# บทที่ 5
# อภิปรายและสรุปผล

## อภิปรายผล

**1. การจำแนกเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวจากแหล่งต่าง ๆ**

จากผลการสำรวจความเป็นไปได้ในการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวจากจังหวัด ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี นั้นสามารถพบแบคทีเรียชนิด *Vibrio* spp. จากทั้งสามแหล่ง แต่จำแนกเป็น *V. vulnificus* ได้ในปลากะพงขาวที่มีอาการป่วย คือ เกล็ดหลุด ครีบกร่อน ตกเลือดบริเวณลำตัว ปลายหาง ครีบ และอวัยวะภายใน จากจังหวัดฉะเชิงเทราเท่านั้น ทำให้บ่งชี้ได้ว่าสามารถพบแบคทีเรียก่อโรคชนิด *V. vulnificus* ได้เมื่อกำลังก่อโรครุนแรงอยู่ในปลากะพงขาว สอดคล้องกับการรายงานการพบเชื้อ *V. vulnificus* ในปลาเลี้ยงชนิด Silver Sea Bream (*Sparus sarba*) ที่กำลังป่วย (Li et al., 1999) ซึ่งการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวในครั้งนี้ใช้ชุดทดสอบ API 20E ในการจำแนกตามการทดลองของ Fouz and Amaro (2003) ซึ่งได้ใช้ชุดทดสอบ API 20E ในการจำแนกเชื้อ *V. vulnificus* จากปลาไหลที่มีอาการป่วย และในการจำแนกชนิดของเชื้อ *V. vulnificus* สามารถจำแนกโดยหลักการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลเช่น PCR (Macian, Arias, Aznar, Garay, & Pujalte, 2000), Multiplex PCR (Subedi, Barnette, & Rakshit, 2005) และ DNA Probes( Harwood, Gandhi, & Wright, 2004)

**2. การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* โดยการทดสอบทางชีวเคมี**

*Vibrio vulnificus* สามารถจำแนก Biotype ได้ตามการทดสอบทางชีวเคมี (Bioca et al., 1996) และความจำเพาะในการก่อโรคต่อเจ้าบ้านโดย *V. vulnificus* Biotype 1 สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์จากการกินอาหารทะเลที่มีเชื้อ Biotype 1 ปะปนอยู่ (Patel, Gardner, & Burton, 2002; Watanabe, Miyoshi, Kawase, Tomochika, & Shinoda, 2004)โดยให้ผลการทดสอบ Indole และ Ornithin Decarboxylase เป็นบวก ส่วน *V. vulnificus* Biotype 2 ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาไหลในประเทศแถบยุโรป และประเทศญี่ปุ่น (Marco-Noales, Milan, Fouz, Sanjuan, & Amaro, 2001) ให้ผลการทดสอบ Indole และ Ornithin Decarboxylase เป็นลบ จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถแยก *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวป่วยได้สองสายพันธุ์ ซึ่งถูกแยกเป็น Biotype 1 จากการทดสอบ Indole และ Ornithin Decarboxylaseโดยให้ผลเป็นบวก ส่วน *V. vulnificus* Biotype 2 ให้ผล Indole และ Ornithin Decarboxylase เป็นลบ แต่ สายพันธุ์ก่อโรคในมนุษย์ DMST 5852 ให้ผลไม่ตรงกันกับทั้งสอง Biotype ที่แยกได้จากปลากะพงขาว อย่างไรก็ตามผลการทดสอบทาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชีวเคมี ยังมีความสับสนเนื่องจากในการทดสอบเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ให้ผล Ornithin Decarboxylase และ Indole ที่ไม่สอดคล้องกันในดังรายงานของ Bioca et al. (1996) ซึ่งพบว่า Biotype 1 (N = 17) และ Biotype 2 (N = 83) ให้ผลในการทดสอบ Ornithin Decarboxylase และ Indole ไม่ตรงกัน รวมทั้งการรายงานการจำแนก Biotype ที่ได้จากน้ำทะเล กุ้งเลี้ยง ปลาไหล และหอยนางรม (N = 1,167) จำแนกเป็น *V. vulnificus* เพียง N = 67 จัดเป็น Biotype 1 (91%) เนื่องจากให้ผล Indole เป็นลบ และเป็น Biotype 2 เนื่องจากให้ผล Ornithin Decarboxylase และ Mannitol เป็นบวก (Hsueh et al., 2004) อย่างไรก็ตามจากการทดลองในประเทศ Denmark และ Sweden พบว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ Biotype 2 ที่ก่อให้เกิดโรคในปลาไหลให้ผล Indole เป็นบวก (Buller, 2004) นอกจากนี้การจำแนก Biotype ของแบคทีเรีย สามารถใช้ความแตกต่างทางแอนติเจนจากการตอบสนองทางแอนติบอดีของสัตว์ทดลองได้ ปัจจุบัน Biotype 2 ที่ก่อโรคในปลาไหลและมีโอกาสติดเชื้อในมนุษย์ได้ถูกจำแนกตามลักษณะทางชีวเคมี และการตอบสนองทางแอนติบอดีขององค์ประกอบ Lipopolysaccharide แล้วเรียกชื่อแบบใหม่ว่า *V. vulnificus* serovar E (Biosca, Amaro, Larsen, & Pedersen, 1997)

ผลการทดสอบความไวของแบคทีเรีย *V. vulnificus* ต่อยาปฏิชีวนะพบว่าประเภทของยาอาจใช้แยก Biotype ได้ ดังผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่า ทั้งสอง Biotype มีความไว และต้านต่อ Ampicillin และ Sulfadiazine แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานอื่น ๆ ที่พบว่าทั้งสอง Biotype มีความไวต่อ Chloramphenicol และ Kanamycin (Bioca et al., 1996; Li et al., 1999) นอกจากนี้เชื้อทั้งสอง Biotype มีความไวต่อ Oxytetracyclin จึงถือว่ามีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาก เนื่องจากเป็นยาที่ถูกอนุญาตให้ใช้ในการรักษาปลาที่นำมาเป็นอาหารของมนุษย์

**3. การจำแนก Biotype ของ *V. vulnificus* โดย Outer Membrane Protein และแอนติบอดี**

ในการแยก Biotype ของ *V. vulnificus* นอกจากใช้ความแตกต่างทางการทดสอบชีวเคมีแล้วยังจำแนกได้ด้วย รูปแบบของ OMP, LPS และ แคปซูล (Biosca, Llorens et al., 1993; Biosca, Garay et al., 1993) ความสำคัญในการที่ต้องแยก Biotype เพื่อให้ทราบความรุนแรงในการระบาดของโรค เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอาจก่อโรคได้ทั่วไปทั้งมนุษย์ และปลา ในการทดลองครั้งนี้ผลทางชีวเคมียังมีความไม่ชัดเจนในการแยก Biotype ของ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาว และสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ DMST 5852 และเมื่อพิจารณารูปแบบ OMP และ แอนติบอดี ในการแยก Biotype ของทั้งสามสายพันธุ์ก็ยังแสดงผลที่ไม่ชัดเจน ความแตกต่างของ *V. vulnificus* ทั้งสอง Biotype ที่ได้จากปลากะพงขาวป่วย คือ *V. vulnificus* Biotype 1 แสดงแถบโปรตีนหลักที่มวลโมเลกุล 37 kDa กับสายพันธุ์ DMST 5852 ที่ก่อโรคในมนุษย์ จากประเทศไทย แต่ *V. vulnificus* Biotype 2 แสดง

แถบโปรตีนหลักที่มวลโมเลกุลที่ 36 kDa ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ที่ก่อโรคในปลากะพงขาวอาจเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสายพันธุ์ของ *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในปลาไหลแถบยุโรป ประเทศสเปน เปรียบเทียบกับที่ก่อโรคในมนุษย์ (ก่อให้เกิดบาดแผลที่ขา) พบว่าทั้งสองสายพันธุ์เป็น Biotype 2 ซึ่งบ่งชี้ว่าแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาสามารถฉวยโอกาสก่อโรคในมนุษย์ได้ เนื่องจากมีโปรตีนหลักที่ 36 KDa ตรงกับการทดลองในครั้งนี้ (Amaro & Biosca, 1996) อย่างไรก็ตาม Biosca, Garay et al., (1993) รายงานว่า *V. vulnificus* Biotype 1 บางสายพันธุ์ที่ได้จากปลาไหลมีโปรตีนหลักที่ 35.5 kDa แต่ที่ได้จากมนุษย์มีโปรตีนหลักที่ 37 kDa และได้อธิบายความแตกต่างของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นอาจสัมพันธ์กับ แหล่งที่อยู่ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และ Porinsซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผ่านเข้าออกของแร่ธาตุในชั้น Outer Membrane (Bader et al., 2004) ในการศึกษารูปแบบของ OMP มีบทบาทสำคัญเนื่องจาก OMP มีส่วนช่วยในการปรับตัวของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในเจ้าบ้าน และการศึกษาโครงสร้าง และหน้าที่ของ OMP ของแบคทีเรียจะเป็นการง่ายในการวางแผนการใช้ยาปฏิชีวนะและการพัฒนาวัคซีน (Lin et al., 2002; Xu, Wang, Zhaoxia, & Peng, 2005)

**4. การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* โดยการใช้แอนติบอดี**

ผลการทดลองการแยก Biotype หรือ Serotype โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนที่ 6.5 kDa (จาก Biotype 2) และโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ OMP (จาก Biotype 2) พบว่าให้ผลตรงกันเนื่องจากการปรากฏของแอนติเจนที่ 6.5 kDa เฉพาะจาก Biotype 2 แต่ไม่ปรากฏใน Biotype 1 ของปลากะพงขาวป่วย อย่างไรก็ตามสายพันธุ์จากมนุษย์ DMST 5852 เกิดปฏิกริยาที่มวลโมเลกุล 6.5 kDa เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย ผลดังกล่าวแสดงว่า *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่ได้จากมนุษย์ ในประเทศไทยที่ได้รับเชื้อจากการกินอาหารทะเล น่าจะมีแอนติเจนร่วมกันที่ 6.5 kDa ดังนั้นควรนำแอนติเจนที่ 6.5 kDa นี้ไปศึกษาเปรียบเทียบลำดับสายโปรตีนทางโครงสร้างโมเลกุลกับ Biotype 2 ของปลากะพงขาวป่วยต่อไปเพื่อประโยชน์ทางด้านการวินิจฉัยโรค ตรวจสอบสายพันธุ์ที่ก่อโรคทั้งในปลาและมนุษย์ ส่วน *V. vulnificus* สองสายพันธุ์จากประเทศอังกฤษคือ *V. vulnificus* BT89/ 04/ 7052 และ *V. vulnificus* MT1506 ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้งนี้อาจเนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลบนแอนติเจนที่ไม่เหมือนกัน เพราะเป็นสายพันธุ์จากปลาต่างชนิดกันและต่างภูมิภาค

สำหรับการแยก Biotype โดยใช้โพลิโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลองพบว่าโพลิโคลนอลแอนติบอดี Biotype 1 สามารถ เกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ 33 kDa ในBiotype 1 ของปลากะพงขาว เกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ 35 kDa จาก DMST 5852 และ เกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ 30 kDa จาก Biotype 2 ของปลากะพงขาว ซึ่งสอดคล้องกับผลทางชีวเคมี (Indole และ

Ornithin Decarboxylase) ที่แตกต่างกันทั้ง 3 สายพันธุ์ ส่วนโพลิโคลนอลแอนติบอดี Biotype 2 สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ 30 kDa ของ Biotype 1 ของปลากะพงขาว และ DMST 5852 เกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ 33, 25, 17 และ 6.5 kDa ของ Biotype 2 และการเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ 6.5 kDa นี้ให้ผลตรงกับการเกิดปฏิกิริยาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี อนึ่งผลการทดลองได้พบว่า มวลโมเลกุลที่ 33 kDa ของ OMP ที่ทั้ง Biotype 1 และ 2 เพราะปฏิกิริยาเกิดขึ้นระหว่าง โพลีโคลนอลแอนติบอดีของทั้งสอง Biotype และมวลโมเลกุลที่ 33 kDa ของ Biotype 2 พบได้ที่ OMP, Whole Cell Lysate (WCL), Sonicate Cell (SOC) และ Whole Cell แต่ตรงกันข้ามกับBiotype 1 ที่มวลโมเลกุลที่ 33 kDa พบได้เฉพาะที่ OMP เท่านั้น (ไม่ได้แสดงผลของปฏิกิริยาในส่วนของผลการทดลอง) ทั้งนี้การเกิดปฏิกิริยาของโพลิโคลนอลแอนติบอดีมีได้หลายตำแหน่งโมเลกุล เนื่องจากโพลิโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยประชากรจำนวนมากของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Epitop ต่าง ๆ ของแอนติเจน จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาในหลายตำแหน่ง (ไพศาล สิทธิกรกุล , 2548) ผลประสิทธิภาพที่ดีของโพลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูทดลองที่จับจำเพาะต่อแอนติเจนหลายตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับผลโพลิโคลนอลแอนติบอดีในกระต่ายที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนหลายตำแหน่งต่อ *V. vulnificus* ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ (Martin & Siebeling, 1991)

*Vibrio vulnificus* ที่ได้จากปลากะพงขาวป่วยจากจังหวัดฉะเชิงเทราในครั้งนี้ สามารถแยกออกได้เป็น Biotype 1 และ Biotype 2 เนื่องจากให้ผลต่างกันทั้งการทดสอบทางชีวเคมี การดื้อยา และรูปแบบ OMP การเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่างกันทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* นอกจากใช้ แอนติบอดีในการจำแนก Biotype แล้ว ยังสามารถใช้วิธีการทาง Genotype ของลักษณะ Ribotyping (Biosca, Amaro, Larsen, & Pedersen, 1997) นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการใช้คุณสมบัติการสร้าง Ferric-Reductase จาก Periplasm และ Cytoplasm ของเซลล์ ในขบวนการ Iron Acquisition แต่ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากทั้งสอง Biotype สามารถสร้างได้เหมือนกัน (Mazoy, Lopez, Fouz, Amaro, & Lemos, 1999)

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

จากการทดลองฉีดเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 เข้าช่องท้องปลากะพงขาว เพื่อทดสอบความรุนแรง พบว่า ทั้ง Biotype 1 และ 2 ก่อการตายในปลากะพงขาวภายใน 24 ชั่วโมง แต่ไม่แสดงอาการผิดปกติภายนอกให้เห็น แต่ภายหลังจาก 48 ชั่วโมง พบว่าปลากะพงขาวทั้ง 2 กลุ่มทดลอง แสดงอาการตกเลือดรอบบริเวณที่ฉีดเชื้อ มีแผลตามลำตัว การตกเลือดบริเวณรอบปาก และ

เกล็ดหลุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Fouz and Amaro (2003) ที่ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* ต่อปลาไหลหลังได้รับเชื้อผ่านทางน้ำ พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ปลาไหลมีการตาย และไม่แสดงอาการผิดปกติภายนอก แต่หลังจาก 24 ชั่วโมง พบอาการ ตกเลือดบริเวณครีบ และมีแผลเปื่อยส่วน Austin and Austin (1993) ได้รายงานว่าปลาไหลที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* มีการตาย 80 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ การตายของปลาเป็นผลมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และสารพิษในกระแสเลือดเพราะ *V. vulnificus* สามารถสร้างสารพิษ Endotoxin เช่น LPS (Linkous & Oliver, 1999) รวมทั้ง Enzyme จำพวก Hemolysin, Elastase, Collagenase, Dnase, Lipase, Phospholipase, Mucinase, Chodrotin Sulfatase, Hyaluronidase, Fibrinolysin, และ Protease (Linkous & Oliver, 1991) ซึ่งสัมพันธ์กับอาการของโรคที่แสดงออก เช่น การอักเสบ การตกเลือด เนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย ตามผิวหนัง และครีบ สารพิษแต่ละชนิดดังกล่าวที่ถูกสร้างจากแบคทีเรียจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* เช่น Hemolysin ที่ถูกสกัดให้บริสุทธิ์แล้วนำไปฉีดเข้าหนูทดลองที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้หนูทดลองตายได้ และจากการฉีด LPS จากเชื้อ *V. vulnificus* เข้าเส้นเลือดของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองมีความดันลดลงภายในเวลา 10 นาที และตายในเวลา 30-60 นาที (Linkous & Oliver, 1999) ส่วน Strom & Paranjpye (2000) ได้รายงานถึงความรุนแรงของ metalloproteses ที่ *V. vulnificus* สร้างขึ้นเมื่อสกัดให้บริสุทธิ์แล้วทดลองฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลองพบว่าทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง และเซลล์ผิวหนังมีการตาย

แบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มี 2 สายพันธุ์ คือ จากปลากะพงขาวทั้ง Biotype 1 และ 2 ได้ถูกทดสอบแล้วว่ามีความรุนแรงในการก่อโรค และความรุนแรงในการก่อโรคไม่แตกต่างกัน โดยเมื่อฉีดเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง 2 Biotype เข้าช่องท้องปลากะพงขาว และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 96 ชั่วโมง *V. vulnificus* Biotype 1 ปลากะพงขาวมีอัตราการตายสะสม 88 เปอร์เซ็นต์ และ Biotype 2 มีอัตราการตายสะสม 76 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งสองสายพันธุ์มี Virulent Factor คือ Cytolysin Gene (ได้ PCR Product ขนาด100 bp เมื่อใช้ Primer ที่ประกอบด้วยสาย VV-F: TTCAGGCGAGCGTGAATTTG และ VV-R: ATCAAATACCCAGCCACTGC) เมื่อใช้เทคนิคทาง Polymerase Chain Reaction (Subedi et al., 2005)

**6. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวและประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรค**

แบคทีเรียแกรมลบเป็นแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายให้ปลาเขตร้อน ที่เลี้ยงในฟาร์ม (Thune, Stanley, & Cooper, 1993) การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียต่อปลาได้มีการพัฒนากันอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาวัคซีนที่เหมาะสมในการทำให้ปลามีการ

ตอบสนอง โดยการสร้างแอนติบอดีในการต้านทานโรค ซึ่งส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยโมเลกุลที่สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเช่น OMP, Capsule polysaccharide, Protease, LPS และ Toxin โดยแต่ละโมเลกุลมีความแตกต่างของ Epitope ซึ่งจะถูกใช้ในการตัดสินในการผลิตวัคซีน เพราะปลาต้องตอบสนองทางภูมิคุ้นกันแล้วคุ้มครองตัวเองไม่ให้เป็นโรคจากแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ (Katari & Piganelli, 1996) การทดลองในครั้งนี้เลือกใช้ฉีดวัคซีนรวมจากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 มาใช้ในการผลิตวัคซีนแบบ Bacterin และ OMP เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสอง Biotype มีความรุนแรงในการก่อโรคใกล้เคียงกัน ส่วนของ OMP ของแบคทีเรียมีความสำคัญ และเป็นปัจจัยในการกำหนดความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย และในหลาย ๆ การทดลอง การใช้วัคซีนชนิด OMP ทำให้เกิดการป้องกันโรคได้สูงดีกว่าการใช้วัคซีนแบบ Bacterin ดังการทดลองของ Rahman, Kuroda, Dijktra, Kiryu, Nakanishi, and Ototake (2002) ที่ทดลองผลิตวัคซีน Bacterin และ OMP จากเชื้อ *Flavobacterium psychrophilum* และพบว่าวัคซีนชนิด OMP ทำให้ปลามีการตอบสนองทางแอนติบอดีได้ดีกว่าวัคซีนชนิด Bacterin

การทดลองในครั้งนี้ได้ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวทั้งทาง Humural Immune Response (HIR) โดยการวัดระดับแอนติบอดี และทาง Cell Mediated Immune Response (CMIR) โดยการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ถูกสร้างขึ้นภายหลังจากการได้รับวัคซีน และได้เลือกวิธีการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องเนื่องจากเป็นวิธีการที่ทำให้ปลาได้รับการป้องกันโรคมากกว่าวิธีอื่น (Newman, 1993) ผลการตอบสนองทาง HIR ของปลากะพงขาวได้รับวัคซีนรวมชนิด Bacterin และ OMP พบว่าปลากะพงขาวสามารถสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นและระดับแอนติบอดีในเลือดของปลาที่ได้รับวัคซีนรวมชนิด OMP มีระดับสูงกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนรวมชนิด Bacterin แม้ว่าจะถูกสร้างช้ากว่า ซึ่งเป็นไปได้ว่าวิธีที่ผลิตวัคซีนรวมชนิด OMP มีการทำลาย Epitope บนแอนติเจนน้อยกว่าวัคซีนรวมชนิด Bacterin ดังที่ได้มีการศึกษาในแบคทีเรีย *F. pscychrophilum* ในปลา Rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) และปลา Ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Rahman et al., 2002) วิธีการฉีดในการทดลองครั้งนี้ ทำให้แอนติบอดีในเลือดสูงขึ้นในปลากะพงขาว สอดคล้องกับการฉีดในปลาไหลที่ตอบสนองให้แอนติบอดีสูงกว่าแบบแช่ (Collado et al., 2000) นอกจากนี้แอนติบอดีสูงสุด ในสัปดาห์ที่ 2 จากการฉีด Bacterin ในปลากะพงขาวสอดคล้องกับการฉีดในปลา Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Park et al., 2001) ปลาเมื่อได้รับวัคซีนจะมีการตอบสนอง ทั้ง Innate Immunity และ Acquired Immunity (Van Muiswinkel & Wiegertjes, 1997) ดังการตอบสนองทาง CMIR ของปลากะพงขาวหลังรับทั้งสองวัคซีน ได้มีการสร้างเม็ดเลือดขาวรวมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 (วัคซีน Bacterin) และ สัปดาห์ที่ 3 (วัคซีน OMP) และมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมนั้น สอดคล้องกับการสร้างเม็ดเลือดขาวรวมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อสัปดาห์

ที่ 4 ในปลา Salmon (*Salmo solar* L.) หลังการรับวัคซีนเชื้อ *Cryptobia salmostica* (Chin & Woo, 2005)

ปลากะพงขาวทั้งที่รับวัคซีนรวมทั้งแบบ OMP และ Bacterin มีการตอบสนองอย่างจำเพาะ โดยพบอิมโมโนเจน จากวัคซีนรวม OMP สามารถทำปฏิกิริยาส่วนใหญ่กับ OMP ที่ตำแหน่งมวลโมเลกุล 33, 17 และ 6.5 kDa ส่วนแอนติซีรัมปลากะพงที่ได้รับวัคซีนรวมชนิด Bacterin สามารถทำปฏิกิริยาส่วนใหญ่กับ Whole Cell เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งมวลโมเลกุล 17 kDa ซึ่งการตอบสนองแบบจำเพาะที่ตำแหน่งโมเลกุลขนาดต่าง ๆ เหล่านี้ มีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีในเลือดเมื่อทดสอบด้วย Indirect ELISA ซึ่งการตอบสนองอย่างจำเพาะเกิดขึ้นได้เมื่อทดสอบในปลาอื่น ๆ หลายชนิด เช่น ปลา Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) หลังรับวัคซีนต้านเชื้อ *Photobacterium damsela* sub sp. *piscicida* มีการตอบสนองที่มวลโมเลกุลในช่วง 15-5 kDa (Bakopoulos, Volpatti, Adams, Galeotti, & Richards, 1997) ในปลา Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) หลังรับวัคซีน OMP ของเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* มีการตอบสนองที่มวลโมเลกุลที่ 97, 80 และ 19 kDa (Bader et al., 2004) จากผลการทดลองการตอบสนองของปลากะพงขาวหลังรับวัคซีนรวม OMP และ Bacterin ปลากะพงขาวมีการตอบสนองอิมโมโนจินิค มวลโมเลกุลที่ตรงกันคือ 33 และ 17 kDa ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความเป็นอิมโมโนจินิค ของ OMP ทั้งจาก Biotype 1 และ 2 ในโพลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูทดลอง ดังนั้นโมเลกุลที่ 33 และ 17 kDa น่าจะเป็นอิมโมโนจินิคที่สำคัญที่ในการผลิตวัคซีนเพื่อต้านทานแบคทีเรีย *V. vulnificus* เช่นเดียวกับงานทดลองของ LaFrentz, LaPatra, Jones, and Cain (2004) ที่เสนอแนะการผลิตวัคซีนต้านเชื้อ *F. psychrophilum* ในปลา Rainbow Trout ที่ควรมีอิมโมโนจินิคในช่วง 70-100 kDa เพราะให้ค่า RPS ที่ 94 เปอร์เซ็นต์

ประสิทธิภาพของวัคซีนรวมทั้ง Bacterin และ OMP ในการทดลองครั้งนี้ให้ความคุ้มโรคในปลากะพงขาวจากแบคทีเรีย *V. vulnificus* ทั้ง 2 Biotype เพราะการตอบสนองทาง HIR ระดับแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นสูง และทาง CMIR ปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การคุ้มโรคมีเปอร์เซ็นต์ RPS สูงถึง 93.40 เปอร์เซ็นต์ในวัคซีนรวมทั้งสองประเภท แสดงว่าวัคซีนที่ใช้มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคสูงเท่ากัน ซึ่งประสิทธิภาพของวัคซีนที่ดีต้องให้ค่า RPS มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (ธีราภรณ์ มอไธสง, 2548 อ้างถึงใน Ellis, 1982) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสะดวก ประหยัด และรวดเร็ว การผลิตวัคซีนแบบ Bacterin จะมีความเหมาะสมมากกว่าการผลิตวัคซีนชนิด OMP วัคซีนที่ได้จากการผสมระหว่าง *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ในการทดลองครั้งนี้ นอกจากช่วยคุ้มครองให้ปลากะพงขาวไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แล้วยังน่าจะช่วยลดปริมาณแบคทีเรีย ในตัวปลากะพงขาว ซึ่งอาจถ่ายทอดเชื้อสู่มนุษย์ได้ เนื่องจาก Biotype 2 ที่ก่อโรคในปลากะพงขาวอาจเป็นสายพันธุ์เดียวกับก่อโรคมนุษย์ คือ DMST 5852

การพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสัตว์น้ำในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาในต่างประเทศมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสัตว์น้ำมากมาย เช่น การทำวัคซีนป้องกันโรค Vibriosis, Yersinosis (Gudding et al., 1999) เป็นที่ยอมรับกันแพร่หลาย วัคซีนมีการผลิตในรูปแบบต่าง ๆ จากเชื้อโรค เช่น การสกัดส่วนต่าง ๆ เช่น การสกัดส่วน Toxoid หรือ LPS (Lipopolysaccharide) ของแบคทีเรีย (Collado et al., 2000) ประเทศที่อยู่ในเขตร้อนยังไม่มีวัคซีนที่นำมาใช้ในเชิงพาณิชย์มากนัก เนื่องจากปลาในเขตร้อนมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคได้ดี ประกอบกับระยะเวลาในการเลี้ยงสัตว์น้ำสั้นจึงไม่นิยมการใช้วัคซีน ส่วนประเทศในเขตเอเชียได้มีการผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคในสัตว์น้ำ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ใช้วัคซีนเชิงพาณิชย์ป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* sp. ตัวอย่างได้แก่วัคซีนต้านเชื้อก่อโรค *V. anguillarum, V. parahaemolyticus* และกำลังทดลองผลิตวัคซีนในการป้องกันโรค Columnaris, Iridovirus, Pseudotuberculosis (Schnick et al., 2005) ส่วนในประเทศไทยได้มีการพัฒนาวัคซีนอย่างต่อเนื่อง แต่ในขั้นทดลองเท่านั้น เช่น วีณา เคยพุดซา (2539) ได้ศึกษาการใช้วัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสจากเชื้อ *V. cholerae* ในปลากะพงขาวโดยใช้วัคซีนชนิด Formalin-Killed ซึ่งจากการทดลอง พบว่าวัคซีนให้ผลในความคุ้มโรคดีเนื่องจากปลามีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และ จารี ผลชนะ (2547) ได้ศึกษาและพัฒนาวัคซีนจาก OMP และ Extracellular products ของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาดุกลูกผสม ซึ่งจากการทดลองวัคซีนให้ผลในการคุ้มโรคดีเนื่องจากปลามีอัตราการรอดอยู่ในช่วง 79-89 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาวัคซีนในรูปแบบต่าง ๆ ในสัตว์น้ำเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำ และช่วยในการเพิ่มผลผลิตของสัตว์น้ำโดยไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ในการบริโภคสัตว์น้ำ ซึ่งงานทดลองครั้งนี้แนวโน้มของวัคซีน OMP และ Bacterin ต้านเชื้อ *V. vulnificus* ในปลากะพงขาว ให้ผลในการคุ้มโรคได้ดีถึง 93.40 เปอร์เซ็นต์ ในทั้ง 2 ชนิดวัคซีน จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันโรคในปลากะพงขาว หรือปลาน้ำกร่อยชนิดอื่น ๆ ที่เป็นโรคจากเชื้อ *V. vulnificus*

## สรุปผลการทดลอง

1. การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* ตามการทดสอบ Indole และ Ornithin Decarboxylase ยังมีความไม่แน่นอนเนื่องจากเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ให้ผลการทดสอบไม่สอดคล้องกันโดย *V. vulnificus* Biotype1 ให้ผลในการทดสอบ Indole และ Ornithin Decarboxylase เป็นบวกแต่ *V. vulnificus* Biotype2 ให้ผลเป็นลบในทั้งสองปฏิกิริยา ส่วน *V. vulnificus* DMST 5852 ให้ผลเป็นบวก และลบตามลำดับ

2. สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี และโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการจำแนก Biotype ระหว่างเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ได้

3. การเปรียบเทียบรูปแบบ OMP ระหว่างเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1, 2 และ DMST 5852 พบว่า มีความแตกต่างกันในแถบโปรตีนหลักโดย Biotype 1 และ DMST 5852 แสดงแถบโปรตีนหลักที่มวลโมเลกุล 37 kDa ส่วน Biotype 2 มีแถบโปรตีนหลักที่มวลโมเลกุล 36 kDa

4. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ที่ความเข้มข้น $10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 96 ชั่วโมง ปลาที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 มีการตายสะสม 88 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 2 มีการตายสะสม 76 เปอร์เซ็นต์

5. การศึกษาการสร้างแอนติบอดีภายหลังการได้รับวัคซีน OMP และ Bacterin โดยการทดสอบทั้งทาง HMIR และ CMIR พบว่า วัคซีนทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นให้ปลากะพงขาวมีการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และมีการสร้างเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

6. การทดสอบความจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมของปลากะพงขาวต่อวัคซีนที่ได้รับพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนชนิด OMP มีการตอบสนองต่อวัคซีนที่ได้รับโดยการสร้างแอนติบอดีตอบสนองที่มวลโมเลกุล 43, 33, 17 และ 6.5 kDa ส่วนปลาที่ได้รับวัคซีนชนิด Bacterin มีการตอบสนองที่มวลโมเลกุล 33 และ 17 kDa ดังนั้นมวลโมเลกุลที่ 33 และ 17 kDa ของเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง 2 Biotype น่าจะเป็นโปรตีนที่เป็นอิมโมโนเจนหลักของวัคซีนชนิด Bacterin และ OMP ในการนำไปผลิตวัคซีนในอนาคต

7. วัคซีนชนิด Bacterin และ OMP มีประสิทธิภาพในการคุ้มโรคได้ดี เนื่องจากปลากะพงขาวมีค่า RPS สูงถึง 93.4 เปอร์เซ็นต์ในทั้งสองกลุ่ม

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลในการก่อโรคของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 เช่น Toxin และ Enzyme ที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้

2. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพในการให้วัคซีนโดยวิธีอื่นเพิ่มเติมนอกจากการให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องเพียงอย่างเดียว เช่น การให้วัคซีนโดยวิธีการ แช่ หรือ ผสมอาหาร

3. ควรมีการศึกษาการผลิตวัคซีนด้วยวิธีอื่นโดยอาจจะสกัดส่วนต่างของแบคทีเรียมาผลิตวัคซีน เช่น ส่วน LPS (Lipopolysaccharide) หรือ ECP (Extracellular Protease)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University