บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลากะพงขาว

ปลากะพงขาว มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Lates calcarifer* (Bloch) การจำแนกปลากะพงขาวตามหลักอนุกรมวิธานดังนี้ (วีณา เคยพุดซา, 2539)

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Pisces

Subclass Teleostomi

Order Percomorphi

Suborder Percoidei

Family Latidae

Genus *Lates*

Species *calcarifer*

ปลากะพงขาว เป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ พบแพร่กระจายทั่วไปในเขตร้อน และได้รับความสนใจจากเกษตรกรในการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายเนื่องจาก เป็นปลาที่นิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวาง และเป็นปลาที่มีรสชาติดี ทั้งยังเป็นปลาที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี แต่ถึงอย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้ก็ยังประสบปัญหาคล้ายกับการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดอื่น และปัญหาที่สำคัญ คือ การเกิดโรคระบาด ซึ่งสัมพันธ์กับความเครียดที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การเลี้ยงในอัตราที่หนาแน่น หรือการจัดการไม่ดีพอ ทำให้ปลามีความอ่อนแอ และยอมรับเชื้อก่อโรคได้ง่ายขึ้น วีรวรรณ ชินอักษร (2535) พบว่า สาเหตุของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลากะพงขาว สาเหตุสำคัญได้แก่ *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pasterurella* sp. และ *Pseudomonas* sp. นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อ *V. piscium, V. harveyi, V. vulnificus* Biotype1, *V. anguillarum, V. damsela, Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ลักษณะของเชื้อ *V. vulnificus*

V. vulnificus พบทั่วไปในธรรมชาติทั้งในน้ำเค็ม และน้ำกร่อย คุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่งสั้นขนาดประมาณ 2- 3 μm สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัย แฟลกเจลลา 1 เส้น เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส และพบได้ในน้ำที่ความเค็มตั้งแต่ 1-34 ส่วนในพันส่วน (ptt) ซึ่งคุณสมบัติของเชื้อ *V. vulnificus* แตกต่างจากเชื้อ *Vibrio* sp. อื่น ๆ คือ สามารถหมัก Lactose ได้ (Strom & Paranjipe, 2000) ค่า G + C ของ DNA คือ 45.7-47.8 Mole% (Tison, Nishibuchi, Greenwood, & Seidler, 1982) และสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเกลือแกง 1-2 เปอร์เซ็นต์ (ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์, 2537) เช่น Marine Salt Agar with Blood (MSA-B), Marin2216 Agar (MA2216), Seawater Agar, Tryptone Soy Agar (TSA) หรือ Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) โดยมีขนาดโคโลนี 2-4 มิลลิเมตร ที่ 48 ชั่วโมง แต่ไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการคิดค้นอาหารที่สามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* จาก *Vibrio* sp. ชนิดอื่น ๆ ได้โดยตรง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Cellobiose-Colistin Agar (Buller, 2004)

การจำแนกเชื้อ *V. vulnificus*

V. vulnificus สามารถจำแนกได้เป็น 2 Biotype โดยมีความแตกต่างของแต่ Biotype ตามความจำเพาะต่อเจ้าบ้าน และการทดสอบทางชีวเคมี (Amaro & Biosca, 1996)

1. จำแนกตามความจำเพาะต่อเจ้าบ้าน

1.1 *V. vulnificus* Biotype 1 พบทั่วไปในน้ำทะเล และแหล่งน้ำกร่อย ตามตะกอนดิน แพลงก์ตอน และสามารถแยกได้จากปลา หอย ปู นกทะเล และตรวจพบในอาหารทะเล (Buller, 2004) ซึ่ง *V. vulnificus* Biotype 1 เป็น Primary Septicemia ในมนุษย์จากการกินอาหารทะเลที่มีการเจือปนของเชื้อ และพบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของคนที่มีอาการ Primary Septicemia จะเสียชีวิต (O' Hara, Sowers, Bopp, Duda, & Strockbine, 2003) และคนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่ายคือคนที่ป่วยเป็นโรคเกี่ยวกับตับ หรือดื่มแอลกอฮอล์ในปริมาณที่มาก จะยอมรับเชื้อได้ดี อาการติดเชื้อของผู้ป่วยที่รับเชื้อ *V. vulnificus* จะมีไข้สูง อาเจียน ท้องร่วง ปวดท้องอย่างรุนแรง ความดันเลือดต่ำ (Strom & Paranjpye, 2000) ในรายที่มีบาดแผลเมื่อสัมผัสกับน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* จะมีอาการปวดที่แผลบริเวณติดเชื้อ มีเลือดออกเป็นจ้ำ ๆ จนถึงอาการเนื้อตาย (Linkous & Oliver, 1999) อย่างไรก็ตาม Fouz et al. (2001) พบว่า ปลานิลสามารถติดเชื้อ *V. vulnificus* Biotype1 ได้ โดยอาการที่พบจะมีแผลบริเวณลำตัว และตกเลือดตามลำตัวด้วย

1.2 *V. vulnificus* Biotype 2 สามารถตรวจพบในสัตว์น้ำ เช่น ปลาไหล ปลากะพงขาว โดยสามารถแยกเชื้อได้จากเหงือก เมือก ม้าม และไต ของปลาที่ติดเชื้อ (Buller, 2004)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

V. vulnificus Biotype 2 เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในสัตว์น้ำโดยมีการระบาด และสร้างความเสียหายให้แก่ธุรกิจสัตว์น้ำ ทำให้มีการตายของสัตว์น้ำในอัตราที่สูงเช่น ปลาไหล กุ้ง ปลากะพง และสามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ (Opportunistic Pathogen) จากการที่มนุษย์มีบาดแผลแล้วไปสัมผัสสัตว์น้ำที่มีการติดเชื้อ *V. vulnificus* หรือน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus*

2. จำแนกตามการทดสอบทางชีวเคมี

เชื้อ *V. vulnificus* สามารถจำแนก Biotype จากการทดสอบทางชีวเคมีโดยการใช้การทดสอบ Indole และ Ornithine Decarboxylase ซึ่ง *V. vulnificus* Biotype 1 ให้ผลการทดสอบ Indole และ Ornithine Decarboxylase เป็นบวกแต่ *V. vulnificus* Biotype 2 ให้ผลการทดสอบทั้งสองเป็นลบ (Biosca, Oliver, & Amaro, 1996) แต่ทั้งนี้การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง 2 Biotype ยังมีความไม่แน่นอน เนื่องจากการในบางตัวอย่างพบว่า เชื้อ Biotype 1 บางสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบ Indole เป็นลบ

ลักษณะอาการของปลาที่ติดเชื้อ *V. vulnificus*

ลักษณะอาการของปลาที่ติดเชื้อ *V. vulnificus* จะมีการตกเลือดตามครีบท้อง ครีบหาง รอบปาก ทวาร ตามลำตัว และมีการตกเลือดของอวัยวะภายในร่วมด้วย เช่น ที่ลำไส้ เหงือก หัวใจ ตับ ม้าม บริเวณหัวมีแผลถลอก เกล็ดหลุด ในปลาที่มีอาการหนักจะมีลักษณะท้องบวมน้ำ และมีการติดเชื้อทางกระแสเลือด (Septicemia) โดยมีอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อ วิบริโอ โดยทั่วไป (นิลุบล ยูอาสะ, 2543)

การทำให้เกิดโรคของเชื้อ *V. vulnificus*

ความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ เช่น

1. Exoenzyme

Exoenzyme เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* โดย Linkous and Oliver (1999) พบว่า *V. vulnificus* สามารถผลิต Hemolysin Elastase, Collagenase, Dnase Metalloprotase, Lipases, Phospholipases, Chondroitin Sulfatase, Mucinase, Hyaluronidase, Fibrinolysin ได้ Strom and Paranjpye (2000) ได้ทดลองสกัด Hemolysin ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกให้บริสุทธิ์ ฉีดกลับเข้าไปในหนูทดลองที่ความเข้มข้น 3 $\mu g\ kg^{-1}$ พบว่า สามารถทำให้หนูทดลองตายได้

2. Iron utilization

ความรุนแรงของโรคโลหิตจางที่เกิดขึ้นในเจ้าบ้านมีความสัมพันธ์กับปริมาณของธาตุเหล็กเนื่องจาก *V. vulnificus* มีความต้องการธาตุเหล็กสูงในการเจริญโดยจะมีกลไกในการดึง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ธาตุเหล็กจากเจ้าบ้านโดย *V. vulnificus* สามารถสร้าง phenolates และ hydroxamates ซึ่งเป็น Siderphore ไปกระตุ้นธาตุเหล็กที่อยู่ในเลือด และเนื้อเยื่อให้แยกจาก Transferring และ Lactoferrin ของเจ้าบ้านเพื่อมาจับกับ Siderphore จากนั้นเหล็กจะถูกส่งเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (Strom & Paranijpye, 2000)

3. Capsule Polysaccharide

การศึกษาความรุนแรงของ *V. vulnificus* โดยใช้ Capsule Polysaccharide (CPS) เป็นวิธีการศึกษาความรุนแรงของเชื้อที่ดีที่สุด เนื่องจาก Polysaccharide Capsule เป็นโครงสร้างชั้นนอกสุดของแบคทีเรีย ที่มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อดีที่สุด เพราะ Capsule เป็นส่วนปกป้องแบคทีเรีย โดยทำหน้าที่ต้านทาน ซีรัม และขบวนการจับกิน (Phagocytosis) ของ Macrophage หากเชื้อแบคทีเรียมีความหนาของ Capsule มาก แบคทีเรียก็จะสามารถรอดจากการถูกจับกิน และการย่อยของเจ้าบ้านได้

4. Endotoxin

อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus* เช่น การติดเชื้อทางกระแสเลือด การอักเสบส่วนใหญ่เกี่ยวเนื่องกับ Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารพิษชนิด Endotoxin โดย McPherson, Watts, Simpson, and Oliver (1991) ได้ทดลองสกัด LPS ของ *V. vulnificus* ที่ความเข้มข้น 400 $\mu g\ kg^{-1}$ ฉีดเข้าหนูทดลองพบว่า หนูทดลองมีความดันเลือดลดลงภายใน 10 นาที และมีการตาย ภายใน 30-60 นาที

ชนิดของปลาที่เกิดโรค

มีรายงานการเกิดโรคของสัตว์น้ำที่มีสาเหตุจากเชื้อ *V. vulnificus* โดย Sakala and Hottori (1991) อ้างถึงใน Fouze et al. (2002) พบว่า ปลานิลมีการติดเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ซึ่งปลาที่ติดเชื้อจะมีอาการตกเลือดที่ลำตัวและทำให้มีการตาย 10-20 เปอร์เซ็นต์ และในปี 1975 และ 1977 ในประเทศญี่ปุ่นได้มีการเกิดโรคระบาดกับปลาไหล และเป็นเชื้อชนิดที่พบการแพร่ระบาดในแถบประเทศทางยุโรป โดยสาเหตุของการเกิดโรคคือ เชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 และ Fouz et al. (2002) พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงในภาวะที่มีความเครียด สามารถยอมรับเชื้อ *V. vulnificus* ได้ เนื่องจาก *V. vulnificus* เป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสก่อโรค (Opputunistic Pathogen) โดยจะทำให้สัตว์น้ำเกิดโรคเมื่อร่างกายของสัตว์น้ำมีแผลหรือ เมื่อสัตว์น้ำมีอาการเครียด

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

ระบบภูมิคุ้มกันปลามีการพัฒนาไม่ดี ส่วนใหญ่สุขภาพของปลาจะขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Nonspecific Immunity) ซึ่งภูมิคุ้มกันนี้ไม่จำเป็นต้องได้รับแอนติเจนหรือเชื้อโรค

ก่อนที่จะเกิดการตอบสนอง (ชนกันต์ จิตรมนัส, 2545, หน้า 740 อ้างถึงใน Vadsteim ,1997) ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะนี้ถือเป็นด่านแรกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค และมีการตอบสนองอย่างรวดเร็ว ซึ่งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ของปลาโดยปกติจะมีเมือก เกล็ด ผิวหนังช่วยในการป้องกันเชื้อโรคและในทางเดินอาหารยังมีคุณสมบัติพิเศษ คือ pH ต่ำช่วยในการฆ่าเชื้อ และเป็นด่านในการป้องกันเมื่อเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย แต่ถ้าเชื้อโรคสามารถผ่านด่านนี้ไปได้ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะประเภทอื่นจะเข้ามามีบทบาทในการกำจัดเชื้อโรค เช่น Monocyte, Macrophage, Granular, Leukocyte ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่จับกินเชื้อโรคโดยกระบวนการ Phagocytosis โดยเม็ดเลือดขาวจะเข้าโอบล้อมเชื้อโรคแล้วย่อยด้วยเอนไซม์ จากนั้นจะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายออกนอกเซลล์

ส่วนภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Specific Immunity) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากมีความทรงจำในระดับเซลล์ ทำให้กำจัดเชื้อโรคได้ดีถ้าเชื้อนั้นมีการบุกรุกเข้ามาเป็นครั้งที่ 2 เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ได้แก่ Macrophage ที่ทำหน้าที่เป็น Antigen Presenting Cell และ Lymphocyte ซึ่งแบ่งได้ 2 ชนิด คือ T- Lymphocyte และ B- Lymphocyte โดย T- Lymphocyte มีหน้าที่ในการฆ่าเชื้อโรคโดยตรง และทำหน้าที่ในการช่วย B- Lymphocyte ผลิตแอนติบอดี ส่วน B- Lymphocyte มีหน้าที่ผลิตแอนติบอดี และจดจำแอนติเจนที่เข้ามา ความจำเพาะนี้เกิดจาก ผิวของ B- Lymphocyte มี Membrane Receptor คอยรับรู้แอนติเจนแต่ละชนิดทำให้สามารถกำจัดเชื้อที่บุกรุกเข้าร่างกายปลาในครั้งต่อมาได้ และจากระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนี้นำไปสู่การพัฒนาการทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสัตว์น้ำได้

ชนิดของวัคซีน

วัคซีนที่ใช้ในสัตว์น้ำแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

1. วัคซีนที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Inactivated Vaccine) โดยทั่วไปจะใช้ฟอร์มาลิน ความร้อน หรือความเย็นในการฆ่าเชื้อก่อนแล้วนำมาผลิตวัคซีน เช่น ในแบคทีเรียแกรมลบ *V. anguillarum* ที่นำมาฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินก่อนแล้วจึงนำมาผลิตวัคซีน แต่วัคซีนประเภทนี้มีข้อเสียคือ ต้องใช้แบคทีเรียจำนวนมาก และอาจต้องให้วัคซีนหลายครั้ง

2. วัคซีนอ่อนกำลังแต่ยังมีชีวิตอยู่ (Live Attenuated Vaccine) ส่วนใหญ่เป็นการแยกเชื้อจากปลาที่เกิดโรคแล้วนำมาเลี้ยงในเซลล์ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานานจนทำให้เชื้อลดความรุนแรงลง จากนั้นจึงนำไปทำวัคซีน เช่น การทำวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อ *Cryptobia samositica* ในปลาแอตแลนติก แซลมอน วัคซีนชนิดนี้มีข้อดีคือ สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดเชื้อที่อาศัยอยู่ในเซลล์ การให้วัคซีนทำได้ไม่ยากไม่จำเป็นต้องใช้

ปริมาณมาก เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนในสัตว์น้ำได้ (Gudding, Lillehaug, & Evensna, 1999) อย่างไรก็ตาม อาจมีข้อจำกัดการใช้วัคซีนชนิดนี้ในพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของเชื้อ เนื่องจากเกรงว่าวัคซีนจะเปลี่ยนสภาพเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงได้

3. วัคซีนที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ (Vaccine Based on DNA- Technology) ปัจจุบันมีการใช้ดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของแบคทีเรียหรือ พลาสมิด (Plasmid) เป็นพาหะเพื่อใช้ในการผลิตสารที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือแอนติเจนให้ได้ปริมาณที่มากพอโดยขบวนการทางวิธีการจัดระเบียบใหม่ของ ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA) ส่วนใหญ่วัคซีนพวกนี้สร้างขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อไวรัส วิธีการเตรียมวัคซีนเริ่มจากการแยกยีนที่น่าสนใจ และคิดว่าน่าจะสร้างโปรตีนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาได้ มาเพิ่มปริมาณให้ได้มากเท่าที่ต้องการซึ่งกระบวนการดังกล่าวเรียกว่า การโคลนยีน (Gene Cloning) เช่นการโคลนยีนที่สร้างไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) จากไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค Virus Haemorrhagic Septicemia (VIH) และ Infectious Haematopietic Necrosis (IHN) จากปลา

วิธีการให้วัคซีนในสัตว์น้ำ

ทำได้ 3 ทาง

1. การฉีด (Intraperitoneal Injection) ซึ่งส่วนมากจะฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง หรือกล้ามเนื้อ โดยอาจมีการผสมวัคซีนกับสาร Adjuvant จะให้ผลดีที่สุด และอัตราการให้ที่แน่นอน แต่วิธีการนี้ทำให้ปลาเครียดได้ง่าย สิ้นเปลืองเวลา แรงงาน และไม่เหมาะสมกับปลาที่มีขนาดเล็กและปลาราคาถูก ซึ่งปริมาณ และความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับแอนติเจนเป็นดัชนีวัดการตอบสนองของปลาต่อวัคซีนที่ได้รับ หากแต่ความสามารถในการป้องกันโรคจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิต ความพร้อมของปลา และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลา

2. การให้วัคซีนทางปาก (Oral Administration) หรือวัคซีนผสมอาหารเป็นวิธีการที่ง่าย สามารถใช้ได้กับปลาทุกชนิดในปริมาณมาก ๆ แต่ยังพบว่าวิธีนี้ให้ผลการป้องกันการเกิดโรคที่ค่อนข้างต่ำ อาจเป็นผลมาจากแอนติเจนบางชนิดถูกทำลายหมดด้วยกรดในกระเพาะอาหาร และลำไส้ส่วนหน้าของปลาแต่ได้ มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ เพื่อแก้ไขปัญหาต่าง ๆ เช่น การเคลือบแอนติเจนด้วย Methacrylic Acrylic Acid Polymer หรือ Polylacticeco-Glycolide Polymer แต่ไม่มีการรายงานผลการทดลอง (Ellis, 1999)

3. การให้วัคซีนโดยการแช่ (Immersion) เป็นวิธีการที่นิยมมากที่สุดในปลาขนาดเล็ก แต่ว่าต้องมีการปรับปรุงเพื่อให้ประสิทธิภาพในการดูดซึมแอนติเจนเข้าตัวปลาได้ดีมากที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Osmotic Shock เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความสามารถของสัตว์น้ำในการรับแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายทำโดยการนำปลาไปแช่ในน้ำเกลือจากนั้นจึงนำไปแช่ในวัคซีน

การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดี

Enzyme Linked Immunoadsorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบแอนติบอดี เนื่องจากสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้หลายตัวอย่าง และใช้เวลาในการตรวจสอบรวดเร็ว ELISA เป็นการทดสอบ ปฏิกิริยาระหว่าง แอนติบอดี และแอนติเจน โดยมีการใช้เอนไซม์ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการเปลี่ยนสี เพื่อยืนยันการเกิดปฏิกิริยา วิธีการทดสอบ ELISA แบ่งได้เป็นหลายวิธีที่สำคัญได้แก่

1. Indirect ELISA เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่าง ๆ มีหลักการคือ ให้แอนติบอดีที่ต้องการตรวจทำปฏิกิริยากับแอนติเจนซึ่งทราบชนิดแล้ว และติดอยู่บนพื้นของ Solid Phase และใช้ Anti Immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง การย่อย Substrate จะมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจ

2. Double Antibody Sandwich ELISA เป็นการตรวจหาแอนติเจนโดยมีหลักการ คือ เคลือบผิวของ Solid Phase ด้วยแอนติบอดี แล้วเติมแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาลงไปทำปฏิกิริยา ล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมแอนติบอดี (ตัวเดียวกับที่ใช้เคลือบผิวของ Solid Phase) ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ลงไปทำปฏิกิริยาอีกครั้ง

3. Competitive ELISA วิธีการนี้ตรวจได้ทั้งแอนติเจน และแอนติบอดีถ้าต้องการตรวจหาแอนติเจนจะเคลือบ Solid Phase ด้วยแอนติบอดี หลังจากนั้นจึงเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ ซึ่งผสมกับสิ่งตรวจที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนนั้นลงไป ความแตกต่างของปริมาณ Substrate ที่ถูกย่อยระหว่างหลอดที่ใส่แต่แอนติเจนที่ติดฉลากเพียงอย่างเดียว กับหลอดที่มีทั้งแอนติเจนติดฉลากและแอนติเจน ในสิ่งตรวจเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนในสิ่งตรวจนั้น

Outer Membrane Protein (OMP)

Outer Membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ มีส่วนประกอบสำคัญคือ Phospholipids, Lipopolysaccharide ที่ทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของผนังเซลล์ไม่ให้ออกจากช่องว่างเพอริพลาสมิค (Periplasmic Space) และยังกั้นสารเคมี และเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) OMP มีบทบาทสำคัญต่อการทำให้เกิดโรคของแบคทีเรียโดยจะเพิ่มพฤติกรรมการปรับตัวของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสิ่งแวดล้อม และเจ้าบ้าน เช่น Iron Uptake, Antimicrobial Peptide Resistance, Serum Resistance, Multi Drug Resistance และ Bile Resistance (Lin, Huang, & Zhang, 2002)

การศึกษาเกี่ยวกับ Outer Membrane Protein

Biosca, Garay, Toranzo, and Amaro (1993) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบ Outer Membrane Protein ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 โดยพบว่า ทั้ง 2 Biotype มีแถบโปรตีนหลักคล้ายกันที่ 36 kDa แต่มีความแตกต่างกันในแถบโปรตีนรอง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องการใช้วัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus*

Collado, Fouz, Sanjuan, and Amaro (2000) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้ส่วนของแบคทีเรียในการผลิตวัคซีนที่ต่างกัน คือ Whole Cell Bacterin, Toxoid-Enriched Bacterin, Virulence Attenuated Live Cell Vaccine และ LPS Based Vaccine และ แบ่งการให้วัคซีนเป็น 2 ทาง คือ ให้โดยการฉีด และการแช่ และประเมินผลการทดลองโดยพิจารณาอัตราการตายของปลา และศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการทดสอบ Antibody Titer ในซีรัม และเมือกปลา จากการทดลองพบว่า การให้วัคซีนโดยการฉีดส่งผลทำให้ปลามีอัตราการรอดสูงสุด และวัคซีนที่เตรียมโดย Whole Cell Bacterin มีประสิทธิภาพมากเนื่องจากทำให้ปลามีอัตราการรอดมากที่สุด

Park et al. (2001) ได้ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus* ในปลา Flounder โดยการให้วัคซีน 2 แบบคือ Uncoated Heat Killed Bacterin (UHKB) และ Enteric Coated Heat Killed Bacterin (ECHB) ให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้อง และการให้ทางปาก พบว่าวัคซีนชนิด UHKB สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา Flounder ได้ดีกว่าวัคซีนแบบ ECHB

Gassent, Fouz, Barrera, and Amaro (2004) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพการให้วัคซีนป้องกันเชื้อ *V. vulnificus* ในปลาไหล โดยการแช่ แล้วให้วัคซีนโดยการให้ทางปากในวันที่ 4, 11, 15, 30 และหลังจาก 60 วันทำการเก็บส่วนของ ซีรัม เมือก และน้ำดีของปลามาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ แอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการทดลอง พบว่า การให้วัคซีนด้วยการผสมอาหารแก่ปลาที่เคยได้รับวัคซีนโดยการแช่มาแล้วมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอนติบอดี และปลามีความต้านทานต่อเชื้อได้ดี

Gassent, Fouz, and Amaro (2004) ได้ศึกษาการให้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus* ในปลาไหลโดยการให้วัคซีน 4 แบบ คือ โดยการฉีดเข้าช่องท้อง, การกิน, การแช่ และการทางทวาร(Anal) จากการทดลอง พบว่าการให้วัคซีนโดยวิธีการ กิน และให้ทางช่องทวารมีประสิทธิภาพมากที่สุด ซึ่งพบว่าปลามีอัตราการตายน้อยที่สุดคือ น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และการให้โดยวิธีการแช่พบอัตราการตายของปลามากที่สุดคือ 30-40 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Gassent, Nielsen, and Amaro (2003) ได้ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ European Eel จากการวัดปริมาณแอนติบอดี โดยวิธีการ ELISA โดยศึกษาปริมาณแอนติบอดีในซีรัม และเมือก การทดลองทำโดยให้ปลาได้รับวัคซีนโดยการแช่ก่อน และให้ปลาได้รับเชื้อโดยการแช่ในน้ำที่มีเชื้อ *V. vulnificus* จากการทดลองพบว่า ปลามีการตอบสนองในเมือกเร็วกว่าในซีรัม คือ ในเมือกจะมีปริมาณแอนติบอดีสูงสุดในวันที่ 3-4 ส่วนปริมาณแอนติบอดีในซีรัมจะสูงสุดในวันที่ 7

Fouz et al. (2001) ได้ทดสอบผลิตวัคซีนต้านเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 ในฟาร์มปลาไหลของประเทศสเปน โดยใช้ลูกปลาไหลขนาด 0.3 กรัม และให้วัคซีนโดยการแช่ และศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังจากให้วัคซีน 6 เดือน ผลที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า วัคซีนต้านเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 สามารถป้องกันการติดเชื้อในปลาไหลได้ พบว่า ปลามีอัตราการรอด 62-86 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับวัคซีนมี Antibody Titer ที่ 200 ส่วนปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนมีระดับ Antibody Titer น้อยกว่า 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อและความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus*

Fouz et al. (2002) ได้ศึกษาความไวของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ต่อการติดเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 ที่ทำให้เกิดในปลาไหล การทดลองใช้เชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 (Serovar E) ที่มีความรุนแรงที่สุดที่ทำให้เกิดการตายในปลาไหลมาใช้ในการทดลองโดยการฉีดเข้าช่องท้อง การแช่ และให้กินเชื้อโดยการผสมอาหาร เปรียบเทียบกับ Biotype 1 ที่ก่อโรคในปลานิล ผลการทดลอง พบว่า การให้ปลาได้รับเชื้อทั้งการฉีด การแช่ เชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ทำให้ปลามีอาการ ตกเลือดภายนอกร่างกายในบริเวณ หาง หัว ลำตัว และครีบท้อง รวมถึงการตกเลือดที่อวัยวะภายใน ส่วนการให้ปลาที่ได้รับเชื้อด้วยการผสมอาหารให้ปลากิน พบว่ามีอัตราการตายเกิดขึ้น 50% ที่ ความเข้มข้นของเชื้อ 1.1×10^{7} CFU/ กรัม จึงสามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *V. vulnificus* ที่เกิดโรคในปลาไหลสามารถทำให้เกิดโรคในปลานิลได้

Biosca and Amaro (1996) ได้ศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ Biotype 2 ที่ก่อโรคในปลาไหล โดยการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องปลา 5 ชนิด คือ Eel, Sea Bream, Sea Bass, Trout, Turbot จากการทดลองพบว่า ปลาทั้ง 5 ชนิดที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ไม่ก่อให้เกิดโรคในปลา ส่วน *V. vulnificus* Biotype 2 พบว่าปลามีการติดเชื้อในกระแสเลือด และมีการตายเกิดขึ้น

Li et al. (1999) ได้ศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* โดยการทดลองฉีดเชื้อที่ $1x10^{8}$ เซลล์/ มิลลิลิตร เข้าช่องท้องของปลา Silver Sea Bream พบว่าปลามีอัตราการตายถึง 60 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Biosca, Llorens, Garay, and Amaro (1993) ได้ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 โดยการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องของปลา Trout ขนาด 10 กรัม และปลาไหล ขนาด 30-100 กรัม ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ $1x10^{1}$-$1x10^{8}$ เซลล์/ มิลลิลิตร พบว่า*V. vulnificus* Biotype 2 ไม่ก่อให้เกิดโรคในปลา Trout แต่มีความรุนแรงในปลาไหล เนื่องจากปลามีอาการป่วย และมีการตายโดยค่า LD_{50}อยู่ที่ 10^{3}-10^{4}เซลล์/ มิลลิลิตร โดยมีการตายของปลาภายใน 7 วัน

Tison et al. (1982) ได้ศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 ที่ได้จากสิ่งแวดล้อม ปลาที่เป็นโรค และจากคนที่เป็นโรคในหนูทดลองน้ำหนัก 17-20 กรัม โดยฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าเชื้อจากปลาไหลที่เป็นโรคมีความรุนแรงที่สุดเนื่องจากมีค่า LD_{50} 9.27×10^{4} CFU/ มิลลิลิตร ส่วนเชื้อจากผู้ป่วยมีค่า LD_{50} $3.50x10^{7}$ CFU/ มิลลิลิตร และเชื้อจากสิ่งแวดล้อมมีค่า LD_{50} $2.27x10^{8}$CFU/ มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University