รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาการผลิตวัคซีน Formalin killed cell เพื่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ในปลากะพงขาวและปลากะรังในเชิงพาณิชย์

(Development of Formalin-killed cells vaccine against *Vibrio vulnificus* in Asian seabass (*Lates calcarifer*) and Grouper (*Epinephelus* spp.) for commercial purpose

ปภาศิริ บาร์เนท

มลฤดี สนธิ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802116
สัญญาเลขที่ 95/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาการผลิตวัคซีน Formalin killed cell เพื่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ในปลากะพงขาวและปลากะรังในเชิงพาณิชย์

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ดร.ปภาศิริ บาร์เนท
ดร.มลฤดี สนธิ

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
คณะเทคโนโลยีทางทะเล
มหาวิทยาลัยบูรพา

30 สิงหาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 95/2560

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 95/2560)

บทคัดย่อ

งานวิจัยศึกษาการพัฒนาการผลิตวัคซีน Formalin killed cell เพื่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ในปลากะพงขาวและปลากะรังในเชิงพาณิชย์ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (virulence strain) ในการก่อโรคไปใช้เป็นวัคซีน ต้องสำรวจจำแนกชนิดและรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* จากปลากะพงขาวและปลากะรังที่เลี้ยงในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย การศึกษามีระยะเวลา 2 ปี โดยในปีแรกที่รายงานครั้งนี้ ได้มีเชื้อ *Vibrio vulnificus* VVB (Burapha) ที่ก่อโรคในปลากะพงขาว ของประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2547 ถูกจำแนกทางจุลชีววิทยาและเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะในการจะระบุเป็นสายพันธุ์รุนแรง (virulence strain) เนื่องจากต้องยืนยันการมี virulence gene จึงได้ศึกษาทางเทคนิคชีวโมเลกุลพีซีอาร์ ด้วยการใช้ 5 virulence gene ได้แก่ *vcg-C, vvhA, CPS1, vvhA1* และ *16s rRNA* แต่ *CPS1* gene ให้ผลพีซีอาร์ที่ยังไม่ชัดเจน เพื่อต้องการหา unique specific marker ของแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงนี้ จึงมีการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตับและตับอ่อนกุ้ง น้ำเลี้ยงกุ้ง และหอยนางรม มาร่วมทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 5 ยีนนี้ ผลยืนยันชัดเจนด้วย specific primer 3 ชนิด ได้แก่ *vcg-C, vvhA* และ *vvhA1* ทำให้สามารถระบุ unique specific marker คือยีน *vvhA1* ที่ควบคุมความรุนแรงของแบคทีเรีย ต่อมาเมื่อใช้ไพรเมอร์ *V. vulnificus* hemolysin (*vvhA1*) ขนาด DNA fragment ที่ 813 bp ในการจำแนกเชื้อจากปลากะพงขาวและปลากะรัง ที่สำรวจจากการเลี้ยงในภูมิภาคต่าง ๆ 10 จังหวัดชายฝั่ง ของประเทศไทย พบว่า จำนวนทั้งหมด 2610 ไอโซเลท จากการเขี่ยเชื้อให้โคโลนีเขียวบนอาหารวุ้นจำเพาะ TCBS สามารถพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวที่ป่วยเท่านั้น จากการเลี้ยงในกระชัง 1 ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี มี 4 ไอโซเลท ซึ่งยืนยันผลบวกตรงกันทั้ง เทคนิคชีวโมเลกุลพีซีอาร์ ร่วมกับเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะ และ พบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวที่ป่วย ที่เลี้ยงในบ่อปูน 1 ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะเท่านั้น และเมื่อตรวจโดยตรงจากเนื้อเยื่อตับและไตปลากะพงขาว จำนวน 107 ตัวอย่าง และปลากะรัง จำนวน 105 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลพีซีอาร์ สามารถพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในตับปลากะพงขาวป่วย ที่เลี้ยงในบ่อปูน 1 ตัวอย่างจากฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา ทั้งนี้ในการสำรวจปลากะรัง ในภาคใต้ ไม่พบเชื้อ *V. vulnificus* ทั้งเทคนิคชีวโมเลกุลพีซีอาร์ และเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะ ดังนั้นในการเลือกไอโซเลทแบคทีเรียเพื่อพัฒนาวัคซีนในปีที่สอง ได้ทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคต่อปลากะพงขาว ผลทดสอบ LD_{50} พบว่า เชื้อ *V. vulnificus* VVB (Burapha) มีความรุนแรงมากที่สุด ทำให้ปลากะพงขาวตายภายในเวลา 24 ชั่วโมง ณ ระดับความเข้มข้น 5.4×10^6 CFU/g fish body weight เมื่อเปรียบเทียบกับ ไอโซเลท จากจังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา และ สตูล (unknown specie) ผลวิจัยในปีที่หนึ่งควรมีการศึกษาต่อไปเนื่องจาก unique specific marker มียีน hemolysin *vvhA1* ที่ควบคุมความรุนแรงของแบคทีเรียนี้ ยังไม่สามารถระบุ biotype เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ต่อระบาดวิทยาในมนุษย์ที่สัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อม

Abstract

The virulent strain of *Vibrio vulnificus* in farmed Asian Seabass (*Lates calcarifer*) and Grouper (*Epinephelus* spp.) poses a challenge to Thai aquaculture. In order to develop a formalin-killed cell vaccine to prevent infection by Vibrio vulnificus, identification of the bacteria species and virulence must be confirmed. One strain of *Vibrio vulnificus* VVB (Burapha) that has caused Asian Seabass mortality in Thailand since 2004 was identified using microbiological traits and specific antibody technique. The first year of this two-year study was used to investigate the existence of virulence genes in *Vibrio vulnificus* VVB (Burapha). A PCR technique was applied to five virulence genes, including vcg-C, vvhA, CPS1, vvhA1 and 16s rRNA. However, the results for the CPS gene were unclear. Therefore, to find a unique specific marker for this disease, bacteria were isolated from the liver and pancreas of shrimp, water from shrimp farms, and from oysters. These bacteria were tested with primers of the aforementioned five genes. The results showed that three specific primer sets (vcg-C, vvhA and vvh1) can be used to identify the unique specific marker vvhA1, which controls the virulence of *Vibrio vulnificus* VVB (Burapha). Subsequently, an 813-bp DNA fragment of the *V. vulnificus* hemolysis gene (whA1) was detected in bacteria from Asian Seabass and Grouper collected from ten coastal provinces across Thailand. From 2,610 isolates appearing as green colonies on TCBS agar, *V. vulnificus* was found in only four isolates from Asian Seabass showing disease symptoms, cultured in cages in Chantaburi Province, confirmed by both PCR and specific antibody techniques. Meanwhile, direct tissue detection by PCR method was performed to identify the bacteria from liver and kidney tissue samples from a total of 107 Asian Seabass and 105 Grouper. Results showed *V. vulnificus* in the livers of sick Asian Seabass cultured in concrete ponds in Chachoengsao Province. Surprisingly, the bacteria colony and tissue samples of Grouper in this survey showed no presence of *V. vulnificus*. For the purpose of vaccine development in the second year of the study, the most virulent strain was selected for vaccine trials. The experimental injection of four bacterial strains for Asian Seabass infection was conducted. Results of LD_{50} challenge tests showed *Vibrio vulnificus* VVB (Burapha) to be the most virulent strain, since it can cause mortality in Asian Seabass within 24 hours at a concentration level 5.4×10^6 CFU/g fish body weight, in comparison to strains from Chantaburi, Chachoengsao, and Satun provinces (unknown species). The results from the first year of this study will be further investigated, since the hemolysin vvhA1 gene can control the same virulence in humans. Finding a genetic marker and its biotype would therefore be beneficial to epidemiological studies related to the environment.

สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	เอกสารงานวิจัย	4
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 4	ผลการวิจัย	15
บทที่ 5	อภิปรายผลการวิจัย	30
	สรุปผลการวิจัย	33
	ข้อเสนอแนะ	34
	ผลผลิต	34
บทที่ 6	เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก		39

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *V .vulnificus* Biotype 2 ด้วยเทคนิค PCR	11
ตารางที่ 2	ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR	12
ตารางที่ 3	ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	12
ตารางที่ 4	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ของ *V. vulnificus* VVB Burapha ที่ได้จากปลากะพงขาวป่วย (isolate จากปี 2547)	17
ตารางที่ 5	ข้อมูลเปรียบเทียบความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA จากฐานข้อมูล GenBank	18
ตารางที่ 6	Result of PCR of severe *V. vunificus* Biotype 2 from L. calcarifer cultured in Thailand	19
ตารางที่ 7	Result of PCR of *Vibrio* sp. from shrimp hepatopancrease, water shrimp pond and oyster	21
ตารางที่ 8	ผลยืนยันไอโซเลทเชื้อ *V. vunificus* ที่ได้จากการแยกเชื้อบนอาหารวุ้น TCBS จากปลากะพงขาวและปลากะรังตามระดับภูมิภาค ที่จำแนกด้วยเทคนิคแอนติบอดีและเทคนิค PCR	24
ตารางที่ 9	ผลยืนยันเชื้อ *V. vunificus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 6 สงขลา (NICA) ที่จำแนกด้วยเทคนิคแอนติบอดีและเทคนิค PCR	25
ตารางที่ 10	แสดงค่า LD50 เป็นค่าที่บ่งบอกความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลากะพงขาวทดลองตาย 50% ของจำนวนที่กำหนดในระยะเวลา 24 – 120 ชั่วโมง	29

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ปลากะพงขาว (2.5-3.5 นิ้ว) ที่เป็นโรคจาก *V. vulnificus* พบทั้ง biotype1 และbiotype2 มีลักษณะบาดแผลตกเลือดตามข้างตัว ส่วนหาง ส่วนหัว ผิวหนังเปิด และเกล็ดหลุด ระบาดเมื่อปี พ.ศ. 2547	2
ภาพที่ 2	PCR amplification of the 5 virulence genes *; vcg-C, vvhA, CPS1, vvhA1* and *16s rRNA* in *V. vulnificus* biotype 2 (virulence strain).	20
ภาพที่ 3	PCR amplification of the 5 virulence genes ; *vcg-C, vvhA, CPS1, vvhA1* and *16s rRNA* in *Vibrio* sp. from shrimp hepatopancrease, water shrimp pond and oyster.	22
ภาพที่ 4	PCR amplification of the 3 virulence genes ; *vvhA, vvhA1* and *vcg-C* in *Vibrio* sp. from shrimp hepatopancrease, water shrimp pond and oyster.	23
ภาพที่ 5	PCR amplification of the *vvhA1* gene (813 bp) in *V. vulnificus* strain received from NICA, Thailand.	26

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ES503LGS9 = ปลากะพงขาวจากภาคตะวันออก สถานีที่ 5 ตัวที่ 3 จากอวัยวะตับ โคโลนีเขียวเล็กที่ 9

FKC = Formalin-killed whole cell

LD50 = เป็นค่าที่บ่งบอกความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลากะพงขาวทดลองตาย 50% ในระยะเวลาหนึ่ง

ODC = ornithine decarboxylase

OMV = Outer membrane vaccine

PCR = Polymerase Chain Reaction

SS404KGS8 = ปลากะพงขาวจากภาคใต้ สถานีที่ 4 ตัวที่ 4 จากอวัยวะไต โคโลนีเขียวเล็กที่ 8

VVB = *Vibrio vulnificus* Burapha

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลากะพงขาวและปลากะรัง เป็นปลาน้ำกร่อยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดที่มีบริเวณชายฝั่งติดกับทะเล จะมีการเลี้ยงปลาเหล่านี้ค่อนข้างหนาแน่น โดยรูปแบบการเลี้ยงปลาทั้งสองชนิดนี้มีทั้งการเลี้ยงในกระชัง และบ่อดิน ซึ่งปัญหาหนึ่งที่ผู้เลี้ยงประสบตลอดมาก็คือ การเกิดโรคระบาดของแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต จากรายงานของประดิษฐ์และคณะ (2530) พบว่าปัญหาการเกิดโรคของปลากะพงขาว ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย ได้แก่ *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pasteurella* sp., *Pseudomanas* sp. และ *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* ซึ่งรายงานพบครั้งแรกที่มีอุบัติการณ์ก่อโรคในปลากะพงขาว เนื่องจากปัญหาการเคลื่อนย้ายปลาจากแหล่งเลี้ยงหนึ่งไปอีกแห่งในจังหวัดชลบุรี (Kanchanopas-Barnette, et.al., 2009) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ วีรวรรณ (2535) ที่รายงานการพบแบคทีเรียสกุล *Vibrio* 5 ชนิด และ *Aeromonas hydrophila* ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังด้วย รวมทั้งมีรายงานการพบ *Flexibacter maritimus* ในปลากะพงขาวเช่นกัน (เยาวนิตย์ และจีรนันท์, 2545) ข้อมูลการระบาดของโรคแบคทีเรียในปลากะพงขาวและปลากะรังจากหน่วยงานของกรมประมงชายฝั่งยังไม่มีระบบจัดเก็บ ในปัจจุบัน พบว่า *Vibrio vulnificus* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการตายของปลาทั้ง 2 ชนิด อันเนื่องจากมีการคัดขนาดลูกปลาช่วงอนุบาลและระหว่างเลี้ยงช่วงขนาดเล็ก fry, fingerling และ juvenile เพื่อลดปัญหาการกินกันเอง การรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มักจะใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นที่รู้กันว่ายาเหล่านี้อาจตกค้างในเนื้อปลา และสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อผู้บริโภค และห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ อีกทั้งแบคทีเรียอาจพัฒนาสายพันธุ์ให้สามารถต้านทานยาชนิดนั้น ๆ ได้ วิธีการหนึ่งที่จะลดปัญหานี้ คือการผลิตวัคซีนต้านแบคทีเรีย

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนในประเทศไทย พบว่ามีการผลิตวัคซีนต้านเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิล ปลาทับทิม (ธารทิพย์และคณะ 2553) แต่สำหรับการผลิตวัคซีน เพื่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* มีเพียงการศึกษาของ วีณา (2539) การพัฒนาวัคซีนแบบ monovalent and bivalent เพื่อต้านแบคทีเรีย *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* และ *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคในปลากะพงขาว (Sasmita, et.al, 2009) และผู้วิจัยได้ศึกษาการตายของปลากะพงขาว สาเหตุจากการเป็นโรคจาก *V. vulnificus* พบทั้ง biotype1 และ biotype2 (ปภาศิริ และศิริโฉม 2549) ปลากะพงขาวมีลักษณะบาดแผลตกเลือดตามข้างตัว ส่วนหาง ส่วนหัว ผิวหนังเปิด และเกล็ดหลุด ดังภาพที่ 1 อันเนื่องจากมีการคัดขนาดลูกปลากะพงขาวเพื่อลดปัญหาการกินกันเอง ซึ่งในงานวิจัยได้หาแนวทางการผลิตวัคซีนต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *V. vulnificus* ในปลากะพงขาว โดยมีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนชนิด Formalin-killed whole cell (FKC) และ outer membrane vaccine (OMV) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่าวัคซีนชนิด FKC มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดี มีความเป็นไปได้ที่จะผลิตออกใช้ในเชิงพาณิชย์ และจากการทดลองนี้ทำให้ได้องค์ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจาก

V. vulnificus แต่ยังไม่ได้พัฒนาในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะใช้องค์ความรู้ดังกล่าวมาพัฒนาต่อยอด เพื่อให้สามารถนำวัคซีนชนิดนี้ไปใช้ได้จริง แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาของงานทดลองดังกล่าวผ่านมาแล้วสิบปี งานวิจัยนี้จึงต้องเริ่มต้นใหม่ตั้งแต่ศึกษาเชื้อ จำแนกเชื้อ และความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* ซึ่งจะมีการรวบรวมเชื้อเพิ่มจากทั้ง 3 ภูมิภาค และศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนทั้งในระดับการทดลองจำลองและระดับฟาร์ม ตลอดจนรูปแบบการผลิตและการเก็บรักษาวัคซีน ซึ่งประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยนี้จะสามารถนำวัคซีนที่ผลิตได้นี้บริการวิชาการสู่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลา ได้อย่างเป็นรูปธรรมเชิงพาณิชย์ที่มีบริษัทตัวแทนสามารถจัดจำหน่าย การหาแนวทางลดอัตราการตายของปลากะพงขาว และปลากะรังที่เกิดจากการระบาดของแบคทีเรีย ทำให้ลดปัญหาความยากจนของเกษตรกรเลี้ยงปลาและมีศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตทางการประมง

ภาพที่ 1 ปลากะพงขาว (2.5-3.5 นิ้ว) ที่เป็นโรคจาก *V. vulnificus* พบทั้ง biotype1 และ biotype2 มีลักษณะบาดแผลตกเลือดตามข้างตัว ส่วนหาง ส่วนหัว ผิวหนังเปิด และเกล็ดหลุด ระบาดเมื่อปี พ.ศ. 2547

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไปในการศึกษาคือ ผลิตวัคซีนชนิด Formalin killed cell (FKC) จากแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในฟาร์มของเกษตรกร และผลิตใช้ในเชิงพาณิชย์

วัตถุประสงค์หลักคือ

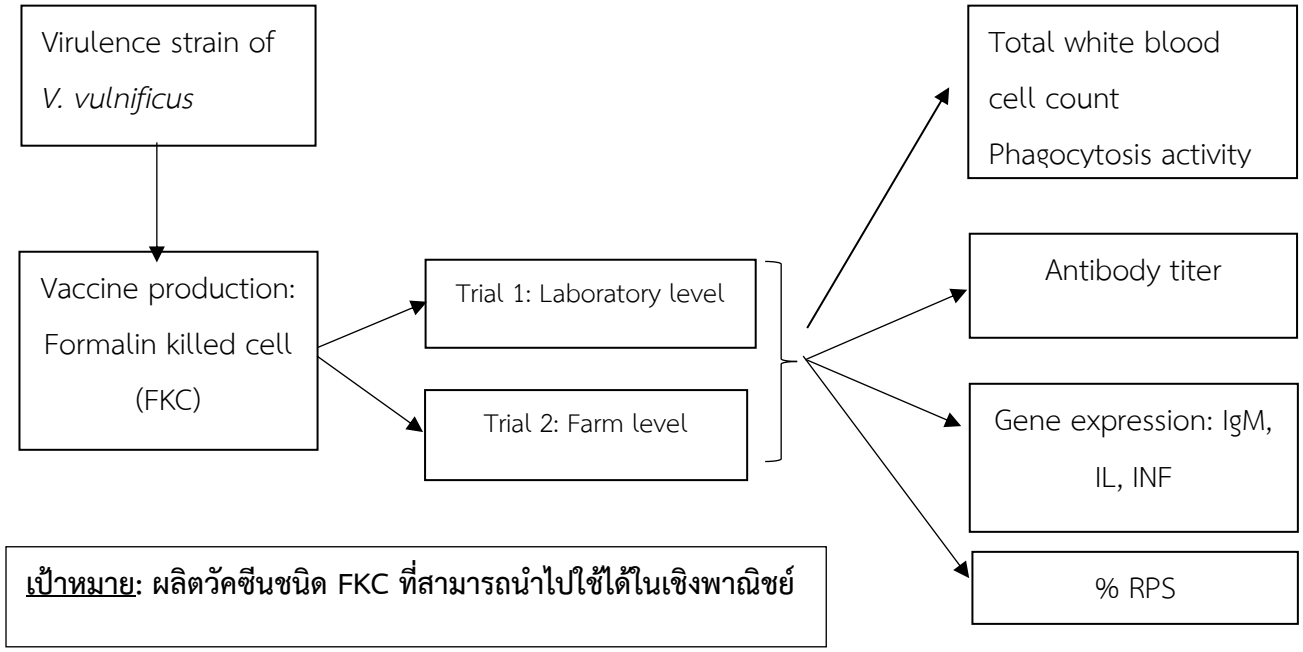
1. เพื่อสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรีย *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวและปลากะรังที่เลี้ยงในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย
2. เพื่อเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่มีความรุนแรงในการผลิตวัคซีนชนิด Formalin killed cell (FKC) จาก *V. vulnificus* ที่สามารถก่อโรคในปลาทะเลเศรษฐกิจ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรีย จำแนกชนิด ที่มีความรุนแรงของโรคจากปลากะพงขาวและปลากะรัง

2. เลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่มีความรุนแรงในการผลิตวัคซีนชนิด FKC จากเชื้อก่อโรค *V. vulnificus*

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



บทที่ 2 เอกสารงานวิจัย

ความสำคัญของปลาทะเลเศรษฐกิจในประเทศไทย โดยเฉพาะปลากะพงขาวและปลากะรัง เป็นปลาทะเลที่นิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางและเป็นปลาที่มีรสชาติดี เนื้อสีขาวและมีความนุ่มหลังปรุงเป็นอาหารทุกประเภท สำหรับปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อย สามารถเลี้ยงได้ในสภาพน้ำจืดกร่อยและเค็ม แต่การผสมพันธ์และอนุบาลลูกปลา fry and fingerling ต้องใช้ความเค็มประมาณ 15 – 30 ส่วนในพันส่วน (ppt) และสามารถลดหรือเพิ่มความเค็มเมื่อเลี้ยงระยะ juvenile ส่วนปลากะรังเป็นปลาน้ำเค็ม การผสมพันธ์และอนุบาลลูกปลา fry and fingerling และระยะ juvenile ต้องใช้น้ำเค็มระดับเดียวกับน้ำทะเล 30 – 32 ppt ดังนั้นปลาทั้งสองชนิดมีการเลี้ยงตามชายฝั่งทะเลของหลายจังหวัดของประเทศไทย ชนิดใดสำคัญขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพใกล้ปากแม่น้ำ หรือ สามารถหาน้ำความเค็มที่ต้องการได้ รวมทั้งการหาลูกพันธุ์ปลาได้ ปลากะพงขาวประสบความสำเร็จมีการเพาะพันธุ์ได้ แต่ลูกปลากะรังยังต้องจับจากธรรมชาติในทะเล ลูกปลาทั้งสองชนิดสามารถอนุบาลได้ทั้งในบ่อคอนกรีตและบ่อดิน หรือกระชังไนล่อนในบ่อ ส่วนการเลี้ยงปลาโตเป็นปลาเนื้อสามารถเลี้ยงได้ทั้งในบ่อดินและกระชัง (นิยมมากกว่า) ในปัจจุบันราคาปลากะรังยังสูงกว่าปลากะพงขาวในขนาดเดียวกัน เนื่องจากปลากะพงขาวและปลากะรัง เป็นปลากินเนื้อ จึงใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเป็นเวลานาน เพื่อเป็นปลาขนาดนิยมขายในท้องตลาด 500 กรัม เรียกว่าปลาจาน แต่อาจเลี้ยงขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อแล่เป็นชิ้นเนื้อบริโภค อย่างไรก็ตามปลากะรังทั้งลูกปลาและปลาโตจะใช้เวลาเลี้ยงนานกว่าปลากะพงขาวในขนาดที่เท่ากัน (Pimoljinda,1993; Rungpantet al., http/nsgl.gso.url.edu/hawauw 94002-part6)

ฟาร์มและผลผลิตการเลี้ยงปลากะพงขาวและปลากะรัง ปลาทะเลทั้งสองชนิดนี้มีการเลี้ยงในเขตภาคตะวันออก (จังหวัดตราด จันทบุรี และระยอง) และฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และสตูล ส่วนเขตจังหวัดชายฝั่งอื่นๆจะเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นส่วนใหญ่ เมื่อคำนึงถึงตามพื้นที่การเลี้ยงปลากะพงขาวในภูมิภาคต่างๆ จะมีผลผลิตมากกว่าปลากะรัง ผลผลิตปลากะพงขาวทั้งประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเท่าตัวทุกๆ 3 ปี คือ จากปี พ.ศ. 2540, 2543 และ 2546 มีผลผลิต 4,090, 7,752 และ 12,229 ตัน ส่วนปลากะรังมีแนวโน้มในทำนองเดียวกัน มีผลผลิต 793, 1,332 และ 2,339 ตัน ตามลำดับ (สถิติฟาร์มเลี้ยงปลาน้ำกร่อย ประจำปี 2545 และ สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2546) ผลผลิตของปลาทั้งสองชนิดมีปัญหาในปีต่อๆ มา เพราะทั้งปลากะพงขาวและปลากะรังเริ่มมีผลผลิตในอัตราลดลง คือ ปี พ.ศ. 2549 และ 2554 มีผลผลิต 15,524 และ 16,157 ตัน ส่วนปลากะรังมีผลผลิต 2,822 และ 2,726 ตัน (สถิติการประมงทะเล 2549 สำรวจโดยวิธีการสุ่มตัวอย่าง และ สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2554) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลากะพงขาวให้ผลผลิตสัดส่วนในกระชังเป็นสองเท่าของบ่อดิน ส่วนปลากะรัง ผลผลิตสัดส่วนในกระชังเป็นแปดเท่าของบ่อดิน (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2554)

รูปแบบการเลี้ยงแบบคัดขนาดของระยะวัยอ่อนปลากับการเกิดโรคจากแบคทีเรีย จะมีรูปแบบการเลี้ยงเป็นสองระยะ คือระยะวัยอ่อน ทั้งปลากะพงขาวและปลากะรังจับจากธรรมชาติขนาด 2.0 – 2.5

เซนติเมตร ถูกเลี้ยงจนได้ขนาด 7.5 – 10.0 เซนติเมตร ก่อนปล่อยเลี้ยงเป็นขนาด juvenile ทั้งปลากะพงขาวและปลากะรัง เนื่องจากเป็นปลากินเนื้อ ระยะวัยอ่อนเลี้ยงในอัตราหนาแน่นสูงจึงสามารถกินกันเองได้ ทำให้ต้องคัดขนาดอย่างน้อยทุก 7 – 10 วัน การคัดขนาดด้วยเครื่องมือที่เป็นภาชนะเจาะรูขนาดต่างๆ ให้ปลาขนาดต่างๆ แยกจากกัน จึงเป็นขั้นตอนทำให้เกิดบาดแผลบนผิวหนังของลูกปลาได้ เป็นช่องทางให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายปลาได้อย่างรวดเร็ว ส่วนขนาด juvenile เลี้ยงให้เป็นขนาดโต (ปลาเนื้อ) ต่อไป ไม่มีการคัดขนาด จึงมีโอกาสเป็นโรคหรือการป่วยจากแบคทีเรียในอัตราต่ำกว่าระยะวัยอ่อน (Pimoljinda,1993; Rungpant et al., http/nsgl.gso.url.edu/hawauw 94002-part6) อาหารใช้สัตว์น้ำมีชีวิต ปลาเป็ด และอาหารเม็ด (ต้นทุนสูง) ประเภทอาหารนอกเหนือจากอาหารเม็ดที่ควบคุมคุณภาพได้ อาหารประเภทอื่นจะนำมาถึงการปนเปื้อนจากอาหาร รวมทั้ง ส่งเสริมให้แบคทีเรียเจริญเติบโตจากอาหารที่เหลือ เมื่อฟาร์มปลาใดมีปลาป่วยเป็นโรคจะมีการแพร่กระจายของเชื้อสู่ธรรมชาติ ไปยังฟาร์มอื่นๆ เนื่องจากไม่มีกฎระเบียบ การขึ้นทะเบียนฟาร์มปลาที่เป็นระบบ และแบ่งเขตของฟาร์มไปกำกับการเพาะเลี้ยงปลาทะเล ทำให้การกระจายของโรคแบคทีเรียเกิดได้อย่างง่าย ไม่สามารถควบคุมได้ โดยเฉพาะแหล่งบริเวณกระชังเลี้ยง จากปัญหาดังกล่าวกลยุทธการป้องกันโรคจากแบคทีเรียต่อการเลี้ยงปลากะพงขาวและปลากะรังจึงมีความสำคัญด้วยการให้วัคซีนทั้งในระยะวัยอ่อนที่มีการคัดขนาด และให้วัคซีนต่อเนื่องเมื่อเลี้ยงเป็นปลาเนื้อ และควรมีการสำรวจประเภทของฟาร์มปลาทะเลทั้งสองชนิดนี้กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียตามชายฝั่งภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อการกำกับควบคุมการระบาดจากเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มปลาตามชายฝั่งของประเทศไทย

คุณลักษณะและการจำแนกเชื้อ *V. vulnificus* โดยธรรมชาติเชื้อ *V. vulnificus* มีอยู่ทั่วไปในน้ำที่มีความเค็มและน้ำกร่อย คุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่งสั้นขนาดประมาณ 2 – 3 ไมโครเมตร สามารถเคลื่อนที่ได้โดยมี แฟลกเจลลา 1 เส้น เจริญเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิ 20 – 37 องศาเซลเซียส และพบที่ความเค็มได้ตั้งแต่ 1 – 34 ppt ซึ่งคุณสมบัติของเชื้อ *V. vulnificus* ต่างจากเชื้อ *Vibrio* sp. อื่นๆ คือสามารถหมัก lactose ได้ (Strom & Paranjipe, 2000) ค่า G + C ของ DNA คือ 45.7 – 47.8 Mole % (Tisen et al., 1982; Amaro et al., 1992) และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเกลือแกง 1 – 2 เปอร์เซ็นต์ เช่น Marine salt agar with blood (MSA-B) , Marine2216 agar (MA2216) , seawater agar, Tryptone soya agar (TSA) หรือ TCBS (ให้โคโลนีสีเขียวบนอาหาร) โดยจะมีโคโลนีขนาด 2 – 4 มิลลิเมตร ที่ 48 ชั่วโมง และได้มีการคิดค้นอาหารที่สามารถแยกเชื้อ *V. vulnificus* ได้โดยตรงคืออาหารเลี้ยงเชื้อชื่อ Cellobiose, polymyxin and Colistin (CPC) agar (Beller, 2004)

การจำแนกเชื้อ *V. vulnificus* สามารถจำแนกได้อย่างน้อยเป็น 2 biotype โดยมีความแตกต่างของแต่ละ biotype ตาม serological การทดสอบทางชีวเคมี และความจำเพาะต่อเจ้าบ้าน (Amaro&Biosca, 1995)

- *V. vulnificus* Biotype 1 พบทั่วไปในน้ำทะเล และแหล่งน้ำกร่อย ตามตะกอนดิน แพลงก์ตอน และสามารถแยกได้จากปลา หอย ปู นกทะเล และตรวจพบในอาหารทะเล (Beller, 2004) ซึ่งเป็น Primary septicemia ในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม Fouz et al. (2001) พบว่าปลานิลสามารถติดเชื้อ *V. vulnificus*

biotype1 ได้ ปภาศิริและ ศิริโฉม (2549) พบเชื้อ *V. vulnificus* biotype1 ในปลากะพงขาวป่วย อาการป่วยของปลาจะแสดงบาดแผลและตกเลือดบริเวณตามลำตัว

- *V. vulnificus* Biotype 2 พบในสัตว์น้ำ เช่น ปลาไหล ปลากะพงขาว เป็นต้น โดยสามารถแยกเชื้อได้จากเหงือก เมือก ม้ามและไต ของปลาที่ติดเชื้อ (Beller, 2004) เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในสัตว์น้ำโดยมีการระบาดและสร้างความเสียหายให้แก่ธุรกิจสัตว์น้ำทำให้มีการตายของสัตว์น้ำในอัตราที่สูง เช่น ปลาไหล กุ้ง ปลากะพง และสามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ (Opportunistic pathogen) จากการที่มนุษย์มีบาดแผลแล้วไปสัมผัสสัตว์น้ำที่มีการติดเชื้อ *V. vulnificus* หรือน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ปภาศิริและ ศิริโฉม (2549) พบเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 ในปลากะพงขาวป่วย

ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *V. vulnificus* ในปลา ลักษณะและกลไกในการทำให้เกิดโรคของ *V. vulnificus* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางกระแสเลือดอย่างรุนแรง และการแพร่ระบาดของโรคในปลา เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* เช่น การผลิตเอนไซม์ และสารพิษที่ทำการย่อย (Degradative toxin and enzymes) ความสามารถในการดึงธาตุเหล็กจากเจ้าบ้าน ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของ *V. vulnificus* และความต้านทานของแบคทีเรียต่อซีรัมของเจ้าบ้าน (Strom and Paranjpye, 2002;) การศึกษาของ Hor and Che (2013) รายงานว่า *V. vulnificus* ก่อโรคติดเชื้อในมนุษย์และปลาไหล จำแนก Cytotoxin ออกเป็น 2 ชนิด คือ *VvhA* and MARTXVv แต่ยังมีปัญหาการตอบสนองการก่อโรคในหนูทดลอง เพื่อให้ทราบหน้าที่และกลไกทาง cytotoxicity โดยมีข้อเสนอแนะให้ศึกษา cytotoxin มีหน้าที่ป้องกันอย่างไรเพื่อให้ *V. vulnificus* อยู่รอดบริเวณของเจ้าบ้านในช่วง primary infection และต้านการจับกินเชื้อของเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด และอวัยวะภายใน กลไลของ cytotoxin ในการ block การจับกินเชื้อของเม็ดเลือดขาวและทำให้เม็ดเลือดแตก

ประสิทธิภาพและระบบภูมิคุ้มกันของปลาหลังรับวัคซีนแบบต่าง ๆ ต่อการต้านแบคทีเรีย *V. vulnificus* งานวิจัยประสิทธิภาพของการให้วัคซีนแบบต่างๆ ที่ใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. vulnificus* ในปลาได้ผลการศึกษาในปลา Flounder โดยการให้วัคซีน 2 แบบคือ uncoated heat killed bacterin (UHKB) และ enteric coated heat killed bacterin (ECHB) โดยการฉีดเข้าช่องท้องและการให้ทางปาก พบว่าวัคซีนชนิด UHKB สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา Founder ได้ดีกว่าวัคซีนแบบ ECHB (Park et al., 2001) ศึกษาการให้วัคซีน 4 แบบ คือ โดยการฉีดเข้าช่องท้อง, การกิน, การแช่ และทางทวาร จากการทดลองพบว่า การให้วัคซีนโดยวิธีการกินและให้ทางช่องทวาร มีประสิทธิภาพมากที่สุดซึ่งพบว่าปลาไหลมีอัตราการตายน้อยที่สุดคือ น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และการให้โดยวิธีการแช่พบอัตราการตายของปลาไหลมากที่สุดคือ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบการแช่ร่วมกับให้วัคซีนโดยการให้ทางปากในวันที่ 4, 11, 15, 30 และ หลังจาก 60 วัน ทำการเก็บส่วนของ ซีรัม เมือก และน้ำดีของปลาไหลมาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่าการให้วัคซีนด้วยการผสมอาหารแก่ปลาไหลที่เคยได้รับ วัคซีนโดยการแช่มาแล้วมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอนติบอดี และปลาไหลมีความต้านทาน

ต่อเชื้อได้ดี (Gassent et al., 2004) ให้วัคซีนต้านเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 โดยการแช่ในฟาร์มปลาไหล ลูกปลาไหลขนาด 0.3 กรัมของประเทศสเปน และศึกษาการตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังจากให้วัคซีน 6 เดือน ผลสรุปได้ว่า วัคซีนต้านเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 สามารถป้องกันการติดเชื้อในปลาไหลได้ มีอัตราการรอด 62 – 86 เปอร์เซ็นต์ และปลาไหลที่ได้รับวัคซีนมี antibody titer ที่ 200 ส่วนปลาไหลที่ไม่ได้รับวัคซีนมีระดับ antibody titre น้อยกว่า 2 (Fouz et al., 2001)

ส่วนในประเทศไทยมีการศึกษาน้อยมากในการผลิตวัคซีนของแบคทีเรีย *V. vulnificus* ต่อปลาทะเล มีการศึกษาของปภาศิริ และ ศิริโฉม (2549) ใช้ bivalent vaccine แบบ whole FKC ของแบคทีเรีย *V. vulnificus* biotype 1 and 2 ต่อปลากะพงขาวระยะ fingerling พบการตอบสนองที่ promise ของ protein immunogen จาก vaccinated fish และมีการทดลองฉีดวัคซีนในปลากะพงขาวขนาด juvenile เลี้ยงในกระชังปลาที่แม่น้ำบางปะกงได้ค่า RPS จำนวน 100% และพบว่าในซีรัมส่วนใหญ่ของปลากะพงขาวที่ได้รับ Formalin-killed cell vaccine ของแบคทีเรีย *V. vulnificus* ตอบสนองสร้าง protein ที่มีมวลโมเลกุลขนาด 17 kDa

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้วัคซีนป้องกันโรค ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในปลาชนิดต่างๆการควบคุมและการรักษาโรคเนื่องจากแบคทีเรียในปลาด้วยยาปฏิชีวนะในปัจจุบันเป็นไปได้ยาก เนื่องจากการออกกฎของกรมประมงอนุญาตให้ประเภทของยาที่ใช้ในฟาร์มปลาได้น้อยลง เนื่องจากปัญหาสารตกค้างที่กระทบต่อการส่งออก อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญและมีการขยายตัวเพิ่มทุกๆปี เนื่องจากความต้องการการบริโภคสัตว์น้ำสูงขึ้นในขณะที่ผลผลิตสัตว์น้ำที่จับได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติลดลง การพัฒนาการเลี้ยงปลาแบบหนาแน่นรูปแบบต่างๆ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น แต่ทำให้ปลาเกิดการเครียดและติดโรคได้ง่าย จากปัญหาดังกล่าวนำไปสู่การคิดค้นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะด้วยการให้วัคซีน ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสัตว์น้ำมากมายในต่างประเทศ เช่น การทำวัคซีนป้องกันโรคในปลาแซลมอน ได้แก่ วัคซีนป้องกันเชื้อที่เกิดจาก Vibriosis, Enteric redmount (ERM) และ Yersinosis เป็นต้น วัคซีนเหล่านี้เป็นที่ยอมรับของตลาดมานานแล้ว ส่วนวัคซีนป้องกันโรคในปลาเขตร้อนยังไม่มีวัคซีนที่นำมาใช้ในเชิงพาณิชย์มากนัก (ชนกันต์, 2543) ปัจจุบันมีการผลิตวัคซีนใช้เองในฟาร์มปลาของบริษัทใหญ่ๆ ของประเทศไทยเท่านั้น เช่น บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารจำกัด (มหาชน) ผลิตวัคซีนจากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila, Streptococcus agalactiae, Edwardsiella tarda* เพื่อใช้ในปลานิล ปลาทับทิม ปลาดุก และปลาสวาย งานวิจัยการพัฒนาวัคซีนเพื่อแก้ปัญหาการตายลูกปลากะพงขาว ในฟาร์มอนุบาล จังหวัดชลบุรี วัคซีนต้านแบคทีเรีย *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* และ *Vibrio harveyi* ถูกผลิตแบบ monovalent และ bivalent ชนิด FKC ผลวิจัยพบว่าค่า innate immunity พารามิเตอร์ phagocytosis activity และ respiratory burst มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ ในช่วงการทดลอง 35 วัน (Sasmita, et.al, 2009)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวและปลากะรัง ตามระดับภูมิภาค

วางแผนการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวและปลากะรัง โดยทำการติดต่อประสานงานเข้าเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่มีการเลี้ยงปลากะพงขาวและปลากะรังในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคใต้ฝั่งอ่าวไทย ภาคใต้ฝั่งอันดามัน และภาคตะวันออก

2. Isolates เชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวและปลากะรัง ตามระดับภูมิภาค

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็งและการเก็บรักษา

2.1.1 ใช้อาหาร selective media ชนิด TCBS แยกเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* จากอวัยวะตับและไตปลากะพงขาวและปลากะรัง (nursing fry and juvenile) ทั้งสภาพปกติและป่วยที่เลี้ยงในฟาร์มทั้งแบบกระชัง บ่อปูนและบ่อดินจากทั้ง 3 ภูมิภาคของประเทศไทย

2.1.2 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและไต แช่ในแอลกอฮอล์ 95% สำหรับการยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1.3 ใช้สายพันธุ์แบคทีเรียจากแหล่งอื่น ๆ เปรียบเทียบและเป็นชุดควบคุม โดยในการวิจัยนี้ได้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Vibrio spp*. จำนวน 10 isolated จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 6 จังหวัดสงขลา (NICA)

2.1.4 เก็บรักษาทุก isolates ที่จำแนกและยืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. vulnificus* โดยให้เจริญในอาหารเหลว TSB (adding 1.5% NaCl) และเก็บเซลล์แบคทีเรียร่วมกับ Glycerol 15 % เก็บไว้ในสภาพแช่แข็ง (Liquid Nitrogen and ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้ในงานยืนยันด้วยเทคนิคพีซีอาร์และเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะ เพื่อการผลิตวัคซีนต่อไป

2.1.5 เก็บรักษา isolates ที่จำแนกและยืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. vulnificus* ยืนยันโดยเทคนิคแอนติบอดีจำเพาะและเทคนิค PCR โดยให้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (113 อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120) ทำการเก็บรักษาแบบถาวรด้วยวิธีแข็งแห้ง (Lyophilization) เฉพาะสายพันธุ์รุนแรงก่อโรคเพื่อใช้ผลิตวัคซีน ในปีที่สอง

3. การจำแนกยืนยันชนิด ของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus*

นำเชื้อแบคทีเรียจากปลากะพงขาวและปลากะรัง โคโลนีสีเขียวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS นำมาจำแนกยืนยันชนิด โดย

3.1 เทคนิคทางแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับเชื้อ *V. vulnificus*

โคโลนีสีเขียวที่เจริญบนอาหารวุ้นแข็ง TCBS ถูกสุ่มเลือก 10 โคโลนีจากแต่ละจานเลี้ยงเชื้อของปลาแต่ละตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบทางแอนติบอดี โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. โคโลนีสีเขียวที่สุ่มเลือกทุกโคโลนี ถูกแบ่งครึ่งโคโลนีผสมกับ 1% Tween80 in Tris pH 9.3 จากนั้นนำไปฆ่าด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส 30 นาที และเมื่อผลการทดสอบแอนติบอดียืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. vulnificus* แล้ว ครึ่งโคโลนีที่เหลือจะเก็บรักษา โดยให้เจริญในอาหารเหลว TSB (adding 1.5% NaCl) ทำการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียร่วมกับ Glycerol 15 % ไว้ในสภาพแช่แข็ง (Liquid Nitrogen and ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้ในการยืนยันเทคนิค PCR และการผลิตวัคซีนต่อไป

2. หยดตัวอย่างแบคทีเรียที่ฆ่าด้วยความร้อน ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงกลางช่องกระดาษไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ 0.5% H_2O_2 in PBS 5 นาที ล้างด้วย PBS-TW20 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จึงนำมาแช่ด้วย 5% นมปราศจากไขมัน 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-TW20 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3. นำไปบ่มในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน ด้วยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. vulnificus* VVB Burapha (Longyant, et al., 2008) เจือจาง 1:250 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4. ล้างด้วย PBS-TW 20 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

5. นำไปบ่มใน Goat anti-mouse IgG (GAM-HRP) เจือจาง 1:1000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

6. ล้างด้วย PBS-TW 20 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

7. แช่ในสารละลายสับสเตรท (substrate) (DAB 7 กรัม, H_2O_2 25 ไมโครลิตร, $CoCl_2$ 100 ไมโครลิตร, PBS 20 มิลลิลิตร) สังเกตจุดสีเข้มที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีจับกับแอนติเจน เทคนิคนี้เป็นผลงานของผู้วิจัยมาก่อน เป็นเทคนิคที่ใช้ง่าย รวดเร็ว สะดวก ประหยัด ใช้ได้กับจำนวน isolates มากๆ เทคนิคนี้ใช้จำแนกแบคทีเรียว่าเป็น *V. vulnificus* แต่ไม่สามารถแยกเป็น biotype ได้ เนื่องจากแอนติบอดีมีความจำเพาะกับทั้ง biotype 1 and 2 (ผลงานจากการทดสอบมาก่อนปีพ.ศ. 2549)

3.2 จำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของเชื้อ

ปฏิกริยา Indole test เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* แต่ละ biotype ในอาหาร 1% tryptone + 1.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 - 48 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent สังเกตวงแหวนที่ด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผลบวกจะเห็นเป็นวงแหวนสีแดงด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และผลลบจะไม่เห็นวงแหวนสีแดง เชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ให้ผลบวก และ biotype 2 ให้ผลลบ (Angelo and Kaysner, 2009)

Ornithine decarboxylase test (อาหาร Decaboxylase Medium Ornithine Modified) เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ornithine decarboxylase (ODC) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ L-ornithine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH เพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสี indicator ให้เป็นสีม่วง ที่ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ให้ผลบวก คือ ที่ 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และจะเปลี่ยนกลับไปเป็นสีม่วง ที่ 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียที่ให้ผลลบ คือ หากอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ที่ 24 ชั่วโมง แต่ไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วง ที่ 48 ชั่วโมง หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีที่ 24 ชั่วโมง เชื้อ *V. vulnificus* biotype 1 ให้ผลบวก และ biotype 2 ให้ผลลบ

การทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดงในอาหาร Blood agar บ่งชี้ความรุนแรงของเชื้อ รูปแบบการทำลายเม็ดเลือดแดง *V. vulnificus* ของ biotype 1 มีการทำลายเม็ดเลือดแบบ β-haemolytic และ biotype 2 เป็นชนิด α– haemolytic

3.3 ศึกษา full sequence ของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* สายพันธุ์ก่อโรคในปลา และออกแบบไพรเมอร์

ได้ส่งเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* Biotype 2 ให้ทาง Thailand Bioresource Research Center (TBRC) หาบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Single strand 16S rDNA sequencing เพื่อนำมาออกแบบไพร์เมอร์

4. การยืนยันเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA) จากเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการ boiling method (Boiling method for DNA extraction) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB Burapha ในอาหารเหลว TSB +1.5% NaCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายใส่หลอด micro centrifuge tube ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง และล้างตะกอนอีกครั้งด้วยน้ำ sterile ultrapure water นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ sterile ultrapure water ปริมาณ 100-200 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับขนาดตะกอน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและหลั่งสารพันธุกรรมออกมา จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 10 นาที และ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสในหลอดใหม่ และเก็บไว้ที่ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำพีซีอาร์ต่อไป (Hervio-Heath et al., 2002)

4.2 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA) จากเนื้อเยื่อตับและไตปลากะพงขาวและปลากะรัง โดยใช้ (TIANamp Genomic DNA Kit) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

ตัดเนื้อเยื่อประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่หลอด micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer GA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นบดเนื้อเยื่อให้ละเอียด เติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex หลังจากนั้นบ่ม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และเติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไป vortex อีกครั้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยทุกๆ 10 นาทีจะต้อง inverted ตัวอย่าง 2-3 ครั้ง หลังจาก 30 นาทีจะสังเกตได้ว่าตัวอย่างเริ่มใสให้เติม buffer GB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไป

vortex อีกครั้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไป vortex และ centrifuge ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสใส่ column นำไป centrifuge ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใส่ทิ้ง เติม buffer GD ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไป centrifuge ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้งหลังจากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนการล้างตะกอน โดยเติม buffer PW ปริมาณ 600 ไมโครลิตร นำไป centrifuge ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใส่ทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนเดิม โดยนำไป centrifuge ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้าย spin column (ส่วนบนของ column) ไปประกอบกับหลอด micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที และนำไป centrifuge ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำไปวัดค่าดูกลืนแสง (260,280) เพื่อหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.3 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอต้นแบบมาตรวจหาเชื้อ *V .vulnificus* VVB Burapha ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *vvhA1* (ตารางที่ 1) จากนั้นเตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยผสมส่วนประกอบต่างๆ ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) นำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR Thermocycler (T100^{tM}) โดยกำหนดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ตารางที่ 3) เตรียม PCR mixture ปริมาณตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Go taq green® (Promega, USA.) 12.5 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer 10 pmol อย่างละ 2 ไมโครลิตร reaction ละ1 คู่ น้ำกลั่น 6.5 ไมโครลิตร และ DNA template 2 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ตามโปรแกรม preheating 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที ต่อจากนั้นเป็น final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จนเสร็จ จากนั้นตรวจหาแถบของ PCR product โดยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ 100 volt ประมาณ 30 นาที อ่านผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation (GelDoc–It®, USA.)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *V .vulnificus* Biotype 2 ด้วยเทคนิค PCR

Targer gene	Primer	Sequence (5'-3')	PCR Product	Reference
vvhA1	F	AGATTAAGTGTGTGTTGCACAAGCGGTG	813 bp	Senoh et al. (2005)
	R	ACCGAAAACAGCGCTGAAGGAAGAACGGTA		

ตารางที่ 2 ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR

Components	Volume/reaction(ไมโครลิตร)
Distilled water clave	17.75
10x PCR buffer	2.5
10 mM dNTP mixture	0.5
25 mM มิลลิกรัมCl_2	0.75
Taq DNA Polymerase (5 U/ไมโครลิตร)	0.5
Primer F 10 µM	0.5
Primer R 10 µM	0.5
DNA template (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2
Total	25

ตารางที่ 3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Process (min)	T(°C)	Time	cycle
Initinal denaturation	95	5 min	1
Denaturation	95	30 sec	30
Annealing	62	30 sec	
Extension	72	90 sec	1
Final extension	72	5 min	

5. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* (Challenge Test)

5.1 คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียเพื่อเป็นตัวแทนในแต่ละภูมิภาค

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ถูกจำแนกยืนยันด้วยเทคนิคแอนติบอดีจำเพาะ Immunodot Blotting ร่วมกับเทคนิคทางชีวเคมี และเทคนิค PCR แยกได้จากอวัยวะตับและไตปลากะพงขาวและปลากะรัง ซึ่งพบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* เฉพาะในปลากะพงขาวเท่านั้น และพบจากตัวแทนในภูมิภาคตะวันออกจังหวัดจันทบุรีเท่านั้น และจะทำการเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB Burapha (คาดว่าเป็น biotype 2 จากเทคนิคแอนติบอดีจำเพาะ) สายพันธุ์จากมหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี เปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ได้จากปลากะพงขาวให้เป็นตัวแทน

จากภาคใต้ จังหวัดสตูล รหัส SS404KGS8 (unkown sp.) และตัวแทนจากภาคตะวันออก จังหวัดฉะเชิงเทรา รหัส ES503LGS9

5.2 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย (colony forming unit) และการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB Burapha ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB + 1.5% NaCl 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย (colony forming unit) โดยทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียใน 1.5 % น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ที่ความเข้มข้น $10^{-2} – 10^{-8}$ จากนั้นดูดตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA + 1.5% NaCl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จึงทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เนื่องจากต้องการทดสอบเชื้อแบคทีเรียโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรียในความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ คือ $1 \times 10^2 – 10^8$ CFU/มิลลิลิตร จำเป็นต้องเตรียมความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อให้ได้ปริมาณที่ต้องการ คือ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร เพื่อที่จะนำไปฉีด challenge ปลากะพงขาวทดลอง duplicate ละ 0.5 มิลลิลิตร และมีการทดสอบเชื้อแบคทีเรียเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยเทคนิคแอนติบอดีทุกครั้งในการเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อนการทดลอง

5.3 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* โดยการฉีดทดลองในปลากะพงขาว

เตรียมปลากะพงขาวขนาด 3 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 8-10 กรัม จำนวนไม่น้อยกว่า 640 ตัว จะถูกแบ่งออกเป็น 8 ชุดการทดลองตามระดับความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรีย $1 \times 10^2 – 10^8$ CFU/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม ชุดการทดลองละ 10 ตัว แต่ละชุดทำ 2 ซ้ำ จากนั้นฉีดเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต่อปลากะพงขาว 1 ตัว บริเวณช่องท้องของปลากะพงขาว ฉีดจนครบตามระดับความเข้มข้น ส่วนปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมฉีดด้วย 1.5% น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สังเกตและบันทึกผลการทดลองที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง หลังจากฉีดทดสอบ

5.4 บันทึกผลการตายของปลากะพงขาวหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย ระยะเวลา 5 วัน (Observe mortality) และการคำนวณค่า LD_{50}

การตายของปลากะพงขาวหลังฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จนครบระยะเวลา 5 วัน จะถูกบันทึกผลเพื่อประเมินอัตราการตาย ปลากะพงขาวทดลองที่ตายจะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีทุกครั้งเพื่อยืนยันการพบเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยเทคนิค Immunodot Blotting

การคำนวณค่า LD50 เป็นค่าที่บ่งบอกความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลากะพงขาวทดลองตาย 50% ในระยะเวลาหนึ่ง จะคำนวณโดยใช้สมการความสัมพันธ์ linear regression ระหว่างความเข้มข้น

ของเชื้อแบคทีเรีย 1 x 10^2 – 10^8 CFU/มิลลิลิตร กับ เปอร์เซ็นต์การตายของปลากะพงขาวในระยะเวลา 24 – 120 ชั่วโมง

บทที่ 4 ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวและปลากะรัง ตามระดับภูมิภาค

เลือกจังหวัดที่มีการเลี้ยงมากที่สุดในแต่ละภูมิภาค ได้แก่ ภาคใต้ฝั่งอ่าวไทย จำนวน 2 ฟาร์ม จากจังหวัดสงขลา เป็นการเลี้ยงแบบกระชัง ภาคใต้ฝั่งอันดามัน จำนวน 9 ฟาร์ม จากจังหวัดสตูล, ตรัง, กระบี่, พังงา และภูเก็ต เป็นการเลี้ยงแบบกระชัง (แสดงดังภาคผนวก ตารางที่ 1) และภาคตะวันออก จำนวน 10 ฟาร์ม จากจังหวัดฉะเชิงเทรา และชลบุรี เป็นการเลี้ยงแบบกระชัง บ่อปูน และบ่อดิน และจากจังหวัดจันทบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม เป็นการเลี้ยงแบบกระชัง (แสดงดังภาคผนวก ตารางที่ 2)

2. Isolates เชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ตามระดับภูมิภาค ในปลากะพงขาวและปลากะรัง

อาหาร selective media ชนิด TCBS แยกเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* จากอวัยวะตับและไตปลากะพงขาวและปลากะรัง (nursing fry and juvenile) ทั้งสภาพปกติและป่วย ที่เลี้ยงในฟาร์มทั้งแบบกระชัง บ่อปูนและบ่อดินจากทั้ง 3 ภูมิภาคของประเทศไทย พบโคโลนีสีเขียวทั้งหมด 3,804 โคโลนี (จากภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยและภาคใต้ฝั่งอันดามัน 3,205 โคโลนี ภาคตะวันออก 599 โคโลนี) (แสดงดังภาคผนวก ตารางที่ 3)

3. การจำแนกยืนยันชนิดและ biotype ของเชื้อ *V. vulnificus*

3.1 จำแนกยืนยันชนิดโดยเทคนิคแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับเชื้อ *V. vulnificus*

โคโลนีสีเขียวที่เจริญบนอาหารวุ้นแข็ง TCBS ถูกสุ่มเลือก 10 โคโลนีจากแต่ละจานเลี้ยงเชื้อของปลาแต่ละตัวอย่าง ต่อมาจะถูกจำแนกเบื้องต้นว่าเป็น *V. vulnificus* ด้วยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. vulnificus* (ความร่วมมือระหว่าง ไพศาล สิทธิกรกุล และศิวพร ลงยันต์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และปภาศิริ บาร์เนท มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปี พ.ศ. 2549) เทคนิคแอนติบอดีจำเพาะในการศึกษาครั้งนี้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี VVB158/7 และโมโนโคลนอลแอนติบอดี VV20D1 ซึ่งแอนติบอดี VVB158/7 เป็นแอนติบอดีมีความจำเพาะกับ biotype 2 และจับได้บางส่วนกับ biotype 1 ส่วนแอนติบอดี VV20D1 จำเพาะกับทั้ง biotype 1 และ 2 ผลการจำแนกยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ด้วยเทคนิคแอนติบอดี ดังนี้

3.1.1 จำแนกโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS ที่แยกได้จากอวัยวะตับและไตของทั้งปลากะพงขาวและปลากะรัง สุ่มเก็บในตัวอย่างทั้งในปลาสุขภาพดีและปลาป่วยจากภูมิภาคต่างๆ พบว่าจากโคโลนีสีเขียวที่ถูกสุ่มเลือกทั้งหมด 865 โคโลนีที่แยกจากตับและไตปลากะพงและปลากะรังภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยและภาคใต้ฝั่งอันดามัน ผลการทดสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดี Immunodot Blotting ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

V. vulnificus ส่วนแบคทีเรียโคโลนีสีเขียว 207 โคโลนีที่แยกจากตับและไตปลากะพงขาวภาคตะวันออก ผลการทดสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดี Immunodot Blotting พบ 6 isolate (คิดเป็น 2.9%) ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดี ได้แก่ปลากะพงขาวเลี้ยงในกระชังจากจังหวัดฉะเชิงเทรา พบจำนวน 2 isolate และจากปลากะพงขาวเลี้ยงในบ่อดินและกระชัง จากจังหวัดจันทบุรี จำนวน 4 isolate มีข้อสังเกตคือตรวจพบได้จากปลากะพงขาวที่กำลังป่วย ซึ่งปลากะพงขาวสุขภาพดีส่วนใหญ่ จะไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ทั้งจากบ่อปูน บ่อดินและกระชัง และไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในปลากะรังที่สำรวจเลย (แสดงดังภาคผนวก ตารางที่ 4 และ 5)

3.1.2 การทดสอบเชื้อ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งอื่นๆ และ *Vibrio* spp. ด้วยเทคนิคแอนติบอดีโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี VV20D1 ที่มีความจำเพาะกับ *V. vulnificus* และโมโนโคลนอลแอนติบอดี VVB158/7 ที่มีความจำเพาะกับ *V. vulnificus* Biotype 2 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งอื่นๆ ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ มีจำนวน 10 สายพันธุ์ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 6 จังหวัดสงขลา (NICA) ให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วยแอนติบอดี VV20D1 และอีก 1 สายพันธุ์ คือ *V. vulnificus* VV DSMT 5285 จาก Department of Medical Science, Ministry of Public Health Thailand ซึ่งสายพันธุ์นี้ให้ผลบวกทั้งสองแอนติบอดี (แสดงดังภาคผนวก ตารางที่ 6)

3.2 จำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus*

เชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* แต่ละ biotype สามารถจำแนกคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาได้ คือ biotype 1 ให้ผลบวกในปฏิกิริยา Indole test and Ornithine decarboxylase test (อาหาร Decaboxylase Medium Ornithine Modified) ส่วน biotype 2 จะให้ผลเป็นลบทั้งคู่

Indole test เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่มี enzyme tryptophanase ซึ่งสามารถ oxidize tryptophan แล้วเกิด indolic-metabolites พวก indole, skatole (methyl indole) และ indoleacetic acid (IA) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบโดยใช้ Kovac's reagent ซึ่งมี P-Dimethyl aminobezaldehyde จะเกิดสีแดงลอยในชั้น alcohol ถ้าเกิดเป็นวงแหวนสีแดงในชั้น Kovac alcohol แสดงว่าให้ผลบวก ถ้าไม่มีวงแหวนสีแดง แสดงว่าให้ผลลบ แต่ถ้าเป็นสีส้ม จัดเป็นพวก variable เนื่องจาก tryptophan ถูก oxidize ไปเป็น skatole (methyl indole)

Ornithine decarboxylase test เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ornithine decarboxylase (ODC) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ L-ornithine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH เพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสี indicator ให้เป็นสีม่วง ที่ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ให้ผลบวก คือ ที่ 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสี

เหลืองและจะเปลี่ยนกลับไปเป็นสีม่วงหลังจากครบ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ให้ผลลบ คือ ที่ 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่ไม่เปลี่ยนกลับเป็นสีม่วง ที่ 48 ชั่วโมง หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี

3.3 ศึกษา full sequence ของเชื้อ *V. vulnificus* VVB Burapha สายพันธุ์ก่อโรคในปลากะพงขาว และออกแบบไพรเมอร์

บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* (Thailand Bioresource Research Center,TBRC) แสดงดังตารางที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบกับ 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอสปีชีส์อื่นๆ ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีบริเวณ Conserve region ที่ใกล้เคียงกันมาก แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ของ *V. vulnificus* VVB Burapha ที่ได้จากปลากะพงขาวป่วย (isolate จากปี 2547)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide sequence(s)			
ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Sample No.	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	Unknown 1	16S rDNA	>unknown 1 GGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGA TATGCCCAGGTGGGATTAGATAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG CCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTTGTGAGGAAGGTGGTGTCGTTAATAGCGGCA TCATTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATC GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAACTGCATTT GAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACC GGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCTGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCT GGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATG CAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGG TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCA GCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCT TACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCC

ตารางที่ 5 ข้อมูลเปรียบเทียบความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA จากฐานข้อมูล GenBank

Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Mismatch/ Total nt
1	*Vibrio navarrensis*	ATCC 51183	Urdaci et al. 1991	JMCG01000001	98.51	17/1139
2	*Vibrio vulnificus*	NBRC 15645	(Reichelt et al. 1979) Farmer 1980	AMQV01000037	98.42	18/1139
3	*Vibrio cortegadensis*	C16.17	Lasa et al. 2014	HF955037	98.24	20/1139
4	*Vibrio shilonii*	AK1	Kushmaro et al. 2001	ABCH01000080	98.16	21/1139
5	*Vibrio mediterranei*	CIP 103203	Pujalte and Garay 1986	X74710	98.15	21/1137
6	*Vibrio natriegens*	DSM 759	(Payne et al. 1961) Baumann et al. 1981	ATWU01000093	98.07	22/1139
7	*Vibrio thalassae*	MD16	Tarazona et al. 2014	HF541973	98.07	22/1139
8	*Vibrio alfacsensis*	CAIM 1831	Gomez-Gil et al. 2012	JF316656	97.98	23/1139
9	*Vibrio azureus*	NBRC 104587	Yoshizawa et al. 2009	BATL01000140	97.98	23/1139
10	*Vibrio scophthalmi*	LMG 19158	Cerdà-Cuéllar et al. 1997	AFWE01000105	97.89	24/1139
11	*Vibrio parahaemolyticus*	NBRC 12711	(Fujino et al. 1951) Sakazaki et al. 1963	BBQD01000032	97.89	24/1139
12	*Vibrio campbellii*	CAIM 519	(Baumann et al. 1971) Baumann et al. 1981	AMDG01000189	97.89	24/1139
13	*Vibrio antiquarius*	Ex25	Hasan et al. 2015	DS267822	97.89	24/1139
14	*Vibrio alginolyticus*	NBRC 15630	(Miyamoto et al. 1961) Sakazaki 1968	CP006718	97.89	24/1139
15	*Vibrio madracius*	A-354	Moreira et al. 2014	KC751062	97.89	24/1139
16	*Vibrio rotiferianus*	LMG 21460	Gomez-Gil et al. 2003	AJ316187	97.81	25/1139
17	*Vibrio cidicii*	2756-81	Orata et al. 2016	LOMK01000001	97.81	25/1139
18	*Vibrio ichthyoenteri*	DSM 14397	Ishimura et al. 1996	AJ421445	97.81	25/1139
19	*Vibrio diabolicus*	HE800	Raguénès et al. 1997	X99762	97.79	25/1132
20	*Vibrio splendidus*	ATCC 33125	(Beijerinck 1900) Baumann et al. 1981	X74724	97.71	26/1134
21	*Catenococcus thiocycli*	DSM 9165	Sorokin 1994	HE582778	97.63	27/1138
22	*Vibrio sinaloensis*	CAIM 797	Gomez-Gil et al. 2008	DQ451211	97.54	28/1136
23	*Vibrio neptunius*	LMG 20536	Thompson et al. 2003	AJ316171	97.45	29/1138
24	*Vibrio pectenicida*	A365	Lambert et al. 1998	Y13830	97.19	32/1137
25	*Vibrio hepatarius*	LMG 20362	Thompson et al. 2003	AJ345063	97.19	32/1137
26	*Vibrio xuii*	LMG 21346	Thompson et al. 2003	AJ316181	96.66	38/1139
27	*Vibrio brasiliensis*	LMG 20546	Thompson et al. 2003	AEVS01000097	96.22	43/1138

4. การยืนยันเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA) จากเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการ boiling method (Boiling method for DNA extraction) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

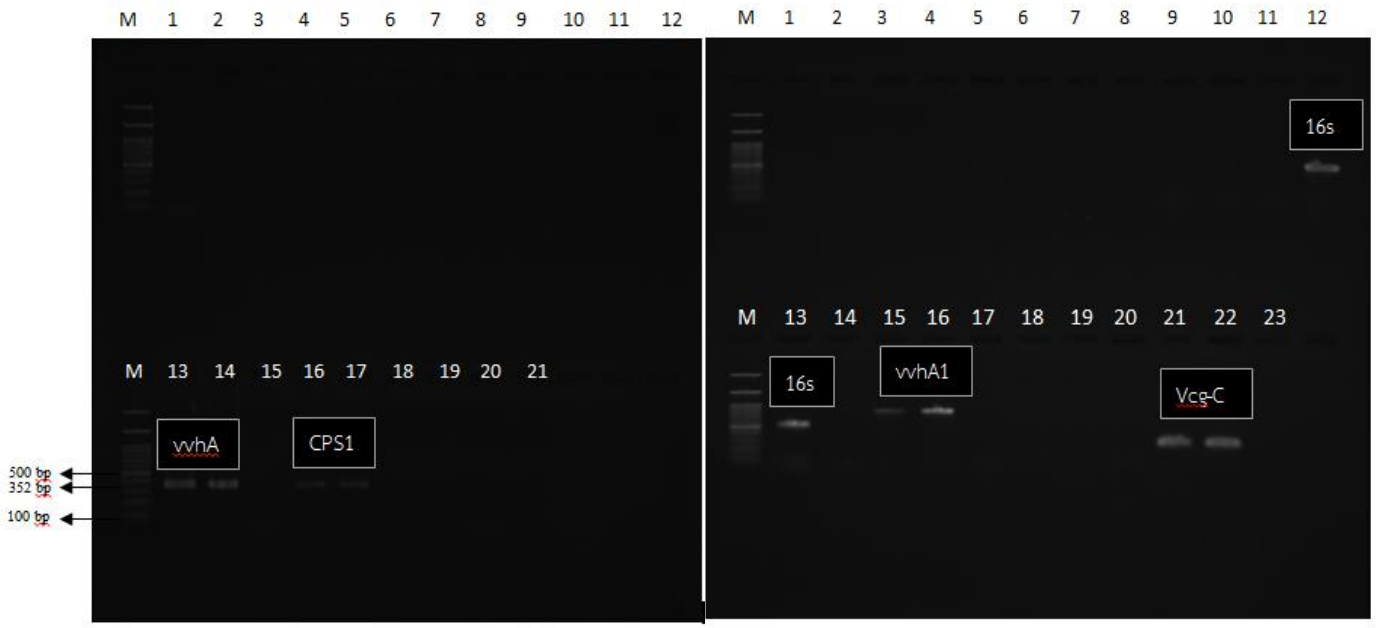
จากการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB Burapha (Biotype 2) โดยใช้ไพรเมอร์ *vvhA1* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *V. vulnificus* โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบการปรากฏของเชื้อ *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดจันทบุรีเท่านั้น ส่วนเชื้อแบคทีเรียจากปลากะพงขาวที่เลี้ยงจากภาคใต้และภาคตะวันออกจังหวัดฉะเชิงเทรา ให้ผลลบต่อการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (แสดงดังภาคผนวกตารางที่ 7 และ 8)

4.1.1 การยืนยันเชื้อ *V.vulnificus* VVB (Burapha strain) สายพันธุ์รุนแรงที่มีการระบาดในปลากะพงขาว ที่เลี้ยงในประเทศไทย (ปีพ.ศ. 2547) โดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผศ.ดร. ปภาศิริ บาร์เน็ท

จากผลการหา specific marker ของเชื้อแบคทีเรีย *V.vulnificus* VVB สายพันธุ์รุนแรงที่มีการระบาดในปลากะพงขาว ที่เลี้ยงในประเทศไทย พบว่าเชื้อนี้ให้ผลบวกต่อ virulence gene ทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ *vcg-C*, *vvhA*, *CPS1*, *vvhA*1 และ *16s rRNA* ซึ่ง *CPS gene* ให้ผลพีซีอาร์ที่ยังไม่ชัดเจน แสดงดังตารางที่ 6 และภาพที่ 2

ตารางที่ 6 Result of PCR of severe *V. vunificus* Biotype 2 from *L. calcarifer* cultured in Thailand

Sample	PCR result for:												
	vvh	*viuB*	*vcg-C*	*vcg-E*	*vvhA*	CPS1	CPS2	*vvhA*1	*vvhA*2	16s rRNA	V10	V25	V51
V. vunificus Biotype 2 from *L. calcarifer* in Thailand (severe strain)	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-



Lane M = Marker

1 = vcg-E-(P2)-VVB1
2 = vcg-E-(P2)-VVB2
3 = vcg-E-(P2) Negative
4 = v10-VVB1
5 = v10-VVB2
6 = v10 Negative
7 = v25-VVB1
8 = v25-VVB2
9 = v25 Negative
10 = v51-VVB1
11 = v51-VVB2
12 = v51 Negative

13 = vvhA-VVB1
14 = vvhA-VVB2
352 bp
15 = vvhA Negative
16 = CPS-allele1-VVB1
17 = CPS-allele1-VVB2
352 bp
18 = CPS-allele1 Negative
19 = CPS-allele2-VVB1
20 = CPS-allele2-VVB2
21 = CPS-allele2 Negative

Lane M = Marker

1 = vvh-VVB1 annealing=65 °C
2 = vvh-VVB1 Negative
3 = vvh-VVB2 annealing=53 °C
4 = vvh-VVB2 Negative
5 = viuB-VVB1 annealing=65 °C
6 = viuB-VVB1 Negative
7 = viuB-VVB2 annealing=56 °C
8 = viuB-VVB2 Negative
9 = 16s rRNA-27F –VVB1
10 = 16s rRNA-27F –VVB2
11 = 16s rRNA-27F Negative
12 = 16s rRNA-8UA-VVB1 492 bp

13 = 16s rRNA-8UA-VVB2
14 = 16s rRNA-8UA Negative
15 = vvhA type1-VVB1
16 = vvhA type1-VVB2
813 bp
17 = vvhA type1 Negative
18 = vvhA type2-VVB1
19 = vvhA type2-VVB2
20 = vvhA type2 Negative
21 = vcg-C-(P1)-VVB1
22 = vcg-C-(P1)-VVB2
277 bp
23 = vcg-C-(P1) Negative

ภาพที่ 2 PCR amplification of the 5 virulence genes ; *vcg-C*, *vvhA*, *CPS1*, *vvhA*1 and *16s rRNA* in *V. vulnificus* biotype 2 (virulence strain).

4.2 การทดสอบ unique specific marker ของเชื้อแบคทีเรีย *V.vulnificus* VVB (virulence strain)

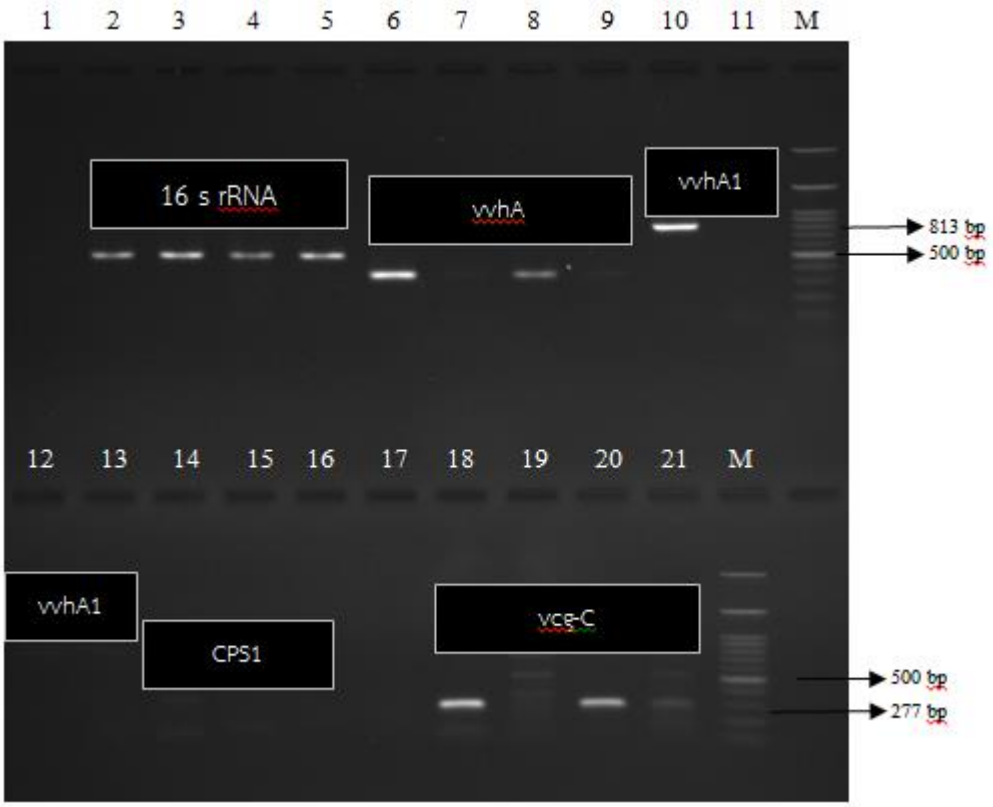
จากผลการทดลอง 4.1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ แบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (virulence strain) ให้ผลบวกต่อ virulence gene ทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ *vcg-C*, *vvhA*, *CPS1*, *vvhA*1 และ 16s rRNA ดังนั้นเพื่อต้องการหา unique specific marker ของแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงนี้ จึงมีการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตับและตับอ่อนกุ้ง น้ำเลี้ยงกุ้ง และหอยนางรม มาร่วมทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 5 ยีนนี้

ตารางที่ 7 Result of PCR of *Vibrio* sp. from shrimp hepatopancrease, water shrimp pond and oyster

Sample	PCR result for:				
	vcg-C	*vvhA*	*CPS1*	*vvhA1*	16s rRNA
V. vunificus Biotype 2 from *L. calcarifer* in Thailand (severe strain)	+	+	-	+	+
Green colony in TCBS from shrimp hepatopancreas	-	-	-	-	+
Green colony in TCBS from oyster	+	+	-	-	+
Yellow colony in TCBS from water shrimp pond	+	+/-	-	-	+

**หมายเหตุ *: +/-* ให้ผลไม่ชัดเจน

จากผลการทดสอบ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *V. vunificus* VVB (virulence strain) แบคทีเรียจากหอยนางรม และแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงกุ้ง ให้ผลบวกต่อ *vcg-C* gene และ *vvhA* อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงกุ้งให้ผลที่ไม่ชัดเจนกับไพรเมอร์ *vvhA* เชื้อทั้งหมดที่นำมาทดสอบให้ผลบวกกับไพรเมอร์ 16s rRNA gene นอกจากนี้การยืนยันเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์ *CPS1* gene ให้ผลลบกับทุกเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาของพีซีอาร์ สำหรับไพรเมอร์ *vvhA*1 gene ให้ผลบวกต่อเชื้อ *V. vulnificus* VVB (virulence strain) สายพันธุ์เดียวเท่านั้น แสดงดังตารางที่ 7 และภาพที่ 3 จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า *V. vulnificus* VVB (virulence strain) ที่ระบาดในประเทศไทยมียีน *vvhA1* ที่ควบคุมความรุนแรงของแบคทีเรียตัวนี้ ที่สามารถนำมาใช้เป็น unique specific marker ของแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาว ที่เลี้ยงในประเทศไทยได้



Lane M = Marker

1 = Negative

2 = โคโลนีสีเขียวจากกุ้ง

3 = โคโลนีสีเขียวจากหอย 16s rRNA-F8UA-R519B 492 bp

4 = โคโลนีสีเหลืองจากน้ำเลี้ยงกุ้ง

5 = Positive

6 = Positive

7 = โคโลนีสีเขียวจากกุ้ง

8 = โคโลนีสีเขียวจากหอย vvhA-F-R 352 bp

9 = โคโลนีสีเหลืองจากน้ำเลี้ยงกุ้ง

10 = Positive

11 = โคโลนีสีเขียวจากกุ้ง

12 = โคโลนีสีเขียวจากหอย vvhA-type 1-F-R 813 bp

13 = โคโลนีสีเหลืองจากน้ำเลี้ยงกุ้ง

14 = Positive

15 = โคโลนีสีเขียวจากกุ้ง

16 = โคโลนีสีเขียวจากหอย CPS-allele 1-F-R 342 bp

17 = โคโลนีสีเหลืองจากน้ำเลี้ยงกุ้ง

18 = Positive

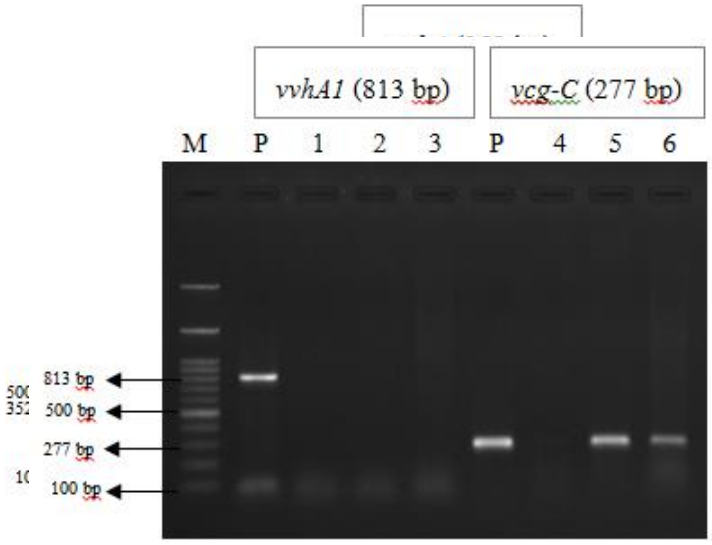
19 = โคโลนีสีเขียวจากกุ้ง

20 = โคโลนีสีเขียวจากหอย vcg-C-F-R 277 bp

21 = โคโลนีสีเหลืองจากน้ำเลี้ยงกุ้ง

ภาพที่ 3 PCR amplification of the 5 virulence genes ; *vcg-C, vvhA, CPS1, vvhA1 and 16s rRNA* in *Vibrio sp.* from shrimp hepatopancrease, water shrimp pond and oyster.

จากตารางที่ 7 เพื่อให้ผลการทดสอบชัดเจนยิ่งขึ้น จึงนำ specific primer 3 ชนิด ได้แก่ *vcg-C*, *vvhA* และ *vvhA1* มาทดสอบอีกครั้ง กับตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 แหล่ง โดยใช้ *V. vulnificus* biotype 2 (virulence strain) เป็น positive control ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 3 จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึง specific marker ของยีน *vvhA1* ในการตรวจสอบเชื้อ *V. vulnificus* biotype 2 (virulence strain) โดยพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เท่านั้นที่ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ *vvhA1* gene ในขณะที่ *vvhA* และ *vcg*-C gene ให้ผลบวกกับแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ที่มาจากแหล่งอื่น ๆ



N = Negative

P = Positive

1 = โคโลนีสีเขียวจากกุ้ง

2 = โคโลนีสีเขียวจากหอย

3 = โคโลนีสีเหลืองจากน้ำเลี้ยงกุ้ง

P = Positive

4 = โคโลนีสีเขียวจากกุ้ง

5 = โคโลนีสีเขียวจากหอย

6 = โคโลนีสีเหลืองจากน้ำเลี้ยงกุ้ง

ภาพที่ 4 PCR amplification of the 3 virulence genes ; *vvhA*, *vvhA*1 and *vcg-C* in *Vibrio sp.* from shrimp hepatopancrease, water shrimp pond and oyster.

จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า *V. vulnificus* VVB Burapha (virulence strain) ที่ระบาดในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2547 มียีน *vvhA1* ที่ควบคุมความรุนแรงของแบคทีเรียตัวนี้ ที่สามารถนำมาใช้เป็น unique specific marker ของแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาว ที่เลี้ยงในประเทศไทยได้

5. การจำแนกยืนยันเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* จากสำรวจจากภาคสนามตัวอย่างและแบคทีเรียอ้างอิง

5.1 การจำแนกแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ได้จากการเขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้น จากอวัยวะตับและไตปลากะพงขาวเลี้ยงในภาคใต้ และภาคตะวันออก แล้วถูกทดสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดี Immunodot blotting

เทียบกับเทคนิค PCR ผลพบว่าจำนวนทั้งหมด 2610 ไอโซเลท 10 จังหวัด มีเพียงตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากภาคตะวันออกจังหวัดจันทบุรีเท่านั้น จำนวน 4 isolate และตัวอย่างแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ผลทดสอบ Immunodot blotting และผลทดสอบเป็นบวก ยืนยันตรงกันด้วยเทคนิค PCR ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลยืนยันไอโซเลทเชื้อ *V. vunificus* ที่ได้จากการแยกเชื้อบนอาหารวุ้น TCBS จากปลากะพงขาวและปลากะรังตามระดับภูมิภาค ที่จำแนกด้วยเทคนิคแอนติบอดีและเทคนิค PCR

สถานที่	จำนวนโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS	ผลบวกจำแนกด้วยแอนติบอดีจำเพาะ	ผลบวกจำแนกด้วยเทคนิค PCR
จังหวัดสงขลา	33	0	0
จังหวัดปัตตานี	0	0	0
จังหวัดสตูล	581	0	0
จังหวัดตรัง	503	0	0
จังหวัดกระบี่	952	0	0
จังหวัดพังงา	35	0	0
จังหวัดภูเก็ต	67	0	0
จังหวัดฉะเชิงเทรา	431	2	0
จังหวัดชลบุรี	3	0	0
จังหวัดจันทบุรี	5	4	4
มหาวิทยาลัยบูรพา	1	1	1

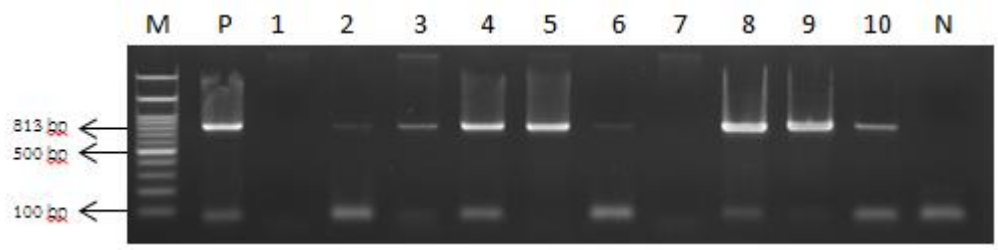
5.2 การจำแนกยืนยันเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 6 สงขลา (NICA) ไพรเมอร์ *vvhA1* gene ซึ่งเป็น unique specific primer สำหรับตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *V.vulnificus* VVB สายพันธุ์ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในประเทศไทย ดังนั้นจึงนำไพรเมอร์นี้มายืนยันเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก NICA ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยใช้ *V. vulnificus* biotype 2 (virulence strain) เป็น positive control ให้ผลแสดงดังตารางที่ 9 โดยให้ *vvhA1* gene ที่ขนาด 813 bp ดังภาพที่ 5 จากผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* สายพันธุ์ VVA2 และ VV1 ไม่พบยีน *vvhA1* อย่างไรก็ตามการที่ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ตรวจไม่พบยีน *vvhA1* ไม่ได้หมายความว่าเชื้อดังกล่าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่ได้เป็น *V. vulnificus* แต่อาจจะเป็น biotype อื่น ซึ่งอาจจะต้องใช้ virulence gene อื่นในการตรวจสอบต่อไป

5.3 การตรวจจากเนื้อเยื่อปลากะพงขาวและปลากะรัง โดยการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ใช้ (TIANamp Genomic DNA Kit) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

จากการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB ในเนื้อเยื่อปลากะพงขาวและปลากะรังที่เลี้ยงในภาคตะวันออกและภาคใต้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *V. vulnificus* (*V. vulnificus* hemolysin; *vvhA1*) โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าเนื้อเยื่อตับปลากะพงขาวจากภาคตะวันออก จังหวัดฉะเชิงเทรา เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น ที่แสดงผลบวกต่อการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ คิดเป็น 0.93 % (1 ตัวอย่าง ใน107 ตัวอย่าง) สำหรับเนื้อเยื่อปลากะพงขาวและปลากะรังที่เลี้ยงในภาคใต้ ให้ผลลบต่อการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ทั้งหมด คิดเป็น 0% (0 ตัวอย่าง ใน105 ตัวอย่าง) (แสดงดังภาคผนวกตารางที่ 9 และ 10)

ตารางที่ 9 ผลยืนยันเชื้อ *V. vunificus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 6 สงขลา (NICA) ที่จำแนกด้วยเทคนิคแอนติบอดีและเทคนิค PCR

V. vulnificus strain received from NICA	Immunodot Blotting Result	PCR Result
VVA2	+	-
VVA3	+	+
VVA4	+	+
VVA6	+	+
VVA7	+	+
VVA8	+	+
VV1	+	-
VV3	+	+
FVV11	+	+
12 nica VV.NF.158	+	+



ภาพที่ 5 PCR amplification of the *vvhA1* gene (813 bp) in *V. vulnificus* strain received from NICA, Thailand. Lane M: Marker; Lane P: Positive control; Lane 1: VVA2; Lane 2: VVA3; Lane 3: VVA4; Lane 4: VVA6; Lane 5: VVA7; Lane 6: VVA8; Lane 7: VV1; Lane 8: VV3; Lane 9: FVV11; Lane 10: 12 nica VV.NF.158; Lane N: Negative control.

6. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* (Challenge Test)

6.1 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียเป็นตัวแทนในแต่ละภูมิภาค

หลังจากที่ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอวัยวะตับและไตปลากะพงขาวและปลากะรัง ซึ่งตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* เฉพาะในปลากะพงขาวจังหวัดจันทบุรีเท่านั้น จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียรหัส ES1106LGL3 เป็นตัวแทนในระดับภูมิภาค และได้ทำการเปรียบเทียบความรุนแรงกับสายพันธุ์จากมหาวิทยาลัยบูรพา แบคทีเรียรหัส VVB โดยมีสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดอื่นที่ได้จากปลากะพงขาวให้เป็นตัวแทนจากภาคใต้ จังหวัดสตูล รหัส SS404KGS8 และตัวแทนจากภาคตะวันออก จังหวัดฉะเชิงเทรา รหัส ES503LGS9

6.2 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย (colony forming unit)

เป็นการนับปริมาณโคโลนี (colony) ที่มีขนาดใหญ่พอที่จะมองเห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งมาจากเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกตรึงอยู่กับที่ เจริญและแบ่งตัวจากเซลล์เดียว เป็นหลายๆ เซลล์อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ค่าที่ได้จากการตรวจนับแบคทีเรียมาตรฐาน คือ colony forming unit (cfu) โดยทั่วไปการนับปริมาณแบคทีเรียจะนับเฉพาะจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี

การนับปริมาณแบคทีเรีย (colony forming unit) ของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* สายพันธุ์จากจังหวัดจันทบุรีและมหาวิทยาลัยบูรพา และแบคทีเรียสายพันธุ์ชนิดอื่นจากจังหวัดสตูลและจังหวัดฉะเชิงเทราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังนี้

รหัส ES1106LGL3 ปริมาณแบคทีเรีย เท่ากับ 3.3×10^9 CFU/มิลลิลิตร

รหัส VVB ปริมาณแบคทีเรีย เท่ากับ 5.08×10^6 CFU/มิลลิลิตร

รหัส SS404KGS8 ปริมาณแบคทีเรีย เท่ากับ 8.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร

รหัส ES503LGS9 ปริมาณแบคทีเรีย เท่ากับ 3.48 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร

6.3 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรียในปลากะพงขาว (Challenge Test)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ คือ 1 x 10^2 – 10^8 CFU/มิลลิลิตร และเตรียม 1.5% น้ำเกลือปราศจากเชื้อสำหรับกลุ่มปลากะพงขาวควบคุม ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียและน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ในปลากะพงขาวแต่ละชุดการทดลอง ทำการทดลองละ 2 ซ้ำ สังเกตอาการและบันทึกผลการตายของปลากะพงขาวหลังฉีดทดลองที่ 24-120 ชั่วโมง ถ้าหากมีปลากะพงขาวทดลองตายจะถูกพิสูจน์การพบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ด้วยเทคนิค Immunodot Blotting และผลการพิสูจน์ยืนยันจากตัวอย่างปลากะพงขาวทดลองที่ตายหลังจากฉีดทดลองแล้วนั้น พบว่าปลากะพงขาวทุกตัวที่ตายตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ด้วยเทคนิค Immunodot Blotting ทุกตัวอย่าง

6.4 บันทึกผลการตายของปลากะพงขาวหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย ระยะเวลา 5 วัน (Observe mortality) และการคำนวณค่า LD50

ผลการสำรวจความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* หลังฉีดทดสอบที่ทำให้ปลากะพงขาว (น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม) ตาย พบว่า

หลังฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* 24 ชั่วโมง

รหัส VVB ปลากะพงขาวมีอัตราการตายรวม 31 ตัว คิดเป็น 38.75% (ตาย 31 ตัวใน 80 ตัว) โดยความเข้มข้นที่ปลากะพงขาวตายมากที่สุดหรือปลาตายทุกตัว คือที่ความเข้มข้น 1x10^7 และ 1x10^8 CFU/มิลลิลิตร โดยที่ความเข้มข้น 1x10^8 CFU/มิลลิลิตร นั้นสามารถทำให้ปลากะพงขาวตายภายในระยะเวลา 5-6 ชั่วโมงหลังฉีดทดสอบ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความรุนแรงมาก

รหัส ES503LGS9 ปลากะพงขาวมีอัตราการตายรวม 13 ตัว คิดเป็น 16.25% (ตาย 13 ตัวใน 80 ตัว) โดยความเข้มข้นที่ปลากะพงขาวตายมากที่สุด 9 ตัว คือที่ความเข้มข้น 1x10^8 CFU/มิลลิลิตร

รหัส SS404KGS8 ปลากะพงขาวตาย 1 ตัวที่ความเข้มข้น 1x10^8 CFU/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการตายรวม 1.25% (ตาย 1 ตัวใน 80 ตัว)

รหัส ES1106LGL3 ปลากะพงขาวตาย 3 ตัวที่ความเข้มข้น 1x10^8 CFU/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการตายรวม 3.75% (ตาย 3 ตัวใน 80 ตัว)

หลังฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* 48 ชั่วโมง

รหัส VVB ที่ความเข้มข้น 1x10^3, 1x10^5 และ 1x10^6 CFU/มิลลิลิตร ปลาตายความเข้มข้นละ 1 ตัว คิดเป็นอัตราการตายรวม 42.5% (ตาย 34 ตัวใน 80 ตัว)

รหัส ES503LGS9 ปลากะพงขาวไม่มีการตายเพิ่มที่ 48 ชั่วโมง

รหัส SS404KGS8 ที่ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$และ$1x10^8$ CFU/มิลลิลิตร ปลากะพงตาย 1, 3, 2 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการตายรวม 8.75% (ตาย 7 ตัวใน 80 ตัว)

รหัส ES1106LGL3 ปลากะพงตาย 1 ตัว ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ CFU/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการตายรวม 5% (ตาย 4 ตัวใน 80 ตัว)

หลังฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* 72 – 120 ชั่วโมง

รหัส VVB ไม่มีปลากะพงตายเพิ่มหลังจาก 48 ชั่วโมง

รหัส ES503LGS9 ไม่มีปลากะพงขาวตายเพิ่มหลังจาก 48 ชั่วโมง

รหัส SS404KGS8 ปลากะพงขาวเริ่มตายที่ 72 ชั่วโมง และทยอยตายสะสมจนถึง 120 ชั่วโมง

รหัส ES1106LGL3 ไม่มีปลากะพงขาวตายหลังจาก 72 ชั่วโมง แสดงดังภาคผนวก ตารางที่ 11

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรงที่สุดที่สามารถทำให้ปลากะพงขาวตายทั้งชุดการทดลอง ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ – $1x10^8$ CFU/มิลลิลิตร ภายใน 24 ชั่วโมง คือ รหัส VVB ส่วนแบคทีเรียที่ความรุนแรงของเชื้อรองลงมาคือ รหัส ES503LGS9 ความรุนแรงของเชื้อสามารถทำให้ปลากะพงขาวตายเกือบทั้งหมดชุดการทดลองที่ความเข้มข้น $1x10^8$ CFU/มิลลิลิตร เท่านั้นหลังจาก 48 ชั่วโมงก็ไม่มีปลากะพงขาวตายเพิ่ม และเชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรงน้อย คือรหัส SS404KGS8 ที่ไม่ทำให้ปลากะพงตายภายใน 24 ชั่วโมง แต่เริ่มมีปลากะพงขาวตายหลังจากผ่านไป 72 ชั่วโมงและตายสะสมจนถึง 120 ชั่วโมง และรหัส ES1106LGL3 ปลากะพงขาวตายเล็กน้อยที่ 24 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง แต่ไม่มีตายเพิ่มภายใน 120 ชั่วโมง

ค่า LD50 เป็นค่าที่บ่งบอกความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลากะพงขาวทดลองตาย 50% ของจำนวนที่กำหนดในระยะเวลาหนึ่ง คำนวณโดยใช้สมการความสัมพันธ์ linear regression ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ฉีดในปลากะพงขาว ความเข้มข้น 1×10^2 – 10^8 CFU/มิลลิลิตร กับเปอร์เซ็นต์การตายของปลากะพงขาวในระยะเวลา 24 – 120 ชั่วโมง แสดงผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่า LD50 เป็นค่าที่บ่งบอกความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลากะพงขาวทดลองตาย 50% ของจำนวนที่กำหนดในระยะเวลา 24 – 120 ชั่วโมง

ภูมิภาค	**เชื้อแบคทีเรีย (รหัสแบคทีเรีย)**	**ค่า LD50 (CFU/g fish body wt.)**	**ระยะเวลา (ชั่วโมง)**
มหาวิทยาลัยบูรพา	*V. vulnificus* (VVB)	5.4×10^6	24
ภาคตะวันออก จังหวัดฉะเชิงเทรา	Unknown (ES503LGS9)	6.9×10^8	48
ภาคใต้ฝั่งอันดามัน จังหวัดสตูล	Unknown (SS404KGS8)	6.16×10^7	96
ภาคตะวันออก จังหวัดจันทบุรี	*V. vulnificus* (ES1106LGL3)	ความเข้มข้น $1x10^4$-$1x10^9$ ตาย 10-40%	72 และไม่ตายเพิ่มภายใน 5 วัน

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไปในการศึกษาคือ พัฒนาผลิตวัคซีนชนิด Formalin killed cell (FKC) จากแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในฟาร์มของเกษตรกร และผลิตใช้ในเชิงพาณิชย์ มีระยะเวลาศึกษารวม 2 ปี โดยในปีแรก (พ.ศ.2560) มีวัตถุประสงค์หลักคือ เพื่อสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรีย *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวและปลากะรังที่เลี้ยงในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย และพัฒนาวัคซีนชนิด Formalin killed cell (FKC) จาก *V. vulnificus* ที่สามารถก่อโรคในปลาทะเลเศรษฐกิจได้ ตามขอบเขตของโครงการวิจัย ได้รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียจากปลากะพงขาวและปลากะรัง เพื่อจำแนกชนิดสายพันธุ์โดยใช้ 2 เทคนิค คือ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิคแอนติบอดี (Immunodot Blotting) ที่จับจำเพาะ

จำแนกชนิด *V. vulnificus* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิคแอนติบอดี (Immunodot Blotting) ที่จับจำเพาะ

ผลการสำรวจแบคทีเรียจาก 3 ภูมิภาค คือภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออก จากปลากะพงขาวเลี้ยงและปลากะรังเลี้ยงในกระชัง บ่อดิน และบ่อปูน ทั้งที่มีอาการป่วยและสภาพปกติแข็งแรง โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากไตและตับปลา บนอาหารวุ้นจำเพาะ TCBS ไม่เลือกโคโลนีสีเหลืองที่เจริญบนอาหารวุ้นจำเพาะ แต่เลือกโคโลนีเจริญให้สีเขียว เพราะไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโคลส แต่ก็อาจมีหลายชนิดของแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เป็นโคโลนีสีเขียว ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบและยืนยัน จำแนกเป็นชนิด *V. vulnificus* ที่เป็น biotype 1 หรือ biotype 2 ต่อไป งานวิจัยได้ออกแบบดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ด้วยการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA) จากเชื้อแบคทีเรีย ที่ได้จากสายพันธุ์ ต่างๆ คือ *V. vulnificus* (virulence strain) ของมหาวิทยาลัยบูรพา BUU2548 เป็น positive control เปรียบเทียบกับ เชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 6 สงขลา (NICA) ผลการออกแบบและทดสอบจะได้ ไพรเมอร์ *vvhA1* gene ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ถือว่าเป็น unique specific primer สำหรับตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* สายพันธุ์ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในประเทศไทย (แต่ต้องตรวจสอบในปลากะรังหรือปลาทะเลอื่นๆ ต่อไป) แต่ยังไม่สามารถแยกจนถึง biotype ซึ่งในภาคใต้ของประเทศไทย ได้มีการจำแนก *V. vulnificus* เป็น biotype 1 ที่ได้เชื้อจากปลากะรัง (Tiger grouper *Epinepherus fuscocguttatus* Forsskal, 1775) ที่ป่วยเป็นโรค โดยการจำแนกด้วย *vvhA* gene และกล่าวว่าเป็นสายพันธุ์ ที่สัมพันธ์กับการก่อโรคในมนุษย์ (Thawonsuwan, et al., 2016)

ผลการสำรวจเชื้อ *V. vulnificus* ได้เทคนิคชีวโมเลกุล PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *V. vulnificus* hemolysin (*vvhA1*) ร่วมกับเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะจากภาคใต้และภาคตะวันออก ในปลากะพงขาว

และปลากะรัง เมื่อตรวจจากโคโลนีบนอาหารวุ้น สามารถพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปลากะพงขาว ที่ป่วยเท่านั้น จากการเลี้ยงในกระชัง 1 ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี มี 4 ไอโซเลท ซึ่งยืนยันผลบวกตรงกันทั้งสองเทคนิค และเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะสามารถพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวเลี้ยงในบ่อปูน 1 ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ไอโซเลท ส่วนการตรวจโดยตรงจากเนื้อเยื่อปลาสามารถพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปลากะพงขาว(ป่วย) ที่เลี้ยงในบ่อปูน 1 ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา 1 ตัวอย่างจากตับ เหตุผลของความแตกต่างของผลจากสองเทคนิค น่าจะมาจากความจำเพาะของการพัฒนาทั้งสองเทคนิคโดยไพรเมอร์ *vvhA1* gene จะมีความจำเพาะต่อ DNA ของแบคทีเรีย ส่วนแอนติบอดีจะจำเพาะกับแอนติเจน (Longyant et.al., 2008)

Vibrio spp. ก่อโรค Vibriosis เป็นปัญหาต่อการเพาะเลี้ยงปลาทะเล ซึ่งมีหลายชนิดคือ *V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. anguillarum, V. vulnificus* เป็นต้น การจำแนกอย่างแม่นยำ รวดเร็ว เพื่อยืนยันแต่ละชนิด เทคนิคทางชีวโมเลกุล ใช้พื้นฐานของ phenotypic characteristics เช่น เทคนิคที่นิยมมากที่สุดมี DNA-sequence-based identification, 16S rRNA and housekeeping genes และมีเทคนิค Ribotyping and PCR-based techniques เช่น Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), repetitive extragenic palindrome–PCR (rep-PCR), and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Chatterjee and Haldar, 2012) การปรากฏของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* จากการสำรวจในการศึกษาครั้งนี้ ยังมีการพบไอโซเลทน้อย โดยพบที่ฟาร์มเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังจังหวัดจันทบุรี อาจเป็นเพราะกลไกการระบาดของโรคจากแบคทีเรียในปลายังไม่ป่วยถึงขั้นปรากฏในร่างกาย อาจทำให้โอกาสพบปริมาณเซลล์แบคทีเรียน้อยที่จะตรวจเจอทั้งเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารวุ้น และตรวจสอบโดยเทคนิค PCR ในเนื้อเยื่อปลา แต่อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในการสำรวจในครั้งนี้ยังมีการพบสายพันธุ์นี้น้อยจากทั้ง 3 ภูมิภาค และสำรวจพบได้จากปลากะพงขาวเท่านั้น ไม่พบในปลากะรัง การเขี่ยเชื้อที่แยกได้จากอวัยวะไตและตับจากปลากะพงขาวป่วย และนำมาเลี้ยงต่อในจานเพาะเชื้อ มีโอกาสที่จะตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้มากกว่าในเนื้อเยื่อปลา แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถอยู่ในร่างกายปลาได้โดยที่ยังไม่ก่อโรคและอาจดำรงชีวิตเป็น opportunistic pathogen ซึ่งเมื่อไหร่ก็ตามที่ปลาอ่อนแอ จึงจะแสดงอาการของโรคชัดเจน สามารถก่อให้เกิดการป่วย ก่อความเสียหายต่อธุรกิจการเลี้ยงปลากะพงขาวทั้งอนุบาลและปลาเลี้ยงเนื้อได้ทันที

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* ต่อการก่อโรคในปลากะพงขาว เพื่อการพัฒนาวัคซีนชนิด inactivated formalin whole-cell (FKC) จากสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง

เพื่อการพัฒนาวัคซีนชนิด Formalin-killed cells (FKC) จากเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ต้องเลือกไอโซเลท เป็นสายพันธ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุด ซึ่งจากผลสำรวจนั้น สายพันธุ์แบคทีเรีย จากปลากะพงขาวความรุนแรงในการก่อโรคอีกครั้งต่อปลากะพงขาว ด้วยการฉีดเข้าช่องท้อง เชื้อ *V. vulnificus* รหัส VVB ไอโซเลทของมหาวิทยาลัยบูรพา สามารถทำให้ปลาตาย 50% (LD_{50}) ที่ ระดับความเข้มข้น 5.4 x 10^6 CFU/ g fish body weight ภายในเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับ ไอโซเลท จากจังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา และ สตูล (unknown specie) จึงจะใช้ไอโซเลท VVB นี้ในการพัฒนาวัคซีนชนิด FKC จากเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปีที่ 2 ต่อไป ซึ่งความรุนแรงของ Vibriosis ในปลากะพงขาวในประเทศไทยมีความสำคัญอย่างมากต่อการก่อการตายของลูกปลาช่วงอนุบาล เนื่องจากมีคัดขนาด เพื่อหลีกเลี่ยงการกินกันเอง แต่การคัดขนาดจะก่อบาดแผลให้ปลากะพงขาว เชื้อแบคทีเรียสามารถแพร่กระจายทำให้ปลาตายในปริมาณมากเสมอ เชื้อ *V. vulnificus* รหัส VVB ไอโซเลทของมหาวิทยาลัยบูรพา นี้มีความรุนแรงปานกลางตามคำจำกัดความของ Santo, et al. (1993) และเมื่อเปรียบเทียบกับ *Photobacterium damselae* subsp.*damselae* ที่ก่อโรคในปลากะพงขาวของประเทศไทย ณ ระดับความเข้มข้น 8.1 X 10^5 CFU/g fish body weight (Barnette, et al., 2009) และความรุนแรงปานกลางในปลาทะเลอื่นๆ สอดคล้องกับ Abdelaziz, et al. (2017) ได้ทำการตรวจสอบชนิดของวิบริโอต่างๆ ที่มีผลต่อปลาทะเลในทะเลสาบ Qarun และอ่าว Suez โดยวิธีการทางลักษณะฟีโนไทป์และโมเลกุล โดยมีการเก็บตัวอย่าง ปลาลิ้นหมา (Solea aegyptiaca), ปลากะรัง (*Epinephelus marginatus*) และปลากระบอก (*Mugil cephalus*) ที่ตายในทะเลสาบ Qarun และอ่าว Suez ประเทศอียิปต์ จำนวน 100 ตัวอย่าง เก็บตั้งแต่เดือนตุลาคม 2014 ถึงกรกฎาคม 2015 เป็นระยะเวลา 10 เดือน ศึกษาลักษณะภายนอกหลังการตายของปลา ตรวจหาชนิดของวิบริโอและทดสอบนำเชื้อฉีดเข้าช่องท้องของปลาที่ไม่ป่วย ผลการศึกษาพบว่า ในปริมาณเชื้อ 5.0 x 10^7 cfu/ มิลลิลิตร ที่เท่ากัน *V. alginolyticus* ทำให้ปลาตายได้ 70-80% ส่วนชนิด *V. parahaemolyticus* ทำให้ปลาตายได้ 20-65% และ *V. vulnificus* ทำให้ปลาตายได้ 40% และจากรายงานความรุนแรงในการก่อโรคอีกครั้งของ การฉีด *V. vulnificus* biotype 1 ในปลากะรัง *E. fuscocguttatus* ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^5 CFU/ มิลลิลิตร ทำให้ปลาตายภายใน 5 วันและสภาพป่วยแบบเดียวกัน (Thawonsuwan, et al., 2016)

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

สรุปผลการวิจัย

1. สามารถยืนยัน เชื้อ *V. vulnificus* รหัส VVB (BUU) ที่ก่อโรคในปลากะพงขาวของประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2547 เป็นสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง มี virulence gene คือ *vvhA1* ในการควบคุม

2. พัฒนาความจำเพาะของไพรเมอร์ *V. vulnificus* hemolysin (*vvhA1*) ของเชื้อ *V. vulnificus* รหัส VVB (BUU) ที่ก่อโรคในปลากะพงขาวของประเทศไทย ด้วยการสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรีย เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์จากไพรเมอร์ 13 คู่ จากงานวิจัยต่างๆ เมื่อตรวจเชื้อ VVB (BUU) กลับพบว่าให้ผลบวกต่อ virulence gene ทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ *vcg-C, vvhA, CPS1, vvhA1* และ 16s rRNA แต่ *CPS* gene ให้ผลพีซีอาร์ที่ยังไม่ชัดเจน เพื่อต้องการหา unique specific marker ของแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงนี้ จึงมีการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตับและตับอ่อนกุ้ง น้ำเลี้ยงกุ้ง และหอยนางรม มาร่วมทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 5 ยีนนี้ และผลบวกยืนยันชัดเจนกับ specific primer 3 ชนิด ได้แก่ *vcg-C, vvhA* และ *vvhA1* จึงสรุปยืนยัน *V. vulnificus* ของเชื้อรหัส VVB (Burapha เป็นสายพันธุ์รุนแรง, virulence strain) ที่ระบาดในประเทศไทย มียีน *vvhA1* ที่ควบคุมความรุนแรงของแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้เป็น unique specific marker ของแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาว ที่เลี้ยงในประเทศไทยได้ รวมทั้งยืนยันผลบวกจากไอโซเลทและสายพันธุ์ที่ได้จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 6 สงขลา (NICA)

3. โดยใช้ ไพรเมอร์ *V. vulnificus* hemolysin (*vvhA1*) เทคนิคชีวโมเลกุล PCR ร่วมกับเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะ เปรียบเทียบในการตรวจจากเนื้อเยื่อปลาด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล PCR และจากโคโลนีบนอาหารจำเพาะด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะ ต่อการปรากฏของเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวเลี้ยงและปลากะรังเลี้ยงจาก 10 จังหวัด สามารถพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปลากะพงขาว ที่ป่วยเท่านั้นจากการเลี้ยงในกระชัง 1 ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี มี 4 ไอโซเลท (2610 ไอโซเลท) ซึ่งยืนยันผลบวกตรงกันทั้งสองเทคนิค และมีการพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในปลากะพงขาว (ป่วย) ที่เลี้ยงในบ่อปูน 1 ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะเท่านั้น และตรวจเนื้อเยื่อตับและไต ปลากะพงขาว (107 ตัวอย่าง) และปลากะรัง (105 ตัวอย่าง) โดยตรงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล PCR สามารถพบเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* ในตับปลากะพงขาวป่วย ที่เลี้ยงในบ่อปูน 1 ตัวอย่างจากฟาร์มบ่อปูน จังหวัดฉะเชิงเทรา ทั้งนี้ในการสำรวจปลากะรังในภาคใต้ ไม่พบเชื้อ *V. vulnificus* ทั้งเทคนิคชีวโมเลกุล PCR และเทคนิคทางแอนติบอดีจำเพาะ

4. ความรุนแรงในการก่อโรคอีกครั้ง ต่อปลากะพงขาวด้วยเชื้อ *V. vulnificus* รหัส VVB Burapha ไอโซเลทของมหาวิทยาลัยบูรพา ณ ที่ ระดับความเข้มข้น 5.4×10^6 CFU/g fish body weight ภายในเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับ ไอโซเลท จากจังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา และ สตูล (unknown specie)

ข้อเสนอแนะ

เชื้อ *V. Vulnificus* ที่ก่อโรคในปลากะพงขาวของประเทศไทย สามารถตรวจเชื้อนี้ได้โดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ *V. vulnificus* hemolysin (*vvhA1*) ที่ถูกพัฒนาขึ้น สามารถระบุเป็น virulence strain แต่ยังไม่สามารถจำแนกเป็น biotype ได้ จึงควรมีการศึกษา genetic virulent profile ของแต่ละไอโซเลทของเชื้อ *V. vulnificus* ที่พบทั้งในปลากะพงขาว ปลากะรัง สิ่งแวดล้อม และมนุษย์ เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาถึง biotype ของเชื้อนี้ร่วมกับผลทางชีวเคมี และการพัฒนาวัคซีนต้าน เชื้อ *V. Vulnificus* ที่สามารถต้านโรคในปลากะพงขาว และประโยชน์ของการระบาดวิทยาในมนุษย์ที่สัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมทางทะเล ส่วนในปลากะรังและปลาเศรษฐกิจทะเลอื่นๆ อาจต้องสำรวจไอโซเลทหรือสายพันธุ์ใหม่ต่อไป ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่มีความรุนแรงคือจากมหาวิทยาลัยบูรพา รหัส VVB Burapha มีความรุนแรงมากที่สุดในการก่อโรคในปลากะพงขาวเมื่อเปรียบเทียบกับจากภาคใต้และภาคตะวันออก จึงควรนำไปทดสอบและทดลองเพื่อพัฒนาผลิตวัคซีน (Formalin-killed cells) ต่อไปในปีที่ 2

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานได้มีการร่าง เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ (ยังไม่สามารถระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

2. การยื่นจดสิทธิบัตร ผลงานวิจัยยังไม่มีการยื่นในปี 2560

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ ยังไม่มีการนำเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจหรือบุคคลทั่วไป

4. ผลงานเชิงสาธารณะ ยังไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น

5. สามารถผลิตบัณฑิต 3 คน ในการทำปัญหาพิเศษ เรื่อง

5.1 การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* Burapha strain (VVB) ในเนื้อเยื่อของปลาทะเลโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (DETECTION OF BACTERIAL *Vibrio vulnificus* Burapha strain (VVB) IN TISSUES OF MARINE FISHES USING POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE)

5.2 การสำรวจเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในปลากะพงขาวจากรูปแบบการเลี้ยงในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา (Survey *Vibrio* spp. in seabass (*Lates calcarifer*) from culture farming systems in Chachoengsao Province)

5.3 การสำรวจเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio* spp. ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) จากฟาร์มเลี้ยง ในจังหวัดฉะเชิงเทรา (Surveying of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. from farmed Pacific white Shrimp (*Penaeus vannamei*) at Chachoengsao province)

บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. (2552). สถิติการประมงทะเล 2549 สำรวจโดยวิธีการสุ่มตัวอย่าง. เอกสารฉบับที่ 1/2552

กรมประมง. (2556). สถิติการประมงแห่งประเทศไทยพ.ศ.2554. เอกสารฉบับที่ 11/2556

จินตวาณี โลหะการ (2547) การวิเคราะห์ต้นทุนและผลตอบแทนของการเลี้ยงปลากะรังในกระชังในจังหวัดพังงาปีการผลิต 2546. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เศรษฐศาสตร์การเกษตร). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชนกันต์ จิตรมนัส. (2544). ความรู้เกี่ยวกับวัคซีนเพื่อป้องกันโรคปลา.วารสารการประมง, 54(6),515-520.

ปภาศิริ บาร์เนท และ ศิริโฉม ทุ่งเก้า (2549). รายงานฉบับสมบูรณ์เรื่องแนวทางการผลิตวัคซีนต้านทานแบคทีเรียก่อโรคชนิด Vibrio vulnificusในปลากะพงขาว. มหาวิทยาลัยบูรพา. ทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาไทย.

ประดิษฐ์ ชนชื่นชอบ, สุขศรี สัมภวะผล, อดุลย์ แมเร๊าะ, อุดม บุญชม, บุญเกิด โสมปัดทุม, ทวีวัฒน์ หลงขาว และชม อนงค์. 2530. การศึกษาโรคและพยาธิในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชัง ในเขตจังหวัดสตูล ตรัง กระบี่. วารสารการประมง 40. 315-326.

เยานิตย์ ดนยดล และ จีรนันท์ อุไรประสิทธิ์. 2545 คุณลักษณะเชื้อ Flexibacter maritimus สาเหตุของโรคแผลด่างในปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2545 สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. หน้า 1-10.

วีรวรรณ ชินอักษร. 2535. โรคและปรสิตของปลากระพงขาว. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 128 หน้า.

ธารทิพย์ ว่องไวไพโรจน์, ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ, ศศิมนัส อุณจักร์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2553. ประสิทธิภาพของวัคซีน *Streptococcus agalactiae* ที่เตรียมด้วยวิธีต่างกันต่อภูมิคุ้มกันของปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.). ใน: การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 สาขาประมง 30 ม.ค.-2 ก.พ. 2553. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Abdelaziz M., Ibrahem Mai D., Ibrahim Marwa A., Abu-Elala Nermeen M.& Abdel-moneam Dalia A. (2017). Monitoring of different vibrio species affecting marine fishes in Lake Qarun and Gulf of Suez: Phenotypic and molecular characterization. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 43. 141–146.

Barnette, P-K., Alejandro Labella, Manuel Manchado, Dolores Castro and Juan J. Borrego. 2009. *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* involved in abdominal swelling affecting cultured Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) in Thailand. Fish Pathology. 44(1):47-50.

Buller, N.B. (2004).Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI Publishing, 361.

Cook, M. T., Hayball, P. J., Hutchinson, W., Nowak, B. F. & Hayball, J. D. (2003). Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (Pagrus auratus, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. Fish & Shellfish Immunology, 14, 333-345.

Couso, N., Castro, R., Magarinos, B., Obach, A. & Lamas, J. (2003). Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. Aquaculture, 219, 99-109.

Cuesta, A., Meseguer, J. & Esteban, M.A. (2004). Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (Sparus aurata L.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 101, 203-210.

Chuanfu Dong, Xiaopeng Xiong, Yongwen Luo, Shaoping Weng, Qing Wang and Jianguo He. 2013. Efficacy of a formalin-killed cell vaccine against infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and immunoproteomic analysis of its major immunogenic proteins. Veterinary Microbiology, 162, 419–428.

Fouz,B.,Gassent,M.D.E.,Barrera,R.,Larsen,J.L.,Nielsen,M.E.,&Amaro,C.(2001).Field testing of a Vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. Disease of aquatic oranganisms, 45,183 – 189.

Gassent,M.D.,Fouz,B.,&Amaco,C.(2004).Efficacy of abivalent vaccine against eel disease caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. Fish& Shellfish Immunology,16, 93 – 105.

Gassent,M.D.,Fouz,B.,Barrera,R.,&Amaco,C.(2004).Efficacy of oral reimmunisation after immersion vaccination against *Vibrio vulnificus* in farmed European eels.Aquaculture,231,9-22.

Hervio-Heath, D., Colwell, R.R, Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M., Pommepuy, M. (2002). Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. J. Appl. Microbiol. 92, 1123-1135.

Hor, L-I and Che, C-L. 2013. Cytotoxins of *Vibrio vulnificus*: Functions and roles in pathogenesis, review article. BioMedicine. 3(1): 19-26.

Hsing-Yen Huang, Yan-Chun Chen, Pei-Chi Wang, Ming-An Tsai, Shih-Chun Yeh, Hong-Jen Liang and Shih-Chu Chen. 2014. Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper *Epinephelus coioides* by intraperitoneal immunization. Vaccine, 32, 7014–7020.

Kumar, S. R., Ahmed, V. P. I., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Babu, V. S. &Hameed, A. S. S. (2008). Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNAvaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from Vibrio (*Listonella anguillarum*). Fish & Shellfish Immunology, 25, 47-56.

Lee, T.H., Kim, M.H., Lee, C-S., Lee, J-H and Rhee,J.H. 2014. Protection against *Vibrio vulnificus* infection by active and passive immunization with the C-terminal region of the RtxA1/MARTXVv. Vaccine. 32, 271-276.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. METHODS. 25, 402–408.

Longyant, S., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Suksawad, P., Srisuk C., Sithigorngul, W., Piyatiratitivorakul, S. & Sithigorngul P. (2008). Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. Invertebrate Pathology, 98, 63-68.

Noga, E. J. (2000). Fish disease: diagnostic and treatment (2nd ed.). United States of America: Iowa State Press.

Park, J-H., W.J. Park, and H.D. Jeong. 2001. Immunological efficacy of *Vibrio vulnificus* bacterins given as an oral vaccine in the flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 201, 187-197.

Pimoljinda, J. (1993). Status and problems of marine fish seed production in Thailand. SEAFDEC/AQD Institutional Repositoty (SAIR). http//hdl.handle.net/10862/647 (search on 20 March,2015)

Ruangpant, N. and Yashiro, R. A review of Grouper (*Epinephelus* spp.) and Sea bass (*Lates calcarifer*) culture in Thailand. http/nsgl.gso.url.edu/hawauw 94002-part6 (search on 20 March, 2015).

Santos, Y., A. E. Toranzo, J. L. Barja, T. P. Nieto and T. G. Villa. (1988): Infection and Immunity. 56, 3285–3293.

Sasmita, R, Barnette, P-K. and Kashane Chalermwat. 2009. Effects of monovalent and bivalent vaccines from photobacterium damselae subsp. damselae and vibrio harveyi on innate immune system of the asian seabass, lates calcarifer bloch. The second UKM-UI joint seminar 2009, Malaysia. 465-473.

Senoh, M., Miyoshi, S-I., Okamoto, K., Fouz, B., Amaro, C. and Shinoda, S. (2005). The cytotoxin-hemolysin genes of human and eel pathogenic *Vibrio vulnificu*s strains:

Comparison of nucleotide sequences and application to the genetic grouping. Microbiol. Immunol. 49(6), 513-519.

Shoemaker, C.A., LaFrentz, B.R. and Klesius, P.H. 2011. Vaccination of sex reversed hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*).Biologicals.39, 424-429.

SongLin, G., PanPan, L., Jiangjun, F., JinPing, Z., Peng, L. and LiHua, D. 2015. A novel recombinant bivalent outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* and *Aeromonas hydrophila* as a vaccine antigen of Amercican eel (*Anguilla rostrata*). Fish & Shellfish Immunology, 30, 256-265.

Strom,M.S., and Paranjpye,R.N.(2002).Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus* .Microbes and infection. 2, 177-188.

Thiagarajan R., Gopalakrishnan S., Thilagam H.. (2006). Immunomodulation in the Marine Green Mussel Perna viridis Exposed to Sub-Lethal Concentrations of Cu and Hg. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51, 392-399.

Yeoung-Hwan Jang, Dharaneedharan Subramanian and Moon-Soo Heo. 2014. Efficacy of formalin-killed *Pseudomonas anguilliseptica* vaccine on immune gene expression and protection in farmed olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Vaccine, 32, 1808–1813.

Zhijuan Mao, Jian Ye, Meifang Li, Huiying Xu and Jigang Chen. 2013. Vaccination efficiency of surface antigens and killed whole cell of *Pseudomonas putida* in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Fish & Shellfish Immunology, 35, 375-381.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวและปลากะรัง ภาคใต้

สถานที่	เจ้าของ	ความเค็ม (ppt)	ข้อมูลกระชัง	ข้อมูลปลา
สถานีที่ 1 บ้านบางไหน ต.ปากรอ อ.สิงหนคร จ.สงขลา	คุณ สหรัฐ บินดุสัะ	3	ขนาดกระชัง 4 x 4 x 8 ม. จำนวน 80 กระชัง	- ลงปลาขนาด 8 นิ้ว - ลงปลากระชัง ตั้งแต่ พฤศจิกายน 59 จำนวน 200 ตัว - อายุปลาตั้งแต่โรงเพาะเลี้ยงถึงปลากระชัง 6 เดือนครึ่ง - ให้อาหารวันละ 1 มื้อ - ช่วงแรกเริ่มเลี้ยงให้อาหารเม็ด เป็นเวลา 1 ปี - พอเข้าปีที่ 2 ให้อาหารสด ปลาเป็ด - เลี้ยงขนาด 4 – 5 กิโลกรัม ครบ 2 ปี จึงจับขาย - มีอาการตายช่วงน้ำท่วม (มกราคม 60) - ปลาขนาด 9 นิ้ว ตาย 50 % - พอปลาเริ่มตาย ใช้อ๊อกซี่ ผสมอาหาร
สถานีที่ 2 บ้านแหลมจาก ต.ปากรอ อ.สิงหนคร จ.สงขลา	คุณจำเนียร แก้วชูศรี		ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม.	- เวลาฝนตกหนักน้ำจะไหลผ่านคลองปากรอ จึงทำให้ปลาเป็นโรคก่อนจุดอื่น - จากปลา 500 ตัว ตอนนี้เหลือ ประมาณ 80 ตัว - ปลาขนาด 6 นิ้ว ที่มีการตาย
สถานีที่ 3 ท่าเรือเฉ ต.ปากบารา อ.ละงู จ.สตูล	คุณ ดนหล๊ะ คีรีรัตน์	25	ขนาดกระชัง 3 x 3 x2 ม. - ปลาเก๋า 18 กระชัง - ปลากะพง 4 กระชัง	- ปลาเก๋า 150 ตัว/กระชัง ถ้ามีขนาดเล็กก็อาจลงได้ถึง 200 ตัว - ปลากะพง 200 ตัว/กระชัง - ให้อาหารเหยื่อ (ปลาเป็ด) มาตั้งแต่อนุบาล ปลาเป็ดซื้อกิโลกรัมละ 7-8 บาท - ปลาเก๋าให้อาหาร 4-5 วัน/ครั้ง - ปลากะพงให้อาหารวันเว้นวัน - ปลาเก๋าจะมีลักษณะเกล็ดพอง ตัวดำ ตาเหลือง
สถานีที่ 4 ท่าเรือเฉ ต.ปากบารา อ.ละงู จ.สตูล	คุณ สมศักดิ์ หยีมะเหรบ	25	ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม.	- จับลูกปลาเก๋า ขนาด 1-2 นิ้ว จากธรรมชาติมาอนุบาลในบ่อดิน เลี้ยงจนมีขนาด 8-9 นิ้ว จึงย้ายมาลงในกระชัง - ให้ปลาเป็ด เนื่องจากอาหารเม็ดมีราคาแพง - ปลาเก๋า ถุงลงโป่งพอง ตาเหลือง ตับเหลือง เกิดจากไวรัส - ปลากะพง มีเม็ดสาคูสากๆแทรกในกล้ามเนื้อ - ช่วงที่ป่วยและมีการตายมากที่สุด ช่วงเดือนธันวาคม(59) – มีนาคม (60)

				- ปลาในธรรมชาติก็มีการตาย เช่น ปลาสลิดหิน ปลาขี้ตัง เป็นต้น
สถานีที่ 5 คลองหลักขัน ต.ท่าข้าม อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	คุณ สมบูรณ์ ชัย เสนี	25	ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม. - 80 กระชัง มีการเลี้ยงหอยนางรม และหอยแมลงภู่ร่วมด้วยกับปลาเก๋าและกะพง - หอยแมลงภู่ จากอ่างศิลา นำมาขายพวงละ 60 บาท	- ปลากะพงเคยมีอาการตัว พอง เกล็ดช้ำ เมื่อปี 51
สถานีที่ 6 บ้านแหลม ต.วังวน อ.กันตัง จ.ตรัง	คุณ กฤษฎา หนูช่วย		ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม. - 80 กระชัง มีการเลี้ยงหอยนางรม ร่วมกับปลากะพง	- ลงลูกปลากะพง ขนาด 6 นิ้ว จำนวน 400 ตัว ตั้งแต่เดือนธันวาคม ปี 58 - ปล่อยปลาเก๋า 50 – 100 ตัว ลงในกระชังด้วย เพื่อกินเศษอาหารที่เหลือจากปลากะพง - อาหารปลาให้หัวปลาสด ซื้อมากิโลกรัมละ 7 – 8 บาท
สถานีที่7 คลองจิหลาด จ.กระบี่	คุณ สมชาย แสงสุก	28 - 30	ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม. - มี 80 กระชัง โดยเลี้ยงหอยแมลงภู่ 40 กระชัง - และอีก 40 กระชัง เลี้ยงปลาเก๋าร่วมกับกะพง - หอยแมลงภู่มาจากชลบุรี ซื้อมาพวงละ 40 บาท	- ลูกปลาส่วนใหญ่จับในธรรมชาติ จากการวางลอบ ดักไซ - หลังจากนั้นจึงปล่อยลงกระชัง - ลงลูกปลา เดือนสิงหา – กันยา ปี 59 - ให้อาหารสด ปลาเหยื่อทั้งตัว (ปลาทูแขก) หัวปลา - ทั้งปลาเก๋าและกะพงให้อาหารสดวันละ 150 กิโลกรัม - ปลาทูแขก ซื้อกิโลกรัมละ 16 บาท - หัวปลา ซื้อกิโลกรัมละ 4 บาท
สถานีที่8 แหลมสัก อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	คุณ ประเสริฐ วารีศรี		ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม. - ไม่ทราบจำนวนกระชัง แต่มีการเลี้ยงหอยแมลงภู่กับสาหร่ายพวงองุ่น	- ปลาเก๋าและกะพงตายมากที่สุดช่วงฤดูน้ำหลาก แต่ช่อนทะเลไม่ตาย

			- กระชังปลาอยู่ที่อ่าวเหนา ระยะทางประมาณ 3 กิโลเมตร - หอยแมลงภู่ ซื้อพวงละ 50 บาท	
สถานีที่ 9 ต.ทุ่งมะพร้าว อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	คุณบุญพา วัลยเพชร		ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม.	
สถานีที่ 10 บ้านแหลมทราย ต.เทพกระษัตรี อ.ถลาง จ.ภูเก็ต	คุณ ศิริโรจน์ ลิ้มนันทพิสิฐ	30	ขนาดกระชัง 3 x 3 x 2 ม. - มี 24 กระชัง โดยเลี้ยงปลาเก๋าและปลากะพงเป็นหลัก - มีเลี้ยงปลาอื่นด้วย เช่น ปลาช่อนทะเล ปลาเสือพ่อน้ำ	- เนื่องจากการจับขายจะจับปลาจากกระชังมาลงในบ่อพัก จึงทำให้ปลาบอบช้ำ เป็นแผลอยู่หลายตัว เนื่องจากเกิดความเครียด - ในจังหวัดภูเก็ตเองมีปัญหา ปลากะพงเกล็ดหลุด ผิวด่างตกเลือด ที่ยังแก้ปัญหาไม่ได้ - มีอัตรารอดแค่ 20 % - ปลากะพงขนาด 200 กรัม มีปัญหารอยด่างมากที่สุด
สถานีที่ 11 บ้านคอเอน อ.ถลาง จ.ภูเก็ต	คุณสมพร ชลเขตต์	ช่วงเดือนเมษายน อาจมีความเค็มถึง 38	ขนาดกระชัง 2 x 5 x 2.5 ม. - 15 กระชัง มีปลาเก๋า ปลากะพง ปลามง หอยแมลงภู่ และสาหร่ายพวงองุ่น - สาหร่ายพวงองุ่น ซื้อจากเพชรบุรี กิโลกรัมละ 220 บาท นำมาชำประมาณ 2 อาทิตย์ก็จะแตกหน่อ - หอยแมลงภู่ ซื้อจากชลบุรี พวงละ 60 บาท	- ปลากะพง 5000 ตัว ที่ลงไว้เมื่อเดือนมกราคมที่ผ่านมา ปลาตายเกือบหมดภายใน 3 อาทิตย์ ตอนนี้เหลืออยู่ประมาณ 50 กว่าตัว - ปลามีอาการบวมน้ำ 50 % ทั้งปลาเก๋าและกะพง

ตารางที่ 2 ข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่างปลากะพงขาว ภาคตะวันออก

สถานที่	เจ้าของ	ความเค็ม (ppt)	ข้อมูลบ่อ/กระชัง	ข้อมูลปลา
สถานีที่ 1 ม.8 ต.สองคลอง อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	คุณ สุรพล ยังมากนาม	6.1	บ่อดิน ขนาด 1-2 ไร่ จำนวน 4 บ่อ -บ่อใหญ่ 1 บ่อ -บ่อเล็ก 3 บ่อ	- ลงปลาขนาด 1.4 นิ้ว - บ่อเล็ก ลงปลา 40000 ตัว - บ่อใหญ่ ลงปลา 80000 ตัว - การคัดขนาด ใช้อวนลาก แล้วใช้กะละมังคัดขนาดขนาด - ปลาเลี้ยงด้วยปลาเหยื่อ 25 วัน คัดขนาด - ถ้าเลี้ยงด้วยอาหารเม็ด 1 เดือน คัดขนาด - เลี้ยงด้วยปลาเหยื่อ และ อาหารเม็ด - ถ้าปลาที่อนุบาลด้วยปลาเหยื่อ นำมาเลี้ยงด้วยอาหารเม็ด ปลาจะไม่ยอมกินอาหาร - มีการสาดจุลินทรีย์อาทิตย์ละครั้ง
สถานีที่ 2 ม.6 ต.สองคลอง อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	คุณ วันชัย	6.4	บ่อดิน	
สถานีที่ 3 ม. 8 ต.สองคลอง อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	คุณ อานนท์	8.0	บ่อดิน	-ปล่อยปลาตุ้มจากบ่อปูนขนาด 1 นิ้ว จำนวน 44000 ตัว ลงในบ่อดิน - เลี้ยงอาหารเม็ด จากปลาขนาด 1 นิ้ว จนถึงขนาด 5 นิ้ว ใช้ระยะเวลา 1 เดือนครึ่ง
สถานีที่ 4 ต.ท่าข้าม อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	คุณ วชรพร พรหมศิริ	26.4	กระชังขนาด 4 x 4 x 2.5 ม.24 กระชัง	- ตั้งแต่ปี 52 พบปลามีอาการ เกล็ดหลุด ตัวแดง ตุ่มแดง บางครั้งภายในตุ่มแดงนั้นจะเน่า แต่ปลายังมีชีวิตอยู่ - พบมากในช่วงน้ำเปลี่ยน พอโดนแดดก็ไม่ค่อยมีอาการ
สถานีที่ 5 ต.ท่าข้าม อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	คุณ ประยุทธ์ พรหมศิริ	27.1	กระชังขนาด 4 x 4 x 2.5 ม.	

สถานีที่ 6 ต.ท่าข้าม อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	คุณ มนธิชา กิจระกาล	26.4		
สถานีที่7 อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	กิตติฟาร์ม	27.1	บ่อปูน - มี 18 บ่อ	- ปลาขนาด 3 นิ้ว จากบ่อดิน นำมาพักไว้ปรับน้ำ รอส่งออกที่มาเลเซีย - ให้อาหารสด
สถานีที่8 อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	สินเมธา ฟาร์ม*	30.6	บ่อปูน - มี 22 บ่อ	- ปลาในบ่อพัก มีอาการป่วย ตั้งแต่วันที่เก็บตัวอย่าง
สถานีที่ 9 ม.6 ต.สองคลอง อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	คุณ วันชัย	28.6	บ่อปูน - มีทั้งหมด 80 บ่อ - แต่พักปลาอยู่ 21 บ่อ	- ปลาขนาด 3 นิ้ว จากบ่อดิน นำมาปรับน้ำ 2-3 วัน ในบ่อปูน
สถานีที่ 10 ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี	คุณวาสนา มณีรัตน์ ฟาร์มทะเลทอง	33.1	บ่อปูน	
สถานีที่ 11 จ.จันทบุรี	ฟาร์ม ลุงนิด*	บ่อดิน 12.6 กระชัง 9.4	กระชัง และบ่อดิน - มี 40 กระชัง - เลี้ยงปลาอยู่ 28 กระชัง	- ปล่อยปลา 3000 ตัว ขนาด 5-6 นิ้ว เลี้ยงจนมีขนาด 8-9 นิ้ว - เลี้ยงปลา 3 รุ่น หมุนเวียนกันไป ช่วงไหนปลาใหญ่ราคาดีก็จับขายเอาเงินที่ได้มาเป็นทุนเลี้ยงรุ่นเล็กต่อ สลับกันไปมา - เลี้ยงอาหารเม็ด - ให้อาหาร 2 มื้อ เช้า-เย็น สำหรับบ่อดิน - ปลากระชังให้มื้อเย็น ครั้งเดียว - เคยมีการระบาดของโรค เมื่อปลายปี 59 - ตัวอย่างปลาที่ได้มา ขนาด 8-9 นิ้ว มีลักษณะตาขุ่น ตาแดง น่าจะเป็น Mycrobacterium

* ปลาป่วย เป็นการระบาดของเชื้อ *Vibrio vulnificus*

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรีย Vibrio โคโลนีสีเขียวที่แยกจากปลากะพงขาวและปลากะรัง ตามระดับภูมิภาค

สถานี	สถานที่	ตัวอย่าง	ตัวที่	รหัสตัวอย่าง	กว้าง (เซนติเมตร)	ยาว (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กรัม)	โคโลนีเขียวบน TCBS				หมายเหตุ
								ไต		ตับ		
								โคโลนีเล็ก	โคโลนีใหญ่	โคโลนีเล็ก	โคโลนีใหญ่	
1	บ้านบางไหน ตำบลปากรอ อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา	ปลากะพง (กระชัง)	1	SS101	10.5	27.5	230	0	-	0	-	
			2	SS102	7.8	29.2	260	0	-	0	-	
			3	SS103	9.5	29.0	300	0	-	0	-	
			4	SS104	10.9	27.5	310	0	-	8	-	
			5	SS105	11.5	29.5	350	1	-	2	-	
			6	SS106	11.5	32.5	430	1	-	0	-	
			7	SS107	11.9	34.0	460	1	-	1	-	
			8	SS108	13.5	32.5	430	0	-	1	-	
			9	SS109	10.0	32.0	400	1	-	1	-	
			10	SS110	12.0	30.0	360	3	-	0	-	
2	บ้านแหลม จาก ตำบลปากรอ อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา	ปลากะพง (กระชัง)	1	SS201	11.5	35.0	630	4	-	1	-	
			2	SS202	11.0	38.0	760	1	-	2	-	
			3	SS203	11.0	34.5	610	0	-	5	-	ตกเลือด
3	ท่าเรือเฉ บ้านปากบารา อำเภอละงู จังหวัดสตูล	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG301	6.4	22.0	200	0	0	0	0	
			2	SG302	7.3	24.0	230	1	0	0	0	
			3	SG303	10.0	27.5	500	1	0	2	0	
			4	SG304	10.5	30.0	560	2	0	1	0	
			5	SG305	7.0	24.0	180	1	0	0	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS301	7.5	20.0	110	60	0	76	0	
			2	SS302	8.8	23.7	190	49	0	11	2	
			3	SS303	8.5	23.2	150	13	0	17	0	
			4	SS304	8.3	22.8	140	126	0	9	0	
			5	SS305	8.4	21.5	130	1	0	107	0	
4	ท่าเรือเฉ บ้านปากบารา	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG401	5.3	17.5	80	80	44	23	112	
			2	SG402	5.3	15.6	70	9	10	5	8	
			3	SG403	5.5	19.3	100	25	2	113	7	

	อำเภอละงู จังหวัดสตูล		4	SG404	5.5	18.0	90	19	3	15	15	
			5	SG405	5.5	16.8	70	7	2	0	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS401	7.3	19.5	80	6	0	6	5	
			2	SS402	7.6	25.0	180	7	0	25	4	
			3	SS403	8.8	24.0	150	2	3	2	2	
			4	SS404	10.0	23.3	160	10	2	0	3	
			5	SS405	11.3	27.3	230	8	18	7	0	
5	คลองหลักขัน ตำบลท่าข้าม อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG501	5.5	28.7	390	5	3	2	0	
			2	SG502	8.2	23.4	270	23	1	4	0	
			3	SG503	7.6	22.8	220	0	0	4	0	
			4	SG504	8.6	26.2	220	3	1	0	2	
			5	SG505	6.6	22.8	150	1	0	3	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS501	8.8	27.3	250	178	18	72	1	
			2	SS502	12.0	34.3	500	2	0	3	0	
			3	SS503	13.7	38.5	820	0	0	1	1	
			4	SS504	12.7	38.5	650	1	0	31	0	
			5	SS505	13.7	36.0	690	6	0	28	3	
		ปลาเสือตอ	1		11.3	24.5	450	0	-	0	-	
6	บ้านแหลม ตำบลวังวน อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG601	9.0	27.5	280	1	0	0	0	
			2	SG602	8.8	32.0	390	14	0	0	0	
			3	SG603	9.5	29.5	320	0	0	0	0	
			4	SG604	9.0	35.0	350	0	0	0	0	
			5	SG605	8.2	28.0	310	2	0	1	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS601	7.8	22.3	130	0	0	0	0	
			2	SS602	10.2	27.5	250	49	0	4	0	
			3	SS603	9.8	24.3	200	1	0	8	2	
			4	SS604	7.2	23.2	150	0	0	1	0	
			5	SS605	9.2	24.0	130	0	0	0	0	
7	คลองจิหลาด อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG701	7.0	23.5	170	0	0	0	0	
			2	SG702	9.0	32.2	420	43	0	20	0	
			3	SG703	6.6	24.0	180	2	0	0	0	
			4	SG704	8.1	28.2	360	31	2	46	0	
			5	SG705	7.5	26.2	270	16	0	0	2	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS701	8.9	24.5	170	0	0	0	0	
			2	SS702	9.5	29.0	320	0	0	0	0	

			3	SS703	8.0	25.8	170	4	2	0	0	
			4	SS704	9.0	26.5	200	0	0	0	0	
			5	SS705	8.0	25.7	190	0	0	0	0	
8	บ้านแหลมสัก อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG801	3.8	12.4	30	50	0	62	2	
			2	SG802	7.6	23.6	200	1	0	3	1	
			3	SG803	7.3	27.3	250	1	0	0	0	
			4	SG804	7.2	22.0	150	3	1	0	0	
			5	SG805	4.7	16.3	50	56	0	29	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS801	5.3	13.0	40	135	0	147	0	
			2	SS802	4.7	16.6	60	233	0	87	0	
			3	SS803	4.6	16.3	50	142	0	53	0	
			4	SS804	4.5	15.3	50	42	0	75	0	
			5	SS805	5.0	16.2	50	6	0	26	0	
9	บ้านทุ่งมะพร้าว ตำบลโคกกลอย อำเภอท้ายเหมือง จังหวัดพังงา	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG901	9.0	38.0	710	63	0	3	0	
			2	SG902	12.0	38.0	900	0	0	0	0	
			3	SG903	12.3	38.2	1500	0	0	0	0	
			4	SG904	10.0	35.0	580	30	0	2	0	
			5	SG905	10.5	34.5	560	5	1	0	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS901	12.0	38.5	620	0	0	0	0	
			2	SS902	10.5	34.6	480	15	0	3	1	
			3	SS903	13.5	38.3	620	4	2	5	5	
			4	SS904	11.5	37.2	580	0	0	0	0	
			5	SS905	10.5	38.0	590	0	0	0	0	
10	บ้านแหลมทราย ตำบลเทพกระษัตรี อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต	ปลากะรัง (กระชัง)	1	SG1001	7.2	22.8	190	46	0	8	0	
			2	SG1002	9.5	34.2	520	8	0	0	0	
			3	SG1003	9.2	31.2	450	0	0	0	0	
			4	SG1004	8.0	29.5	330	0	0	0	0	แผลตกเลือด
			5	SG1005	7.3	29.8	300	13	0	0	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS1001	7.9	33.0	460	0	0	0	0	
			2	SS1002	7.5	34.0	420	0	0	0	0	
			3	SS1003	9.5	33.0	400	0	0	0	0	
			4	SS1004	10.6	34.8	450	0	0	0	0	
			5	SS1005	9.4	32.3	380	3	0	1	0	
11			1	SG1101	7.3	30.3	360	0	0	0	0	

	บ้านคอเอน ตำบลไม้ขาว อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต	ปลากะรัง (กระชัง)	2	SG1102	8.0	25.3	290	0	0	0	0	
			3	SG1103	8.3	24.3	260	0	0	0	0	บวมน้ำ
			4	SG1104	8.0	26.7	230	0	0	0	0	บวมน้ำ
			5	SG1105	7.5	28.0	300	0	0	0	0	
		ปลากะพง (กระชัง)	1	SS1101	10.0	32.0	390	1	0	11	0	บวมน้ำ
			2	SS1102	9.0	37.0	430	20	0	2	0	
			3	SS1103	13.0	33.0	450	16	0	9	3	
			4	SS1104	11.0	32.4	380	0	0	0	0	บวมน้ำ
			5	SS1105	9.5	32.0	340	0	0	1	0	บวมน้ำ
12	ม.8 ตำบลสองคลอง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (บ่อดิน)	1	ES101	3.8	12.2	22	0	1	0	0	
			2	ES102	3.8	12.4	21	0	0	0	0	
			3	ES103	3.6	12.0	21	0	0	0	0	
			4	ES104	3.4	10.7	15	1	0	0	0	
			5	ES105	3.5	10.9	15	0	0	0	0	
			6	ES106	2.9	10.2	10	0	0	0	0	
			7	ES107	3.0	9.9	11	0	0	0	0	
			8	ES108	2.8	9.2	9	0	0	0	0	
			9	ES109	2.6	6.2	2	0	0	0	0	
			10	ES110	1.5	5.5	1.5	0	0	0	0	
13	ม.6 ตำบลสองคลอง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (บ่อดิน)	1	ES201	2.0	8.3	8	0	0	0	0	
			2	ES202	2.2	8.5	8	0	0	0	0	
			3	ES203	1.9	8.4	9	0	0	0	0	
			4	ES204	2.1	7.6	5	0	0	0	0	
			5	ES205	1.9	7.9	5	0	0	0	0	
			6	ES206	1.9	7.6	4	0	0	0	0	
			7	ES207	1.9	7.7	5	3	0	0	0	
			8	ES208	2.0	7.2	5	0	0	0	0	
			9	ES209	2.1	7.8	5	0	0	0	0	
			10	ES210	2.0	7.3	6	0	0	0	0	
14	ม.8 ตำบลสองคลอง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (บ่อดิน)	1	ES301	4.9	11.3	70	0	0	0	0	
			2	ES302	4.5	17.5	49	0	0	0	0	
			3	ES303	4.2	15.5	40	0	0	0	0	
			4	ES304	3.9	14.4	35	0	0	0	0	
			5	ES305	3.7	14.0	31	0	0	0	0	
			6	ES306	3.2	12.0	20	0	0	0	0	
			7	ES307	3.2	11.2	19	0	0	0	0	

			8	ES308	2.8	11.2	18	0	0	0	0	
			9	ES309	3.1	11.0	18	0	0	0	0	
			10	ES310	3.2	11.1	18	0	0	0	0	
15	ตำบลท่าข้าม อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (กระชัง)	1	ES401	11.7	40.7	970	0	0	0	0	
			2	ES402	10.3	37.7	680	0	1	10	0	
			3	ES403	11.2	37.3	840	0	0	17	0	
			4	ES404	10.6	36.8	755	4	0	11	0	
			5	ES405	10.6	37.9	780	2	0	3	0	
16	ตำบลท่าข้าม อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (กระชัง)	1	ES501	9.5	35.8	610	0	0	54	0	
			2	ES502	10.3	37.4	780	50	0	0	0	
			3	ES503	9.4	37.5	650	48	0	62	0	
			4	ES504	9.5	36.0	640	0	0	0	0	
			5	ES505	9.0	33.8	500	103	0	0	0	
16	ตำบลท่าข้าม อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (กระชัง)	1	ES601	3.2	12.5	20	0	0	0	0	ลงปลา 25 วัน
			2	ES602	3.0	12.2	21	0	0	3	0	
			3	ES603	2.9	10.8	19	0	0	0	0	
			4	ES604	2.9	11.5	20	0	0	0	0	
			5	ES605	2.7	10.3	18	0	0	5	0	
			6	ES606	2.6	10.4	10	0	0	0	0	
			7	ES607	2.7	10.7	15	0	0	0	0	
			8	ES608	2.7	10.2	16	0	0	0	0	
			9	ES609	2.6	9.9	16	0	0	0	0	
			10	ES610	2.5	9.7	10	0	0	0	0	
17	ม.6 ตำบลสองคลอง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (บ่อปูน)	1	ES701	2.2	9.0	9	0	0	0	0	
			2	ES702	2.1	8.2	9	0	0	10	0	
			3	ES703	2.0	7.2	9	0	0	4	0	
			4	ES704	2.0	7.7	10	0	0	0	0	
			5	ES705	2.0	7.7	10	0	0	2	0	
			6	ES706	1.9	7.3	10	0	0	4	0	
			7	ES707	2.0	7.4	11	0	0	0	0	
			8	ES708	2.1	7.8	9	0	0	0	0	
			9	ES709	2.0	7.3	9	0	0	0	0	
			10	ES710	2.0	7.4	9	0	0	0	0	
18	ม.6 ตำบลสองคลอง	ปลากะพง (บ่อปูน)	1	ES801	3.7	14.6	20	0	0	0	0	
			2	ES802	3.0	11.4	15	0	0	0	0	

	อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา		3	ES803	2.7	10.3	14	0	0	1	0	
			4	ES804	2.5	10.5	14	0	0	0	0	
			5	ES805	2.6	9.9	14	0	0	0	0	
			6	ES806	2.5	9.9	14	2	0	0	0	
			7	ES807	2.3	9.1	8	0	0	1	0	
			8	ES808	2.4	9.7	8	0	0	0	0	
			9	ES809	2.4	9.2	7	0	0	0	0	
			10	ES810	2.5	9.7	7	1	0	1	0	
19	ม.6 ตำบลสองคลอง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	ปลากะพง (บ่อปูน)	1	ES901	2.0	8.0	8	0	0	0	0	
			2	ES902	1.9	8.0	8	0	0	0	0	
			3	ES903	2.1	7.4	8	0	0	4	1	
			4	ES904	2.0	7.6	8	1	0	0	0	
			5	ES905	1.8	6.9	7	0	0	0	0	
			6	ES906	2.0	7.4	8	0	0	0	0	
			7	ES907	2.0	8.0	7	0	0	0	0	
			8	ES908	1.8	7.5	8	0	0	0	0	
			9	ES909	2.1	7.4	8	0	0	0	0	
			10	ES910	2.0	7.3	7	0	0	0	0	
20	ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมืองจังหวัดชลบุรี	ปลากะพง (บ่อปูน)	1	ES1001	0.9	3.7	2	0	0	0	0	
			2	ES1002	0.9	3.5	1	0	0	0	0	
			3	ES1003	1.1	3.6	2	0	0	0	0	
			4	ES1004	1.0	3.5	1	0	0	0	0	
			5	ES1005	1.0	3.6	2	1	0	0	0	
			6	ES1006	1.1	3.6	2	2	0	0	0	
			7	ES1007	1.0	3.4	1	0	0	0	0	
			8	ES1008	1.0	3.5	1	0	0	0	0	
			9	ES1009	1.1	4.0	3	0	0	0	0	
			10	ES1010	1.0	3.2	1	0	0	0	0	
21	ฟาร์มลุงนิด จังหวัดจันทบุรี	ปลากะพง (กระชัง)	1	ES1101	10.5	38.0	640	0	0	0	0	
			2	ES1102	10.5	38.4	680	0	0	0	0	
			3	ES1103	8.5	33.5	430	0	0	0	0	
			4	ES1104	8.0	33.0	430	0	0	1	8	
			5	ES1105	10.0	34.2	540	2	0	0	1	
			6	ES1106	8.5	32.5	430	36	0	55	11	
			7	ES1107	11.0	36.5	650	0	0	0	0	

			8	ES1108	8.6	33.5	380	0	0	0	0	
			9	ES1109	9.9	33.2	510	0	0	0	0	
			10	ES1110	11.4	38.5	720	0	0	0	0	
			11	ES1111	10.5	36.2	590	0	0	0	0	
			12	ES1112	11.0	37.4	660	0	0	0	0	
			13	ES1113	4.5	20.3	70	0	0	0	0	
			14	ES1114	6.5	22.6	110	0	0	0	0	
			15	ES1115	5.5	19.5	70	0	23	5	42	
			16	ES1116	5.5	22.5	100	0	0	2	0	
			17	ES1117	6.0	21.5	130	0	0	0	0	

หมายเหตุ : SG คือ ปลาเก๋าจากภาคใต้, SS คือ ปลากะพงจากภาคใต้, ES คือปลากะพงจากภาคตะวันออก

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างปลากะพงขาวและปลาเก๋า ภาคใต้ด้วยเทคนิคแอนติบอดี

Spice	ID	Site	Source	Dot blotting	
				VV20D1	VVB158/7
ปลากะพง	SS104LG1	บ.บางไหน จ.สงขลา	ตับ	-	-
	SS104LG2	"	ตับ	-	-
	SS104LG3	"	ตับ	-	-
	SS104LG4	"	ตับ	-	-
	SS104LG5	"	ตับ	-	-
	SS104LG6	"	ตับ	-	-
	SS104LG7	"	ตับ	-	-
	SS104LG8	"	ตับ	-	-
	SS105KG1	"	ไต	-	-
	SS106KG1	"	ไต	-	-
	SS107KG1	"	ไต	-	-
	SS108LG1	"	ตับ	-	-
	SS109KG1	"	ไต	-	-
	SS109LG1	"	ตับ	-	-
	SS110KG1	"	ไต	-	-
	SS110KG2	"	ไต	-	-
ปลากะพง	SS201KG1	บ.แหลมจาก จ.สงขลา	ไต	-	-
	SS201KG2	"	ไต	-	-
	SS201KG4	"	ไต	-	-
	SS202KG1	"	ไต	-	-
	SS202LG1	"	ตับ	-	-
	SS203LG1	"	ตับ	-	-
	SS203LG2	"	ตับ	-	-
	SS203LG4	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	SSP6Y1	ปัตตานี	ลูกปลา	-	-
	SSP6Y2	"	ลูกปลา	-	-
	SSP6Y3	"	ลูกปลา	-	-
	SSP8G1	"	ลูกปลา	-	-
	SSP8G2	"	ลูกปลา	-	-
ปลากะรัง	SG302KGS1	ต.ปากบารา จ.สตูล	ไต	-	-

	SG303KGS1	"	ไต	-	-
	SG303LGS2	"	ตับ	-	-
	SG304KGS1	"	ไต	-	-
	SG304KGS2	"	ไต	-	-
	SG304LGL1	"	ตับ	-	-
	SG305KGS1	"	ไต	-	-
ปลากะพง	SS301KGS1	"	ไต	-	-
	SS301KGS2	"	ไต	-	-
	SS301KGS3	"	ไต	-	-
	SS301KGS4	"	ไต	-	-
	SS301KGS5	"	ไต	-	-
	SS301KGS6	"	ไต	-	-
	SS301KGS7	"	ไต	-	-
	SS301KGS8	"	ไต	-	-
	SS301KGS9	"	ไต	-	-
	SS301KGS10	"	ไต	-	-
	SS301LGS1	"	ตับ	-	-
	SS301LGS2	"	ตับ	-	-
	SS301LGS3	"	ตับ	-	-
	SS301LGS4	"	ตับ	-	-
	SS301LGS5	"	ตับ	-	-
	SS301LGS6	"	ตับ	-	-
	SS301LGS7	"	ตับ	-	-
	SS301LGS8	"	ตับ	-	-
	SS301LGS9	"	ตับ	-	-
	SS301LGS10	"	ตับ	-	-
	SS302KGS1	"	ไต	-	-
	SS302KGS2	"	ไต	-	-
	SS302KGS3	"	ไต	-	-
	SS302KGS4	"	ไต	-	-
	SS302KGS5	"	ไต	-	-
	SS302KGS6	"	ไต	-	-
	SS302KGS7	"	ไต	-	-
	SS302KGS8	"	ไต	-	-
	SS302KGS9	"	ไต	-	-
	SS302KGS10	"	ไต	-	-

	SS302LGS1	"	ตับ	-	-
	SS302LGS2	"	ตับ	-	-
	SS302LGS3	"	ตับ	-	-
	SS302LGS5	"	ตับ	-	-
	SS302LGS6	"	ตับ	-	-
	SS302LGS7	"	ตับ	-	-
	SS302LGS8	"	ตับ	-	-
	SS302LGS9	"	ตับ	-	-
	SS302LGS10	"	ตับ	-	-
	SS302LGL1	"	ตับ	-	-
	SS302LGL2	"	ตับ	-	-
	SS303KGS1	"	ไต	-	-
	SS303KGS2	"	ไต	-	-
	SS303KGS3	"	ไต	-	-
	SS303KGS4	"	ไต	-	-
	SS303KGS6	"	ไต	-	-
	SS303KGS7	"	ไต	-	-
	SS303KGS8	"	ไต	-	-
	SS303KGS9	"	ไต	-	-
	SS303KGS10	"	ไต	-	-
	SS303LGS1	"	ตับ	-	-
	SS303LGS2	"	ตับ	-	-
	SS303LGS3	"	ตับ	-	-
	SS303LGS5	"	ตับ	-	-
	SS303LGS6	"	ตับ	-	-
	SS303LGS8	"	ตับ	-	-
	SS303LGS9	"	ตับ	-	-
	SS303LGS10	"	ตับ	-	-
	SS304KGS1	"	ไต	-	-
	SS304KGS2	"	ไต	-	-
	SS304KGS3	"	ไต	-	-
	SS304KGS4	"	ไต	-	-
	SS304KGS5	"	ไต	-	-
	SS304KGS6	"	ไต	-	-
	SS304KGS7	"	ไต	-	-
	SS304KGS8	"	ไต	-	-

	SS304KGS9	"	ไต	-	-
	SS304KGS10	"	ไต	-	-
	SS304LGS1	"	ตับ	-	-
	SS304LGS2	"	ตับ	-	-
	SS304LGS3	"	ตับ	-	-
	SS304LGS4	"	ตับ	-	-
	SS304LGS5	"	ตับ	-	-
	SS304LGS6	"	ตับ	-	-
	SS304LGS7	"	ตับ	-	-
	SS304LGS8	"	ตับ	-	-
	SS304LGS9	"	ตับ	-	-
	SS305KGS1	"	ไต	-	-
	SS305LGS1	"	ตับ	-	-
	SS305LGS2	"	ตับ	-	-
	SS305LGS3	"	ตับ	-	-
	SS305LGS4	"	ตับ	-	-
	SS305LGS5	"	ตับ	-	-
	SS305LGS6	"	ตับ	-	-
	SS305LGS7	"	ตับ	-	-
	SS305LGS8	"	ตับ	-	-
	SS305LGS9	"	ตับ	-	-
	SS305LGS10	"	ตับ	-	-
ปลากะรัง	SG401KGS1	ต.ปากบารา จ.สตูล	ไต	-	-
	SG401KGS2	"	ไต	-	-
	SG401KGS3	"	ไต	-	-
	SG401KGS4	"	ไต	-	-
	SG401KGS5	"	ไต	-	-
	SG401KGS6	"	ไต	-	-
	SG401KGS7	"	ไต	-	-
	SG401KGS8	"	ไต	-	-
	SG401KGS9	"	ไต	-	-
	SG401KGS10	"	ไต	-	-
	SG401KGL1	"	ไต	-	-
	SG401KGL2	"	ไต	-	-
	SG401KGL3	"	ไต	-	-
	SG401KGL4	"	ไต	-	-

	SG401KGL5	"	ไต	-	-
	SG401KGL6	"	ไต	-	-
	SG401KGL7	"	ไต	-	-
	SG401KGL8	"	ไต	-	-
	SG401KGL9	"	ไต	-	-
	SG401LGS1	"	ตับ	-	-
	SG401LGS2	"	ตับ	-	-
	SG401LGS3	"	ตับ	-	-
	SG401LGS4	"	ตับ	-	-
	SG401LGS5	"	ตับ	-	-
	SG401LGS7	"	ตับ	-	-
	SG401LGS8	"	ตับ	-	-
	SG401LGS9	"	ตับ	-	-
	SG401LGS10	"	ตับ	-	-
	SG401LGL1	"	ตับ	-	-
	SG401LGL2	"	ตับ	-	-
	SG401LGL3	"	ตับ	-	-
	SG401LGL4	"	ตับ	-	-
	SG401LGL6	"	ตับ	-	-
	SG401LGL8	"	ตับ	-	-
	SG401LGL9	"	ตับ	-	-
	SG401LGL10	"	ตับ	-	-
	SG402KGS1	"	ไต	-	-
	SG402KGS2	"	ไต	-	-
	SG402KGS3	"	ไต	-	-
	SG402KGS4	"	ไต	-	-
	SG402KGS5	"	ไต	-	-
	SG402KGS6	"	ไต	-	-
	SG402KGS7	"	ไต	-	-
	SG402KGS8	"	ไต	-	-
	SG402KGS9	"	ไต	-	-
	SG402KGL1	"	ไต	-	-
	SG402KGL2	"	ไต	-	-
	SG402KGL3	"	ไต	-	-
	SG402KGL4	"	ไต	-	-
	SG402KGL5	"	ไต	-	-

	SG402KGL6	"	ไต	-	-
	SG402KGL7	"	ไต	-	-
	SG402KGL8	"	ไต	-	-
	SG402KGL9	"	ไต	-	-
	SG402KGL10	"	ไต	-	-
	SG402LGS1	"	ตับ	-	-
	SG402LGS2	"	ตับ	-	-
	SG402LGS3	"	ตับ	-	-
	SG402LGS4	"	ตับ	-	-
	SG402LGS5	"	ตับ	-	-
	SG402LGL1	"	ตับ	-	-
	SG402LGL2	"	ตับ	-	-
	SG402LGL3	"	ตับ	-	-
	SG402LGL4	"	ตับ	-	-
	SG402LGL6	"	ตับ	-	-
	SG402LGL7	"	ตับ	-	-
	SG402LGL8	"	ตับ	-	-
	SG403KGS1	"	ไต	-	-
	SG403KGS2	"	ไต	-	-
	SG403KGS3	"	ไต	-	-
	SG403KGS4	"	ไต	-	-
	SG403KGS5	"	ไต	-	-
	SG403KGS6	"	ไต	-	-
	SG403KGS7	"	ไต	-	-
	SG403KGS8	"	ไต	-	-
	SG403KGS9	"	ไต	-	-
	SG403KGS10	"	ไต	-	-
	SG403KGL1	"	ไต	-	-
	SG403KGL2	"	ไต	-	-
	SG403LGS1	"	ตับ	-	-
	SG403LGS2	"	ตับ	-	-
	SG403LGS3	"	ตับ	-	-
	SG403LGS4	"	ตับ	-	-
	SG403LGS5	"	ตับ	-	-
	SG403LGS6	"	ตับ	-	-
	SG403LGS7	"	ตับ	-	-

	SG403LGS9	"	ตับ	-	-
	SG403LGS10	"	ตับ	-	-
	SG403LGL1	"	ตับ	-	-
	SG403LGL2	"	ตับ	-	-
	SG403LGL3	"	ตับ	-	-
	SG403LGL4	"	ตับ	-	-
	SG403LGL5	"	ตับ	-	-
	SG403LGL7	"	ตับ	-	-
	SG404KGS1	"	ไต	-	-
	SG404KGS2	"	ไต	-	-
	SG404KGS3	"	ไต	-	-
	SG404KGS4	"	ไต	-	-
	SG404KGS5	"	ไต	-	-
	SG404KGS6	"	ไต	-	-
	SG404KGS7	"	ไต	-	-
	SG404KGS8	"	ไต	-	-
	SG404KGS9	"	ไต	-	-
	SG404KGS10	"	ไต	-	-
	SG404KGL2	"	ไต	-	-
	SG404KGL3	"	ไต	-	-
	SG404LGS1	"	ตับ	-	-
	SG404LGS2	"	ตับ	-	-
	SG404LGS3	"	ตับ	-	-
	SG404LGS4	"	ตับ	-	-
	SG404LGS6	"	ตับ	-	-
	SG404LGS8	"	ตับ	-	-
	SG404LGS9	"	ตับ	-	-
	SG404LGS10	"	ตับ	-	-
	SG404LGL1	"	ตับ	-	-
	SG404LGL2	"	ตับ	-	-
	SG404LGL3	"	ตับ	-	-
	SG404LGL4	"	ตับ	-	-
	SG404LGL5	"	ตับ	-	-
	SG404LGL6	"	ตับ	-	-
	SG404LGL7	"	ตับ	-	-
	SG404LGL8	"	ตับ	-	-

	SG404LGL9	"	ตับ	-	-
	SG404LGL10	"	ตับ	-	-
	SG405KGS1	"	ไต	-	-
	SG405KGS3	"	ไต	-	-
	SG405KGS5	"	ไต	-	-
	SG405KGS6	"	ไต	-	-
	SG405KGS7	"	ไต	-	-
	SG405KGL1	"	ไต	-	-
	SG405KGL2	"	ไต	-	-
ปลากะพง	SS401KGS1	"	ไต	-	-
	SS401KGS2	"	ไต	-	-
	SS401KGS3	"	ไต	-	-
	SS401KGS4	"	ไต	-	-
	SS401KGS5	"	ไต	-	-
	SS401KGS6	"	ไต	-	-
	SS401LGS1	"	ตับ	+	-
	SS401LGS2	"	ตับ	-	-
	SS401LGS3	"	ตับ	+	+
	SS401LGS4	"	ตับ	+	+
	SS401LGS5	"	ตับ	-	+
	SS401LGS6	"	ตับ	-	-
	SS401LGL1	"	ตับ	-	+
	SS401LGL2	"	ตับ	-	-
	SS401LGL3	"	ตับ	-	+
	SS401LGL4	"	ตับ	-	+
	SS401LGL5	"	ตับ	+	+
	SS402KGS1	"	ไต	-	-
	SS402KGS2	"	ไต	-	-
	SS402KGS3	"	ไต	-	-
	SS402KGS4	"	ไต	-	-
	SS402KGS5	"	ไต	-	-
	SS402KGS6	"	ไต	-	-
	SS402LGS1	"	ตับ	-	-
	SS402LGS2	"	ตับ	-	-
	SS402LGS3	"	ตับ	-	-

SS402LGS4	"	ตับ	-	-
SS402LGS5	"	ตับ	-	-
SS402LGS6	"	ตับ	-	-
SS402LGS7	"	ตับ	-	-
SS402LGS8	"	ตับ	-	+
SS402LGS9	"	ตับ	-	+
SS402LGS10	"	ตับ	-	-
SS402LGL1	"	ตับ	+	+
SS402LGL2	"	ตับ	-	+
SS402LGL3	"	ตับ	-	-
SS402LGL4	"	ตับ	+	+
SS403KGS2	"	ไต	+	+
SS403KGL1	"	ไต	+	+
SS403KGL2	"	ไต	-	-
SS403KGL3	"	ไต	+	+
SS403LGS1	"	ตับ	-	-
SS403LGS2	"	ตับ	-	-
SS404KGS1	"	ไต	-	-
SS404KGS2	"	ไต	-	-
SS404KGS3	"	ไต	-	+
SS404KGS4	"	ไต	-	-
SS404KGS5	"	ไต	-	-
SS404KGS6	"	ไต	-	-
SS404KGS7	"	ไต	+	+
SS404KGS8	"	ไต	+	+
SS404KGS9	"	ไต	-	-
SS404KGS10	"	ไต	-	-
SS404KGL1	"	ไต	+	+
SS404KGL2	"	ไต	-	-
SS404LGL1	"	ตับ	-	-
SS404LGL2	"	ตับ	+	+
SS404LGL3	"	ตับ	-	-
SS405KGS1	"	ไต	-	-
SS405KGS2	"	ไต	-	-

	SS405KGS3	"	ไต	-	+
	SS405KGS4	"	ไต	-	+
	SS405KGS5	"	ไต	-	-
	SS405KGS6	"	ไต	-	+
	SS405KGS7	"	ไต	-	-
	SS405KGS8	"	ไต	-	-
	SS405KGL1	"	ไต	-	-
	SS405KGL2	"	ไต	-	-
	SS405KGL3	"	ไต	-	-
	SS405KGL4	"	ไต	-	-
	SS405KGL5	"	ไต	-	-
	SS405KGL6	"	ไต	-	-
	SS405KGL7	"	ไต	-	-
	SS405KGL8	"	ไต	-	-
	SS405KGL9	"	ไต	-	-
	SS405KGL10	"	ไต	-	-
	SS405LGS1	"	ตับ	-	-
	SS405LGS2	"	ตับ	-	-
	SS405LGS3	"	ตับ	-	-
	SS405LGS4	"	ตับ	-	-
	SS405LGS5	"	ตับ	-	-
	SS405LGS6	"	ตับ	-	-
	SS405LGS7	"	ตับ	-	-
ปลากะรัง	SG501KGS1	ต.ท่าข้าม จ.ตรัง	ไต	-	-
	SG501KGS2	"	ไต	-	-
	SG501KGS3	"	ไต	-	-
	SG501KGS4	"	ไต	-	-
	SG501KGS5	"	ไต	-	-
	SG501KGS6	"	ไต	-	-
	SG501KGS7	"	ไต	-	-
	SG501KGS8	"	ไต	-	-
	SG501KGL1	"	ไต	-	-
	SG501KGL2	"	ไต	-	-
	SG501KGL3	"	ไต	-	-
	SG501LGS1	"	ตับ	-	-

	SG501LGS2	"	ตับ	-	-
	SG502KGS1	"	ไต	-	-
	SG502KGS2	"	ไต	-	-
	SG502KGS3	"	ไต	-	-
	SG502KGS4	"	ไต	-	-
	SG502KGS5	"	ไต	-	-
	SG502KGS6	"	ไต	-	-
	SG502KGS7	"	ไต	-	-
	SG502KGS8	"	ไต	-	-
	SG502KGS9	"	ไต	-	-
	SG502KGS10	"	ไต	-	-
	SG502KGL1	"	ไต	-	-
	SG502LGS1	"	ตับ	-	-
	SG502LGS3	"	ตับ	-	-
	SG502LGS4	"	ตับ	-	-
	SG503LGS1	"	ตับ	-	-
	SG503LGS2	"	ตับ	-	-
	SG503LGS4	"	ตับ	-	-
	SG504KGS1	"	ไต	-	-
	SG504KGS2	"	ไต	-	-
	SG504KGS3	"	ไต	-	-
	SG504KGL1	"	ไต	-	-
	SG504LGL1	"	ตับ	-	-
	SG504LGL2	"	ตับ	-	-
	SG505KGS1	"	ไต	-	-
	SG505LGS1	"	ตับ	-	-
	SG505LGS2	"	ตับ	-	-
	SG505LGS3	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	SS501KGS1	"	ไต	-	-
	SS501KGS2	"	ไต	-	-
	SS501KGS3	"	ไต	-	-
	SS501KGS4	"	ไต	-	-
	SS501KGS5	"	ไต	-	-
	SS501KGS6	"	ไต	-	-
	SS501KGS7	"	ไต	-	-
	SS501KGS8	"	ไต	-	-

	SS501KGS9	"	ไต	-	-
	SS501KGS10	"	ไต	-	-
	SS501KGL1	"	ไต	-	-
	SS501KGL2	"	ไต	-	-
	SS501KGL3	"	ไต	-	-
	SS501KGL4	"	ไต	-	-
	SS501KGL5	"	ไต	-	-
	SS501KGL6	"	ไต	-	-
	SS501KGL7	"	ไต	-	-
	SS501KGL8	"	ไต	-	-
	SS501KGL9	"	ไต	-	-
	SS501KGL10	"	ไต	-	-
	SS501LGS1	"	ตับ	-	-
	SS501LGS2	"	ตับ	-	-
	SS501LGS3	"	ตับ	-	-
	SS501LGS4	"	ตับ	-	-
	SS501LGS5	"	ตับ	-	-
	SS501LGS6	"	ตับ	-	-
	SS501LGS7	"	ตับ	-	-
	SS501LGS8	"	ตับ	-	-
	SS501LGS9	"	ตับ	-	-
	SS501LGS10	"	ตับ	-	-
	SS501LGL1	"	ตับ	-	-
	SS502KGS1	"	ไต	-	-
	SS502KGS2	"	ไต	-	-
	SS502LGS1	"	ตับ	-	-
	SS502LGS2	"	ตับ	-	-
	SS503LGS1	"	ตับ	-	-
	SS503LGL1	"	ตับ	-	-
	SS504KGS1	"	ไต	-	-
	SS504LGS1	"	ตับ	-	-
	SS504LGS2	"	ตับ	-	-
	SS504LGS3	"	ตับ	-	-
	SS504LGS4	"	ตับ	-	-
	SS504LGS5	"	ตับ	-	-
	SS504LGS6	"	ตับ	-	-

	SS504LGS7	"	ตับ	-	-
	SS504LGS8	"	ตับ	-	-
	SS504LGS9	"	ตับ	-	-
	SS504LGS10	"	ตับ	-	-
	SS505KGS1	"	ไต	-	-
	SS505KGS2	"	ไต	-	-
	SS505KGS3	"	ไต	-	-
	SS505KGS4	"	ไต	-	-
	SS505KGS5	"	ไต	-	-
	SS505KGS6	"	ไต	-	-
	SS505LGS1	"	ตับ	-	-
	SS505LGS2	"	ตับ	-	-
	SS505LGS3	"	ตับ	-	-
	SS505LGS4	"	ตับ	-	-
	SS505LGS5	"	ตับ	-	-
	SS505LGS6	"	ตับ	-	-
	SS505LGS7	"	ตับ	-	-
	SS505LGS8	"	ตับ	-	-
	SS505LGS9	"	ตับ	-	-
	SS505LGS10	"	ตับ	-	-
	SS505LGL1	"	ตับ	-	-
	SS505LGL2	"	ตับ	-	-
	SS505LGL3	"	ตับ	-	-
ปลากะรัง	SG601KGS1	ต.วังวน จ.ตรัง	ไต		
	SG602KGS1	"	ไต		
	SG602KGS2	"	ไต		
	SG602KGS3	"	ไต	-	-
	SG602KGS4	"	ไต	-	-
	SG602KGS5	"	ไต	-	-
	SG602KGS6	"	ไต	-	-
	SG602KGS7	"	ไต	-	-
	SG602KGS8	"	ไต	-	-
	SG602KGS9	"	ไต	-	-
	SG602KGS10	"	ไต	-	-
	SG605KGS1	"	ไต	-	-
	SG605KGS2	"	ไต	-	-

ปลากะพง	SS602KGS1	"	ไต	-	-
	SS602KGS2	"	ไต	-	-
	SS602KGS3	"	ไต	-	-
	SS602KGS4	"	ไต	-	-
	SS602KGS5	"	ไต	-	-
	SS602KGS6	"	ไต	-	-
	SS602KGS7	"	ไต	-	-
	SS602KGS8	"	ไต	-	-
	SS602KGS9	"	ไต	-	-
	SS602KGS10	"	ไต	-	-
	SS602LGS1	"	ตับ	-	-
	SS602LGS2	"	ตับ	-	-
	SS602LGS3	"	ตับ	-	-
	SS602LGS4	"	ตับ	-	-
	SS603KGS1	"	ตับ	-	-
	SS603LGS1	"	ตับ	-	-
	SS603LGS2	"	ตับ	-	-
	SS603LGS3	"	ตับ	-	-
	SS603LGS4	"	ตับ	-	-
	SS603LGS5	"	ตับ	-	-
	SS603LGS6	"	ตับ	-	-
	SS603LGS7	"	ตับ	-	-
	SS603LGS8	"	ตับ	-	-
	SS603LGL1	"	ตับ	-	-
	SS603LGL2	"	ตับ	-	-
	SS604LGS1	"	ตับ	-	-
ปลากะรัง	SG702KGS1	คลองจิหลาด จ.กระบี่	ไต	-	-
	SG702KGS2	"	ไต	-	-
	SG702KGS3	"	ไต	-	-
	SG702KGS4	"	ไต	-	-
	SG702KGS5	"	ไต	-	-
	SG702KGS6	"	ไต	-	-
	SG702KGS7	"	ไต	-	-
	SG702KGS8	"	ไต	-	-
	SG702KGS9	"	ไต	-	-
	SG702KGS10	"	ไต	-	-

	SG702LGS1	"	ตับ	-	-
	SG702LGS2	"	ตับ	-	-
	SG702LGS3	"	ตับ	-	-
	SG702LGS4	"	ตับ	-	-
	SG702LGS5	"	ตับ	-	-
	SG702LGS6	"	ตับ	-	-
	SG702LGS7	"	ตับ	-	-
	SG702LGS8	"	ตับ	-	-
	SG702LGS9	"	ตับ	-	-
	SG702LGS10	"	ตับ	-	-
	SG703KGS1	"	ไต	-	-
	SG703KGS2	"	ไต	-	-
	SG704KGS1	"	ไต	-	-
	SG704KGS2	"	ไต	-	-
	SG704KGS3	"	ไต	-	-
	SG704KGS4	"	ไต	-	-
	SG704KGS5	"	ไต	-	-
	SG704KGS6	"	ไต	-	-
	SG704KGS7	"	ไต	-	-
	SG704KGS8	"	ไต	-	-
	SG704KGS9	"	ไต	-	-
	SG704KGS10	"	ไต	-	-
	SG704KGL1	"	ไต	-	-
	SG704KGL2	"	ไต	-	-
	SG704LGS1	"	ตับ	-	-
	SG704LGS2	"	ตับ	-	-
	SG704LGS3	"	ตับ	-	-
	SG704LGS4	"	ตับ	-	-
	SG704LGS5	"	ตับ	-	-
	SG704LGS6	"	ตับ	-	-
	SG704LGS7	"	ตับ	-	-
	SG704LGS8	"	ตับ	-	-
	SG704LGS9	"	ตับ	-	-
	SG704LGS10	"	ตับ	-	-
	SG705KGS1	"	ไต	-	-
	SG705KGS2	"	ไต	-	-

	SG705KGS3	"	ไต	-	-
	SG705KGS4	"	ไต	-	-
	SG705KGS5	"	ไต	-	-
	SG705KGS6	"	ไต	-	-
	SG705KGS7	"	ไต	-	-
	SG705KGS8	"	ไต	-	-
	SG705KGS9	"	ไต	-	-
	SG705KGS10	"	ไต	-	-
	SG705LGL1	"	ตับ	-	-
	SG705LGL2	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	SS703KGS4	"	ไต	-	-
	SS703KGL1	"	ไต	-	-
	SS703KGL2	"	ไต	-	-
ปลากะรัง	SG801KGS1	บ.แหลมสัก จ.กระบี่	ไต	-	-
	SG801KGS3	"	ไต	-	-
	SG801KGS4	"	ไต	-	-
	SG801KGS5	"	ไต	-	-
	SG801KGS6	"	ไต	-	-
	SG801KGS7	"	ไต	-	-
	SG801KGS9	"	ไต	-	-
	SG801LGS1	"	ตับ	-	-
	SG801LGS2	"	ตับ	-	-
	SG801LGS3	"	ตับ	-	-
	SG801LGS4	"	ตับ	-	-
	SG801LGS5	"	ตับ	-	-
	SG801LGS6	"	ตับ	-	-
	SG801LGS7	"	ตับ	-	-
	SG801LGS8	"	ตับ	-	-
	SG801LGS9	"	ตับ	-	-
	SG801LGS10	"	ตับ	-	-
	SG801LGL2	"	ตับ	-	-
	SG802KGS1	"	ไต	-	-
	SG803KGS1	"	ไต	-	-
	SG804KGS3	"	ไต	-	-
	SG804KGL1	"	ไต	-	-
	SG805KGS1	"	ไต	-	-

	SG805KGS2	"	ไต	-	-
	SG805KGS3	"	ไต	-	-
	SG805KGS4	"	ไต	-	-
	SG805KGS5	"	ไต	-	-
	SG805KGS6	"	ไต	-	-
	SG805KGS7	"	ไต	-	-
	SG805KGS8	"	ไต	-	-
	SG805KGS9	"	ไต	-	-
	SG805KGS10	"	ไต	-	-
	SG805LGS1	"	ตับ	-	-
	SG805LGS2	"	ตับ	-	-
	SG805LGS3	"	ตับ	-	-
	SG805LGS4	"	ตับ	-	-
	SG805LGS5	"	ตับ	-	-
	SG805LGS6	"	ตับ	-	-
	SG805LGS7	"	ตับ	-	-
	SG805LGS8	"	ตับ	-	-
	SG805LGS9	"	ตับ	-	-
	SG805LGS10	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	SS801KGS1	"	ไต	-	-
	SS801KGS2	"	ไต	-	-
	SS801KGS3	"	ไต	-	-
	SS801KGS4	"	ไต	-	-
	SS801KGS5	"	ไต	-	-
	SS801KGS6	"	ไต	-	-
	SS801KGS7	"	ไต	-	-
	SS801KGS8	"	ไต	-	-
	SS801KGS9	"	ไต	-	-
	SS801KGS10	"	ไต	-	-
	SS801LGS1	"	ตับ	-	-
	SS801LGS2	"	ตับ	-	-
	SS801LGS3	"	ตับ	-	-
	SS801LGS4	"	ตับ	-	-
	SS801LGS5	"	ตับ	-	-
	SS801LGS6	"	ตับ	-	-
	SS801LGS7	"	ตับ	-	-

	SS801LGS8	"	ตับ	-	-
	SS801LGS9	"	ตับ	-	-
	SS801LGS10	"	ตับ	-	-
	SS802KGS1	"	ไต	-	-
	SS802KGS2	"	ไต	-	-
	SS802KGS3	"	ไต	-	-
	SS802KGS4	"	ไต	-	-
	SS802KGS5	"	ไต	-	-
	SS802KGS6	"	ไต	-	-
	SS802KGS7	"	ไต	-	-
	SS802KGS8	"	ไต	-	-
	SS802KGS9	"	ไต	-	-
	SS802KGS10	"	ไต	-	-
	SS802LGS1	"	ตับ	-	-
	SS802LGS2	"	ตับ	-	-
	SS802LGS3	"	ตับ	-	-
	SS802LGS4	"	ตับ	-	-
	SS802LGS5	"	ตับ	-	-
	SS802LGS6	"	ตับ	-	-
	SS802LGS7	"	ตับ	-	-
	SS802LGS8	"	ตับ	-	-
	SS802LGS9	"	ตับ	-	-
	SS802LGS10	"	ตับ	-	-
	SS803KGS1	"	ไต	-	-
	SS803KGS2	"	ไต	-	-
	SS803KGS3	"	ไต	-	-
	SS803KGS4	"	ไต	-	-
	SS803KGS5	"	ไต	-	-
	SS803KGS6	"	ไต	-	-
	SS803KGS7	"	ไต	-	-
	SS803KGS8	"	ไต	-	-
	SS803KGS9	"	ไต	-	-
	SS803KGS10	"	ไต	-	-
	SS803LGS1	"	ตับ	-	-
	SS803LGS2	"	ตับ	-	-
	SS803LGS3	"	ตับ	-	-

	SS803LGS4	"	ตับ	-	-
	SS803LGS5	"	ตับ	-	-
	SS803LGS6	"	ตับ	-	-
	SS803LGS7	"	ตับ	-	-
	SS803LGS8	"	ตับ	-	-
	SS803LGS9	"	ตับ	-	-
	SS803LGS10	"	ตับ	-	-
	SS804KGS1	"	ไต	-	-
	SS804KGS2	"	ไต	-	-
	SS804KGS3	"	ไต	-	-
	SS804KGS4	"	ไต	-	-
	SS804KGS5	"	ไต	-	-
	SS804KGS6	"	ไต	-	-
	SS804KGS7	"	ไต	-	-
	SS804KGS9	"	ไต	-	-
	SS804KGS10	"	ไต	-	-
	SS804LGS1	"	ตับ	-	-
	SS804LGS2	"	ตับ	-	-
	SS804LGS3	"	ตับ	-	-
	SS804LGS4	"	ตับ	-	-
	SS804LGS5	"	ตับ	-	-
	SS804LGS6	"	ตับ	-	-
	SS804LGS7	"	ตับ	-	-
	SS804LGS8	"	ตับ	-	-
	SS804LGS9	"	ตับ	-	-
	SS804LGS10	"	ตับ	-	-
	SS805KGS1	"	ไต	-	-
	SS805KGS2	"	ไต	-	-
	SS805KGS3	"	ไต	-	-
	SS805KGS4	"	ไต	-	-
	SS805KGS5	"	ไต	-	-
	SS805KGS6	"	ไต	-	-
	SS805LGS1	"	ตับ	-	-
	SS805LGS2	"	ตับ	-	-
	SS805LGS3	"	ตับ	-	-
	SS805LGS4	"	ตับ	-	-

	SS805LGS5	"	ตับ	-	-
	SS805LGS6	"	ตับ	-	-
	SS805LGS8	"	ตับ	-	-
	SS805LGS9	"	ตับ	-	-
	SS805LGS10	"	ตับ	-	-
ปลากะรัง	SG901KGS1	ต.ทุ่งมะพร้าว จ.พังงา	ไต	-	-
	SG901KGS2	"	ไต	-	-
	SG901KGS3	"	ไต	-	-
	SG901KGS4	"	ไต	-	-
	SG901KGS5	"	ไต	-	-
	SG901KGS6	"	ไต	-	-
	SG901KGS7	"	ไต	-	-
	SG901KGS8	"	ไต	-	-
	SG901KGS9	"	ไต	-	-
	SG901KGS10	"	ไต	-	-
	SG901LGS1	"	ตับ	-	-
	SG901LGS2	"	ตับ	-	-
	SG901LGS3	"	ตับ	-	-
	SG904KGS1	"	ไต	-	-
	SG904KGS2	"	ไต	-	-
	SG904KGS3	"	ไต	-	-
	SG904KGS4	"	ไต	-	-
	SG904KGS5	"	ไต	-	-
	SG904KGS6	"	ไต	-	-
	SG904KGS7	"	ไต	-	-
	SG904KGS8	"	ไต	-	-
	SG904KGS9	"	ไต	-	-
	SG904KGS10	"	ไต	-	-
	SG904LGS1	"	ตับ	-	-
	SG904LGS2	"	ตับ	-	-
	SG905KGS1	"	ไต	-	-
	SG905KGS2	"	ไต	-	-
	SG905KGS3	"	ไต	-	-
	SG905KGS4	"	ไต	-	-
	SG905KGS5	"	ไต	-	-
	SG905KGL1	"	ไต	-	-

ปลากะพง	SS902KGS1	"	ไต	-	-
	SS902KGS2	"	ไต	-	-
	SS902KGS3	"	ไต	-	-
	SS902KGS4	"	ไต	-	-
	SS902KGS5	"	ไต	-	-
	SS902KGS6	"	ไต	-	-
	SS902KGS7	"	ไต	-	-
	SS902KGS8	"	ไต	-	-
	SS902KGS9	"	ไต	-	-
	SS902KGS10	"	ไต	-	-
	SS902LGL1	"	ตับ	-	-
	SS903KGS1	"	ไต	-	-
	SS903KGS2	"	ไต	-	-
	SS903KGS3	"	ไต	-	-
	SS903KGL1	"	ไต	-	-
	SS903KGL2	"	ไต	-	-
	SS903LGS1	"	ตับ	-	-
	SS903LGS2	"	ตับ	-	-
	SS903LGS3	"	ตับ	-	-
	SS903LGS4	"	ตับ	-	-
	SS903LGS5	"	ตับ	-	-
	SS903LGL1	"	ตับ	-	-
	SS903LGL2	"	ตับ	-	-
	SS903LGL3	"	ตับ	-	-
	SS903LGL4	"	ตับ	-	-
	SS903LGL5	"	ตับ	-	-
ปลากะรัง	SG1001KGS1	บ.แหลมทราย จ.ภูเก็ต	ไต	-	-
	SG1001KGS2	"	ไต	-	-
	SG1001KGS3	"	ไต	-	-
	SG1001KGS4	"	ไต	-	-
	SG1001KGS5	"	ไต	-	-
	SG1001KGS6	"	ไต	-	-
	SG1001KGS7	"	ไต	-	-
	SG1001KGS8	"	ไต	-	-
	SG1001KGS9	"	ไต	-	-
	SG1001KGS10	"	ไต	-	-

	SG1001LGS1	"	ตับ	-	-
	SG1001LGS2	"	ตับ	-	-
	SG1001LGS3	"	ตับ	-	-
	SG1001LGS4	"	ตับ	-	-
	SG1001LGS5	"	ตับ	-	-
	SG1001LGS6	"	ตับ	-	-
	SG1001LGS7	"	ตับ	-	-
	SG1001LGS8	"	ตับ	-	-
	SG1002KGS1	"	ไต	-	-
	SG1002KGS2	"	ไต	-	-
	SG1002KGS3	"	ไต	-	-
	SG1002KGS4	"	ไต	-	-
	SG1002KGS5	"	ไต	-	-
	SG1002KGS6	"	ไต	-	-
	SG1002KGS7	"	ไต	-	-
	SG1002KGS8	"	ไต	-	-
	SG1005KGS1	"	ไต	-	-
	SG1005KGS2	"	ไต	-	-
	SG1005KGS3	"	ไต	-	-
	SG1005KGS4	"	ไต	-	-
	SG1005KGS5	"	ไต	-	-
	SG1005KGS6	"	ไต	-	-
	SG1005KGS7	"	ไต	-	-
	SG1005KGS8	"	ไต	-	-
	SG1005KGS9	"	ไต	-	-
	SG1005KGS10	"	ไต	-	-
ปลากะพง	SS1005KGS1	"	ไต	-	-
	SS1005KGS2	"	ไต	-	-
	SS1005KGS3	"	ไต	-	-
	SS1005LGS1	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	SS1102KGS1	บ.คอเอน จ.ภูเก็ต	ไต	-	-
	SS1102KGS3	"	ไต	-	-
	SS1102KGS4	"	ไต	-	-
	SS1102KGS6	"	ไต	-	-
	SS1102KGS7	"	ไต	-	-
	SS1102KGS8	"	ไต	-	-

	SS1102KGS9	"	ไต	-	-
	SS1102KGS10	"	ไต	-	-
	SS1102LGS1	"	ตับ	-	-
	SS1102LGS2	"	ตับ	-	-
	SS1103KGS2	"	ไต	-	-
	SS1103KGS3	"	ไต	-	-
	SS1103KGS4	"	ไต	-	-
	SS1103KGS5	"	ไต	-	-
	SS1103KGS6	"	ไต	-	-
	SS1103KGS7	"	ไต	-	-
	SS1103KGS8	"	ไต	-	-
	SS1103KGS9	"	ไต	-	-
	SS1103KGS10	"	ไต	-	-
	SS1103LGS1	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS2	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS3	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS4	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS5	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS6	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS7	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS8	"	ตับ	-	-
	SS1103LGS9	"	ตับ	-	-

หมายเหตุ : S= South , E= Eastern, S= Sea bass, G=Grouper, 101= สถานีที่1ตัวที่1, L=Liver, K=Kidney, ล= โคโลนีขนาดเล็ก ,ญ= โคโลนีขนาดใหญ่, เลขหลังสุด คือ หมายเลขของโคโลนีของตัวอย่าง

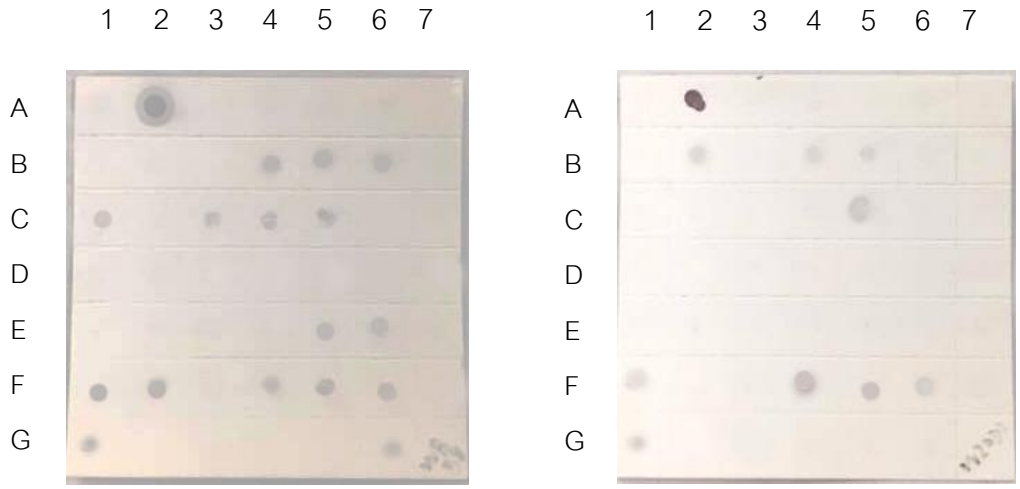
เช่น SS104LG1 หมายถึง โคโลนีเขียวที่ 1 จากตับปลากะพงขาวจากภาคใต้ สถานีที่ 1 ตัวที่ 4

SS104LG2 หมายถึง โคโลนีเขียวที่ 2 จากตับปลากะพงขาวจากภาคใต้ สถานีที่ 1 ตัวที่ 4

SS105KG1หมายถึง โคโลนีเขียวที่ 1 จากไตปลากะพงขาวจากภาคใต้ สถานีที่ 1 ตัวที่ 5

SG302KGS1หมายถึง โคโลนีเขียวเล็กที่ 1 จากไตปลากะพงขาวจากภาคใต้ สถานีที่ 3 ตัวที่ 2

SG304LGL1หมายถึง โคโลนีเขียวใหญ่ที่ 1 จากตับปลากะพงขาวจากภาคใต้ สถานีที่ 3 ตัวที่4



VVB158/7 แผ่นที่1 VV20D1 แผ่นที่1

ภาพที่ 1 แถว A; Negative control (*V. alginoliticus* 14800), Positive control (*V.vulnificus* biotype II), SS401KGS1, SS401KGS2, SS401KGS3, SS401KGS4 ,SS401KGS5

แถว B; S401KGS6 , SS401LGS1, SS401LGS2, SS401LGS3, SS401LGS4 , SS401LGS5, SS401LGS6

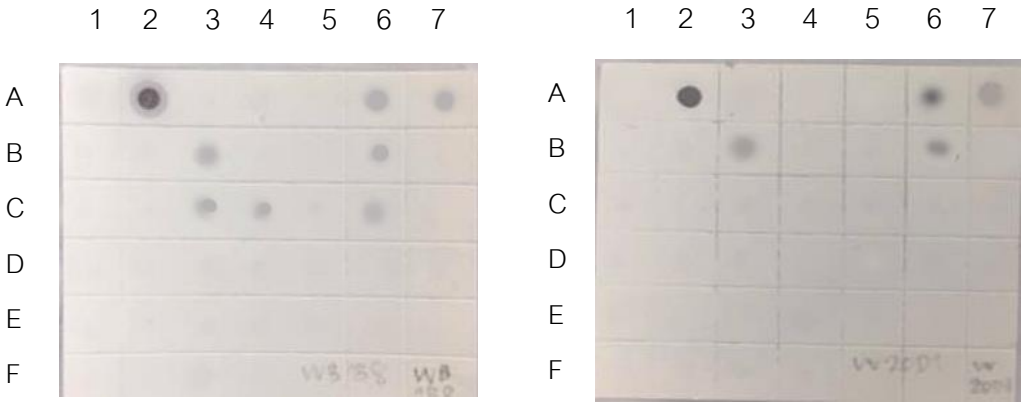
แถว C; SS401LGL1, SS401LGL2, SS401LGL3, SS401LGL4, SS401LGL5, SS402KGS1, SS402KGS2

แถว D; SS402KGS3 , SS402KGS4, SS402KGS5 ,SS402KGS6, SS402LGS1, SS402LGS2, SS402LGS3

แถว E; SS402LGS4 , SS402LGS5, SS402LGS6 ,SS402LGS7, SS402LGS8, SS402LGS9, SS402LGS10

แถว F; SS402LGL1, SS402LGL2, SS402LGL3, SS402LGL4, SS403KGS2, SS403KGL1, SS403KGL2

แถว G; SS403KGL3, SS403LGS1, SS403LGS2, SS404KGS1, SS404KGS2, SS404KGS3



VVB158/7 แผ่นที่2 VV20D1 แผ่นที่2

ภาพที่ 2 แถว A; Negative control (*V. alginoliticus* 14800), Positive control (*V.vulnificus* biotype II), SS404KGS4, SS404KGS5, SS404KGS6, SS404KGS7, SS404KGS8

แถว B; SS404KGS9, SS404KGS10, SS404KGL1, SS404KGL2, SS404LGL1, SS404LGL2, SS404LGL3

แถว C; SS405KGS1, SS405KGS2, SS405KGS3, SS405KGS4, SS405KGS5, SS405KGS6, SS405KGS7

แถว D; SS405KGS8, SS405KGL1, SS405KGL2, SS405KGL3, SS405KGL4, SS405KGL5, SS405KGL6

แถว E; SS405KGL7, SS405KGL8, SS405KGL9, SS405KGL10, SS405LGS1, SS405LGS2, SS405LGS3

แถว F; SS405LGS4, SS405LGS5, SS405LGS6, SS405LGS7

ตารางที่ 5 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *V. vulnificus* จากตัวอย่างปลากะพงขาว ภาคตะวันออก ด้วยเทคนิคแอนติบอดี

Type	ID	Site	Source	Dot blotting	
				VV20D1	VVB158/7
ปลากะพง	ES101KGL1	บ่อดิน ต.สองคลอง	ไต	+	-
ปลากะพง	ES202LGS1	บ่อดิน ต.สองคลอง	ตับ	-	-
	ES202LGS2	"	ตับ	-	-
	ES202LGS3	"	ตับ	-	-
	ES203LGS6	"	ตับ	-	-

	ES204LGS1	"	ตับ	-	-
	ES204LGS2	"	ตับ	-	-
	ES204LGS3	"	ตับ	-	-
	ES204LGS4	"	ตับ	-	-
	ES204LGS5	"	ตับ	-	-
	ES205LGS1	"	ตับ	-	-
	ES205LGS2	"	ตับ	-	-
	ES205LGS3	"	ตับ	-	-
	ES205LGS4	"	ตับ	-	-
	ES205LGS5	"	ตับ	-	-
	ES205LGS6	"	ตับ	-	-
	ES205LGS7	"	ตับ	-	-
	ES205LGS8	"	ตับ	-	-
	ES205LGS9	"	ตับ	-	-
	ES205LGS10	"	ตับ	-	-
	ES209LGS1	"	ตับ	-	-
	ES209LGS2	"	ตับ	-	-
	ES209LGS3	"	ตับ	-	-
	ES209LGS4	"	ตับ	-	-
	ES209LGS5	"	ตับ	-	-
	ES209LGS6	"	ตับ	-	-
	ES209LGS7	"	ตับ	-	-
	ES209LGS8	"	ตับ	-	-
	ES209LGS9	"	ตับ	-	-
	ES209LGS10	"	ตับ	-	-
	ES210LGS1	"	ตับ	-	-
	ES210LGS2	"	ตับ	-	-
	ES210LGS3	"	ตับ	-	-
	ES210LGS4	"	ตับ	-	-
	ES210LGS5	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	ES404LGS1	กระชัง ต.ท่าข้าม	ตับ	-	-
	ES404LGS2	"	ตับ	-	-
	ES404LGS3	"	ตับ	-	-
	ES404LGS4	"	ตับ	-	-
	ES404LGS5	"	ตับ	-	-
	ES404LGS6	"	ตับ	-	-

	ES404LGS7	"	ตับ	-	-
	ES404LGS8	"	ตับ	-	-
	ES404LGS9	"	ตับ	-	-
	ES404LGS10	"	ตับ	-	-
	ES404KGS1	"	ไต	-	-
	ES404KGS2	"	ไต	-	-
	ES404KGS3	"	ไต	-	-
	ES404KGS4	"	ไต	-	-
	ES405LGS1	"	ตับ	-	-
	ES405LGS2	"	ตับ	-	-
	ES405LGS3	"	ตับ	-	-
	ES405KGS1	"	ไต	-	-
	ES405KGS2	"	ไต	-	-
ปลากะพง	ES501LGS1	กระชัง ต.ท่าข้าม	ตับ	-	-
	ES501LGS2	"	ตับ	-	-
	ES501LGS3	"	ตับ	-	-
	ES501LGS4	"	ตับ	-	-
	ES501LGS5	"	ตับ	-	-
	ES501LGS6	"	ตับ	-	-
	ES501LGS7	"	ตับ	-	-
	ES501LGS8	"	ตับ	-	-
	ES501LGS9	"	ตับ	-	-
	ES501LGS10	"	ตับ	-	-
	ES502KGS1	"	ไต	-	-
	ES502KGS2	"	ไต	-	-
	ES502KGS3	"	ไต	-	-
	ES502KGS4	"	ไต	-	-
	ES502KGS5	"	ไต	-	-
	ES502KGS6	"	ไต	-	-
	ES502KGS7	"	ไต	-	-
	ES502KGS8	"	ไต	-	-
	ES502KGS9	"	ไต	-	-
	ES502KGS10	"	ไต	-	-
	ES503LGS1	"	ตับ	-	-
	ES503LGS2	"	ตับ	-	-
	ES503LGS3	"	ตับ	-	-

	ES503LGS4	"	ตับ	-	-
	ES503LGS5	"	ตับ	-	-
	ES503LGS6	"	ตับ	-	-
	ES503LGS7	"	ตับ	-	-
	ES503LGS8	"	ตับ	-	-
	ES503LGS9	"	ตับ	+	-
	ES503LGS10	"	ตับ	-	-
	ES503KGS1	"	ไต	-	-
	ES503KGS2	"	ไต	-	-
	ES503KGS3	"	ไต	-	-
	ES503KGS4	"	ไต	-	-
	ES503KGS5	"	ไต	-	-
	ES503KGS6	"	ไต	-	-
	ES503KGS7	"	ไต	-	-
	ES503KGS8	"	ไต	-	-
	ES503KGS9	"	ไต	-	-
	ES503KGS10	"	ไต	-	-
	ES505KGS1	"	ไต	-	-
	ES505KGS2	"	ไต	-	-
	ES505KGS3	"	ไต	-	-
	ES505KGS4	"	ไต	-	-
	ES505KGS5	"	ไต	-	-
	ES505KGS6	"	ไต	-	-
	ES505KGS7	"	ไต	-	-
	ES505KGS8	"	ไต	-	-
	ES505KGS9	"	ไต	-	-
	ES505KGS10	"	ไต	-	-
ปลากะพง	ES602LGS1	กระชัง ต.ท่าข้าม	ตับ	-	-
	ES602LGS2	"	ตับ	-	-
	ES602LGS3	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	ES702LGS1	บ่อปูน ต.สองคลอง	ตับ	-	-
	ES702LGS2	"	ตับ	-	-
	ES702LGS3	"	ตับ	-	-
	ES702LGS4	"	ตับ	-	-
	ES702LGS5	"	ตับ	-	-
	ES702LGS6	"	ตับ	-	-

	ES702LGS7	"	ตับ	-	-
	ES702LGS8	"	ตับ	-	-
	ES702LGS9	"	ตับ	-	-
	ES702LGS10	"	ตับ	-	-
	ES705LGS1	"	ตับ	-	-
	ES706LGS1	"	ตับ	-	-
	ES706LGS2	"	ตับ	-	-
	ES706LGS3	"	ตับ	-	-
	ES706LGS4	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	ES803LGS1	บ่อปูน ต.สองคลอง	ตับ	-	-
	ES806KGS1	"	ไต	-	-
	ES806KGS2	"	ไต	-	-
	ES807LGS1	"	ตับ	-	-
	ES810LGS1	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	ES903LGS1	บ่อปูน ต.สองคลอง	ตับ	-	-
	ES903LGL1	"	ตับ	-	-
ปลากะพง	ES1005KGS1	บ่อปูน ต.อ่างศิลา	ไต	-	-
ปลากะพง	ES1104LGS1	กระชัง จ.จันทบุรี	ตับ	-	-
	ES1104LSL1	"	ตับ	-	-
	ES1104LSL2	"	ตับ	-	-
	ES1104LSL3	"	ตับ	-	-
	ES1104LSL4	"	ตับ	-	-
	ES1104LSL5	"	ตับ	-	-
	ES1104LSL6	"	ตับ	-	-
	ES1105LGL1	"	ตับ	+	-
	ES1105KGS1	"	ไต	-	-
	ES1105KGS2	"	ไต	-	-
	ES1106LGS1	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS3	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS4	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS5	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS6	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS7	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS8	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS9	"	ตับ	-	-
	ES1106LGS10	"	ตับ	-	-

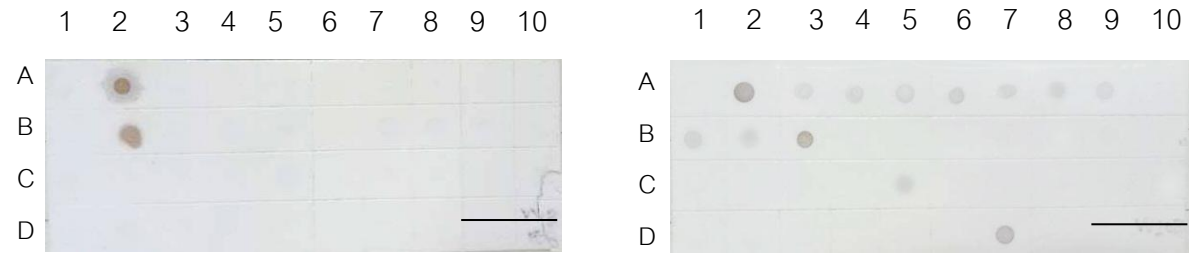
	ES1106LGL1	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL2	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL3	"	ตับ	+	-
	ES1106LGL4	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL5	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL6	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL7	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL8	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL9	"	ตับ	-	-
	ES1106LGL10	"	ตับ	-	-
	ES1106KGS1	"	ไต	-	-
	ES1106KGS2	"	ไต	-	-
	ES1106KGS3	"	ไต	-	-
	ES1106KGS4	"	ไต	-	-
	ES1106KGS5	"	ไต	-	-
	ES1106KGS6	"	ไต	-	-
	ES1106KGS7	"	ไต	-	-
	ES1106KGS9	"	ไต	+	-
	ES1106KGS10	"	ไต	-	-
	ES1115LGS1	"	ตับ	-	-
	ES1115LGS2	"	ตับ	-	-
	ES1115LGS3	"	ตับ	-	-
	ES1115LGS4	"	ตับ	-	-
	ES1115LGS5	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL1	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL2	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL3	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL4	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL5	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL6	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL7	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL8	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL9	"	ตับ	-	-
	ES1115LGL10	"	ตับ	-	-
	ES1115KGL1	"	ไต	-	-
	ES1115KGL2	"	ไต	+	-

	ES1115KGL3	"	ไต	-	-
	ES1115KGL4	"	ไต	-	-
	ES1115KGL5	"	ไต	-	-
	ES1115KGL6	"	ไต	-	-
	ES1115KGL7	"	ไต	-	-
	ES1115KGL8	"	ไต	-	-
	ES1115KGL9	"	ไต	-	-
	ES1115KGL10	"	ไต	-	-

ตารางที่ 6 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *V. vulnificus* สายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งอื่นๆ และ *Vibrio* spp. ด้วยเทคนิคแอนติบอดี

NO.	ID	Bacteria	Source	Dot Blotting	
				VV20D1	VVB158/7
1	VV1	V. *Vulnificus*	ไตกะพงขาว สงขลา	+	-
2	VV2	V. *Vulnificus*	ไตกะพงขาว สงขลา	+	-
3	VV3	V. *Vulnificus*	ตับกะพงขาว สตูล	+	-
4	VVA6	V. *Vulnificus*	เก๋าเสือ กระบี่	+	-
5	VVA7	V. *Vulnificus*	เก๋าเสือ กระบี่	+	-
6	VVA8	V. *Vulnificus*	เก๋าเสือ กระบี่	+	-
7	FVV11	V. *Vulnificus*	เก๋าเสือ ห้าหรับ	+	-
8	VVBS	V. *Vulnificus* biotype I	กะพงขาว BUU	-	-
9	VV29307	V. *Vulnificus*	ATCC	+	-
10	VV DSMT 5285	V. *Vulnificus*	DMST 5285	+	+
11	VV MT 1506	V. *Vulnificus*	MT 1506	+	-
12	VV BT	V. *Vulnificus*	BT2-89Denmark	-	-
13	VVC	V. *Vulnificus*	Cu	-	-
14	VP	V. *parahaemolyticus*	ตับกะพงขาว NICA	-	-
15	VP cect 5034	V. *parahaemolyticus*	cect 5034	-	-
16	VP DMST 15285	V. *parahaemolyticus*	DMST 15285	-	-
17	VPC	V. *parahaemolyticus*	DMSC (VPC)	-	-
18	VPB	V. *parahaemolyticus*	DASB (VPB)	-	-
19	VPV	V. *parahaemolyticus*	VAMRC (VPV)	-	-
20	VA1	V. *alginolyticus*	ตับกะพงขาว สตูล	-	-
21	VA2	V. *alginolyticus*	ไตกะพงขาว สงขลา	-	-
22	VA3	V. *alginolyticus*	ตับกะพงขาว สงขลา	-	-

23	VAL DMST 14800	V. *alginolyticus*	DMST 14800	-	-
24	VC1	V. *cholerae*	Inaba AFRIM	-	-
25	VC2	V. *cholerae*	Ogawa AFRIM	-	-
26	VC3	V. *cholerae*	0139 AFRIM	-	-
27	VH1	V. *harveyi*	KCTC 2717	-	-
28	VH2	V. *harveyi*	47666-1	-	-
29	VH3	V. *harveyi* 1526, Virulent stain	-	-	-
30	VIB 02	V. *Ordallii*	-	-	-
31	AVL01	V. *anguillarum*	-	-	-
32	T1	Unknown	กะพงขาว จันทบุรี	-	-
33	T2	Unknown	กะพงขาว จันทบุรี	-	-
34	T3	Unknown	กะพงขาว จันทบุรี	-	-
35	M1	Unknown	กะพงขาว จันทบุรี	+	-
36	M3	Unknown	กะพงขาว จันทบุรี	-	-



VVB158/7 VV20D1

ภาพที่ 3 แถว A; Negative control (*V. alginoliticus* 14800), Positive control (*V.vulnificus* biotype II), VV1, VV2, VV3, VVA6, VVA7, VVA8, FVV11, VVBS

แถว B; VV29307, VV DSMT 5285, VV MT 1506, VV BT, VVC, VP, VP cect 5034, VP DMST 15285, VPC, VPB

แถว C; VPV, VA1, VA2, VA3, VAL DMST 14800, VC1, VC2, VC3, VH1, VH2

แถว D; VH3, VIB 02, AVL01, T1, T2, T3, M1, M3

ตารางที่ 7 ผลการยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากปลากะพงขาวภาคใต้ โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

Type	ID	Site	Source	Dot blotting		PCR result
				VV20D1	VVB158/7	
ปลากะพง		ต.ปากบารา จ.สตูล				
	SS401LGS1	"	ตับ	+	-	-
	SS401LGS3	"	ตับ	+	+	-
	SS401LGS4	"	ตับ	+	+	-
	SS401LGS5	"	ตับ	-	+	-
	SS401LGL1	"	ตับ	-	+	-
	SS401LGL3	"	ตับ	-	+	-
	SS401LGL4	"	ตับ	-	+	-
	SS401LGL5	"	ตับ	+	+	-
	SS402LGS8	"	ตับ	-	+	-
	SS402LGS9	"	ตับ	-	+	-
	SS402LGL1	"	ตับ	+	+	-
	SS402LGL2	"	ตับ	-	+	-
	SS402LGL4	"	ตับ	+	+	-
	SS403KGS2	"	ไต	+	+	-
	SS403KGL1	"	ไต	+	+	-
	SS403KGL3	"	ไต	+	+	-
	SS404KGS3	"	ไต	-	+	-
	SS404KGS7	"	ไต	+	+	-
	SS404KGS8	"	ไต	+	+	-
	SS404KGL1	"	ไต	+	+	-
	SS404LGL2	"	ตับ	+	+	-
	SS405KGS3	"	ไต	-	+	-
	SS405KGS4	"	ไต	-	+	-
	SS405KGS6	"	ไต	-	+	-

ตารางที่ 8 ผลการยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* ที่แยกได้จากปลากะพงขาวภาคตะวันออก โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

Type	ID	Site	Source	Dot blotting		PCR Result
				VV20D1	VVB158/7	
ปลากะพง	ES101KGL1	ต.สองคลอง จ.ฉะเชิงเทรา	ไต	+	-	-
	ES503LGS9	ต.ท่าข้าม จ.ฉะเชิงเทรา	ตับ	+	-	-
	ES1105LGL1	อ.แหลมสิงห์ จ. จันทบุรี	ตับ	+	-	+
	ES1106KGS9		ไต	+	-	+
	ES1106LGL3		ตับ	+	-	+
	ES1115KGL2		ไต	+	-	+

ตารางที่ 9 ผลการยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* จากเนื้อเยื่อปลากะพงขาวและปลากะรังภาคใต้ โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

No.	code	Site	Source	PCR results
1	SS101	ปลากะพง บ.บางไหน จ.สงขลา	ตับ	-
2	SS102		ตับ	-
3	SS103		ตับ	-
4	SS104		ตับ	-
5	SS105		ตับ	-
6	SS106		ตับ	-
7	SS107		ตับ	-
8	SS108		ตับ	-
9	SS109		ตับ	-
10	SS110		ตับ	-
11	SS201	ปลากะพง บ.แหลมจาก จ.สงขลา	ตับ	-
12	SS202		ตับ	-
13	SS203		ตับ	-
14	SSP	ลูกปลากะพงขาว จ.ปัตตานี	ลูกปลา	-
15	ปลาเสือตอ	ปะเหลียน จ.ตรัง	ตับ	-
16	SG301	ปลาเก๋า ต.ปากบารา จ.สตูล	ตับ	-
17	SG302		ตับ	-

18	SG303		ตับ	-
19	SG304		ตับ	-
20	SG305		ตับ	-
21	SS301	ปลากะพง ต.ปากบารา จ.สตูล	ตับ	-
22	SS302		ตับ	-
23	SS303		ตับ	-
24	SS304		ตับ	-
25	SS305		ตับ	-
26	SG401	ปลาเก๋า ต.ปากบารา จ.สตูล	ตับ	-
27	SG402		ตับ	-
28	SG403		ตับ	-
29	SG404		ตับ	-
30	SG405		ตับ	-
31	SS401	ปลากะพง ต.ปากบารา จ.สตูล	ไต	-
32	SS402		ไต	-
33	SS403		ไต	-
34	SS404		ไต	-
35	SS405		ตับ	-
36	SG501	ปลาเก๋า ต.ท่าข้าม จ.ตรัง	ตับ	-
37	SG502		ตับ	-
38	SG503		ตับ	-
39	SG504		ตับ	-
40	SG505		ตับ	-
41	SS501	ปลากะพง ต.ท่าข้าม จ.ตรัง	ไต	-
42	SS502		ไต	-
43	SS503		ไต	-
44	SS504		ไต	-
45	SS505		ไต	-
46	SG601	ปลาเก๋า ต.วังวน จ.ตรัง	ตับ	-
47	SG602		ไต	-
48	SG603		ตับ	-
49	SG604		ตับ	-
50	SG605		ไต	-
51	SS601	ปลากะพง ต.วังวน จ.ตรัง	ไต	-
52	SS602		ไต	-
53	SS603		ไต	-

54	SS604		ไต	-
55	SS605		ไต	-
56	SG701	ปลาเก๋า คลองจิหลาด จ.กระบี่	ตับ	-
57	SG702		ตับ	-
58	SG703		ตับ	-
59	SG704		ตับ	-
60	SG705		ตับ	-
61	SS701	ปลากะพง คลองจิหลาด จ.กระบี่	ไต	-
62	SS702		ไต	-
63	SS703		ไต	-
64	SS704		ไต	-
65	SS705		ไต	-
66	SG801	ปลาเก๋า บ.แหลมสัก จ.กระบี่	ตับ	-
67	SG802		ตับ	-
68	SG803		ตับ	-
69	SG804		ตับ	-
70	SG805		ตับ	-
71	SS801	ปลากะพง บ.แหลมสัก จ.กระบี่	ไต	-
72	SS802		ไต	-
73	SS803		ไต	-
74	SS804		ไต	-
75	SS805		ไต	-
76	SG901	ปลาเก๋า ต.ทุ่งมะพร้าว จ.พังงา	ตับ	-
77	SG902		ตับ	-
78	SG903		ตับ	-
79	SG904		ตับ	-
80	SG905		ตับ	-
81	SS901	ปลากะพง ต.ทุ่งมะพร้าว จ.พังงา	ไต	-
82	SS902		ไต	-
83	SS903		ไต	-
84	SS904		ไต	-
85	SS905		ไต	-
86	SG1001	ปลาเก๋า บ.แหลมทราย ภูเก็ต	ตับ	-
87	SG1002		ตับ	-
88	SG1003		ตับ	-
89	SG1004		ตับ	-

90	SG1005		ตับ	-
91	SS1001	ปลากะพง บ.แหลมทราย ภูเก็ต	ตับ	-
92	SS1002		ตับ	-
93	SS1003		ตับ	-
94	SS1004		ไต	-
95	SS1005		ไต	-
96	SG1101	ปลาเก๋า บ.คอเอน จ.ภูเก็ต	ตับ	-
97	SG1102		ตับ	-
98	SG1103		ตับ	-
99	SG1104		ตับ	-
100	SG1105		ตับ	-
101	SS1101	ปลากะพง บ.คอเอน จ.ภูเก็ต	ไต	-
102	SS1102		ไต	-
103	SS1103		ไต	-
104	SS1104		ไต	-
105	SS1105		ไต	-

ตารางที่ 10 ผลการยืนยันเชื้อ *V. vulnificus* จากเนื้อเยื่อปลากะพงขาวภาคตะวันออก โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

No.	ID	Site	Source	PCR result
1	ES101	บ่อดิน ต. สองคลอง จ. ฉะเชิงเทรา	ไต	-
2	ES102		ไต	-
3	ES103		ตับ	-
4	ES104		ตับ	-
5	ES105		ตับ	+
6	ES106		ตับ	-
7	ES107		ไต	-
8	ES108		ไต	-
9	ES109		ลูกปลา	-
10	ES110		ลูกปลา	-
11	ES201	บ่อดิน ต. สองคลอง จ. ฉะเชิงเทรา	ลูกปลา	-
12	ES202		ลูกปลา	-
13	ES203		ลูกปลา	-
14	ES204		ลูกปลา	-

15	ES205		ลูกปลา	-
16	ES206		ลูกปลา	-
17	ES207		ลูกปลา	-
18	ES208		ลูกปลา	-
19	ES209		ลูกปลา	-
20	ES210		ลูกปลา	-
21	ES301	บ่อดิน ต. สองคลอง จ. ฉะเชิงเทรา	ไต	-
22	ES302		ไต	-
23	ES303		ไต	-
24	ES304		ไต	-
25	ES305		ไต	-
26	ES306		ไต	-
27	ES307		ตับ	-
28	ES308		ตับ	-
29	ES309		ตับ	-
30	ES310		ตับ	-
31	ES401	กระชัง ต. ท่าข้าม จ. ฉะเชิงเทรา	ไต	-
32	ES402		ตับ	-
33	ES403		ไต	-
34	ES404		ไต	-
35	ES405		ไต	-
36	ES501	กระชัง ต. ท่าข้าม จ. ฉะเชิงเทรา	ไต	-
37	ES502		ตับ	-
38	ES503		ไต	-
39	ES504		ไต	-
40	ES505		ตับ	-
41	ES601	กระชัง ต. ท่าข้าม จ. ฉะเชิงเทรา	ตับ	-
42	ES602		ตับ	-
43	ES603		ตับ	-
44	ES604		ตับ	-
45	ES605		ตับ	-
46	ES606		ตับ	-
47	ES607		ไต	-
48	ES608		ไต	-
49	ES609		ตับ	-
50	ES610		ตับ	-

51	ES701	บ่อปูน ต. สองคลอง จ. ฉะเชิงเทรา	ลูกปลา	-
52	ES702		ลูกปลา	-
53	ES703		ลูกปลา	-
54	ES704		ลูกปลา	-
55	ES705		ลูกปลา	-
56	ES706		ลูกปลา	-
57	ES707		ลูกปลา	-
58	ES708		ลูกปลา	-
59	ES709		ลูกปลา	-
60	ES710		ลูกปลา	-
61	ES801	บ่อปูน ต. สองคลอง จ. ฉะเชิงเทรา	ตับ	-
62	ES802		ตับ	-
63	ES803		ตับ	-
64	ES804		ลูกปลา	-
65	ES805		ลูกปลา	-
66	ES806		ลูกปลา	-
67	ES807		ลูกปลา	-
68	ES808		ลูกปลา	-
69	ES809		ลูกปลา	-
70	ES810		ลูกปลา	-
71	ES901	บ่อปูน ต. สองคลอง จ. ฉะเชิงเทรา	ลูกปลา	-
72	ES902		ลูกปลา	-
73	ES903		ลูกปลา	-
74	ES904		ลูกปลา	-
75	ES905		ลูกปลา	-
76	ES906		ลูกปลา	-
77	ES907		ลูกปลา	-
78	ES908		ลูกปลา	-
79	ES909		ลูกปลา	-
80	ES910		ลูกปลา	-
81	ES1001	บ่อปูน ต. อ่างศิลา จ. ชลบุรี	ลูกปลา	-
82	ES1002		ลูกปลา	-
83	ES1003		ลูกปลา	-
84	ES1004		ลูกปลา	-
85	ES1005		ลูกปลา	-
86	ES1006		ลูกปลา	-

87	ES1007		ลูกปลา	-
88	ES1008		ลูกปลา	-
89	ES1009		ลูกปลา	-
90	ES1010		ลูกปลา	-
91	ES1101	กระชัง ต.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี	ตับ/ไต	-
92	ES1102		ตับ/ไต	-
93	ES1103		ตับ/ไต	-
94	ES1104		ตับ/ไต	-
95	ES1105		ตับ/ไต	-
96	ES1106		ตับ/ไต	-
97	ES1107		ตับ/ไต	-
98	ES1108		ตับ/ไต	-
99	ES1109		ตับ/ไต	-
100	ES1110		ตับ/ไต	-
101	ES1111		ตับ/ไต	-
102	ES1112		ตับ/ไต	-
103	ES1113		ตับ/ไต	-
104	ES1114		ตับ/ไต	-
105	ES1115		ตับ/ไต	-
106	ES1116		ตับ/ไต	-
107	ES1117		ตับ/ไต	-

ตารางที่ 11 อัตราการตายสะสมของปลากะพงขาวหลังฉีดทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus*

Dose (CFU/มิลลิลิตร)	อัตราการตายสะสมของปลากะพงขาวหลังฉีดเชื้อแบคทีเรีย																			
	24 ชั่วโมง				48 ชั่วโมง				72 ชั่วโมง				96 ชั่วโมง				120 ชั่วโมง			
	VV B	ES503	SS404	ES1106	VV B	ES503	SS404	ES1106	VV B	ES503	SS404	ES1106	VV B	ES503	SS404	ES1106	VV B	ES503	SS404	ES1106
control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1×10^2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1×10^3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1×10^4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0
1×10^5	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	3	0
1×10^6	9	1	0	0	10	2	1	0	0	0	2	1	0	0	3	0	0	0	5	0
1×10^7	10	1	0	0	0	3	3	0	0	0	5	1	0	0	8	0	0	0	10	0
1×10^8	10	9	1	2	0	10	3	3	0	0	7	4	0	0	10	0	0	0	0	0

ภาพกิจกรรม