มหาวิทยาลัยฟาฏอนี ร่วมกับ เครือข่ายความร่วมมือ
มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

Proceedings

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6

เรื่อง

สร้างสรรค์งานวิจัยเพื่อขับเคลื่อนประเทศ
สู่ความมั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืนในยุค
Thailand 4.0

(การนำเสนอแบบโปสเตอร์)

18 ตุลาคม 2017
ณ อาคารเรียนรวมเฉลิมพระเกียรติ
มหาวิทยาลัยฟาฏอนี

ความปลอดภัยจากแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครง (*Anadara granosa*) บริเวณอ่าวปัตตานี

วารุณี หะยีมะสาและ[1], วิพัฒน์ ถาวโรฤทธิ์[2], อลภา ทองไชย[3], ลักขณา รักขพันธ์[4]

[1] ดร. (เทคโนโลยีชีวภาพ), อาจารย์สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[2] กศ.ม. (ชีววิทยา), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, อาจารย์สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[3] วท.ม. (สัตววิทยา), อาจารย์สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[4] วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์), นักวิทยาศาสตร์สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานี โดยประยุกต์ใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันซึ่งใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ตั้งแต่เดือนมกราคม-พฤษภาคม 2560 พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียสกุล Vibrio จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. fluvialis* โดย *V. parahaemolyticus* ที่พบในหอยแครง เป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งทำให้เกิดกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยมีปริมาณเชื้อ 7.48×10^4, 3.5×10^3 และ 6×10^3 CFU/ml ในเดือนมกราคม เมษายน และพฤษภาคม ตามลำดับ ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จากข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์ในการป้องกันการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษต่อไป

คำสำคัญ: สกุลวิบริโอ, หอยแครง, อ่าวปัตตานี, โมโนโคนอลแอนติบอดี

Safety of Pathogenic Bacteria Genus Vibrio in Bloody Cockle (*Anadara granosa*) at Pattani Bay

Warunee Hajimasalaeh[1], Wipat Thavarorith[2], Alapa Thongchai[3], Rakkhana Rakkapan[4]

[1] Dr. (Biotechnology), Lecturer of Biology Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University.
[2] M.Ed. (Biology), Assist. Prof., Lecturer of Biology Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University.
[3] M.S. (Zoology), Lecturer of Biology Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University.
[4] B.S. (Applied Biology), Scientist of Biology Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University.

Abstract

This research aimed to investigate the contamination of pathogenic bacteria genus Vibrio in bloody cockle (*Anadara granosa*) at Pattani Bay by monoclonal antibody (MAbs) specific to *Vibrio* spp. were used and detected by dot blotting immunoassay during January to May, 2017. In samples of bloody cockle were contaminated with three species of genus Vibrio including *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. fluvialis*. Pathogenic bacteria *V. parahaemolyticus* cause food poisoning in human was yielded 7.48 x 10^4, 3.5 x 10^3 and 6 x 10^3 CFU/ml. in January, April and May, respectively. It exceeded the standard of the department of Medical Sciences Thailand. This data attempts to useful on the carefulness on epidemic of food poisoning.

Keyword: genus Vibrio, blood clam, Pattani Bay, monoclonal antibodies

บทนำ

แบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio หรือ *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารของคน เช่น โรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) อหิวาตกโรค (cholera) และเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ซึ่งอาจมีอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ (Angela et al. 2005) สำหรับแบคทีเรีย Vibrio ที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *V. cholera* เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงอย่างแรง *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบหรือโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารทะเล และ *V. vulnificus* ทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณบาดแผลซึ่งเกิดจากการสัมผัสกับเชื้อในอาหารทะเล หรือก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในคนที่กินอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อนี้ ในคนที่มีภูมิต้านทานต่ำโดยเฉพาะป่วยเป็นโรคตับ มักจะมีการติดเชื้อในกระแสเลือดร่วมด้วย ทำให้มีอาการรุนแรงและอาจถึงกับเสียชีวิต เป็นต้น (วีรานุช หลาง. 2552, Ang et al. 2010 Daniels et al. 2000, Michael et al. 2007) โดยเป็นเชื้อสามารถพบการปนเปื้อนในอาหารทะเลชนิดต่างๆ เช่น ในหอยแครง หอยนางรม หอยแมลงภู่ และกุ้งทะเล เป็นต้น ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของอหิวาตกโรค ในช่วงวันที่ 16 พฤศจิกายน ถึง 10 ตุลาคม พ.ศ.2550 พบผู้ป่วยในพื้นที่ระบาดใหม่ 29 จังหวัด โดยเชื้อที่พบเป็น *V. cholerae* El Tor Ogawa ทั้งหมด ยกเว้นจังหวัดลำปางพบการระบาดของเชื้อ *V. cholere El Tor Inaba* โดยการระบาดดังกล่าวเกิดขึ้นในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12 จังหวัด ซึ่งมีพื้นที่ติดต่อกัน และเริ่มต้นการระบาดในเวลาใกล้เคียงกัน เมื่อศึกษาหาแหล่งโรค พบว่าการรับประทานหอยแครงเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีรายงานจากองค์การอนามัยโลกประจำประเทศลาว ว่ามีผู้ป่วยอหิวาตกโรคในช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งการสอบสวนโรคพบว่าอาหารที่สงสัยที่ทำให้เกิดโรคเป็นหอยแครงลวกซึ่งเป็นหอยแครงที่นำเข้ามาจากประเทศไทย (วราลักษณ์ ตังคณะกุล. 2008)

ดังนั้นการตรวจสอบความปลอดภัยจากแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีจึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากหอยแครงเป็นอาหารทะเลที่ได้รับความนิยมในการบริโภคเช่นเดียวกับอาหารทะเลชนิดอื่นๆ รวมทั้งหอยแครงเป็นสัตว์น้ำที่กรองกินอาหาร ทำให้มีโอกาสที่จะมีการสะสมของ *Vibrio* spp. ที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในน้ำกร่อยและน้ำทะเล ซึ่งน้ำในอ่าวปัตตานีมีลักษณะเป็นน้ำกร่อย และแม่น้ำปัตตานีและแม่น้ำยะหริ่งพัดพาตะกอนมาทับถมภายในอ่าว ทำให้มีลักษณะเป็นหาดเลนที่มีความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหาร (ฮัสสัน ดูมาลี. 2555 และ กันทิมา เหาะเจริญ และคณะ. 2540) ทำให้มีแนวโน้มสูงที่จะพบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ในหอยแครง ในการศึกษานี้จะทำให้ทราบผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีโดยการประยุกต์ใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ นี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านสุขอนามัย รวมทั้งเป็นแนวทางป้องกันและเฝ้าระวังการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารสำหรับผู้ที่นิยมรับประทานอาหารทะเลต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานี
2. เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio

แบคทีเรียสกุล Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ polar flagellum เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe พบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม (Oliver & Japer. 1997, Elliot et al. 1998) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกแบคทีเรียสกุล Vibrio คือ thiosulphate citrate bile-salt sucrose (TCBS) agar ซึ่งสามารถแยกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักน้ำตาลซูโครสได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส โคโลนีจะมีสีเหลือง ได้แก่ *V. cincinnatiensis*, *V. cholera*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii* และ *V. carchariae* ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส โคโลนีจะมีสีเขียว ได้แก่ *V. paraheamolyticus*, *V. mimicus*, *V. damsela* และ *V. vulnificus* (ควรศิริ ศีลภิญโญ และคณะ. 2548) สำหรับเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์โดยเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหารของคน คือ *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* เป็นต้น (นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547) โดยก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) อหิวาตกโรค (cholera) และเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ซึ่งอาจมีอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ (Angela et al. 2005)

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในอาหารทะเล

จากรายงานการระบาดของอหิวาตกโรคและโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยทุกปี ทำให้มีศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio เป็นจำนวนมาก เช่น การศึกษาความชุกของ *V. cholera* และ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครงที่ส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น ซึ่งตรวจวิเคราะห์หาเชื้อด้วยวิธี duplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อมาตรฐาน พบ *V. parahaemolyticus* ในทุกตัวอย่าง โดยมีความชุกของ *V. parahaemolyticus* สูงกว่า *V. cholerae* คิดเป็นร้อยละ 86.3 เมื่อตรวจโดยวิธี duplex PCR และร้อยละ 65.2 เมื่อตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อ (วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ. 2553) แต่ในตัวอย่างกุ้งขาวสด (*Litopenaeus vannamei*) จากตลาดในเขตธนบุรี ได้แก่ ตลาดพรานนก ตลาดบางแค และตลาดวงเวียนใหญ่ เมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกและทดสอบสมบัติทางชีวเคมี และเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานด้านจุลชีววิทยาของกุ้งสด ปรากฏว่าไม่พบการปนเปื้อนของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างจากตลาดทั้ง 3 แห่ง (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และจิณห์วิภา แก้วท่าไม้. 2555) นอกจากนี้ได้มีการประเมินการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด ได้แก่ กุ้ง (*Penaeus merguiensis*) ปลา (*Lates calcarifer*) ปลาหมึก (*Loligo formosana*) หอยนางรม (*Saccostrea cucullata*) และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่จำหน่ายในตลาดในกรุงเทพ โดยอาศัยวิธี Most Probable Number พบว่าปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 24 ถึงมากกว่า 11,000 MPN ต่อกรัม โดยพบการปนเปื้อนในปลา หอยนางรม และหอยแมลงภู่มากที่สุด คือ พบชนิดละ 9 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 90) รองลงมาคือปลาหมึกพบ 8 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) และกุ้งพบน้อยที่สุดคือ 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) (สุรีย์ นานาสมบัติ และคณะ. 2556)

กาประยุกต์ใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ

เทคนิคทางภูมิคุ้มกันเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์และวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies; MAb) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมา ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เพียงเซลล์เดียว จึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียว (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียสกุล Vibrio เช่น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* สามารถนำมาใช้จำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสดที่ประกอบด้วย กุ้ง หอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยนางรมได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และมีความไวในการตรวจเชื้อ *V. parahaemolyticus* บริสุทธิ์อยู่ในช่วง 10^8-10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร (Prompamorn et al. 2013) การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. cholerae* ในการจำแนกซีโรกรุ๊ปของเชื้อโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. อื่นๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบอาหารและในสัตว์ติดเชื้อได้ โดยไม่ต้องทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Pengsuk et al. 2011)

วิธีดำเนินการวิจัย

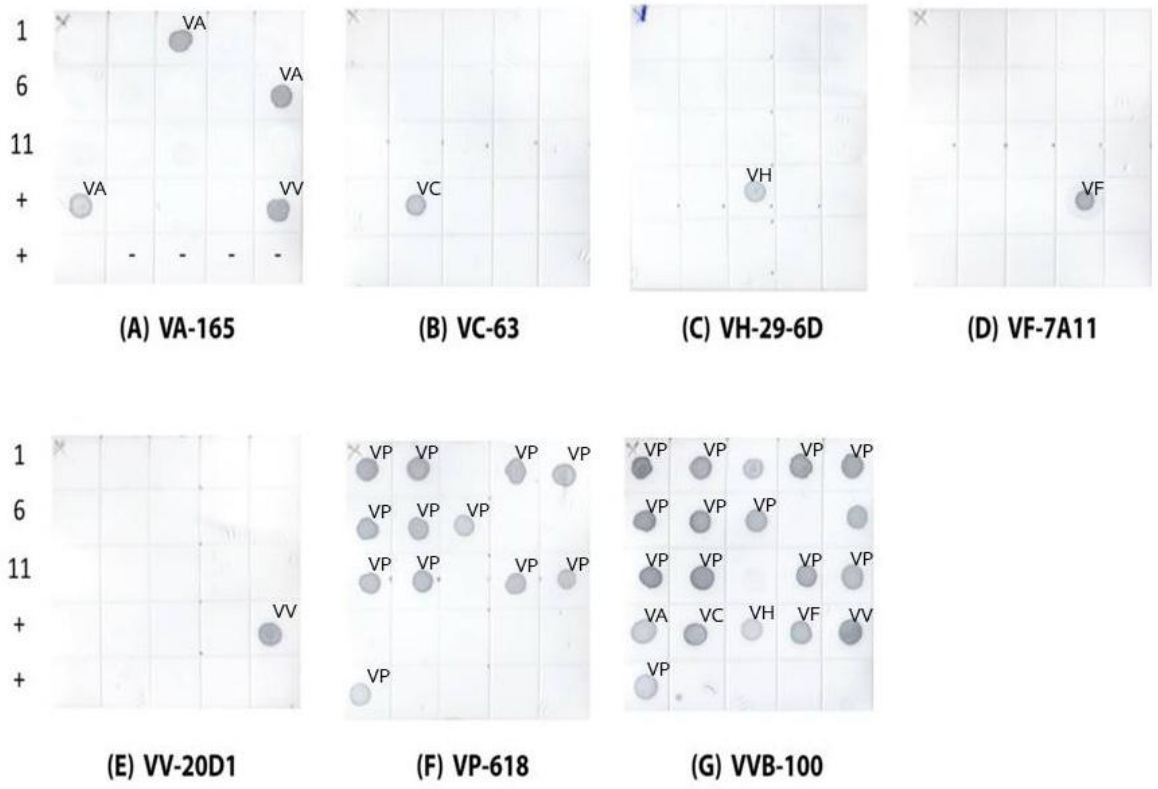
เก็บตัวอย่างหอยแครงจากอ่าวปัตตานี อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ตั้งแต่เดือน มกราคม - พฤษภาคม 2560 จากนั้นทำการตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ด้วยวิธี dot blotting โดยวิธีการดัดแปลงจาก Prompamorn et al. (2013) ดังนี้ นำตัวอย่างหอยแครงบด 25 กรัม ทำการเจือจางแบบ tenfold serial dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อ alkaline peptone water (APW) ที่เติมเกลือ Nacl ความเข้มข้น 2 เปอเซ็นต์ จากนั้นเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก TCBS และคัดเลือกโคโลนีสีเหลืองและสีเขียว จำนวน 10 - 15 โคโลนี จากนั้นนำแต่ละโคโลนีมาเจือจางในสารละลาย 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) แล้วต้มในน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยดลงบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อจุด อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto (นมพร่องมันเนย 5% ที่ละลายในสารละลาย PBS) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปบ่มกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำไปบ่มต่อในแอนติบอดีตัวที่สอง คือ goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03% Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2) และ 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ในสารละลาย PBS ซึ่งจะปรากฏจุดสีดำ (immunoreactivity) บนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 1 ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Vibrio ชนิดต่างๆ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting

ลำดับที่	ชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบด้วยวิธี dot blotting (CFU ml^{-1})	ความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรีย
1	VA-165	10^6	*V. alginolyticus* *V. vulnificus*
2	VC-63	10^7	*V. cholerae*
3	VH-29-6D	10^7	*V. harveyi*
4	VF-7A11	10^7	*V. fluvialis*
5	VV20D1	10^7	*V. vulnificus*
6	VP-618	10^7	*V. parahaemolyticus*
7	VVB-100	10^7	*Vibrio* spp.

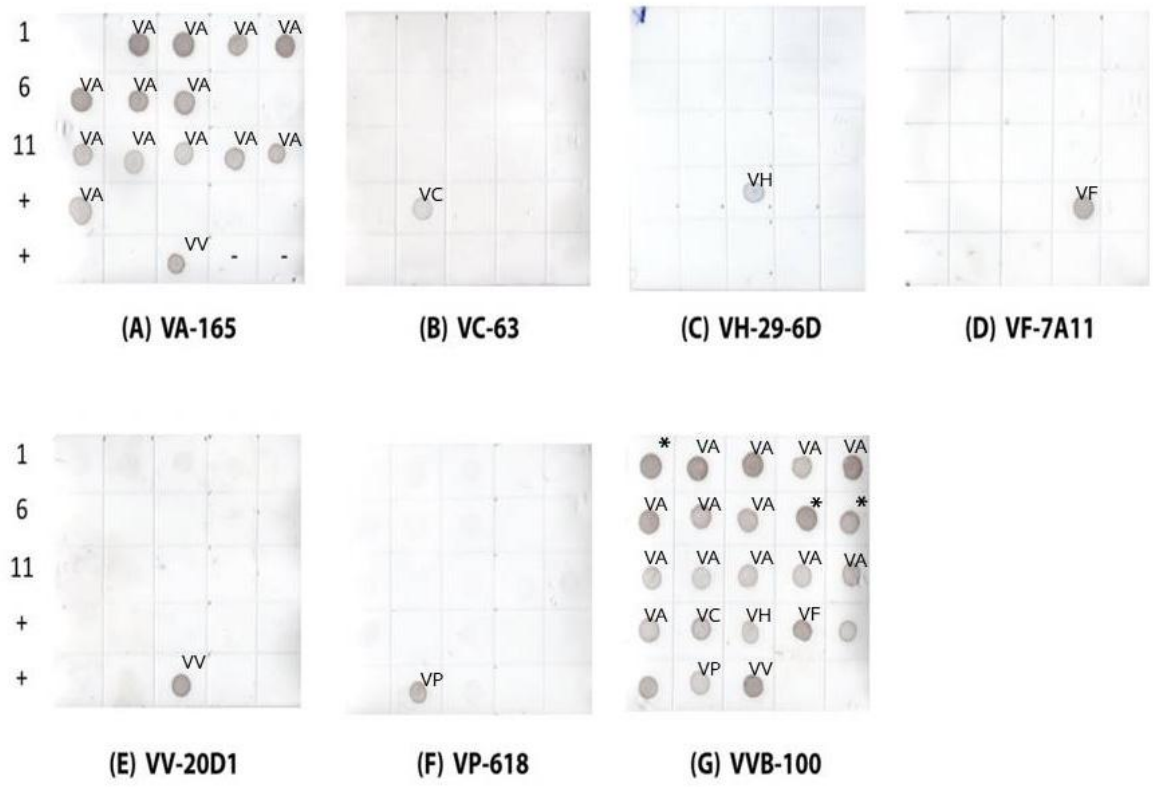
ผลการวิจัย

ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Vibrio ชนิดต่างๆ และนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ตั้งแต่เดือนมกราคม-พฤษภาคม 2560 พบว่าในเดือนมกราคม จากจำนวน 15 โคโลนี ที่ทำการคัดเลือกจากอาหารคัดเลือก TCBS มีการเกิด immunoreactivity กับ *V. alginolyticus* จำนวน 2 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 1.36 x 10^4 CFU/ml) และ *V. parahaemolyticus* จำนวน 11 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 7.48 x 10^4 CFU/ml) ซึ่งเกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA-165 และ VP-168 สามารถจับกับ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ตามลำดับ ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 1A และ F และตารางที่ 2)



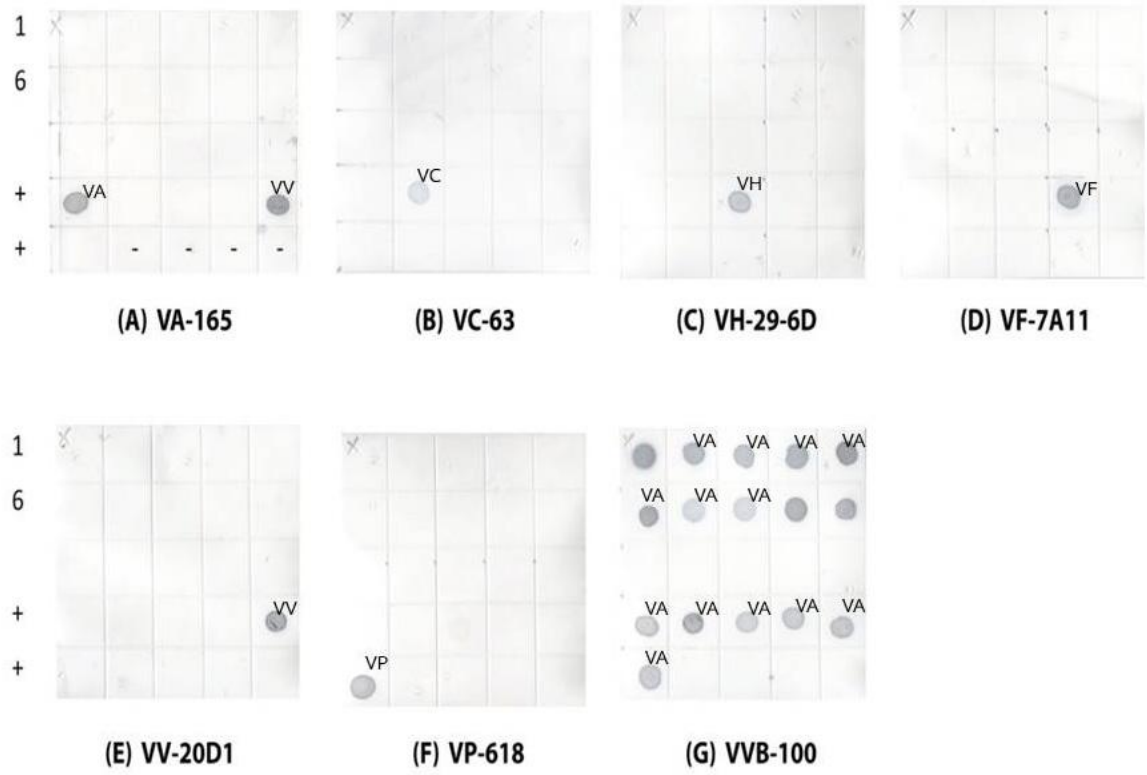
ภาพที่ 1 ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีในเดือนมกราคม 2560 โดยทำการทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ดังนี้ (A) VA-165 (B) VC-63 (C) VH-29-6D (D) VF-7A11 (E) VV-20D1 (F) VP-618 และ (VVB-100) ซึ่งช่องที่ 1–15 คือ 15 โคโลนีของ *Vibrio* spp. บนอาหารคัดเลือก TCBS ที่ผ่านการต้มด้วยความร้อน ส่วนช่องที่ 16–21 คือ vibrio ที่ทราบชนิดแล้ว ได้แก่ VA = *V. alginolyticus*, VC = *V. cholera*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. fluvialis*, VV = *V. vulnificus*, VP = *V. parahaemolyticus* และช่องที่ 22–25 คือ negative control

ในเดือนกุมภาพันธ์ จากจำนวน 15 โคโลนี ที่ทำการคัดเลือกจากอาหารคัดเลือก TCBS มีการเกิด immunoreactivity กับ *V. alginolyticus* จำนวน 12 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 2.4 x 10^4 CFU/ml) และ *Vibrio* spp.จำนวน 3 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 6 x 10^3 CFU/ml) ซึ่งเกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA-165 และ VVB-100 สามารถจับกับ *V. alginolyticus* และ *Vibrio* spp ตามลำดับ ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2A และ G และตารางที่ 2)



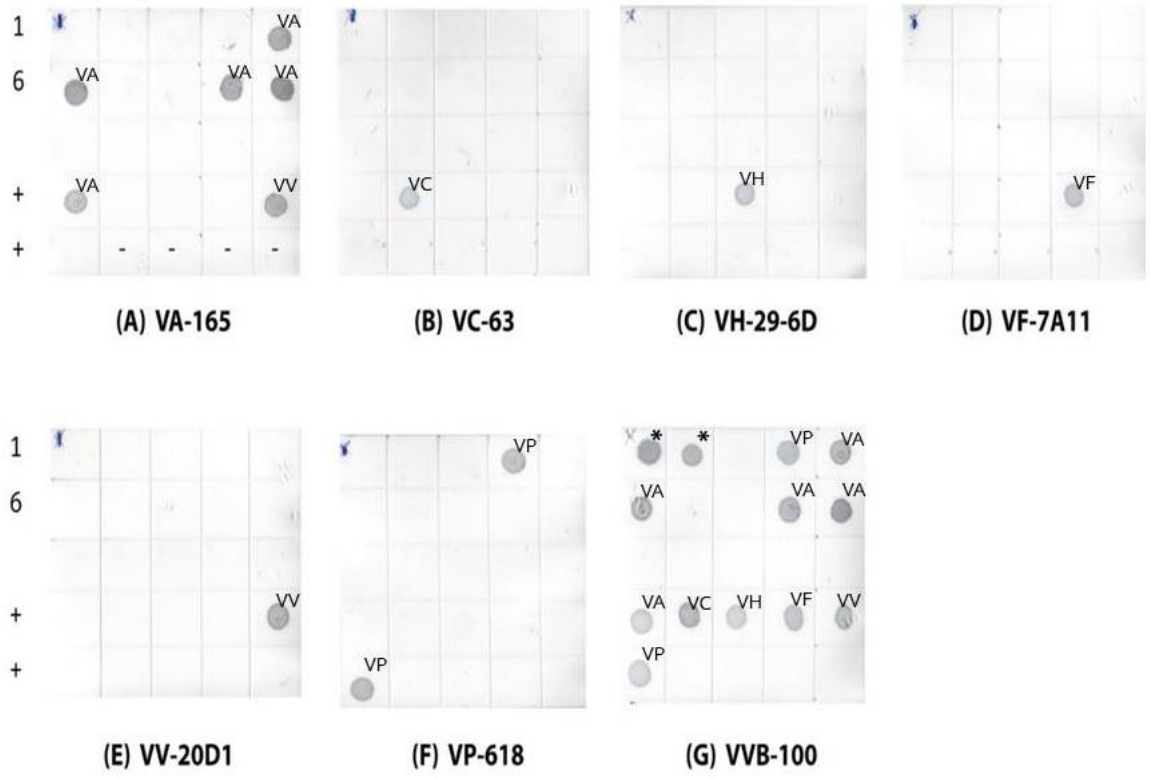
ภาพที่ 2 ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีในเดือนกุมภาพันธ์ 2560 โดยทำการทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ดังนี้ (A) VA-165 (B) VC-63 (C) VH-29-6D (D) VF-7A11 (E) VV-20D1 (F) VP-618 และ (VVB-100) ซึ่งช่องที่ 1–15 คือ 15 โคโลนีของ *Vibrio* spp. บนอาหารคัดเลือก TCBS ที่ผ่านการต้มด้วยความร้อน ส่วนช่องที่ 16–23 คือ vibrio ที่ทราบชนิดแล้ว ได้แก่ VA = *V. alginolyticus*, VC = *V. cholera*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. fluvialis*, VV = *V. vulnificus*, VP = *V. parahaemolyticus* ช่องที่ 24–25 คือ negative control และ * คือ *Vibrio* spp.

ในเดือนมีนาคม จากจำนวน 10 โคโลนี ที่ทำการคัดเลือกจากอาหารคัดเลือก TCBS มีการเกิด immunoreactivity กับ *Vibrio* spp.ทั้งหมด (มีปริมาณเชื้อ 3.5 x 10^4 CFU/ml) ซึ่งเกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี VVB-100 สามารถจับกับ *Vibrio* spp ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 3G และตารางที่ 2) ส่วนในเดือนเมษายน จากจำนวน 10 โคโลนี ที่ทำการคัดเลือกจากอาหารคัดเลือก TCBS มีการเกิด immunoreactivity กับ *V. alginolyticus* จำนวน 4 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 1.4 x 10^4 CFU/ml) *V. parahaemolyticus* จำนวน 1 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 3.5 x 10^3 CFU/ml) และ *Vibrio* spp. จำนวน 2 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 7 x 10^3 CFU/ml) ซึ่งเกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA-165, VP-168 และ VVB-100 สามารถจับกับ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* spp ตามลำดับ ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4A, F และ G และตารางที่ 2)

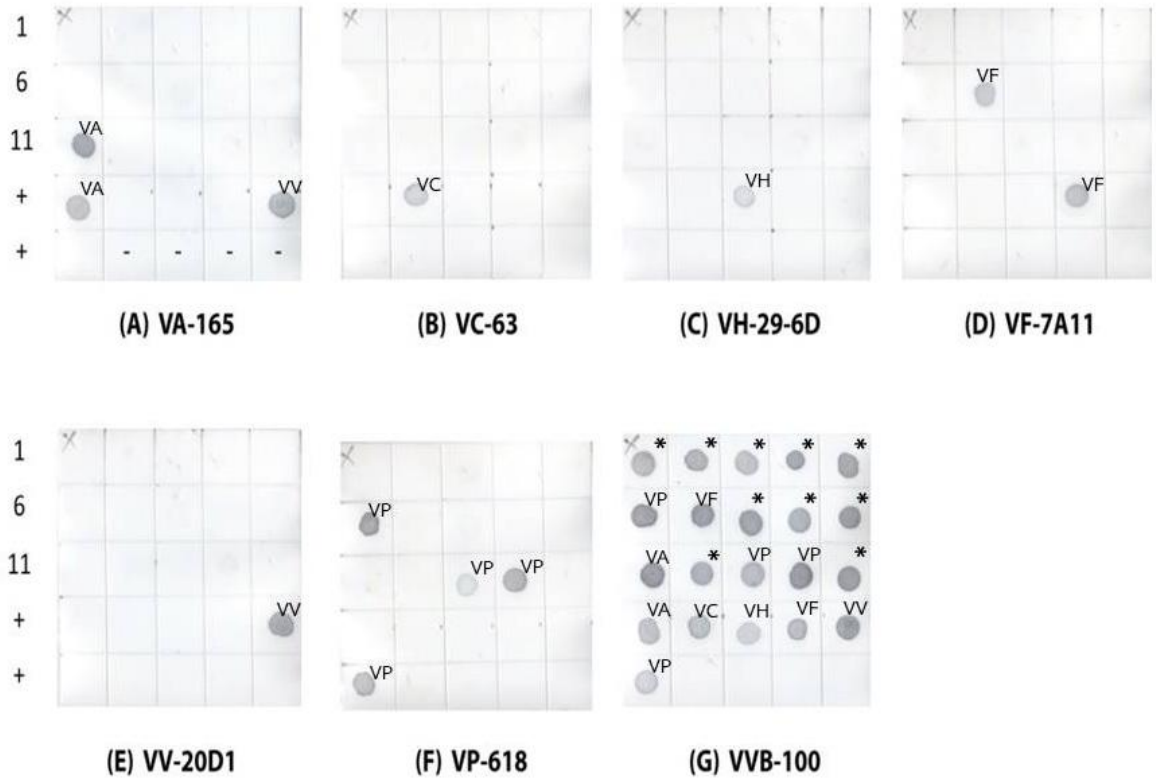


ภาพที่ 3 ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีในเดือนมีนาคม 2560 โดยทำการทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ดังนี้ (A) VA-165 (B) VC-63 (C) VH-29-6D (D) VF-7A11 (E) VV-20D1 (F) VP-618 และ (VVB-100) ซึ่งช่องที่ 1–10 คือ 10 โคโลนีของ *Vibrio* spp. บนอาหารคัดเลือก TCBS ที่ผ่านการต้มด้วยความร้อน ส่วนช่องที่ 16–21 คือ vibrio ที่ทราบชนิดแล้ว ได้แก่ VA = *V. alginolyticus*, VC = *V. cholera*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. fluvialis*, VV = *V. vulnificus*, VP = *V. parahaemolyticus* ช่องที่ 22–25 คือ negative control และ * คือ *Vibrio* spp.

ส่วนในเดือนพฤษภาคม จากจำนวน 15 โคโลนี ที่ทำการคัดเลือกจากอาหารคัดเลือก TCBS มีการเกิด immunoreactivity กับ *V. alginolyticus* จำนวน 1 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 2 x 10^3 CFU/ml) *V. fluvialis* จำนวน 1 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 2 x 10^3 CFU/ml) *V. parahaemolyticus* จำนวน 3 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 6 x 10^3 CFU/ml) และ *Vibrio* spp. จำนวน 10 โคโลนี (มีปริมาณเชื้อ 2 x 10^4 CFU/ml) ซึ่งเกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA-165, VF-7A11, VP-168 และ VVB-100 สามารถจับกับ *V. alginolyticus, V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* spp ตามลำดับ ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 5A, D, F และ G และตารางที่ 2)



ภาพที่ 4 ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีในเดือนเมษายน 2560 โดยทำการทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ดังนี้ (A) VA-165 (B) VC-63 (C) VH-29-6D (D) VF-7A11 (E) VV-20D1 (F) VP-618 และ (VVB-100) ซึ่งช่องที่ 1–10 คือ 10 โคโลนีของ *Vibrio* spp. บนอาหารคัดเลือก TCBS ที่ผ่านการต้มด้วยความร้อน ส่วนช่องที่ 16–21 คือ vibrio ที่ทราบชนิดแล้ว ได้แก่ VA = *V. alginolyticus*, VC = *V. cholera*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. fluvialis*, VV = *V. vulnificus*, VP = *V. parahaemolyticus* และช่องที่ 22–25 คือ negative control และ * คือ *Vibrio* spp.



ภาพที่ 5 ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีในเดือนพฤษภาคม 2560 โดยทำการทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ดังนี้ (A) VA-165 (B) VC-63 (C) VH-29-6D (D) VF-7A11 (E) VV-20D1 (F) VP-618 และ (VVB-100) ซึ่งช่องที่ 1–15 คือ 15 โคโลนีของ *Vibrio* spp. บนอาหารคัดเลือก TCBS ที่ผ่านการต้มด้วยความร้อน ส่วนช่องที่ 16–21 คือ vibrio ที่ทราบชนิดแล้ว ได้แก่ VA = *V. alginolyticus*, VC = *V. cholera*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. fluvialis*, VV = *V. vulnificus*, VP = *V. parahaemolyticus* และช่องที่ 22–25 คือ negative control และ * คือ *Vibrio* spp.

ตารางที่ 2 การตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีด้วยวิธี dot blotting ตั้งแต่เดือนมกราคม-พฤษภาคม 2560

เดือน	ชนิดของ Vibrio	ปริมาณเชื้อที่พบ (CFU/ml)
มกราคม	*V. alginolyticus*	1.36×10^4
	V. parahaemolyticus	7.48×10^4
กุมภาพันธ์	*V. alginolyticus*	2.4×10^4
	Vibrio spp.	6×10^3
มีนาคม	*Vibrio* spp.	3.5×10^4
เมษายน	*V. alginolyticus*	1.4×10^4
	V. parahaemolyticus	3.5×10^3

เดือน	ชนิดของ Vibrio	ปริมาณเชื้อที่พบ (CFU/ml)
พฤษภาคม	*Vibrio* spp.	7×10^3
	V. alginolyticus	2×10^3
	V. fluvialis	2×10^3
	V. parahaemolyticus	6×10^3
	Vibrio spp.	2×10^4

อภิปรายผลการวิจัย

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคสกุล Vibrio ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานีโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Vibrio ชนิดต่างๆ และนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting พบการปนเปื้อนของ *V. alginolyticus* ซึ่งรายงานในประเทศไทย *V. alginolyticus* ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมมีอาการของโรคขี้ขาวโดยก่อโรคร่วมกับ *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* และ *V. cholera* (nonO1) ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี โดยพบเซลล์ตับฝ่อและเกิดการอักเสบในตับของกุ้ง พบการสะสมของเม็ดเลือดล้อมรอบบริเวณเซลล์ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย (แก้วตา ลิ้มเฮง. 2558) และมีรายงานการปนเปื้อนของ *V. alginolyticus* ในหอยนางรมเช่นกัน (สุดสายชล หอมทอง และธดาภรณ วงศพุฒ. 2549)

นอกจากนี้พบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง โดยมีปริมาณเชื้อ 7.48×10^4, 3.5×10^3 และ 6×10^3 ตามลำดับ ซึ่ง *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งทำให้เกิดกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยมีอาการท้องร่วง ปวดศีรษะ อาเจียน ปวดมวนท้อง และมีไข้ต่ำ เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลแบบสุกๆ ดิบๆ ที่มีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ สามารถแยกได้จากอาหารทะเลหลายชนิด เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ และปลาต่างๆ เป็นต้น (Twedt. 1989, Vuddhakul et al., 2000, Su & Liu. 2000, Baffone et al., 2006) ตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย (2553) ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 ดังนี้ 1) อาหารดิบ ประเภทอาหารพร้อมปรุงและประเภทอาหารแช่เย็นและแช่แข็ง 2) อาหารพร้อมบริโภคประเภทอาหารทะเลและประเภทอาหารปรุงสุกทั่วไป ต้องไม่พบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ดังนั้นหอยแครงสดจากอ่าวปัตตานีมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* เกินค่ากำหนด จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหอยแครงเป็นแหล่งสะสมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสกุล Vibrio ควรระมัดระวังในการบริโภคหอยแครงเพื่อความปลอดภัยและป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษต่อไป

ในการศึกษานี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก ค่าใช้จ่ายน้อย และสามารถระบุชนิดของเชื้อได้ชัดเจน ทำให้เป็นวิธีการหนึ่งที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อน *Vibrio* spp. ในหอยแครง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น การเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารคัดเลือก TCBS จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical method) เป็นวิธีการแบบดั้งเดิม ต้องอาศัยระยะเวลานานในการทราบผล และต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวนมากในการทดสอบ และวิธีการทางชีวโมเลกุล เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยการตรวจหายีนที่เป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของ *Vibrio* spp.

เป็นต้น (Bilung et al., 2005, Kanjanasopa et al., 2011) วิธีการนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วแต่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้าน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 จากมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา และได้รับการอนุเคราะห์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ จากรองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. “ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์”. ออนไลน์ http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/dmscguide1.pdf สืบค้นเมื่อ (24 สิงหาคม 2560).

กันทิมา เหาะเจริญ, ซุกรี หะยีสาแม, นิยม กำลังดี และ วรรณชไม การณัด. (2541). “การสำรวจข้อมูลชีวภาพอ่าวปัตตานี (Biological data of pattani bay)”, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

แก้วตา ลิ้มเฮง. (2558). “การศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคขี้ขาวในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี”, **แก่นเกษตร.** ฉบับที่ 43, หน้าที่ 581–587.

ควรศิริ ศีลภิญโญ และ ผศ.ดร.วิมล จันทร์แจ่ม. (2548). “การพัฒนาวิธีพีซีอาร์เพื่อตรวจหาเชื้อในอาหารทะเล”, **วารสารวิจัยรามคำแหง**, ฉบับที่ 11.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2547). **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). **วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย.** กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล. (2008). “การระบาดของอหิวาตกโรคปี 2550”, **รายงานการเฝ้าระวังระบาดวิทยาประจำสัปดาห์**, ฉบับที่ 39, หน้าที่ 345-348.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ. (2553). รายงานการวิจัย เรื่อง “การเฝ้าระวังเชื้อสกุลวิบริโอ ซัลโมเนลลา และชิเกลลาในหอยแครงส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว โดยวิธีโมเลกูลาร์เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ”, กลุ่มโรคติดต่อระหว่างประเทศ, สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข.

วีรานุช หลาง. (2552). **คู่มือตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีย์ นานาสมบัติ และคณะ. (2556). “การตรวจหาการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่จาหน่ายในกรุงเทพและการศึกษาการต้านทานความร้อน”, **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ**, ฉบับที่ 3, หน้าที่ 175-184.

สุดสายชล หอมทอง และธดาภรณ์ วงศ์พุฒ. (2549). “ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Vibrio* spp. จากหอยนางรมบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี”, **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี,** ปีที่ 8, หน้าที่ 41-50.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และ จิณห์วิภา แก้วท่าไม้. (2555). “การตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในกุ้งขาวสดจากตลาดในเขตธนบุรี”, **ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์**, ปีที่ 12, หน้าที่ 85-96.

ฮัสสัน ดูมาลี. (2555). “ขบวนการเคลื่อนไหวทางสังคมแบบใหม่ในการจัดการทรัพยากรชายฝั่งทะเล อ่าวปัตตานี กรณีศึกษากลุ่มเครือข่ายอนุรักษ์อ่าวปัตตานี”, วิทยานิพนธ์ ร.ม. (วิชาการเมืองและการปกครอง). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. บัณฑิตวิทยาลัย.

Ang, G.Y., et al. (2010). “Molecular evidence of cholera outbreak caused by a toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strain in Kelantan, Malaysia”, **Journal of Clinical Microbiology**, 48, 3963-3969.

Angela, D.P., et al. (2005). “Detection of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase-targeted multiplex PCR”, **Journal of Food Safety**, 26, 150-159.

Baffone, W., et al. (2006). “Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties”, **Environmental Microbiology**, 8, p. 1299–1305.

Bilung L.M., et al. (2005). “Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR”, **FEMS Microbiology Letters**, 252, 85-88.

Daniels N.A., et al. (2000). “*Vibrio parahaemolyticus* infection in the United states 1973–1998”, **Journal of Infectious Diseases**, 181, 1661–1666.

Elliot, E.L., et al. (1998). **In Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual**, AOAC International, Gaithersburg.

Kanjanasopa, D., Pimpa, B., & Chow, P.S. (2011). “Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) harvested from the south coast of Thailand”, **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 33, 295-300.

Michael, H.B., et al. (2007). “*Vibrio vulnificus* Infection: Diagnosis and Treatment”, **American Family Physician**, 76, 539-544.

Oliver, J.D., & Japer, J.B., (1997). **Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers**. Washington DC: ASM Press.

Pengsuk, C., et al. (2011). “Differentiation among the *Vibrio cholerae* serotypes O1, O139, O141 and non-O1, non-O139, non-O141 using specific monoclonal antibodies with dot blotting”, **Journal of Microbiological Methods**, 87, 224–233.

Prompamorn, P., et al. (2013). “Rapid identification and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* from *Vibrio* spp. in seafood samples using developed monoclonal antibodies”, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 29, 721–731.

Su, Y.C, & Liu, C.C. (2007). “*Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety”, **Food Microbiology**, 24, 549-558.

Twedt, R.M., (1989). Chapter 13. *Vibrio parahaemolyticus*. New York: Marcel Decker, Inc.

Vuddhakul, V., et al. (2000). “Isolation of a pandemic O3: K6clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand”, **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 2685–2689.