การตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในหอยแครงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Investigation into Contamination by *Vibrio parahaemolyticus*in Cockle (*Anadaragranosa*) Using Monoclonal Antibody

วารุณี หะยีมะสา[1]

Warunee Hajimasalaeh[1]

Received: 17 January 2017 ; Accepted: 19 April 2017

บทคัดย่อ

วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัสหรือ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารทะเล สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ในมนุษย์ และเนื่องจากอาหารทะเลเป็นอาหารที่ได้รับความนิยม แต่มีการบริโภคที่ไม่ถูกสุขลักษณะทำให้มีรายงานอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษทุกปี ดังนั้นในงานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง (*Anadaragranosa*) ในอ่าวปัตตานี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม 2559 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนตีบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และโมโนโคลนอลแอนตีบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ และทดสอบด้วยวิธี dot blotting พบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง มีปริมาณเชื้อ $4x10^3$CFU ml^{-1} ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นอกจากนี้พบการปนเปื้อน *V. vulnificus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด หรือพบการติดเชื้อที่บาดแผลจากข้อมูลนี้เป็นการเฝ้าระวังการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้

คำสำคัญ : วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส โรคอาหารเป็นพิษ หอยแครง โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is a seafood-borne pathogenic bacteria that can cause food poisoning in humans. There is a huge number of current reports concerning an epidemic of food poisoning from seafood consumption. This study aimed to investigate the contamination of *V. parahaemolyticus* in cockle (*Anadaragranosa*) at Pattani Bay during May to August, 2016. A monoclonal antibody (MAbs) specific to *V. parahaemolyticus* and MAbs specific to *Vibrio* spp. were used and detected by dot blotting. The dot blotting indicated that *V. parahaemolyticus* was found in cockle. It had a yield of $4x10^3$ CFU ml^{-1} and it exceeded the standard of the Department of Medical Sciences, Thailand. Moreover, the result revealed contamination by pathogenic *V. vulificus* which causes septicemia and wound infection. Finally, this study attempts to highlight the need for carefulness and attention to the epidemic of food poisoning.

Keywords: Vibrio parahaemolyticus, food poisoning, cockle, monoclonal antibody

บทนำ

แบคทีเรียก่อโรค วิบริโอพาราฮีโมไลติคัส (*Vibrioparahaemolyticus*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบในสกุล Vibrio มีรูปร่างท่อน สามารถพบการกระจายในทะเล มีโพลาร์แฟลกเจลล่าสำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ ซึ่ง *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ซึ่งทำให้เกิดกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) เป็นโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเล โดยมีรายงานการระบาดในอเมริกา ยุโรป เอเชีย และแอฟริกา เกิดจากการบริโภคอาหารทะเล เช่น ปลาคอดปลาซาร์ดีน ปลาแมคเคอเรล หอย ปลาหมึกยักษ์ กุ้ง ปู กุ้งลอบสเตอร์ และหอยนางรม เป็นต้น โดยเฉพาะการบริโภคหอยสุกๆ ดิบๆ ที่มีการปนเปื้อน

[1] *อาจารย์, คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาอำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000,*

[1] *Lecturer, Faculty of Science Technology and Agriculture YalaRajabhat University, AmphorMaung, Yala Province 95000, Thailand. warunee.h@yru.ac.th*

V. parahaemolyticus ก่อให้เกิดกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลัน โดยมีอาการท้องร่วง ปวดศีรษะ อาเจียน ปวดมวนท้อง และมีไข้ต่ำ[1-5] ทั้งนี้ในประเทศไทยการบริโภคอาหารทะเลเป็นที่นิยมอย่างมาก ทำให้มีรายงานการอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษอย่างต่อเนื่อง ในปี 2558 มีรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ รวมทั้งสิ้น 19,612 ราย จากทุกจังหวัดทั่วประเทศ อัตราป่วย 30.4 ต่อประชากรแสนคน โดยอาหารที่เสี่ยงทำให้เกิดโรค ได้แก่ ยำกุ้งเต้น ข้าวผัดโรยเนื้อปู ยำหอยแครง เป็นต้น[6]

ในการตรวจวิเคราะห์หา *V. parahaemolyticus* สามารถตรวจสอบได้หลายวิธีการ เช่น วิธีการดั้งเดิมโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารคัดเลือก Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical method) แต่ต้องอาศัยระยะเวลานานในการทราบผล และต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวนมากในการทดสอบ ดังนั้นมีการพัฒนาวิธีการทางชีวโมเลกุล เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยการตรวจหายีน *tox R, tdh* หรือ *trh* ซึ่งยีนดังกล่าวเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของ *V. parahaemolyticus* เป็นต้น[7-8] วิธีการนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วแต่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านนอกจากนี้มีการตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยวิธีการทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* วิธีการนี้ให้ผลได้จำเพาะ แม่นยำและใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการดั้งเดิม ตัวอย่างเช่น การแยก *V. cholerae* ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคท้องร่วงอย่างรุนแรงหรืออหิวาตกโรคจากตัวอย่างกุ้งและสามารถระบุซีโรไทป์ (serotypes) ของเชื้อ*V. cholerae* ชนิด O1, O139, O141 และ non-O1, non-O139, non-O141 จากอาหารและสัตว์ที่ติดเชื้อได้ โดยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* และอาศัยวิธี dot blotting ซึ่งไม่ต้องอาศัยการยืนยันจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี[9-10] นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* สามารถแยก *V. parahaemolyticus* จาก *Vibrio* spp. ในตัวอย่างอาหารทะเลสดที่มีจำหน่ายในตลาดสด เช่น กุ้ง หอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยนางรม ได้โดยอาศัยวิธี dot blotting[11] ดังนั้นในงานวิจัยนี้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* ในการตรวจหาการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานี อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ซึ่งเป็นแหล่งที่มีประชากรหอยแครงตามธรรมชาติโดยอาศัยวิธี dot blotting

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติในอ่าวปัตตานี บริเวณอำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ทำการเก็บตัวอย่างทุกเดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2559 จากนั้นทำการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี dot blotting โดยวิธีการดัดแปลงจาก Prompamorn*et al.* (2013)[11] ดังนี้ บดตัวอย่างหอยแครงสด 25 กรัม จากนั้นนำตัวอย่างหอยแครงบด 1 กรัม เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ alkaline peptone water (APW) ที่เติม Nacl ความเข้มข้น 2 เปอเซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบ tenfold serial dilution จากนั้นเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก TCBS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Table 1 specificity of monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies	Sensitivity:dot blotting (CFU ml^{-1})	Bacterial immunoreactivity
VP-516[a]	10^7	*V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus*
VP-618[a]	10^7	*V. parahaemolyticus*
VA-165[b]	10^6	*V. alginolyticus* *V. vulnificus*
VH-9B11[c]	10^7	*V. harveyi*
VC-63[d]	10^7	*V. cholerae*
VV20D1[e]	10^7	*V. vulnificus*
VC-201[d]	10^7	*Vibrio* spp.

[a]FromPrompamorn *et al.* (2013)[11]
[b]FromSithigorngul*et al.* (2006)[12]
[c]FromThongkao*et al.* (2009)[13]
[d]FromPengsuk*et al.* (2011)[10]
[e] FromSurasilp (2012)[14]

ทำการนับโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก TCBS และคัดเลือกโคโลนีสีเขียว จำนวน 25 โคโลนีจากนั้นนำแต่ละโคโลนีมาเจือจางในสารละลาย 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) แล้วต้มในน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นหยดลงบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อจุด อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto (นมพร่องมันเนย 5% ที่ละลายในสารละลาย PBS) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด (Table 1) เป็นเวลา

5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำไปบ่มต่อใน GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) เจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 5% blottoที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03% Diaminobenzidinetetrahydrochloride, 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ในสารละลาย PBS ซึ่งจะปรากฏจุดสีดำ (immunoreactivity) บนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์ผล

ผลการศึกษา

ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติในอ่าวปัตตานีโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. แต่ละชนิด และนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2559 พบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ซึ่งเกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* (VP-516 และ VP-618) สามารถจับและเกิด immunoreactivity ได้ชัดเจน (Figure 1a, b) และมีปริมาณเชื้อ $4x10^3$ CFU ml^{-1} (Table 2) แต่พบการปนเปื้อนเพียงเดือนมิถุนายน

นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* (VA-165 และ VV-20D1) สามารถจับกับ *V. vulnificus* ได้อย่างจำเพาะโดยเกิด immunoreactivity ได้ชัดเจน (Figure 1c, e) ซึ่งพบการปนเปื้อน *V. vulnificus* ในหอยแครงทุกเดือนที่ทำการศึกษาโดยมีปริมาณเชื้อ $2x10^3$, $2x10^3$, $3x10^2$ และ $2x10^3$ CFU ml^{-1} ตามลำดับ (Table2) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี VC-201 ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. สามารถจับกับ Vibrio ที่มีโคโลนีสีเขียวอื่นๆ ได้นอกเหนือ Vibrio ที่ใช้ทดสอบ (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*) (Figure 1g)

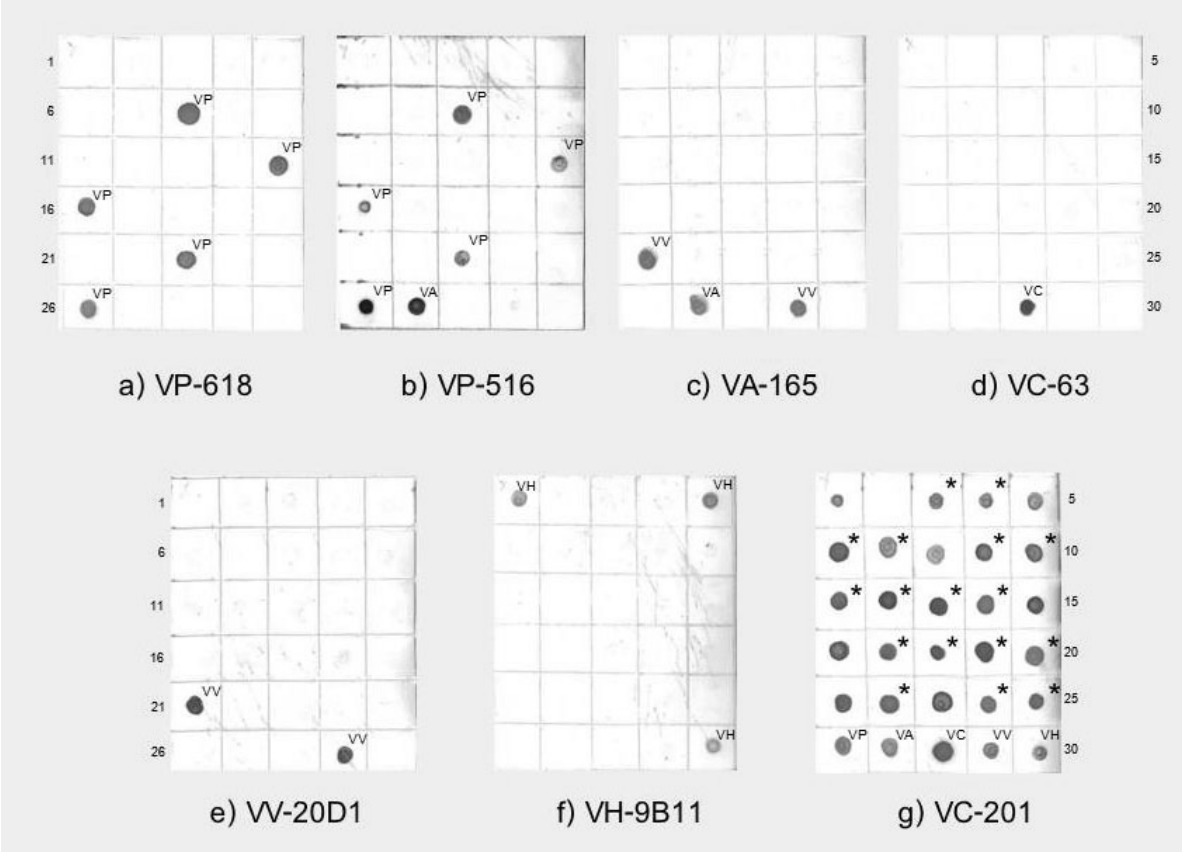

Figure 1 Detection of contamination of V. parahaemolyticus in cockle by dot blotting from Pattani bay in June 2016. The25 bacteria colonies were samples and 1 µl was spotted onto each square of nitrocellulose membrane and probed with monoclonal antibodies: a) VP-618, b) VP-516, c) VA-165, d) VC-63, e) VV-20D1, f) VH-9B11 and g) VC-201. The No.26-30 indicatepositive control VP =V. parahaemolyticus, VA = V. alginolyticus, VC =V. cholera, VV = V. vulnificus,VH =V. harveyiand * indicate Vibrio spp.

Table 2 Contamination of *Vibrio* spp.in cockle from Pattani bay between May-August 2016

Month	Bacteria	Number of CFU ml^{-1}
May	*V. parahaemolyticus*	-
	V. vulnificus	$2x10^3$
June	*V. parahaemolyticus*	$4x10^3$
	V. vulnificus	$2x10^3$
July	*V. parahaemolyticus*	-
	V. vulnificus	$3x10^2$
August	*V. parahaemolyticus*	-
	V. vulnificus	$2x10^3$

วิจารณ์และสรุปผล

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* (VP-516 และ VP-618) สามารถระบุว่าหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานีมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* โดยพบการปนเปื้อนเพียงเดือนมิถุนายน คาดว่าเกิดจาก *V. parahaemolyticus* อยู่ในระยะ viable but non-culturable (VBNC) หรือระยะพัก (resting state) เป็นการตอบสนองของเชื้อเพื่อให้อยู่รอดได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนหรือการเจริญ เป็นต้น[15]และช่วงเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม เป็นฤดูฝนของภาคใต้ ปริมาณน้ำฝนอาจทำให้อุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลลดต่ำลง ส่งผลต่อการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสอดคล้องกับคุณภาพน้ำทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของ *V. parahaemolyticus* เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำทะเล เป็นต้น[16] โดยเฉพาะความเค็มและอุณหภูมิของน้ำทะเลเป็นปัจจัยที่สำคัญในการแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus* ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีในฤดูร้อนและอาศัยในตะกอนดินในน้ำเมื่อเข้าฤดูหนาว[17-19] นอกจากนี้การพบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* บริเวณอ่าวปัตตานีมีความสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2005 พบว่าหอยแครงเป็นแหล่งสะสม *V. parahaemolyticus*ซึ่งเป็นหอยแครงที่รวบรวมจากชายฝั่งทะเลในประเทศมาเลเซียโดยทดสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)[7]

ส่วนผลจากการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบว่ามีปริมาณ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ $4x10^3$ $CFUml^{-1}$ ซึ่งตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2553) ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 ดังนี้ 1) อาหารดิบ ประเภทอาหารพร้อมปรุงและประเภทอาหารแช่เย็นและแช่แข็ง 2) อาหารพร้อมบริโภคประเภทอาหารทะเลและประเภทอาหารปรุงสุกทั่วไป ต้องไม่พบ *V. parahaemolyticus* ใน ตัวอย่างอาหาร 25 กรัม[20] ดังนั้นหอยแครงสดจากอ่าวปัตตานีมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* เกินค่ากำหนด นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อน *V. vulnificus* ในหอยแครงซึ่ง *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์เช่นเดียวกับ *V. parahaemolyticus* เมื่อ *V. vulnificus* เข้าสู่ร่างกายก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) หรือพบการติดเชื้อที่บาดแผล (wound infection) ซึ่งอาจพบอาการรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูงในผู้ป่วยที่มีปัญหาระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคตับอักเสบเรื้อรัง[21] จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าหอยแครงเป็นแหล่งสะสมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสกุล Vibrio ดังนั้นควรระมัดระวังในการบริโภคหอยแครงเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและช่วยป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 จากมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาและได้รับการอนุเคราะห์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดจากรองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ

เอกสารอ้างอิง

1. Twedt RM. Chapter 13. *Vibrio parahaemolyticus*. New York: Marcel Decker, Inc.; 1989.
2. Liston J. Microbial hazards of seafood consumption. Food Technol 1990;44:56-62.
3. Su YC, Liu CC. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. Food microbiol 2007;24:549-558.
4. Kaysner CA, DePaola A. "*Vibrio*".in Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Edn, edsDownes F. P., Ito K., editors. (Washington, DC: American Public Health Association), 1990:405-420.
5. Urmersbach S, Alter T, Koralage MS, Sperling L, Gerdts G, Messelhäusser U, Huehn S. Population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* originating from different geographical regions demonstrates a high

genetic diversity. BMC Microbiol 2014;1-14.

6. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. DDC WATCHจับตาโรคและภัยสุขภาพ: อาหารเป็นพิษ. 2559; 2(4).ได้จาก:http://www.boe.moph.go.th/files/news/20150408_27011424.pdf สืบค้นเมื่อ 20 ตุลาคม 2559
7. Bilung LM, Radu S, Bahaman AR, Rahim RA, Napis S, Vui Ling MWC, Tanil GB, Nishibuchi M. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadaragranosa*) by PCR. FEMS MicrobiolLett2005 Nov 1;252(1):85-88
8. Kanjanasopa D, Pimpa B, Chow PS. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadaragranosa*) harvested from the south coast of Thailand.Songklanakarin J SciTechnol 2011;33:295-300.
9. Pengsuk C, Longyant S, Rukpratanporn S, Chaivisuthangkura P, Sridulyakul P, Sithigorngul P. Development of monoclonal antibodies for simple detection and differentiation of *Vibrio mimicus* from *V. cholerae* and *Vibrio* spp. by dot blotting. Aquacult 2010 Feb 27;300:17-24.
10. Pengsuk C, Longyant S, Rukpratanporn S, Chaivisuthangkura P, Sridulyakul P, Sithigorngul P. Differentiation among the *Vibrio cholerae* serotypes O1, O139, O141 and non-O1, non-O139, non-O141 using specific monoclonal antibodies with dot blotting. J Microbiol Methods2011 Nov;87(2):224-233.
11. Prompamorn P, Longyant S, Pengsuk C, Sithigorngul P, Chaivisuthangkura P. Rapid identification and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* from *Vibrio* spp. in seafood samples using developed monoclonal antibodies. World J MicrobiolBiotechnol 2013 Apr;29(4):721-731.
12. Sithigorngul W,Rengpipat S, Tansirisittikul A, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul P. Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus*. LettApplMicrobiol 2006 June;26(43)4:436-442.
13. Thongkao K, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Rukpratanporn S,Sridulyakul P, Sithigorngul P. Production of monoclonal antibodies specific to *Vibrio harveyi*. In: The 35th congress on science and technology of Thailand (ST33S), 2009 Oct 15–17;Thailand, P 94-95.
14. Surasilp T. Development of immunological-based assay and loop mediated isothermal amplification method for specific detection of *Vibrio vulnificus* in marine animals. Bangkok: Srinakharinwirot University; 2012.
15. James D. The viable but non culturablestate in bacteria. J. Microbiol 2005 Feb;43:93-100.
16. Cabrera-García ME, Vázquez-Salinas C, Quiñones-Ramírez EI. Serologic and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Seawater and Fish Products of the Gulf of Mexico. Appl EnvironMicrobiol 2004 Nov; 70(11):6401–6406.
17. Kaneko T. Colwell RR. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. ApplMicrobiol 1975 Aug;30(2):251-257.
18. Bates TC, Tolker-Nielsen T, Molin S, Oliver JD. The viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus*. Abstracts of the 100th General Meeting of the AmeriSociMicrobiol 2000.
19. DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. Appl Environ Microbiol2003 Mar;69(3):1521-1526.
20. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ได้จากhttp://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/dmscguide1.pdfสืบค้นเมื่อ20 ตุลาคม2559
21. Izumiya H, Matsumoto K, Yahiro S, Lee J, Morita M, Yamonaoto S, Arakawa E, Ohnishi M. Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Mol Cell Probe 2011 Aug;25(4):174-176.