บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวจากแหล่งต่าง ๆ

การแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวจาก จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี ที่แสดงอาการไม่ป่วยและป่วย คือ เกล็ดหลุด ครีบกร่อน ตกเลือดบริเวณลำตัว ปลายหาง ครีบ และอวัยวะภายใน สามารถแยกเชื้อได้จากบริเวณไตส่วนหน้า และเลี้ยงบนอาหารวุ้น เมื่อเชื้อบริสุทธิ์ ทำการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ และใช้ชุดทดสอบ API 20E ในการจำแนกชนิดของเชื้อ พบเป็นเชื้อ *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวจากจังหวัดฉะเชิงเทราเท่านั้น ดังแสดงตารางที่ 1 จากนั้นเชื้อ *V. vulnificus* จะถูกแยกความแตกต่างทาง Biotype โดยการทดสอบทางชีวเคมี และการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดี

ตารางที่ 1 ผลการแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

อวัยวะที่แยกเชื้อ	การพบเชื้อ *V. vulnificus* (จำนวนเชื้อ *V. vulnificus*/ จำนวนเชื้อทั้งหมดที่นำมาจำแนก)		
	ชลบุรี	ฉะเชิงเทรา	จันทบุรี
1. ผิวหนัง	0/ 5	2/ 5	0/ 5
2. ไต	0/ 5	2/ 3	0/ 5

2. การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2

2.1 ลักษณะโคโลนี *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 บนอาหารวุ้น

ลักษณะรูปร่างโคโลนี ของแบคทีเรียทั้ง 2 Biotype เจริญบนอาหาร TSA มีความแตกต่างกัน โดยที่ 24 ชั่วโมง เชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 มีลักษณะ กลม โค้ง นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ใส โคโลนีขนาด 0.5 มิลลิเมตร เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ให้โคโลนีสีเหลือง และเจริญบนอาหาร Blood Agar แบบ Beta-Hemolytic ส่วนเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 มีลักษณะกลม โค้ง นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ขุ่น โคโลนีขนาด 1-1.5 มิลลิเมตร เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ให้โคโลนีสีเขียว และเจริญบนอาหาร Blood Agar แบบ Alpha-Hemolytic

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2

เมื่อนำเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 มาทดสอบย้อมสีแกรม และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20E (แสดงผลดังตารางที่ 2) จากผลการย้อมแกรม พบว่าทั้ง 2 Biotype เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแบบ แท่งสั้น และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อทั้ง 2 Biotype พบว่า เกือบทุกการทดสอบเหมือนกันยกเว้น มีความแตกต่างกันในการทดสอบ Ornithin Decarboxylase และ Indole ดังนี้ เชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ให้ผลการทดสอบ Ornithin Decarboxylase และ Indole เป็นบวก แต่ *V. vulnificus* Biotype 2 ให้ผลการทดสอบทั้งสองการทดสอบเป็นลบ และผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *V. vulnificus* DMST 5852[a] จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ปฏิกิริยา Indole เป็นบวก และ Ornithin Decarboxylase เป็นลบ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ด้วยชุดทดสอบ API 20E

การทดสอบ	*V. vulnificus* Biotype1	*V. vulnificus* Biotype 2	*V. vulnificus* DMST 5852[a]
Gram Stain	-	-	-
Motility	+	+	+
OF	OF	OF	OF
Cytochome Oxidase	+	+	+
TSI	K, A	K, A	nd
ONPG	+	+	nd
Arginine Dihyrolase	-	-	-
Lysine Decarboxylase	+	+	nd
Ornithin Decarboxylase	+	-	-
Citrate	-	-	-
H_2S	-	-	-
Urease	-	-	nd
Indole	+	-	+

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

การทดสอบ	*V. vulnificus* Biotype 1	*V. vulnificus* Biotype 2	*V. vulnificus* DMST 5852[a]
VP	-	-	-
Gelatin	+	+	nd
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	nd
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Melibiose	-	-	nd
Amygdalin	+	+	+
Arabinose	-	-	nd
NO_2	+	+	nd
N_2	-	-	nd
MacConkey Agar	+	+	nd

หมายเหตุ a = ข้อมูลจากศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

nd = ไม่มีการทดสอบ

2.3 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด พบว่า เชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง 2 Biotype มีการต้านยาปฏิชีวนะคล้ายกันแต่แตกต่างกันในการต้านยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin และ Sulfadiazine โดยเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ดื้อต่อ Sulfadiazine แต่ *V. vulnificus* Biotype 2 ไวต่อ Sulfadiazine และ *V. vulnificus* Biotype 2 ดื้อต่อ Ampicillin แต่ *V. vulnificus* Biotype 1 ไวต่อ Ampicillin (ตารางที่ 3)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 โดยวิธี Disc Diffustion

ยาปฏิชีวนะ	ขนาดบรรจุยาแต่ละ Disc	*V. vulnificus* Biotype 1	*V. vulnificus* Biotype 2
Ampicillin	10 mcg	S	R
Chloramphenicol	30 mcg	S	S
Novobiocin	30 mcg	R	R
Nitrofurantion	300 mcg	S	S
Kanamycin	30 mcg	S	S
Oxolinic Acid	2 mcg	S	S
Oxytettracyclin	30 mcg	S	S
0/129	10 mcg	S	S
Sulfadiazine	300 mcg	R	S
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	25 mcg	S	S

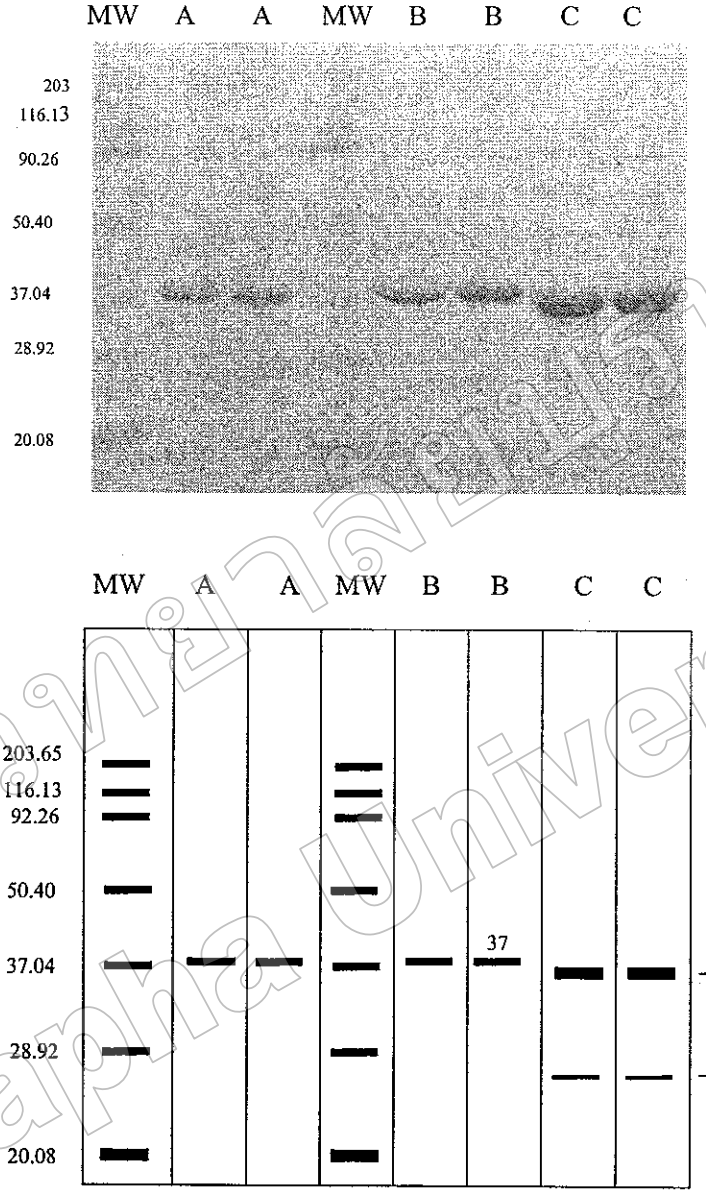
หมายเหตุ S = Sensitive

R = Resistance

3. การเปรียบเทียบรูปแบบ Outer Membrane Protein (OMP) ระหว่างเชื้อ *V. vulnificus* โดยเทคนิค SDS- PAGE

องค์ประกอบโปรตีนของ OMP จากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 เมื่อนำมาผ่านขั้นตอน SDS-PAGE พบว่ารูปแบบ OMP ของ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 มีความแตกต่างกันในแถบโปรตีนหลัก (ภาพที่ 1) คือ รูปแบบ OMP ของ *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา) แสดงแถบโปรตีนหลักที่ 37 kDa คล้ายกับ *V. vulnificus* DMST 5852[a] (จากกรมวิทยาศาสตร์การ แพทย์) แต่ *V. vulnificus* Biotype2 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา) แสดงแถบโปรตีนหลักที่ 36 kDa และพบแถบโปรตีนรองที่ 26 kDa

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบรูปแบบ OMP ของแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยวิธี SDS-PAGE, MW = Molecular Weight Standard (Bio-Rad), A = *V. vulnificus* DMST 5852[a] (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์), B = *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากะพงขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา), C = *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา)

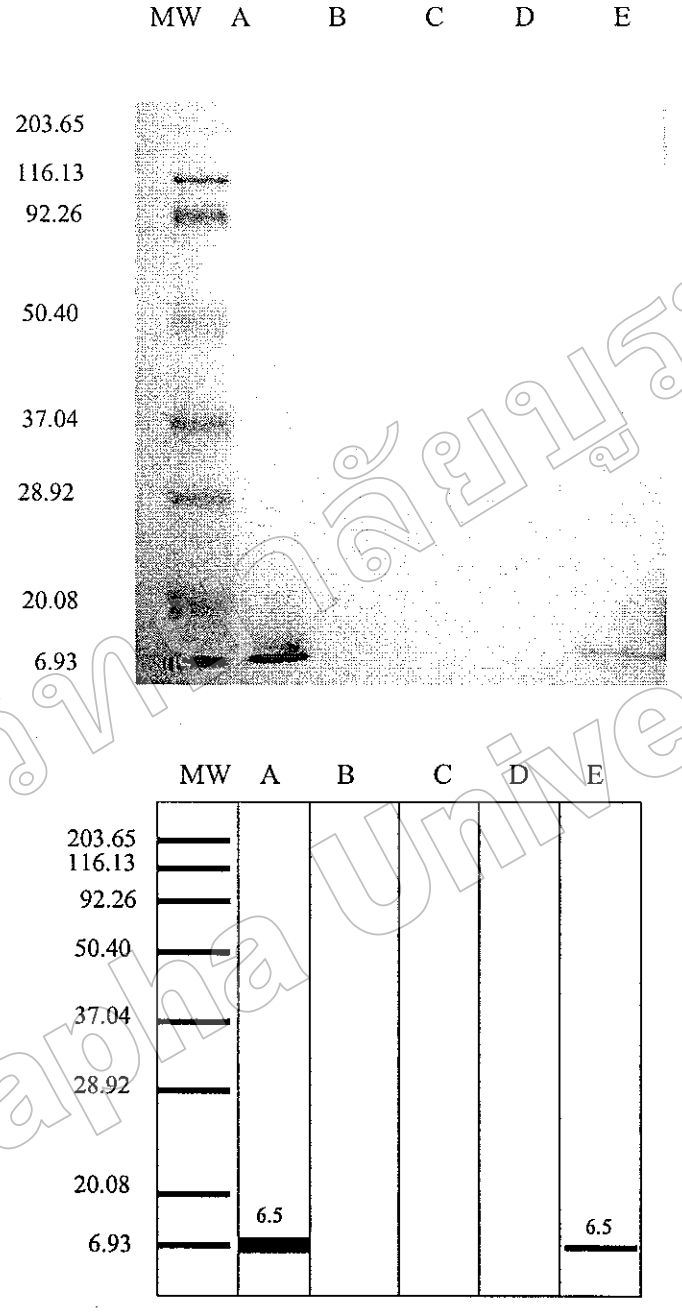
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* โดยแอนติบอดี

4.1 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจำแนกเชื้อ *V. vulnificus*

โดยการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ 6.5 kDa ที่ผลิตจาก *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา) มาทำปฏิกิริยากับ Whole Cell ของเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากปลากะพงขาว และสถานที่ต่าง ๆ (ภาพที่ 2) จากการทดลองพบว่า เชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาว จังหวัด ฉะเชิงเทราที่นำไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี) และ *V. vulnificus* DMST 5852[a] (จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) เกิดปฏิกิริยาที่ 6.5 kDa แต่ไม่พบว่าเกิดปฏิกิริยาต่อ *V. vulnificus* Biotype1 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา) และจากปลาของประเทศอังกฤษคือ *V. vulnificus* BT 89/ 04/ 7052 และ *V. vulnificus* MT1506

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 ต่อ Whole Cell เชื้อ *V. vulnificus;* MW = Molecular Weight Standard (Bio-Rad), A= *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาวจังหวัด ฉะเชิงเทราที่นำไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี), B= *V. vulnificus* Biotype1 (จากปลากะพงขาวจังหวัด ฉะเชิงเทรา), C = *V. vulnificus* MT1506 (จากสัตว์น้ำประเทศอังกฤษ), D = *V. vulnificus* BT 89/ 04/ 7052 (จากสัตว์น้ำประเทศอังกฤษ), E = *V. vulnificus* DMST 5852[a] (จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

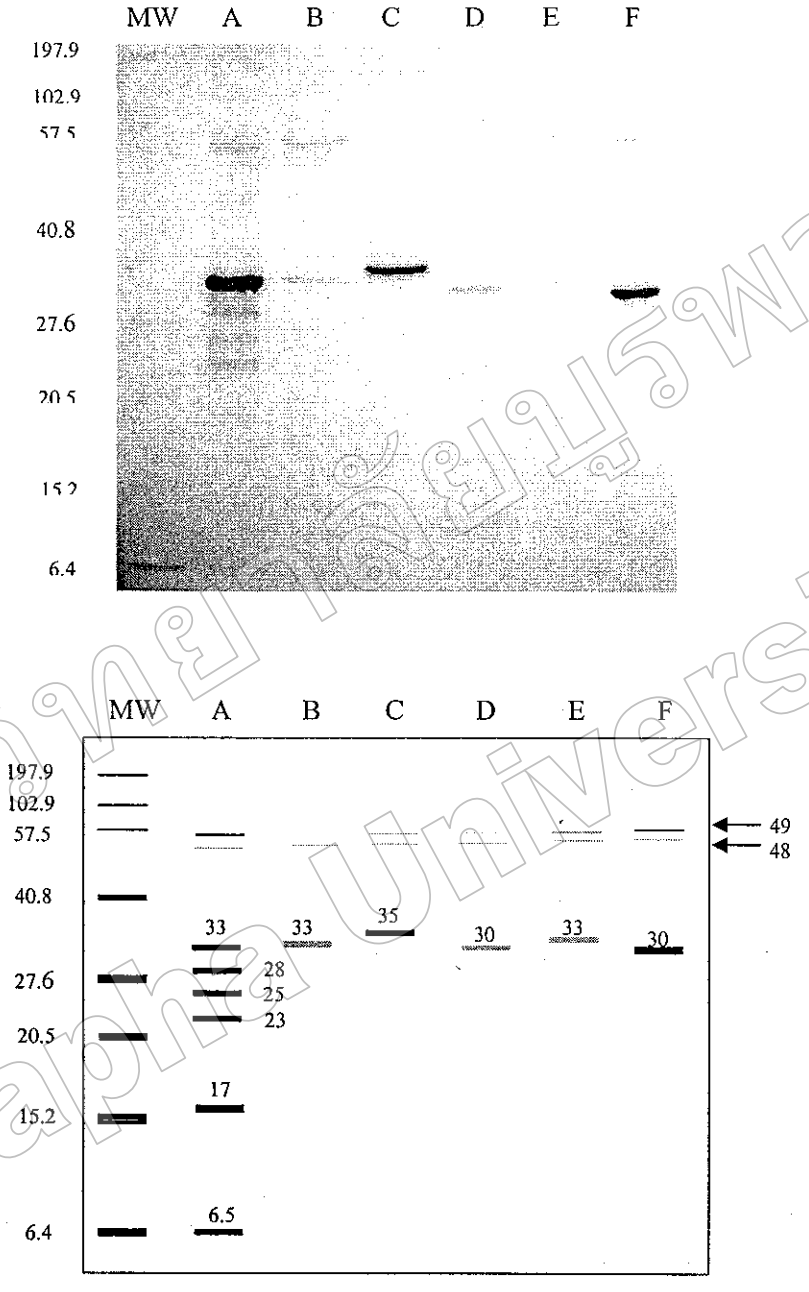
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2 การใช้โพลิโคลนอลแอนติบอดีในการจำแนกเชื้อ *V. vulnificus*

4.2.1 การใช้โพลิโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ในการจำแนกเชื้อ *Vibrio* spp.

ผลการทดลองการทำปฏิกิริยาระหว่างโพลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1(จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา) สามารถทำปฏิกิริยากับ Whole Cell ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากะพงขาวจังหวัด ฉะเชิงเทรา)โดยเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งมวลโมเลกุล 49, 48, 33 (เข้ม), 28, 25, 23, 17 และ 6.5 kDa (ภาพที่ 3) เกิดปฏิกิริยากับ *V. harveyi* (จากกุ้งกุลาดำ) และ *V. vulnificus* BT 89/ 04/ 7052 (จากประเทศอังกฤษ) ที่ตำแหน่งโมเลกุล 49, 48 และ 33 kDa เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *V. vulnificus* DMST 5852[a] (จากกรมวิทยาศาสตร์การ แพทย์) ที่ตำแหน่งโมเลกุล 49,48 และ 35 (เข้ม) kDa และเกิดปฏิกิริยากับ *V. vulnificus* MT1506 (จากประเทศอังกฤษ) และ *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา)โดยเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งโปรตีนมวลโมเลกุลที่ 49,48 และ30 (เข้ม) kDa

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



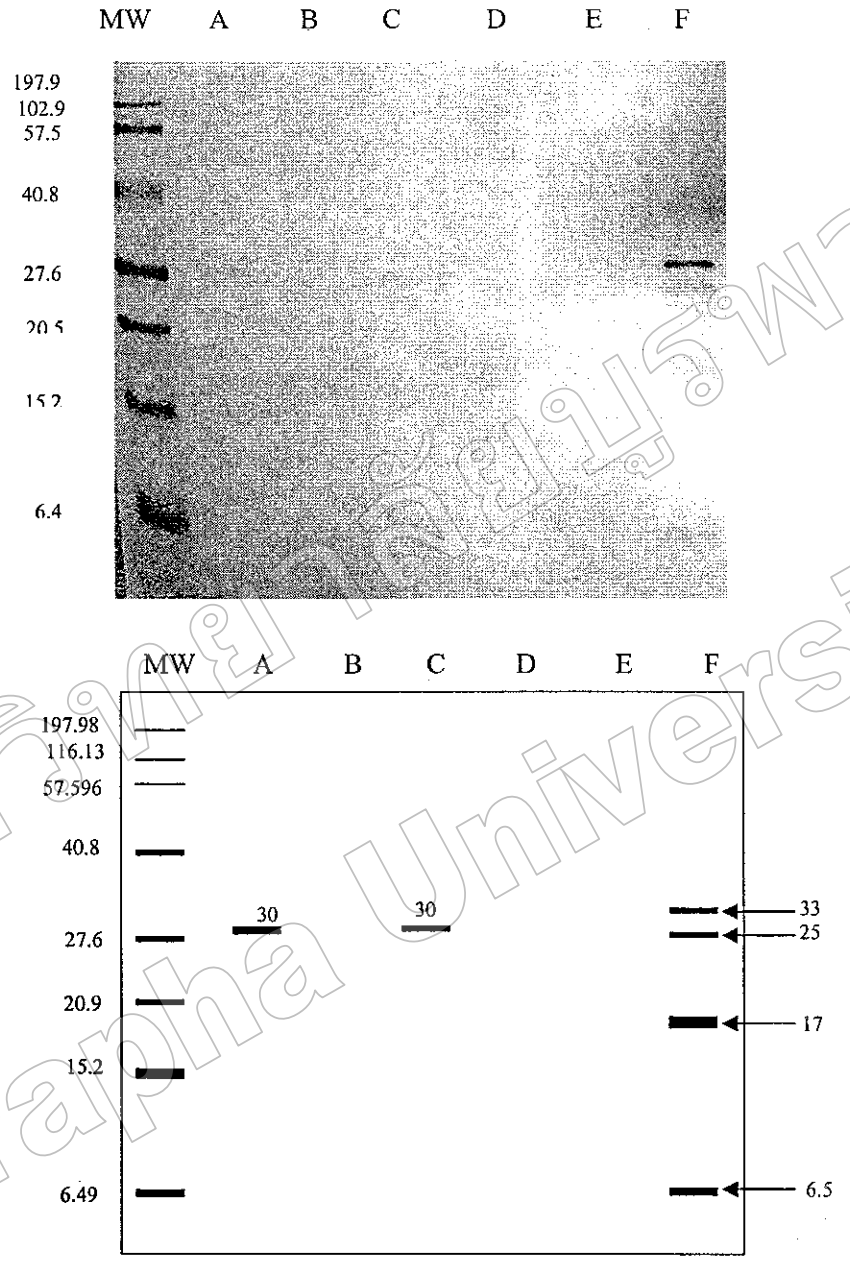
ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาระหว่างโพลิโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ต่อ Whole Cell เชื้อ *V. vulnificus*; MW = Molecular Weight Standard (Bio-Rad), A = *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา), B = *V. harveyi* (จากกุ้งกุลาดำ), C = *V. vulnificus* DMST 5852[a] (จากกรมวิทยาศาสตร์การ แพทย์), D = *V. vulnificus* MT1506(จากประเทศอังกฤษ), E = *V. vulnificus* BT 89/ 04/ 7052 และ F = *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2.2 การใช้โพลิโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 ในการจำแนกเชื้อ *Vibrio* spp.

ผลการทดลองการทำปฏิกิริยาระหว่างโพลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา) ต่อ Whole Cell ของเชื้อ *Vibrio* spp. (ภาพที่ 4) พบว่า โพลิโคนอลแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาต่อ *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา) และ *V. vulnificus* DMST 5852[a] (จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ที่มีตำแหน่งมวลโมเลกุล 30 kDa และเกิดปฏิกิริยากับ *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา) ที่มวลโมเลกุล 33 (เข้ม), 25, 17 และ 6.5 kDa

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4 ผลปฏิกิริยาระหว่างโพลิโคลนอลแอนติบอดีจากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 ต่อ Whole Cell เชื้อ *Vibrio* spp.; MW = molecular weight standard (Bio- rad), A = *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา), B = *V. harveyi* (จากกุ้งกุลาดำ), C = *V. vulnificus* DMST 5852[a] (จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์), D = *V. vulnificus* MT1506 (จากประเทศอังกฤษ), E = *V. vulnificus* BT 89/ 04/ 7052 และ F = *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ในการก่อให้เกิดโรคในปลากะพงขาว

ภายหลังการฉีดเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 เข้าช่องท้องปลากะพงขาว 2 กลุ่ม กลุ่มละ 25 ตัว ที่ความเข้มข้น $1x10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร พบว่าหลังจากปลากะพงขาวได้รับเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 ที่ 24 ชั่วโมง พบอัตราการตาย 60 เปอร์เซ็นต์ (15 ตัว) และ 48 ชั่วโมง มีอัตราการตายสะสม 76 เปอร์เซ็นต์ (19 ตัว) และที่ 96 ชั่วโมง มีอัตราการตายสะสม 88 เปอร์เซ็นต์ (22 ตัว) ส่วนปลากะพงที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 ภายหลังที่ได้รับเชื้อที่ 24 ชั่วโมง พบอัตราการตาย 52 เปอร์เซ็นต์ (13 ตัว) และ 48 ชั่วโมง มีอัตราการตายสะสมที่ 76 เปอร์เซ็นต์ (19 ตัว) หลังจากนั้นไม่พบการตายอีก

ปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง 2 Biotype แสดงอาการผิดปกติภายหลังได้รับเชื้อที่ 48 ชั่วโมงโดยปลามีอาการว่ายน้ำช้าลง และพบอาการตกเลือดรอบบริเวณที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 5) และที่ 72 ชั่วโมง พบว่าปลาเกิดอาการเกล็ดหลุด และบริเวณรอบปากแดงเนื่องจากการตกเลือด

ค่า Relative Percent Survival (% RPS) กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 เท่ากับ 12 และ 24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมค่า % RPS เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 5 ลักษณะปลากะพงขาวภาพหลังการฉีดเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ซึ่งพบว่าบริเวณที่มีการฉีดเชื้อจะแสดงอาการเกล็ดหลุด และตกเลือดเป็นบริเวณกว้าง

6. การศึกษาการสร้างแอนติบอดีของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนรวมชนิด OMP และ Bacterin ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype1 และ 2 โดยวิธี Indirect ELISA

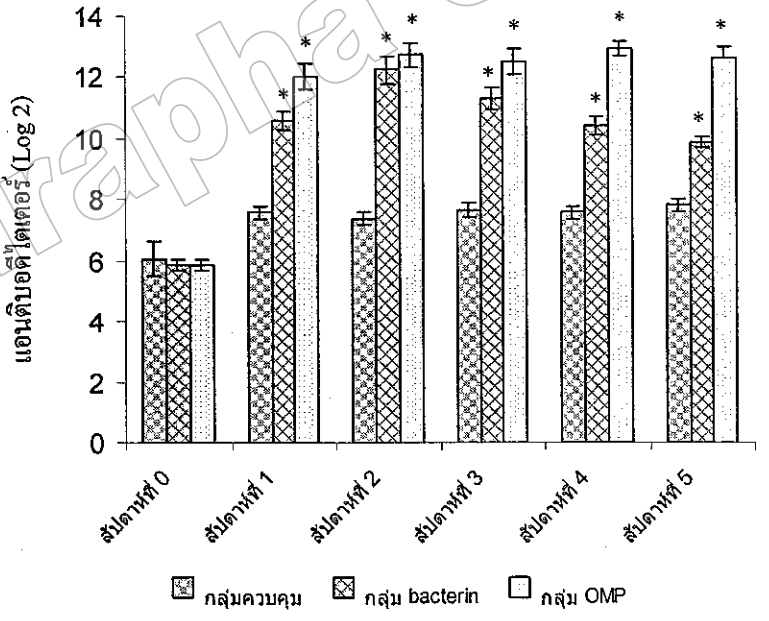
หลังจากฉีดวัคซีนรวม *V. vulnificus* ชนิด OMP และ Bacterin เข้าช่องท้องของปลากะพงขาวโดยมีกลุ่มที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม และสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลาในทุกสัปดาห์เพื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดี ผลจากการทดลองพบว่า หลังจากฉีดวัคซีนทั้ง 2 ชนิด ปลากะพงขาวมีการตอบสนองต่อวัคซีนโดยมีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นโดยปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนรวม Bacterin มีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งสามารถวัดค่า Log 2 ของระดับแอนติบอดีได้เท่ากับ 12.24 ±0.43 ส่วนกลุ่มที่ได้รับวัคซีนรวม OMP มีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งสามารถวัดค่า Log 2 ของระดับแอนติบอดีได้เท่ากับ 12.91±0.23 (ตารางที่ 4) เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Two-Way ANOVA ในระหว่างกลุ่มการทดลอง พบว่าระดับแอนติบอดีของปลาทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และเมื่อนำมาทดสอบความความแตกต่างระหว่างกลุ่มภายในสัปดาห์โดยใช้การทดสอบความแปรปรวนทางสถิติแบบ One-Way ANOVA พบว่า ปลาในกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวม Bacterin และ OMP มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวม OMP มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนรวม Bacterin ในสัปดาห์ที่ 4, 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 ค่าระดับแอนติบอดี (Log 2) โดยเฉลี่ยของปลากะพงขาวโดยเทคนิค Indirect ELISA ภายหลังได้รับวัคซีนประเภทต่าง ๆ

สัปดาห์ที่	การเปลี่ยนแปลงค่า Log 2 ของระดับแอนติบอดีในปลากะพงขาว		
	กลุ่มควบคุม (N =10)	วัคซีน Bacterin (N =10)	วัคซีนOMP (N =10)
0	6.07±0.57[a]	5.86±0.18[a]	5.86±0.18[a]
1	7.58±0.22[a]	10.59±0.28[b]	12.02±0.41[b]
2	7.38±0.19[a]	12.24±0.43[c]	12.71±0.40[b]
3	7.64±0.23[a]	11.32±0.34[b, c]	12.53±0.41[b]
4	7.58±0.22[a]	10.41±0.28[b]	12.91±0.23[b]
5	7.81±0.21[a]	9.88±0.17[b]	12.61±0.40[b]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.01$)
ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.01$)



หมายเหตุ * คือมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) กับกลุ่มควบคุม

ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงระดับแอนติบอดีในปลากะพงขาวภายหลังได้รับวัคซีนประเภทต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ

ผลการตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวัคซีนรวมทั้งสองชนิดในทุกสัปดาห์ พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวจากการได้รับวัคซีนรวมทั้ง 2 ชนิดมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 (ตารางที่ 5 และภาพที่ 7) เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Two-Way ANOVA พบว่า ปลากะพงขาวในกลุ่ม OMP และ Bacterin มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ปลาในกลุ่ม OMP และ Bacterin ไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อนำค่าที่ได้มาทดสอบความความแตกต่างภายในกลุ่ม พบว่าเกิดความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)(ตารางที่ 5) และเมื่อนำค่าที่ได้มาทดสอบความความแตกต่างระหว่างกลุ่มภายในสัปดาห์โดยใช้การทดสอบความแปรปรวนทางสถิติแบบ One-Way ANOVA พบว่า กลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวม Bacterin มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 2, 3, 4, 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวม OMP มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 3, 4, 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวม Bacterin มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวม OMP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในสัปดาห์ที่ 2 เท่านั้น

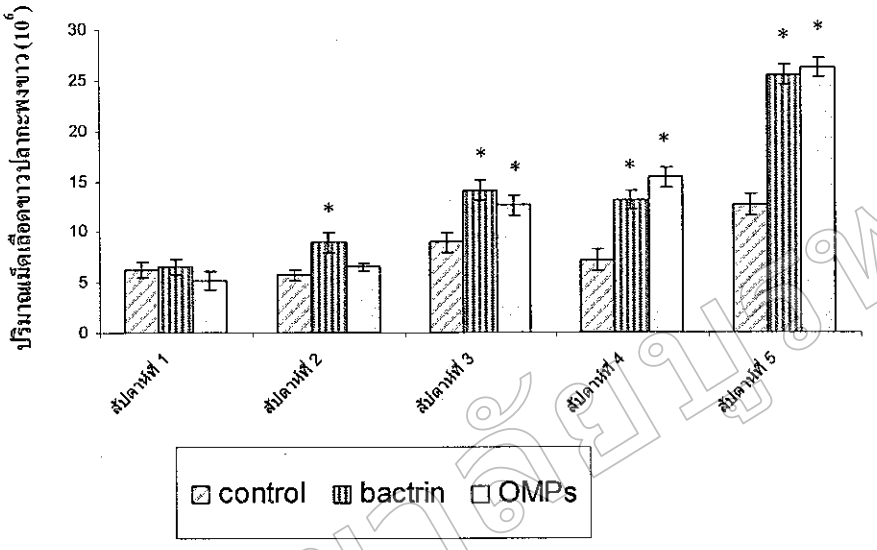
ตารางที่ 5 ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวภายหลังได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ

สัปดาห์ที่	ปริมาณเม็ดเลือดขาวปลากะพงขาว (10^6เซลล์/ มิลลิลิตร)		
	กลุ่มควบคุม (N =10)	วัคซีน Bacterin (N =10)	วัคซีนOMP (N =10)
1	$6.25\pm0.70^{a,c}$	6.52 ± 0.75^{a}	5.23 ± 0.94^{a}
2	5.75 ± 0.51^{c}	8.95 ± 1.00^{a}	6.45 ± 0.37^{a}
3	8.92 ± 1.04^{a}	14.07 ± 0.96^{b}	12.58 ± 0.96^{b}
4	$7.14\pm1.04^{a,c}$	13.07 ± 0.96^{b}	15.35 ± 0.96^{b}
5	12.69 ± 1.04^{b}	25.47 ± 0.96^{c}	26.20 ± 0.96^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



หมายเหตุ * คือมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุม

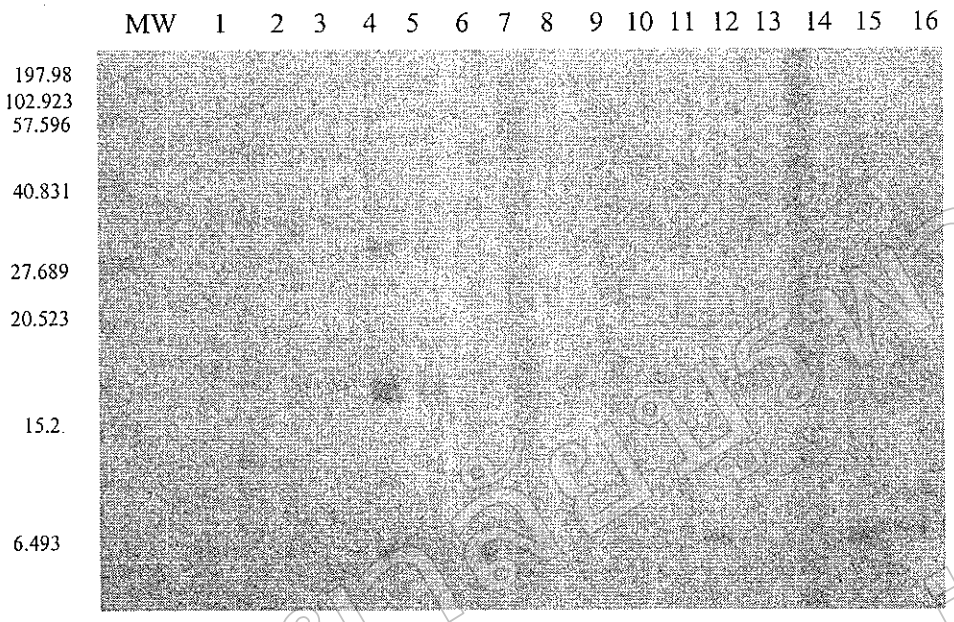
ภาพที่ 7 ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวภายหลังได้รับวัคซีนประเภทต่าง ๆ

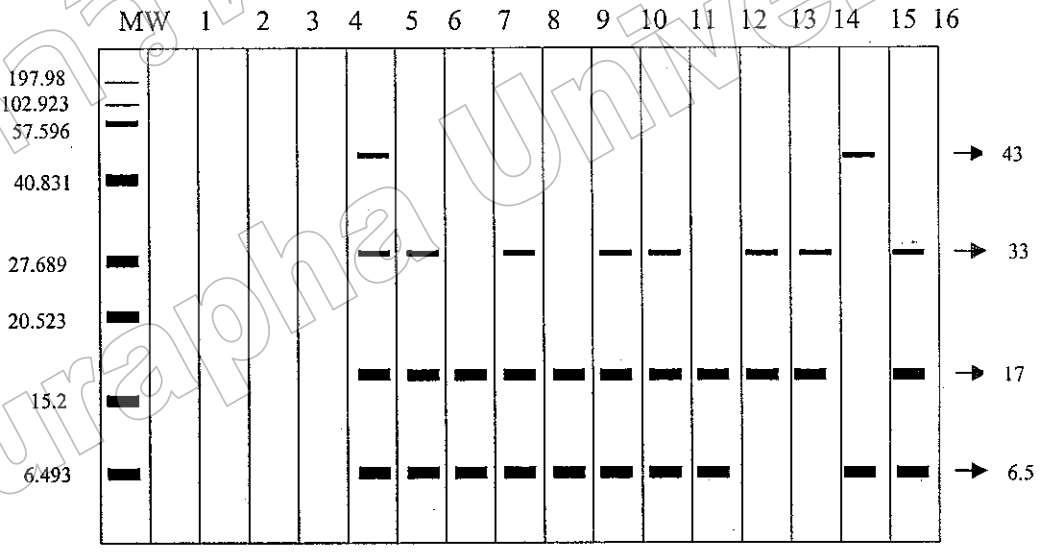
8. การทดสอบความจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมของปลากะพงขาวต่อวัคซีนที่ได้รับด้วยเทคนิค Westen Blot

8.1 แอนติซีรัมของปลากะพงขาว (สัปดาห์ 1-5) ที่ได้รับวัคซีนรวมชนิด OMP สามารถทำปฏิกิริยากับ OMP รวมของ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ที่ตำแหน่งมวลโมเลกุล 43, 33, 17 และ 6.5 kDa (ภาพที่ 8) โดยพบการเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งมวลโมเลกุล 43 kDa จำนวน 8 ตัว ปฏิกิริยาที่มวลโมเลกุล 33 kDa จำนวน 22 ตัว ในตำแหน่งมวลโมเลกุลที่ 17 kDa เกิดปฏิกิริยาเป็นจำนวน 30 ตัว และตำแหน่งมวลโมเลกุลที่ 6.5 kDa เกิดปฏิกิริยาจำนวน 17 ตัว จากตัวอย่างปลาทดลอง 50 ตัว (ตารางที่ 6) โดยมวลโมเลกุลที่ 17 kDa และที่ 6.5 kDa มีความเข้มมาก

8.2 แอนติซีรัมของปลากะพงขาว (สัปดาห์ 1-5) ที่ได้รับวัคซีนรวมชนิด Bacterin สามารถทำปฏิกิริยากับ Whole Cell รวมของ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ได้ที่ตำแหน่งโมเลกุล 33 และ 17 kDa(ภาพที่ 9) โดยเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งมวลโมเลกุลที่ 33 kDa จำนวน 5 ตัว ตำแหน่งที่ 17 kDa พบเกิดปฏิกิริยาเพียง 19 ตัวจากตัวอย่างปลาทดลอง 50 ตัว (ตารางที่ 6) โดยมวลโมเลกุลที่ 17 kDa มีความเข้มมาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

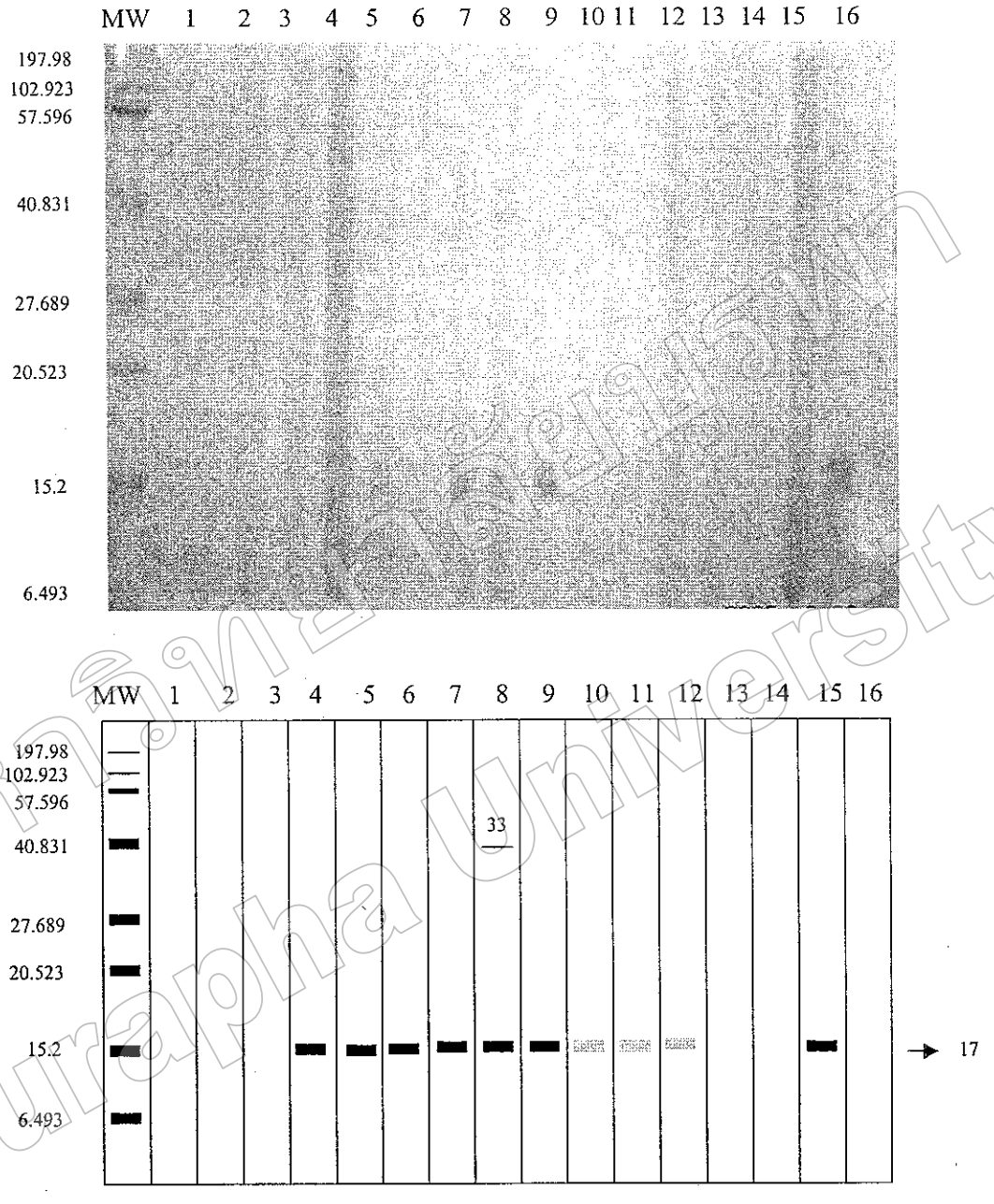




ภาพที่ 8 ผลปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนรวม OMP *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 กับ OMP เชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2

MW = Molecular Weight Standard (Bio-Rad), 1 ถึง 3 = Control, 4 ถึง 16 = ปลาที่ได้รับวัคซีนรวม OMP เชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 9 ผลปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน Bacterin กับ Whole Cell ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2, MW = Molecular Weight Standard (Bio-Rad), 1 ถึง 3 = Control, 4 ถึง 16 = ปลาที่ได้รับวัคซีนรวม Bacterin

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนปลากะพงขาวที่ตอบสนองต่อแอนติซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ

มวลโมเลกุล (kDa)	ชนิดวัคซีน		
	กลุ่มควบคุม(ตัว) (N = 50)	Bacterin (ตัว) (N = 50)	OMP (ตัว) (N = 50)
43	0	0	8 (จาง)
33	0	5 (จาง)	22 (จาง)
17	0	19 (เข้ม)	30 (เข้ม)
6.5	0	0	17 (เข้ม)

9. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรคจากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2

ปลากะพงขาวหลังได้รับวัคซีนรวมทั้งสองชนิด จะมีการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นและ เมื่อระดับแอนติบอดีลดลงในสัปดาห์ที่ 5 จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรคจาก *V. vulnificus* ในสัปดาห์ที่ 6 โดยการฉีดเชื้อรวมของ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 เข้าช่องท้องปลากะพงขาวในทุกกลุ่มการทดลอง ภายหลังจากฉีดเชื้อที่ 24 ชั่วโมง พบว่า ปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุมแสดงอาการตกเลือดบริเวณที่ฉีดเชื้อ และมีอาการติดเชื้อที่รุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ คือ บริเวณที่เกิดการตกเลือดมีการขยายเพิ่มมากขึ้น โดยจะสังเกตได้ที่บริเวณลำตัว และครีบหางจะมีการตกเลือด และยังพบเกล็ดหลุด ครีบกร่อน การว่ายน้ำช้าลง และมีการตกเลือดที่ปาก และพบการตายเกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ และมีการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ คือ จำนวน 15 ตัวในวันที่ 12 สำหรับปลาที่ได้รับวัคซีนรวม Bacterin และ OMP พบว่า จะมีการตกเลือดบริเวณที่ฉีดเชื้อเล็กน้อยแต่อาการดังกล่าวได้หายไป 5 วัน ภายหลังการฉีดเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนรวม Bacterin และ OMP มีอัตราการตายเท่ากันเพียง 6.6 เปอร์เซ็นต์คือ จำนวน 5 ตัว จาก 15 ตัว ในวันที่ 12

ค่า Relative Percent Survival (% RPS) ของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน Bacterin และ OMP เท่ากับ 93.40 เปอร์เซ็นต์ และในกลุ่มควบคุมค่า% RPS เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University