บทที่ 1

บทนำ

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เกษตรกรมีการเพาะปลูก การปศุสัตว์ และการทำประมงอย่างแพร่หลาย การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นอาชีพหนึ่งในการทำประมงที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องด้วยกุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ตลาดโลกโดยเฉพาะญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกามีความต้องการสูง มีผลผลิตส่งออกได้ถึงปีละประมาณ 250,000 ตัน มูลค่าการส่งออกในปี 2548 มีปริมาณ 282,932 ตัน คิดเป็นมูลค่า 71,582 ล้านบาท (กรมศุลกากร, มกราคม 2549) โดยปริมาณการส่งออกคิดเป็น 95% ของผลผลิตรวม ส่วนอีก 5% เป็นการบริโภคภายในประเทศ (สิริ ทุกข์วินาศ และชุติมา ชมวิสัย, 2545 : ออนไลน์)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยประสบปัญหาหลายด้าน ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งคือการตายของกุ้งกุลาดำอันเนื่องมาจากการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวเหลือง โรคตัวแดงดวงขาว และโรควิบริโอซิส ซึ่งโรคเหล่านี้นับวันจะยิ่งทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น และนำความเสียหายมาสู่เศรษฐกิจของประเทศ โรคที่มีความสำคัญอย่างมากในการก่อโรคในกุ้งกุลาดำคือโรควิบริโอซิสที่เกิดจากแบคทีเรียสกุลวิบริโอ หนึ่งในแบคทีเรียชนิดนี้ที่สำคัญต่อกุ้งกุลาดำได้แก่ *Vibrio vulnificus* ที่ก่อให้เกิดโรคเสี้ยนดำ และ *Vibrio mimicus* ที่เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส

โรคเสี้ยนดำเกิดจาก *V. vulnificus* โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะทำให้กุ้งเป็นโรคได้ในบางโอกาสเท่านั้น (Song และคณะ, 1990) และมักพบในการเลี้ยงกุ้งที่มีระบบความเค็มต่ำ หรือการเลี้ยงที่มีระบบความเค็มปกติแต่เป็นช่วงน้ำจืดหรือหน้าฝน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543) การระบาดของโรคเสี้ยนดำในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกปี พ.ศ.2531 ซึ่งเป็นช่วงที่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเริ่มมีการขยายตัว กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้จะมีจุดหรือเสี้ยนสีดำหรือสีน้ำตาลที่ตำแหน่งใต้เปลือกโดยเฉพาะบริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกของแต่ละปล้องและแพนหาง จุดหรือเสี้ยนเหล่านี้สามารถแทงทะลุผ่านกล้ามเนื้อกุ้งทั้ง 2 ด้าน หรือด้านเดียวเข้าไปฝังอยู่ภายใน โดยจะมีขนาดแตกต่างกัน หากมีการฝังในกล้ามเนื้อแม้กุ้งจะมีการลอกคราบแล้วเสี้ยนจะยังคงฝังอยู่ภายในกล้ามเนื้อ เมื่อนำกุ้งที่เป็นโรคเสี้ยนดำไปต้มจนสุกลักษณะจุดหรือเสี้ยนสีดำจะปรากฏเด่นชัด ทำให้เป็นปัญหาต่อการจำหน่ายภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นจุดหรือเสี้ยนจะเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเนื่องจากมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมาก (ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์, 2538) การเกิดจุดหรือเสี้ยนสีดำเป็นผลมาจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เรียกว่าระบบโพรฟีนอลออกซิเดส

ระบบโพรฟีนอลออกซิเดสเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ที่สำคัญในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มครัสเตเซีย โดยเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาและแกรนูลาเซลล์เป็นแหล่งที่สร้างและเก็บเอนไซม์ในระบบนี้ (Sritunyalucksana และ Söderhäll, 2000) ซึ่งเม็ดเลือดเหล่านี้จะถูกกระตุ้นโดยผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต (Torbjörn และ Söderhäll, 1999) ได้แก่ ไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย และบีตา-1,3-กลูแคน ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ราและยีสต์ ให้เกิดดีแกรนูเลชัน (degranulation) หลั่งเอนไซม์กระตุ้นโพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activating enzyme; ppA) ได้แก่ เซอรีนโปรติเอส (serine protease) และโพรฟีนอลออกซิเดส ออกจากเม็ดแกรนูล จากนั้นเซอรีนโปรติเอสจะถูกกระตุ้นโดยผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นเซอรีนโปรติเอสที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ซึ่งจะไปเปลี่ยนโพรฟีนอลออกซิเดสให้เป็นฟีนอลออกซิเดส และฟีนอลออกซิเดสจะออกซิไดซ์ฟีนอลให้เปลี่ยนเป็นควิโนน จากนั้นควิโนนจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่เป็นโดพาโครมเกาะรวมตัวเป็นเม็ดสีดำ (เมลานิน) (Johanson และ Söderhäll, 1989) ดังนั้นจึงสังเกตเห็นเสี้ยนสีดำในกุ้งที่เป็นโรคเสี้ยนดำ

นอกจากนี้ *V. vulnificus* และ *V. mimicus* ยังเป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ โดย *V. vulnificus* ทำให้เกิดกระเพาะและลำไส้อักเสบ โลหิตเป็นพิษ และการติดเชื้อทางบาดแผล (Strom และ Paranjpye, 2000; Linkous และ Oliver, 1999; Amaro และคณะ, 1994) *V. mimicus* ทำให้เกิดโรคท้องร่วงและหูอักเสบ (Lee และคณะ, 2002; Kang และคณะ, 1998; Chowdhury และคณะ, 1989)

การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการแบบดั้งเดิม ซึ่งเป็นการใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์และจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้เวลานานจึงจะทราบผลการตรวจ และจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ (Sanjuan และ Amaro, 2004; Macian และคณะ, 2000; HØI และคณะ, 1998) ทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบสูง นอกจากนี้ยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง ทำให้การศึกษาการระบาดของโรคทำได้ยาก เป็นผลให้การป้องกันการระบาดของโรคไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นเกษตรกรบางรายจึงหาหนทางแก้ไขด้วยการใช้สารปฏิชีวนะทันที ทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาและการตกค้างของสารปฏิชีวนะในกุ้ง ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคและอุตสาหกรรมการส่งออกของประเทศ การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางโมเลกุล (Fukushima และ Seki, 2004; Nilsson และคณะ, 2003) เป็นอีกหนทางหนึ่งที่รวดเร็วและมีความไวสูง แต่มีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญ และห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และวินิจฉัยโรคติด

เชื้อจากแบคทีเรีย โดยเทคนิคนี้เป็นปฏิกิริยาการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติบอดีและแอนติเจน เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทป เพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน ทำให้มีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้น โมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงเป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญในการจำแนกแบคทีเรียที่ต้องการจาก แบคทีเรียชนิดอื่น และยังสามารถนำมาตรวจสอบตำแหน่งของแบคทีเรียเพื่อศึกษากลไกการก่อโรคได้ (Phianphak และคณะ, 2005; Jung และคณะ, 2001) เทคนิคนี้เป็นการตรวจสอบที่มีความไวสูง แม่นยำ ให้ผลที่รวดเร็ว ราคาต่ำ และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ทำให้สะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อทั้งทางการแพทย์ การวิจัย และเกษตรกรรม โดยเกษตรกรและบุคคลทั่วไปสามารถนำไปใช้ได้อย่างปลอดภัยและต้นทุนต่ำ (Sithigorngul และคณะ, 2000) ทำให้การตรวจวินิจฉัยเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและสามารถควบคุมการติดเชื้อจากแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. vulnificus* และ *V. mimicus* ที่สามารถนำมาใช้จำแนก *V. vulnificus* และ *V. mimicus* จาก *Vibrio* spp. แบคทีเรียชนิดอื่นๆ และพัฒนาวิธีตรวจเบื้องต้นโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี