเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อไวรัส ความเครียดอาจเกิดขึ้นเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไปเมื่อมีการถ่ายเทน้ำไม่เพียงพอ ซึ่ง Elston (1983b) กล่าวว่าในการติดตามปริมาณออกซิเจนในบ่อเลี้ยงหอย เมื่อทดลองให้หอยสัมผัสกับออกซิเจนปริมาณ 10-15.6 มก./ลิตร ใน 3 ชั่วโมงแรกพบว่าหอยไม่สามารถเกาะได้ และเมื่อวางหงายก็ไม่สามารถพลิกตัวกลับได้ เท่าและอีพีโปกเดียวบวม ที่ 41 ชั่วโมงหอยหลายตัวพยายามหนีออกไปจากตู้ทดลอง อาจเนื่องจากออกซิเจนแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง หอยทุกตัวติดเชื้อ *V. alginolyticus* ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้พบว่าหอยป่วยในแหล่งเลี้ยงและหอยป่วยจากการทดลองมักจะมีพฤติกรรมชอบขึ้นมาเกาะที่ผิวน้ำ แต่ไม่อาจสรุปได้ว่าปริมาณออกซิเจนจะเป็นสาเหตุความเครียด และส่งผลให้หอยมีพฤติกรรมดังกล่าวหรือไม่ เนื่องจากไม่ปรากฏรายงานการศึกษาสภาวะออกซิเจนที่เหมาะสมในบ่อเลี้ยงหอยเป่าชื่อ

ช่องทาง การติดเชื้อของหอยที่เป็นโรคในครั้งนี้เป็นไปได้ 3 กรณี คือ กรณีที่ 1 เมื่อหอยอ่อนแอและเกิดความเครียด เชื้อเข้าสู่ร่างกายก็เพิ่มปริมาณมากขึ้น ซึ่งเชื้อที่ก่อโรคอาจจะมีการเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารแล้วเจาะผนังเข้าไปในกระแสเลือด เพราะสามารถตรวจพบเชื้อที่ก่อโรคทั้งในเลือดและทางเดินอาหาร กรณีที่ 2 คือ เชื้อที่เพิ่มปริมาณมากขึ้นอาจจะเกาะที่ผิวกล้ามเนื้อเท้าแล้วปล่อยสารพิษออกมาย่อยทำลายเนื้อเยื่อเท้าก่อให้เกิดแผลแล้วเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่ง Elston (1983a) กล่าวว่าสาเหตุการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในหอยเป่าชื่อ *H. rufescens* นั้น อาจเนื่องจากเชื้อนี้เข้าไปทางผิวกล้ามเนื้อเท้าทำให้เกิดแผลบวมแล้วเข้าไปในกระแสเลือด เพราะปรากฏเชื้อแบคทีเรียที่ผิวกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป่าอื้อป่วย หรือเชื้ออาจจะเข้ามาทางทางเดินอาหารแล้วก่อให้เกิดแผลเข้าไปในระบบเลือด นอกจากนี้ Elston และ Leiborite (1980) อ้างโดย McHenery และ Birkbeck (1986) พบว่าในการทดลองให้เชื้อที่ก่อโรค ลักษณะการก่อโรค คือ แบคทีเรียมาเกาะที่เพอริโอสตราคัมและรุกรานผนังหุ้มลำตัวและเนื้อเยื่ออ่อนอื่นๆ แล้วเกิดเป็นแผลนำไปสู่การตายในที่สุด ซึ่งการก่อให้เกิดโรคของเชื้อไวรัสโออาจเนื่องจากการปล่อยสารพิษออกมาออกเซลล์ เพราะมีรายงานการสร้างสารพิษของเชื้อไวรัสโอที่ก่อโรคหลายชนิด เช่น Nottage และ Birkbeck (1986) พบว่า เชื้อไวรัสโอหลายชนิด เช่น *V. anguillarum*, *V. odalli*, *V. tubiashii*, *Vibrio sp.* *V. alginolyticus* สร้างสารพิษและเป็นพิษต่อลูกหอยวัยอ่อนหอยนางรมทั้งสิ้น และมีรายงานว่า *V. anguillarum* สามารถสร้างสารพิษยับยั้งการว่ายน้ำของลูกหอยวัยอ่อนหอยต่างๆ เช่น *O. edulis* (DiSalvo et al., 1978 ; Jeffries, 1982) และ Anguiano และคณะ (1998) พบว่า *V. alginolyticus* สามารถก่อโรคแก่ลูกหอยระยะวัยอ่อนและลูกหอยวัยอ่อนระยะสุดท้าย (post larva) ของหอยเป่าชื่อ red abalone โดยการทดลองให้เชื้อแก่ลูกหอยระยะว่ายน้ำและลูกหอยวัยอ่อนระยะสุดท้ายอายุ 4 วัน พบว่าปริมาณเชื้อที่มากกว่า 10^7 cell/มิลลิลิตร ทำให้ลูกหอยเกิดการตายเป็นอย่างมากภายใน 24 ชั่วโมง ส่วน Brown และ Roland (1984) รายงานว่ามีการผลิตสารพิษของ *V. anguillarum* ซึ่งมีผลกระทบต่อลูกหอยนางรมวัยอ่อน นอกจากนี้ Nottage และ Birkbeck (1987) พบว่า *V. alginolyticus* ผลิตโปรตีนที่ทำลายเนื้อเยื่อเหงือกของหอย *M. edulis* ทำให้แยกเป็นเสี่ยงๆ ไม่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน และกรณีสุดท้ายคือ เชื้อที่ก่อโรคอาจจะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวหอยเองที่เป็นพวกฉวยโอกาสเมื่อหอยอ่อนแอ ซึ่ง Colwell และ Sparks (1967) กล่าวว่า แบคทีเรียที่ก่อโรคโดยทั่วไปอาจมาจากสิ่งแวดล้อมหรือมาจากตัวสัตว์เองที่เป็นพวกฉวยโอกาส