

การพัฒนาวัคซีนต้านแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Vibrio vulnificus* ในปลากระพงขาว

วลัยลักษณ์ นิตยารัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวาริชศาสตร์

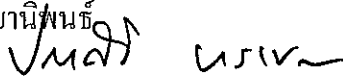
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

มีนาคม 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

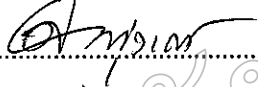
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ วลัยลักษณ์ นิลฉายรัตน์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์



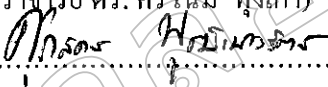
.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโนม พุ่งเกล้า)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

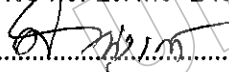
(ดร. ศุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า



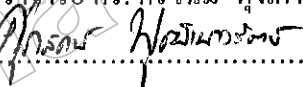
.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท)



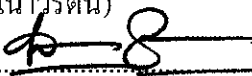
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโนม พุ่งเกล้า)



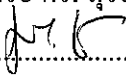
.....กรรมการ

(ดร. ศุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์)



.....กรรมการ

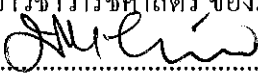
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุริยัน ธีฎกิจจานุกิจ)



.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประทุม ม่วงมี)

วันที่ 16 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2550

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนและส่งเสริมการวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา

จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีการศึกษา 2548

และทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา

จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีการศึกษา 2548

ประกาศขอบคุณ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท ประธานควบคุมวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้คำปรึกษา ให้ความรู้ทั้งภาคทฤษฎี และการทำงานในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในหลาย ๆ ด้าน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม หุ้งแก้ว และ ดร. สุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์ ซึ่งเป็นกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ที่ช่วยแนะนำให้คำปรึกษา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น จึงขอกราบขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้องชาย ที่ได้ให้ความรัก โอกาส กำลังใจ และสนับสนุนทุนในการศึกษามาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือในการทำงาน และให้กำลังใจจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

วลัยลักษณ์ นิลจารรัตน์

46910497: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)

คำสำคัญ: วัคซีน/ *Vibrio vulnificus*/ ปลากระพงขาว/ ภูมิคุ้มกัน/ แอนติบอดี/ โมโนโคลนอล/ โพลีโคลนอล/ ELISA/ Western Blot

วลัยลักษณ์ นิลฉายรัตน์: การพัฒนาวัคซีนต้านทานแบคทีเรียก่อโรคนิคม *Vibrio vulnificus* ในปลากระพงขาว (DEVELOPMENT OF VACCINE AGAINST PATHOGENIC *Vibrio vulnificus* IN SEA BASS (*Lates calcarifer*)) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์: ปภาศิริ บาร์เนท, Ph.D., ศุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์, Ph.D., ศิริโณม พุ่งแก้ว, Ph.D. 70 หน้า. ปี พ.ศ. 2550.

แบคทีเรียจากปลากระพงขาวป่วย 2 เชื้อถูกจำแนกชนิดด้วยชุดทดสอบ API 20E พบว่าเป็น *Vibrio vulnificus* และสามารถจำแนกออกเป็น Biotype 1 เนื่องจากปฏิกิริยา Indole และ Ornithin Decarboxylase เป็นบวกทั้งคู่ และ Biotype 2 เป็นลบทั้งคู่ ผลรูปแบบ Outer Membrane Protein (OMP) พบว่า Biotype 1 มีโปรตีนหลักที่ 37 kDa เหมือนกับสายพันธุ์จากมนุษย์ แต่ Biotype 2 มีโปรตีนหลักที่ 36 kDa แต่การเกิดปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะที่ 6.5 kDa พบได้ใน Biotype 2 และ สายพันธุ์จากมนุษย์ ส่วน โพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถพบโปรตีนจำเพาะ แตกต่างกันทั้งสอง Biotype และสายพันธุ์จากมนุษย์

วัคซีนผสมระหว่าง Biotype 1 และ 2 ได้ถูกพัฒนาต้านแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในปลากระพงขาว เนื่องจากก่อการตายสะสม 88 เปอร์เซ็นต์ และ 76 เปอร์เซ็นต์จาก Biotype 1 และ Biotype 2 ตามลำดับที่ 96 ชั่วโมง ผลการฉีดวัคซีน Bacterin และ OMP เข้าช่องท้องของปลากระพงขาวพบว่า ปลาทั้งสองกลุ่มทดลองมีการสร้างแอนติบอดีในระดับสูงกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อตรวจด้วยเทคนิค Indirect ELISA ตลอดจนการทดลอง 5 สัปดาห์ โดยวัคซีน Bacterin และ OMP มีระดับแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ตามลำดับ และเมื่อเลือกชาวในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีปริมาณสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยเทคนิค Western Blot พบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนชนิด OMP มีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ 43, 33, 17 และ 6.5 kDa ส่วนปลาที่ได้รับวัคซีน Bacterin มีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ 33 และ 17 kDa แต่โมเลกุลที่ 17 kDa น่าจะมีความเป็นอิมโมโนเจนที่ต่ำเนื่องจากแถบโปรตีนมีความเข้มมากและมีการตอบสนองจากปลาหลายตัว ประสิทธิภาพในการคุ้มโรคต่อแบคทีเรีย *V. vulnificus* พบว่าวัคซีนทั้งสองชนิดให้ค่า Relative Percentage Survival (RPS) เท่ากันที่ 93.40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมมีค่า RPS เป็น 0 เปอร์เซ็นต์

46910497: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.SC. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: VACCINE/ *Vibrio vulnificus*/ SEA BASS/ IMMUNITY/ ANTIBODY/

MONOCLONAL/ POLYCLONAL/ ELISA/ WESTERN BLOT

WALAILAK NILCHAIRUTS: DEVELOPMENT OF VACCINE AGAINST PATHOGENIC *Vibrio vulnificus* IN SEABASS (*Lates calcarifer*). THESIS ADVISORS: PRAPASIRI BARNETTE, Ph.D., SIRICHOM TUNGKAO, Ph.D., SUPPALAK PUTTINAOWARAT, Ph.D. 70 P. 2007.

Two isolates of bacteria from diseased seabass *Lates calcarifer*, Bloch were identified by API 20 E test kit and were found to be *Vibrio vulnificus*. Since Indole and Ornithin Decarboxylase were both positive indicated as Biotype 1 while Biotype 2 were both negative. The result of the Outer Membrane Protein (OMP) showed that Biotype 1 contained 37 kDa proteins. This was similar to the bacterial family in human, but Biotype 2 contained mainly 36 kDa proteins. The reactivity of monoclonal antibody specifically in 6.5 kDa was found in Biotype 2 and in bacterial family isolated from human. Polyclonal antibody was found with a different specific protein in Biotypes like that from the bacterial family in human.

Vaccine mixed between Biotype 1 and 2 was developed to prevent bacterial *V. vulnificus* in seabass. Since the cumulative rate of 88% and 76% from Biotype 1 and Biotype 2 during the 96 hours experiment, the result of Bacterin and OMP vaccine intraperitoneal injection into seabass showed that fish between the two groups developed more antibody level than the control group statistically ($p < 0.01$). Upon testing with Indirect ELISA technique through the 5th week of experiment by using Bacterin and OMP vaccine injection, the antibody levels were at their high peak at week 2 and 4, respectively, and the amount of white blood cells that received the vaccine remained higher than the control group statistically ($p < 0.05$). Upon testing with the specific antiserum of vaccinated fish via monoclonal antibody anti seabass immunoglobulin from Western Blot Technique, it showed that OMP vaccinated fish responded to antigen 43, 33, 17 and 6.5 kDa. While the bacterin vaccinated fish responded to the antigen 33 and 17 kDa, the monolecular weight at 17 kDa was possible to be an excellent immunogenic since the staining revealed an intense amount and more response occurred from other fish. Both vaccines gave the same Relative Percentage Survival (% RPS) at 93.04% and 0% as for control.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
สถิติที่ใช้ในการทดสอบ.....	4
สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย.....	5
แผนการดำเนินงาน.....	5
2 เอกสารแต่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ปลากะพงขาว.....	6
ลักษณะของเชื้อ <i>V. vulnificus</i>	7
การจำแนกเชื้อ <i>V. vulnificus</i>	7
ลักษณะอาการของปลาที่ติดเชื้อ <i>V. vulnificus</i>	8
การทำให้เกิดโรคของเชื้อ <i>V. vulnificus</i>	8
ชนิดของปลาที่เกิดโรค.....	9
ระบบภูมิคุ้มกันของปลา.....	9
ชนิดของวัคซีน.....	10
วิธีการให้วัคซีนในสัตว์น้ำ.....	11
การตรวจปริมาณแอนติบอดี.....	12
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ <i>V. vulnificus</i>	13

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อและความรุนแรงของเชื้อ <i>V. vulnificus</i>	13
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
วัสดุและอุปกรณ์.....	16
วิธีการทดลอง.....	19
การแยกเชื้อ <i>V. vulnificus</i> จากปลากะพงขาวจากแหล่งต่าง ๆ.....	19
การจำแนก Biotype ของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> จากปลากะพงขาว.....	19
การเปรียบเทียบรูปแบบ Outer Membrane Protein (OMP) ระหว่างเชื้อ <i>V. vulnificus</i> โดยวิธี SDS- PAGE.....	19
การจำแนกเชื้อ <i>V. vulnificus</i> โดยการใช้แอนติบอดี.....	21
การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 และ 2 ในการก่อให้เกิดโรคในปลากะพงขาว.....	23
การเตรียมวัคซีน.....	23
การศึกษาการสร้างและปริมาณแอนติบอดีในปลากะพงขาว (Immunoglobulin, Ig).....	24
การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวภายหลังได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ.....	25
การทดสอบความจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมปลากะพงขาวต่อวัคซีนที่ได้รับด้วยเทคนิค Western Blots.....	25
4 ผลการวิจัย.....	26
5 อภิปรายและสรุปผล.....	45
อภิปรายผล.....	45
สรุปผลการทดลอง.....	52
ข้อเสนอแนะ.....	53
บรรณานุกรม.....	54
ภาคผนวก.....	61
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	70

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลการแยกเชื้อ <i>Vibrio</i> spp. จากปลากะพงขาวโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E.....	26
2 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 และ 2 ด้วยชุดทดสอบ API 20E.....	27
3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 และ 2 โดยวิธี Disc Diffusion.....	29
4 ค่าระดับแอนติบอดี (Log 2) โดยเฉลี่ยของปลากะพงขาวโดยเทคนิค Indirect ELISA ภายหลังได้รับวัคซีนประเภทต่าง ๆ.....	39
5 ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวภายหลังได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ.....	40
6 จำนวนปลากะพงขาวที่ตอบสนองต่อแอนติซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ จากปลาทดลองทั้งหมด 50 ตัว.....	44

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การเปรียบเทียบ OMP ของแบคทีเรีย <i>V. vulnificus</i> โดยวิธี SDS-PAGE.....	32
2 ปฏิกริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเชื้อ <i>V. vulnificus</i> Biotype 2 ต่อ Whole Cell เชื้อ <i>V. vulnificus</i> spp.....	34
3 ปฏิกริยาระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 ต่อ Whole Cell เชื้อ <i>V. vulnificus</i> spp.....	36
4 ผลปฏิกริยาระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากเชื้อ <i>V. vulnificus</i> Biotype 2 ต่อ Whole Cell เชื้อ <i>Vibrio</i> spp.....	38
5 ลักษณะปลากะพงขาวภาพหลังการฉีดเชื้อ <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 และ 2 ซึ่ง พบว่าบริเวณที่มีการฉีดเชื้อจะแสดงอาการเกล็ดหลุด และตกเลือดเป็นบริเวณกว้าง.....	39
6 การเปลี่ยนแปลงระดับแอนติบอดีในปลากะพงขาวภายหลังได้รับวัคซีน ประเภทต่าง ๆ.....	41
7 ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวภายหลังได้รับวัคซีนประเภทต่าง ๆ.....	43
8 ผลปฏิกริยาจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนรวม OMP <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 และ 2 กับ OMP เชื้อ <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 และ 2.....	44
9 ผลปฏิกริยาจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน Bacterin กับ Whole Cell ของเชื้อ <i>V. vulnificus</i> Biotype 1 และ 2.....	45