บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากะพงขาว จัดเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ให้ผลผลิตสูง และเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีราคาแพง มีผู้นิยมรับประทานกันมาก เนื่องจากมีรสชาติดี การเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นที่นิยมเลี้ยงและได้รับความสนใจจากเกษตรกรผู้เลี้ยงอย่างแพร่หลาย แต่มักจะประสบปัญหาต่าง ๆ มากมายจากการเพาะเลี้ยง นับตั้งแต่ การผสมพันธุ์ เพาะฟัก อนุบาล จนกระทั่งเลี้ยงจนได้ขนาดที่ตลาดต้องการ ทั้งในบ่อดิน และกระชัง ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรได้รับความเสียหายอย่างมากจากการเลี้ยง คือ ปัญหาการตาย เนื่องจากการเกิดโรค หรือเมื่อมีการระบาดของโรคในแหล่งน้ำหนึ่ง ๆ โดยมีรายงานความเสียหายในปัญหาเรื่องโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียโดย พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลากะพงขาวที่สำคัญได้แก่ *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pasterurella* sp. และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถแยกได้จาก ตับ ไต ม้าม และอวัยวะหรือบาดแผล ของปลาที่เกิดโรค (วีรวรรณ ชินอักษร, 2535)

โรค Vibriosis เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสกุล Vibrio มักพบระบาดในปลาทะเลเป็นส่วนใหญ่ โดยเกิดการระบาดในปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำหนึ่ง ๆ หรือบ่อเลี้ยงปลาที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง ความรุนแรงของเชื้อก่อให้เกิดโรคแตกต่างกันไป โดยมีทั้งชนิดที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ด้วยตัวเอง (Primary Pathogen) จนถึงพวกที่เข้าทำอันตรายต่อปลาหลังจากที่ปลามีความอ่อนแอ (Secondary Pathogen) และติดเชื้อมาก่อน เช่น เชื้อรา โปรโตซัว หรือมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงทำให้ปลาเกิดความเครียด อ่อนแอ ทำให้ยอมรับเชื้อแบคทีเรียมากขึ้น (นิลุบล ยูอาสะ, 2543)

Vibrio vulnificus เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคทั้งในมนุษย์ และสัตว์น้ำ เช่น ปลาไหล ปลานิล และกุ้ง (Fouz & Amaro, 2003; Gassent, Fouz, & Amaro, 2004) โดยเฉพาะในปลาไหลได้มีการระบาดของโรค Vibriosis ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาไหลในประเทศแถบยุโรป และในประเทศญี่ปุ่น โดยเชื้อ *V. vulnificus* ที่ระบาดได้ทำให้เกิดการตายของปลาไหลในอัตราที่สูง (Fouz, Alcaide, Barrera, & Amaro, 2002) และความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* ยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อไปยังมนุษย์ได้โดยตัวของมันมีคุณสมบัติเป็น Opportunistic Pathogen คือ เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคเมื่อมนุษย์เกิดบาดแผลแล้วสัมผัสกับน้ำทะเล หรือสัตว์น้ำที่มีเชื้อ *V. vulnificus* เจือปนอยู่ อาจทำให้เกิดการติดเชื้อโดยจะมี

อาการเนื้อเยื่ออักเสบ จนถึงเกิดอาการเนื้อตาย และการบริโภคสัตว์น้ำที่มีการติดเชื้อ *V. vulnificus* ในบางรายอาจมีการติดเชื้อทางกระแสเลือดอย่างรุนแรงซึ่งจะพบว่ามีอัตราการตายสูง และมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของคนที่เกิดอาการโลหิตเป็นพิษจะเสียชีวิต (Strom & Paranjpye, 2000) ส่วนอาการของสัตว์น้ำที่เกิดการติดเชื้อ พบว่า ตามบริเวณลำตัวจะมีสีแดงซึ่งเกิดจากการตกเลือด ซึ่งจะมีการตกเลือดที่ครีบ มีแผลเปื่อยที่บริเวณหัว และมีบาดแผลตามลำตัว ส่วนในปลาที่มีการติดเชื้อรุนแรงอวัยวะภายในจะเกิดการตกเลือดที่บริเวณตับ ม้าม ไต กล้ามเนื้อ และมีการติดเชื้อในกระแสเลือด (Gassent & Amaro, 2004) รวมทั้งท้องบวมน้ำ และจากการศึกษาของ Fouz et al. (2001) พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* สามารถถ่ายทอดจากปลาไหลไปสู่ปลานิลได้โดยผ่านทั้งทางน้ำ และทางอาหาร โดยปลาที่ติดเชื้อจะมีการตกเลือดตามลำตัวและอวัยวะภายใน

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่มีความสำคัญ และมีการขยายตัวเพิ่มทุก ๆ ปี เนื่องจากความต้องการบริโภคสัตว์น้ำที่สูงขึ้น ในขณะที่ผลผลิตสัตว์น้ำที่จับได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติลดลง เกษตรกรจึงได้มีการพัฒนาการเลี้ยงแบบหนาแน่น (Intensive) เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มากขึ้น จึงเป็นสาเหตุให้สัตว์น้ำเกิดอาการเครียด และมีการยอมรับเชื้อได้ง่าย ทำให้มีการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรค จนเกิดปัญหาสารตกค้างจากการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำ การใช้ยาปฏิชีวนะบ่อยครั้ง สามารถก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย (Li et al., 1999) ส่งผลต่อการควบคุม และการรักษาโรคในสัตว์น้ำเป็นไปได้ยาก จากปัญหาดังกล่าว จึงนำไปสู่การคิดค้นแนวทางในการลดการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะ โดยการให้วัคซีน ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าวได้ ในระยะ10 ปีที่ผ่านมามีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสัตว์น้ำมากมาย เช่น การทำวัคซีนป้องกันโรคในปลาแซลมอน ได้แก่ วัคซีนป้องกันเชื้อที่เกิดจาก Vibriosis, Enteric Redmount (ERM) และ Yersinosis ซึ่งเป็นที่ยอมรับของตลาดมานาน ส่วนวัคซีนป้องกันโรคในปลาเขตร้อนยังไม่มีวัคซีนที่นำมาใช้ในเชิงพาณิชย์มากนัก (ชนกันต์ จิตรมนัส, 2544) และวัคซีนป้องกันเชื้อที่เกิดจาก *V. vulnificus* ก็ได้มีผู้สนใจในการศึกษา ดังรายงานการศึกษาของ Park, Park, and Jeong (2001) ได้ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนที่มีกระบวนการผลิตที่ต่างกัน คือ การทำวัคซีนโดยใช้ความร้อน และฟอร์มาลินในการทำให้เชื้อตาย พบว่าการทำวัคซีนโดยการใช้ความร้อนโดยการทำให้เชื้อตาย มีผลให้ปลามีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการใช้ฟอร์มาลินในการทำให้เชื้อตาย

การศึกษาในครั้งนี้ ได้มีการทดลองทำวัคซีนจากเชื้อ *V. vulnificus* โดยการฉีดเข้าช่องท้องของปลา เพื่อให้เข้าใจถึงประสิทธิภาพ ประเภทวัคซีนในการป้องกันโรคโดยสังเกตุจากอัตราการตายหลังการรับแบคทีเรียชนิดเดียวกันอีกครั้ง และหลังการได้รับวัคซีน และศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวหลังจากได้รับวัคซีน เช่นปริมาณเม็ดเลือดขาวปริมาณ

แอนติบอดีจากการตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของปริมาแอนติบอดีของปลาด้วยวิธี Enzyme Linked Immunoadsorbent Assay (ELISA) ซึ่งจากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว จะเป็นแนวทางในการนำไปสู่การพัฒนาการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสัตว์น้ำ และลดการใช้ยาปฏิชีวนะในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสร้างระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบต่าง ๆ

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการให้วัคซีนแบบต่าง ๆ ต่อปลากะพงขาวในการต้านเชื้อ *V. vulnificus*

3. เพื่อเปรียบเทียบ Outer Membrane Protein (OMP) ระหว่างเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ Biotype 2 และทดสอบความเป็นอิมโมโนเจน ของ OMP ทั้งสองชนิด

สมมติฐานของการวิจัย

1. ปลากะพงขาวควรสร้างแอนติบอดี และระบบเซลล์ของภูมิคุ้มกันควรเพิ่มขึ้นภายหลังจากได้รับวัคซีน

2. ประเภทวัคซีนแบบต่าง ๆ ที่ให้ต่อปลากะพงขาวอาจทำให้การต้านทานเชื้อ *V. vulnificus* แตกต่างกัน

3. รูปแบบของ OMP ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ Biotype 2 น่าจะแตกต่างกัน และอิมโมโนเจนอาจมีมวลโมเลกุลที่ต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้แนวทางการผลิต และเข้าใจถึงประสิทธิภาพของวัคซีนเพื่อช่วยควบคุมโรคแบคทีเรียที่เกิดจาก *V. vulnificus* ในปลากะพงขาว

2. สามารถจำแนก Biotype 1 และ Biotype 2 ของ *V. vulnificus* จากรูปแบบ OMP เพื่อเป็นข้อมูลในการจำแนกชนิดของเชื้อ *V. vulnificus* และอิมโมโนเจนของ OMP จะเป็นแนวทางการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus* ให้สามารถครอบคลุมโรคได้ดียิ่งขึ้น

3. ได้ข้อมูลในการวินิจฉัยโรค และการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus*

4. ช่วยเพิ่มอุตสาหกรรมการผลิตปลากะพงขาว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขอบเขตของการวิจัย

1. เปรียบเทียบรูปแบบ OMP ของเชื้อ *V. vulnificus* ระหว่างเชื้อ Biotype 1 และ 2โดยวิธี SDS-PAGE

2. จำแนกเชื้อ *V. vulnificus* จากการทดสอบทางชีวเคมี และการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี และโพลิโคลนอลแอนติบอดี

3. ทดลองใช้ปลากะพงขาวขนาด 150±10 กรัม โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่มใช้ปลากะพงขาวกลุ่มละ 30 ตัวคือ

3.1 กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าที่ช่องท้อง 0.2 มิลลิลิตรต่อปลา 1 ตัว

3.2 กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนชนิด Bacterin ต้านเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ปริมาณ 1 : 1 เข้าช่องท้องปลากะพงขาวที่ความเข้มข้น 10^9 CFU / มิลลิลิตร

3.3 กลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนชนิด OMP ต้านเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ปริมาณ 1 : 1 ชนิด OMP เข้าที่ช่องท้องที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อปลา 100 มิลลิกรัม (ปรับปรุงจากวิธี Bader, Shoemaker, & Klesius, 2004)

หลังจากให้ปลาได้รับวัคซีนทำการเก็บเลือดปลามาวิเคราะห์ทุก 7 วัน จนสิ้นสุดการทดลอง

1. เปรียบเทียบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ในแต่ละกลุ่ม

2. ตรวจปริมาณเม็ดเลือดขาว โดยเทคนิคการย้อมสี Natt-Herrick's Stain

บันทึกอัตราการตาย และจำนวนปลาที่มีอาการป่วยทุกวัน และนำปลาที่ตาย และปลาที่ป่วยมาตรวจหาสาเหตุการตาย และป่วยของปลาแต่ละกลุ่มโดยการเขี่ยเชื้อ

สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

การเปรียบเทียบค่าแอนติบอดีไตเตอร์ระหว่างกลุ่มทดลองใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Two-Way ANOVA ($p<0.01$) และความแตกต่างระหว่างกลุ่มภายในสัปดาห์โดยใช้การทดสอบความแปรปรวนทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ($p<0.01$) และการเปรียบเทียบค่าเม็ดเลือดขาวระหว่างกลุ่มทดลองใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Two-Way ANOVA ($p<0.05$) และความแตกต่างระหว่างกลุ่มภายในสัปดาห์โดยใช้การทดสอบความแปรปรวนทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ($p<0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัยที่โรงเพาะเลี้ยง และห้องปฏิบัติการวิจัยโครงการบัณฑิตศึกษา 6203 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี, Central Lab มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ระยะเวลาที่ทำการศึกษา ตุลาคม 2547- ตุลาคม 2548

แผนการดำเนินงาน

เดือน	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ขั้นตอนการดำเนินงาน												
1. รวบรวมข้อมูล	←					→						
2. รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย					←		→					
3. ศึกษาทดลอง							←		→			
4. วิเคราะห์ผล									←		→	
5. รายงานผล ทำรูปเล่ม										←		→

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University