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. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802116
สัญญาเลขที่ 35/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาการผลิตวัคซีน Formalin killed cell เพื่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ในปลากะพงขาวและปลากะรังในเชิงพาณิชย์

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท
ดร.มลฤดี สนธิ

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
คณะเทคโนโลยีทางทะเล
มหาวิทยาลัยบูรพา

20 กันยายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 35/2561

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 35/2561)

บทคัดย่อ

การพัฒนาวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) ในการศึกษาครั้งนี้ ถูกผลิตจากเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) ที่ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาว ประสิทธิภาพการต้านทานโรคจากแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ในปลากะพงขาวขนาด nursing fry (3 -4 นิ้ว) และ juvenile (5 -6 นิ้ว) ภายหลังการได้รับวัคซีน Folmalin killed whole cell (FKC) ถูกทดสอบในสภาพการทดลองแบบจำลอง เพื่อศึกษาการตอบสนองทาง innate and adaptive immunity และการแสดงออกของยีน (Immune-related gene expression) ในระบบภูมิคุ้มกันของปลาที่กะพงขาวได้รับวัคซีน FKC, *V. vulnificus* สายพันธ์ไทย เพื่อเป็นแนวทางการใช้วัคซีน FKC เชิงพาณิชย์ในฟาร์มปลากะพงขาว ผลการศึกษาการฉีดวัคซีน FKC เชื้อตาย ร่วมกับสารสื่อแอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) เข้าสู่กล้ามเนื้อปลากะพงขาว คุ้มครองโรคที่อัตรารอดตายที่ 80% เนื่องจากวัคซีนส่งเสริมให้เกิดการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ทำการกระตุ้นการแสดงออกในระบบภูมิคุ้มกัน humoral immunity ได้ดีที่สุด โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Ag-Ab complex) ค่า antibody titer เจือจางที่ 1/30,000 จากการที่ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภท small and large lymphocyte เพิ่มขึ้นใน 40 วัน และกระตุ้นการแสดงออกในระบบภูมิคุ้มกัน innate immunity ของขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว จากการประเมินผลการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในอวัยวะ ตับ ไต และม้าม ของปลากะพงขาว การแสดงออกของยีนที่หน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับ (receptor protein) คือ CMKLR1 จะมีระดับสูง ซึ่งเป็นยีนถูกสร้างเมื่อร่างกายปลาตระหนักถึงสิ่งแปลกปลอมเข้าร่างกาย เพื่อให้ขบวนการอักเสบเกิดขึ้นให้มีการเพิ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวและสารโปรตีน และเมื่อวัคซีนตายฉีดร่วมกับสารสื่อแอดจูแวนท์ สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงได้ดีที่สุด เนื่องจากปลากะพงขาวการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ตัวจับกับแอนติเจน (binding protein) คือ IGHM, C1QL4L และ MHCII อย่างชัดเจนภายหลังการฉีดเชื้อที่ระดับวัน ในช่วง 20-30 วัน ในการศึกษาครั้งนี้ การประดิษฐ์วัคซีนเชื้อตาย ให้แนวทางการใช้วัคซีน FKC เชิงพาณิชย์ในฟาร์มปลากะพงขาว ด้วยการฉีดวัคซีนเชื้อตายสายพันธ์บูรพา ร่วมกับแอดจูแวนท์เข้าสู่กล้ามเนื้อปลากะพงขาว เหมาะสมกับลูกปลากะพงขาวขนาด 4 – 5 นิ้ว น้ำหนัก 30 – 40 กรัม เพื่อคุ้มครองโรคแบคทีเรียจาก *Vibrio vulnificus*

Abstract

Vaccination, a vaccine against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* in seabass (*Lates calcarifer*) was studied. The formalin-killed cell vaccine (FKCV) was produced from the bacteria *Vibrio vulnificus* Burapha strain. This strain causes severe infections in Asian Seabass. The ability to defend against *Vibrio vulnificus* in Asian Seabass nursing fry (size 3-4 inches) and juvenile (size 5-6 inches) after vaccination of formalin-killed whole cell (FKC) by immersion and injection administration with and without adjuvant (Freund's incomplete adjuvant) was tested in the laboratory in order to study the innate and humoral immunity response and immune-related gene expression. The results will be beneficial to the FKC's production for commercial purposes in Asian Seabass farms. The vaccinated Asian Seabass has a survival rate of 80% due to the vaccine's induction to activate and stimulate innate and adaptive immunity at its maximum capacity was founded. The reaction between antigens and antibodies (Ag-Ab complex), the antibody titer is diluted at 1/30,000 as the amount of white blood cells, small and large lymphocyte, increases after 40 days. As for stimulating innate immunity in order for white blood cells to eliminate foreign particles, the results showed CMKLR1 (receptor protein) at a high level based on the gene expression assessment in liver, kidney, and spleen. This gene expression occurs when the fish's body comes into contact with foreign particles causing inflammation and thereby increasing the white blood cells and protein. When the formalin-killed cells vaccine is used together with adjuvant, the adaptive immune response can perform its function effectively. As the Asian Seabass gene expression is responsible for binding with protein such as IGHM, C1QL4L and MHCII after vaccine injection within 20-30 days, this study determines that the formalin-killed cells vaccine production with adjuvant intraperitoneal injection in seabass for commercial purpose is most effective for Asian Seabass size 4-5 inches (30-40 grams) in preventing *Vibrio vulnificus* infection.

สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	เอกสารงานวิจัย	4
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 4	ผลการวิจัย	25
บทที่ 5	อภิปรายผลการวิจัย	60
	สรุปผลการวิจัย	66
บทที่ 6	เอกสารอ้างอิง	68
ภาคผนวก		73

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอนการดำเนินงานในเครื่อง PCR	18
ตารางที่ 2	ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอนการดำเนินงานในเครื่อง Real time PCR	19
ตารางที่ 3	ตารางแสดงไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา Quantitative Real-time PCR	23
ตารางที่ 4	แสดงอัตราการเจริญเติบโตที่ต่างกันในรูปของ น้ำหนัก ความกว้าง ความยาว ที่เพิ่มขึ้น ของปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีนต่างกันแต่ละชุดการทดลอง ตลอดการทดลอง ระยะเวลา 35 วัน	28
ตารางที่ 5	แสดงคุณภาพน้ำในบ่อปูนที่เลี้ยงปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ทำการวัดคุณภาพน้ำทุกครั้งหลังจากการคัดขนาด	28
ตารางที่ 6	แสดงอัตราการเจริญเติบโตที่ต่างกันในรูปของ น้ำหนัก ความกว้าง ความยาว ที่เพิ่มขึ้น ของปลากะพงขาวโปรแกรม 2 แต่ละชุดการทดลอง ตลอดการทดลองระยะเวลา 40 วัน	29
ตารางที่ 7	แสดงคุณภาพน้ำในบ่อปูนที่เลี้ยงปลากะพงขาวโปรแกรม 2 ทำการวัดคุณภาพน้ำทุกครั้งหลังจากการคัดขนาด	30
ตารางที่ 8	การตายสะสมของปลากะพงขาววัคซีน FKC โปรแกรม 1 หลังทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) (Challenge Test) ภายใน 120 ชั่วโมง (n=60)	32
ตารางที่ 9	การตายสะสมของปลากะพงขาววัคซีน FKC โปรแกรม 2 หลังทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) (Challenge Test) ภายใน 120 ชั่วโมง (n=60)	33
ตารางที่ 10	ตารางแสดงค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาว ภายหลังการฉีด และแช่วัคซีน FKC โปรแกรม 1	34
ตารางที่ 11	ตารางแสดงค่า Antibody titer ที่ 1:25000 ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด โปรแกรม 2	36
ตารางที่ 12	ตารางแสดงค่าเม็ดเลือดขาวรวม (WBC) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	37
ตารางที่ 13	ตารางแสดง %Small Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	39
ตารางที่ 14	ตารางแสดง % Large Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	40
ตารางที่ 15	ตารางแสดง % Monocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	41
ตารางที่ 16	แสดง % Neutrophill ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	42
ตารางที่ 17	ตารางแสดงค่า *Viability (N)* cell/ml ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด โปรแกรม 2	43
ตารางที่ 18	ตารางแสดง % Phagocytosis ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	44

ตารางที่ 19 แสดงค่า Phagocyte index (PI) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด 45
ตารางที่ 20 ตารางแสดงค่า NBT ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด 46
ตารางที่ 21 แสดงคุณภาพน้ำในแม่น้ำบางปะกงในระหว่างการทดลองให้วัคซีน FKC ระดับฟาร์ม ทำการวัดคุณภาพน้ำทุกครั้งที่มีการเก็บตัวอย่าง ในช่วงเดือน เมษายน - พฤษภาคม พ.ศ. 2561 59

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	ขั้นตอนการทำวัคซีน FKC แบบเปียกให้เป็นแบบแห้ง ในเครื่อง freeze dryer (ยี่ห้อ Flexi-dry™ µD รุ่น FGS)	12
ภาพที่ 3	ผลผลิตของวัคซีนชนิด Formalin killed whole cell (FKC) จากเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) แบบเปียก (A) และแบบผงด้วยเครื่อง Freeze dry (B)	26
ภาพที่ 4	บรรจุภัณฑ์แบบผงแห้งวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยใน สุกร โค-กระบือ จำหน่ายโดยกรมปศุสัตว์	27
ภาพที่ 5	กราฟแสดงค่า Antibody titer ที่ 1/30000 (1) และ 1/40000 (2) ในซีรั่มปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC โปรแกรม 1	35
ภาพที่ 6	กราฟแสดงค่า Antibody titer 1:25000 ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีดเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง (1) และค่า ELISA 1:25000 กับจำนวนวัน (2)	36
ภาพที่ 7	กราฟแสดงค่าเม็ดเลือดขาวรวม (WBC) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	38
ภาพที่ 8	กราฟแสดง %Small Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	40
ภาพที่ 9	กราฟแสดง %Large Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	41
ภาพที่ 10	กราฟแสดง % Monocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	42
ภาพที่ 11	กราฟแสดง %Neutrophill ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	43
ภาพที่ 12	กราฟแสดง % Phagocytosis ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	44
ภาพที่ 13	กราฟแสดงค่า Phagocyte index (PI) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	45
ภาพที่ 14	กราฟแสดงค่า NBT ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด	46
ภาพที่ 15	การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับชั่วโมง	48
ภาพที่ 16	การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับชั่วโมง	49
ภาพที่ 17	การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับชั่วโมง	50
ภาพที่ 18	การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับชั่วโมง	51
ภาพที่ 19	การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับวัน	52

ภาพที่ 20	การแสดงออกของยีนในตับของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับวัน	53
ภาพที่ 21	การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับวัน	54
ภาพที่ 22	การแสดงออกของยีนในตับของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับวัน	55
ภาพที่ 23	ตรวจหาปรสิตภายนอกของปลากะพงขาว พบปลิงใสจำนวนมากเกาะอยู่บริเวณซี่เหงือก (A) และพบเห็บระฆัง (B) และกระสวย 2 หาง (*Henneguya* sp.) (C) ในเมือกปลากะพงขาวเป็นจำนวนมาก	57
ภาพที่ 24	ปลากะพงขาวที่ตายอย่างต่อเนื่องจากการระบาดของปรสิต อาการที่พบชัดเจน ส่วนใหญ่ปลากะพงขาวมีอาการตาแดง ตัวด่าง ตกเลือดบริเวณช่องท้อง ครีบหาง ครีบหลัง และบริเวณครีบหางกร่อน	58
ภาพที่ 25	ปลากะพงขาวที่ตายอย่างต่อเนื่องวันละหลายร้อยตัว เนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ฝนตกหนักติดต่อกันทำให้สภาพแม่น้ำบางปะกงมีตะกอนขุ่นไหลผ่านจำนวนมาก ซึ่งตะกอนเหล่านี้จะไปเกาะติดกับกระชังเลี้ยงปลาทำให้ออกซิเจนในน้ำไม่สามารถไหลผ่านกระชังปลาได้เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายอย่างต่อเนื่องและเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้ปลากะพงขาวเกิดความเครียดทำให้ยอมรับเชื้อก่อโรคที่อยู่ในธรรมชาติได้ง่าย	58
ภาพที่ 26	แสดง pathway ของยีน (immune related gene) ที่ทำการศึกษา	64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

FKC = Formalin-killed whole cell

FKCV = Formalin killed cell vaccine

VVB = Vibrio vulnificus Burapha

PCR = Polymerase Chain Reaction

MHC = Major histocompatibility complex

HMIR = Humoral immune response

CMIR = Cell mediated immune response

CIR = Cellular immune response

IgM = Immunoglobulin M

IL = Interleukin

IFN = Tumor necrosis factor-alpha

ELISA = Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลากะพงขาว และปลากะรัง 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 และ จีรนันท์, 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 *Vibrio vulnificus* ในปลากะพงขาว โดยมีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนชนิด Formalin-killed whole cell (FKC) และ outer membrane vaccine (OMV) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่า วัคซีนชนิด FKC มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดี มีความเป็นไปได้ที่จะผลิตออกใช้ในเชิงพาณิชย์ และจากการทดลองนี้ทำให้ได้องค์ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจาก *Vibrio vulnificus* แต่ยังไม่ได้พัฒนาในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะใช้องค์ความรู้ดังกล่าวมาพัฒนาต่อยอด เพื่อให้

สามารถนำวัคซีนชนิดนี้ไปใช้ได้จริง แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาของงานทดลองดังกล่าวผ่านมาแล้วสิบปี งานวิจัยนี้จึงต้องเริ่มต้นใหม่ตั้งแต่ศึกษาเชื้อ จำแนกเชื้อ และความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ซึ่งจะมีการรวบรวมเชื้อเพิ่ม จากทั้ง 3 ภูมิภาค และศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนทั้งในระดับการทดลองจำลอง และระดับฟาร์ม 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. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านทานโรคจากแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในปลากะพงขาวและปลากะรัง ภายหลังการได้รับวัคซีน FKC ในสภาพการทดลองแบบจำลอง
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน (Immune-related gene expression) ในระบบภูมิคุ้มกันของปลาที่กะพงขาวได้รับวัคซีน แบคทีเรีย *V. vulnificus*
3. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีน FKC เชิงพาณิชย์ในฟาร์มปลากะพงขาว
4. เพื่อศึกษารูปแบบการผลิตและบรรจุภัณฑ์ของวัคซีน FKC แบบเปียกและแบบแห้ง

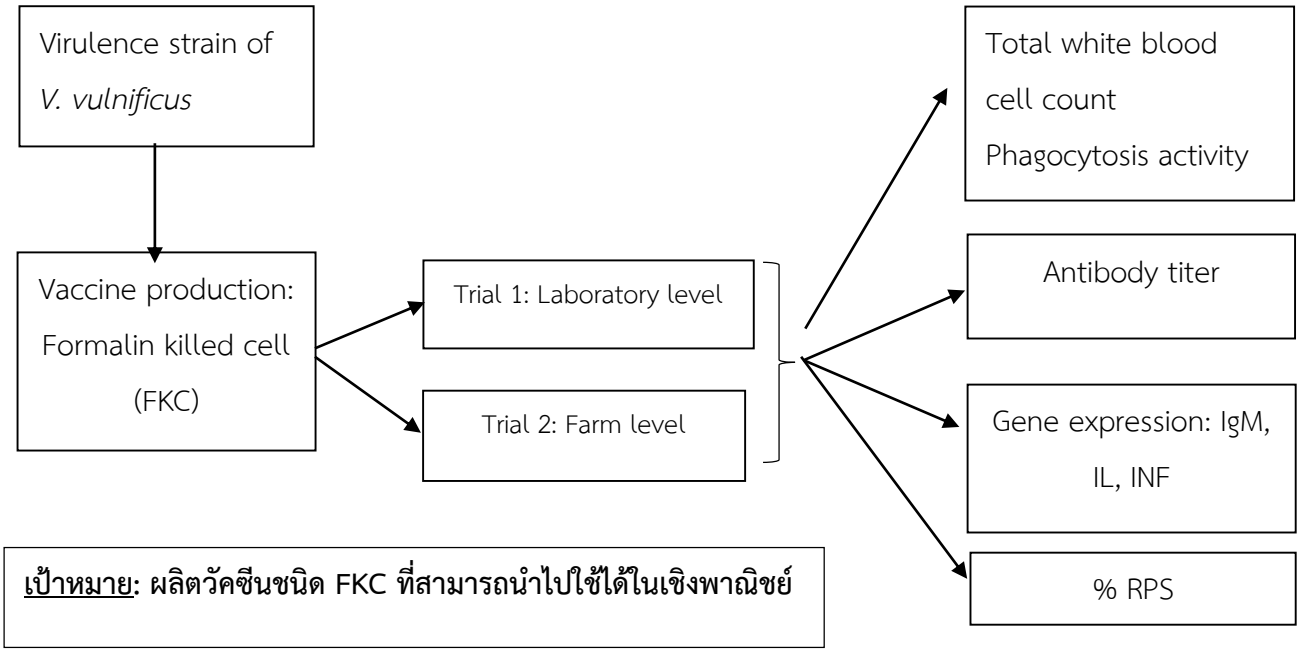
ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.ศึกษาและติดตามประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ในระดับการทดลองจำลองและในระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์ ประเมินผลจากภูมิคุ้มกันในระดับเซลล์ โปรตีน และการแสดงออกของยีน

2. ผลิตวัคซีนชนิด FKC จากเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* สายพันธ์ที่มีความรุนแรง (ที่ดำเนินการปีพ.ศ. 2560)

3. ศึกษาแนวทางรูปแบบการผลิตและบรรจุภัณฑ์ของวัคซีน FKC ที่เหมาะสมเพื่อประโยชน์การใช้เชิงพาณิชย์ในฟาร์มปลา

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



บทที่ 2 เอกสารงานวิจัย

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญของปลาทะเลเศรษฐกิจในประเทศไทย โดยเฉพาะปลากะพงขาวและปลากะรัง เป็นปลาทะเลที่นิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางและเป็นปลาที่มีรสชาติดี เนื้อสีขาวและมีความนุ่มหลังปรุงเป็นอาหารทุกประเภท สำหรับปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อย สามารถเลี้ยงได้ในสภาพน้ำจืดกร่อยและเค็ม แต่การผสมพันธุ์และอนุบาลลูกปลา fry and fingerling ต้องใช้ความเค็มประมาณ 15 – 30 ppt และสามารถลดหรือเพิ่มความเค็มเมื่อเลี้ยงระยะ juvenile ส่วนปลากะรังเป็นปลาน้ำเค็ม การผสมพันธุ์และอนุบาลลูกปลา 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 ซม. ถูกเลี้ยงจนได้ขนาด 7.5 – 10.0 ซม. ก่อนปล่อยเลี้ยงเป็นขนาด juvenile ทั้งปลากะพงขาวปลากะรัง เนื่องจากเป็นปลากินเนื้อ ระยะวัยอ่อนเลี้ยงในอัตราหนาแน่นสูงจึงสามารถกินกันเองได้ ทำให้ต้องคัดขนาดอย่างน้อยทุก 7 – 10 วัน การคัดขนาดด้วยเครื่องมือที่เป็นภาชนะเจาะรูให้ปลาขนาดต่างๆ แยกจากกัน จึงเป็นขั้นตอนทำให้เกิดบาดแผลบนผิวหนังของลูกปลาได้ เป็นช่องทางให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายปลาได้อย่างรวดเร็ว ส่วนขนาด juvenile ถูกคัดขนาดใกล้เคียงกันเพื่อเลี้ยงให้เป็นขนาดโตปลาเนื้อต่อไป ไม่มีการคัดขนาดจึงมีโอกาสเป็นโรคหรือการป่วยจากแบคทีเรียในอัตราต่ำกว่าระยะวัยอ่อน (Pimoljinda,1993; Rungpant et al., http/nsgl.gso.url.edu/hawauw 94002-part6) อาหารใช้สัตว์น้ำมีชีวิต ปลาเป็ด และ อาหารเม็ด (ต้นทุนสูง) ประเภทอาหารนอกเหนือจากอาหารเม็ดที่ควบคุมคุณภาพได้ อาหารประเภทอื่นจะนำมาถึงการปนเปื้อนจากอาหาร รวมทั้ง ส่งเสริมให้แบคทีเรียเจริญเติบโตจากอาหารที่เหลือ เมื่อฟาร์มปลาใดมีปลาป่วยเป็นโรคจะมีการแพร่กระจายของเชื้อสู่ธรรมชาติ ไปยังฟาร์มอื่นๆ เนื่องจากการไม่มีกฎระเบียบ การขึ้นทะเบียนฟาร์มปลาที่เป็นระบบ และแบ่งเขตของฟาร์มไปกำกับการเพาะเลี้ยงปลาทะเล ทำให้การกระจายของโรคแบคทีเรียเกิดได้อย่างง่าย ไม่สามารถควบคุมได้ โดยเฉพาะแหล่งบริเวณกระชังเลี้ยง จากปัญหาดังกล่าวกลยุทธการป้องกันโรคจากแบคทีเรียต่อการเลี้ยงปลากะพงขาวและปลากะรังจึงมีความสำคัญด้วยการให้วัคซีนทั้งในระยะวัยอ่อนที่มีการคัดขนาด และให้วัคซีนต่อเนื่องเมื่อเลี้ยงเป็นปลาเนื้อ และควรมีการสำรวจประเภทของฟาร์มปลาทะเลทั้งสองชนิดนี้กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียตามชายฝั่งภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อการกำกับควบคุมการระบาดจากเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มปลาตามชายฝั่งของประเทศไทย

คุณลักษณะและการจำแนกของเชื้อ *V. vulnificus* โดยธรรมชาติเชื้อ *V. vulnificus* มีอยู่ทั่วไปในน้ำที่มีความเค็มและน้ำกร่อย คุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่งสั้นขนาดประมาณ 2 – 3 µm สามารถเคลื่อนที่ได้โดยมี แฟลกเจลลา 1 เส้น เจริญเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิ 20 – 37 องศาเซลเซียส และพบที่ความเค็มได้ตั้งแต่ 1 – 34 ส่วนในพันส่วน (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 *Vibrio 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* ปภาศิริ และ ศิริโฉม (2549) พบว่าเชื้อ *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

ปฏิกิริยาตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (The Immune Response) ของปลา

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายปลา จะมีการตอบสนองหลายอย่างเกิดขึ้นในร่างกายเพื่อป้องกันตัวเองและกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้น เช่น การสร้างเมือกเพิ่ม ปฏิกิริยาการอักเสบ (Inflammatory response) ซึ่งเป็นส่วนของภูมิต้านทานโดยกำเนิดอย่างไรก็ดียังมีจุลชีพหลายชนิดที่สามารถรอดพ้นจากภูมิต้านทานโดยกำเนิด มีผลทำให้เกิดการติดเชื้อในร่างกายจนเกิดพยาธิสภาพได้ ร่างกายจึงต้องมีกลไกของภูมิต้านทานจำเพาะ เรียกว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) เซลล์เม็ดเลือดขาวที่รับผิดชอบและแสดงปฏิกิริยาเพื่อทำให้เกิดภูมิคุ้มกันที่สำคัญ คือ lymphocyte ส่วนเซลล์ที่ทำหน้าที่เสริมปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophage, eosinophil, mast cell, monocyte,

neutrophil, natural killer cell และ platelet (เกล็ดเลือด) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลามีลักษณะจำเพาะ 4 ประการดังนี้

1. สามารถจำแนกได้ว่าสิ่งใดเป็นสิ่งแปลกปลอมและสิ่งใดเป็นของตัวเอง (differentiation of self from non-self) โดยที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเฉพาะต่อสิ่งแปลกปลอม (non-self) เท่านั้น

2. มีความจำเพาะ (specificity) กล่าวคือการตอบสนองที่เกิดขึ้นจะจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม หรือแอนติเจนที่เข้ามาเท่านั้น

3. มีความจำ (memory) กล่าวคือ เมื่อได้รับแอนติเจนชนิดเดียวกันเป็นครั้งที่ 2 หรือครั้งที่ 3 จะมีการตอบสนองที่รวดเร็วและด้วยปริมาณที่มากกว่าการตอบสนองที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับแอนติเจนเป็นครั้งแรก แสดงว่ามีความจำ

4. มี dose response curve เฉพาะตัว คือจะมีการตอบสนอง เมื่อให้แอนติเจนขนาดพอเหมาะ มิฉะนั้นจะกดไม่ให้มีการตอบสนองได้

ขั้นตอนในการรับรู้แอนติเจนและการเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายในลักษณะพอเหมาะจะเกิดขบวนการต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกันที่จะรับรู้และตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น ขบวนการต่าง ๆ เหล่านี้จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ ๆ ตามลำดับต่อไปนี้

1. Affect (sensitization) phase ขั้นตอนนี้นับจากเวลาที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกายก่อนถูกนำเสนอให้กับลิมโฟไซต์ที่รับรู้ต่อแอนติเจน แบ่งวิธีการนำเสนอเป็น 2 แบบ

1.1 ถ้าแอนติเจนนั้นเป็น T-dependent antigen จะต้องอาศัย T-lymphocyte และแมคโครฟาจ โดยที่แอนติเจนอาจสัมผัสกับแมคโครฟาจ ซึ่งเดินทางผ่านไปในบริเวณที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย (เช่น ผิวหนัง) หรือแอนติเจนอาจถูกดูดซึมผ่านทางกระแสน้ำเหลืองเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียงแล้วสัมผัสกับแมคโครฟาจที่อยู่ในต่อมน้ำเหลือง โดยทั่วไปแมคโครฟาจจะจับกินแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ย่อยแอนติเจนให้เป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ แต่มีคุณสมบัติในการเป็น immunogen สูง (immunodominant) ซึ่งเกาะอยู่บริเวณผิวของแมคโครฟาจแล้วส่งแอนติเจนต่อให้กับ T-lymphocyte ซึ่งรับรู้แอนติเจนที่เกาะอยู่บนผิวแมคโครฟาจร่วมไปกับ Major histocompatibility complex (MHC) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่แสดงมีลักษณะเฉพาะของปลาแต่ละตัวบนผิวของแมคโครฟาจ กล่าวคือ T-lymphocyte นั้นจะต้องมี receptor ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น และจะต้องมี MHC ชนิดของเดียวกันกับของแมคโครฟาจที่แอนติเจนนั้นเกาะอยู่ หรือมี receptor ที่จะรับรู้ MHC ของแมคโครฟาจนั้นถึงจะกระตุ้นได้ เรียกข้อจำกัดของความร่วมมือนี้ว่า MHC restriction ถ้าเป็น Helper T cell จะร่วมมือหรือรับรู้แอนติเจนที่อยู่ชิดกับ MHC Class II molecule ถ้าเป็น Cytotoxic T cell จะรับรู้แอนติเจนที่อยู่ชิดกับ MHC Class I molecule

การร่วมมือกันระหว่างแมคโครฟาจ และ T-lymphocyte อาจเกิดขึ้นจากการที่เซลล์ทั้งสองชนิดมาอยู่ใกล้และสัมผัสกัน หรือเกิดจาก soluble mediator ที่หลั่งออกมาจากแมคโครฟาจ ซึ่งมีรัศมีการทำงานในระยะใกล้ เรียก interleukin-1 (IL-1) ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวของ T-lymphocyte

1.2 T-independent antigen ไม่ต้องอาศัย T-lymphocyte และแมคโครฟาจในการกระตุ้น B lymphocyte โดยแอนติเจนนี้สามารถไปกระตุ้นผิว B lymphocyte โดยตรงสองแห่งคือ antigen receptor บนผิวซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนนั้น (เป็น first signal) และกระตุ้น mitogenic receptor (เป็น second signal) ทำให้ B lymphocyte นั้นแบ่งตัวกลายเป็น plasma cell เพื่อสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นได้ เช่น lipopolysaccharide ของแบคทีเรีย นอกนั้นแอนติเจนส่วนใหญ่จะเป็น T-dependent antigen

2. Central phase ระยะที่มีกลไกการติดต่อระหว่างเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ การหลั่งสารที่มีผลต่อการตอบโต้เชื้อ (mediators) เป็นขั้นตอนซึ่งเกิดขึ้นที่ต่อมน้ำเหลืองหรือม้าม

3. Effector phase ระยะการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น

เมื่อแอนติเจนนั้นเข้าสู่ร่างกายในลักษณะพอเหมาะจะกระตุ้นลิมโฟไซต์ 2 ชนิด คือ B และ T lymphocyte เกิดปฏิกิริยาตอบสนองที่สำคัญของภูมิคุ้มกัน 2 ชนิดคือ Humoral immune response (HMIR) และ Cell mediated immune response (CMIR) หรืออาจเกิดอย่างใดอย่างหนึ่งขึ้นกับลักษณะและทางเข้าของแอนติเจนนั้น

Humoral immune response (Humor = ของเหลว)

คือการสร้างแอนติบอดีโดยแอนติเจนจะเป็นตัวเลือกจับกับ B-lymphocyte ที่มีตำแหน่งที่รับพอเหมาะพอดีกับมัน (Selective activation) เมื่อรวมตัวกันแล้วก็จะมีสัญญาณกระตุ้นให้ B lymphocyte เพิ่มปริมาณและเปลี่ยนแปลงเป็น plasma cell ทั้ง B-lymphocyte และ plasma cell จะสร้างและหลั่งแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้นออกมาในเลือดและสิ่งคัดหลั่ง กลุ่ม B-lymphocyte และ plasma cell ที่จะเจริญมาจาก B-lymphocyte ตัวเดียวกันนี้เรียกว่า clone

เมื่อร่างกายเกิดสภาวะติดเชื้อจะเกิดการกระตุ้น B-lymphocyte ได้หลายชนิด B-lymphocyte และ plasma cell รวมหลาย clone มีแอนติบอดีจำนวนมากถูกผลิตออกมาต่อต้านการติดเชื้อ ปกติต้องใช้เวลาหลายวันเพื่อการผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่เข้ามาครั้งแรก และจะมีเซลล์กลุ่มหนึ่งที่เก็บความจำเกี่ยวกับแอนติเจนนี้ไว้ (memory cell) เซลล์กลุ่มนี้จะมีอายุยืน

Primary and secondary antibody response

ในกรณีที่ร่างกายได้รับแอนติเจนชนิด T-dependent Ag เป็นครั้งแรก จะต้องใช้เวลาในการกระตุ้นลิมโฟไซต์ให้รับรู้และแบ่งตังสร้างแอนติบอดีจนตรวจพบได้ในสัปดาห์ที่ 2 เรียกช่วงรอนี้ว่า lag period แอนติบอดีซึ่งส่วนใหญ่เป็น IgM จะอยู่ได้ระยะหนึ่งแล้วจะมีปริมาณลดต่ำลงระหว่างนี้ B-lymphocyte บางตัวจะกลายเป็น memory cell ให้แบ่งตัวและสร้างแอนติบอดีเดิมอีกจะกระตุ้น memory cell ให้แบ่งตัวและสร้างแอนติบอดีได้มากและรวดเร็ว มีช่วงรอที่สั้นกว่า แอนติบอดีที่เกิดขึ้นครั้งหลังนี้เรียก secondary antibody response จะอยู่นานและมีประสิทธิภาพในการจับกับแอนติเจนได้เหนียวแน่นกว่า และปลาจะมีแอนติบอดีชนิด IgM เท่านั้น จึงใช้หลักการนี้ในการฉีดวัคซีนหลายครั้ง เพื่อให้ร่างกายปลา สร้างแอนติบอดีที่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันคุ้มครองโรคได้นาน ตลอดการเลี้ยงที่ต้องการ หรือ เพื่อจับขาย

สำหรับการสร้างแอนติบอดีต่อชนิด T-independent antigen จะไปมีความจำดังกล่าวข้างต้น แต่จะไม่มี secondary antibody response ซึ่งในหลักการทำวัคซีนให้ปลา เป็นขบวนการที่ไม่ต้องการให้เกิดการตอบสนองขึ้น

Cell mediated immune response (CMIR)

คือภูมิต้านทานผ่านเซลล์ โดยแอนติเจนเข้ามากระตุ้น T cells ด้วยการนำเสนอของ Antigen presenting cell (APC) ให้กลายเป็น sensitized T cell หรือ activated T cells เมื่อพบกับแอนติเจนอีกครั้ง T cell ที่กระตุ้นแล้วนี้จะหลั่งสารกลุ่มหนึ่งเรียก ลิมโฟไคน์ (lymphokines) มีหลายชนิด มีฤทธิ์มากมาย มีประสิทธิภาพในการทำงานสูง แต่สลายตัวเร็วมาก ตั้งชื่อตามการตรวจพบหน้าที่ทางชีวภาพ ลิมโฟไคน์มีมากมายหลายชนิด เช่น Macrophage activating factor (MAF) จะกระตุ้นแมคโครฟาจให้มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น Helper T cell ยังร่วมมือกับ B cells ในการผลิตแอนติบอดีซึ่งเมื่อไปเกาะอยู่บนเซลล์ที่มีที่รับ Fc เช่น K cell ก็จะทำงานโดยกลไกโดย ADDC (Antibody dependent cell mediated cytotoxicity) ได้ สำหรับ NK cells ทำงานโดยไม่จำเพาะในการทำลายเซลล์เป้าหมายหรือโดย ADDC ก็ได้

การกระตุ้น T-cell ด้วยแอนติเจน

เมื่อ T-cell receptor ซึ่งประกอบด้วย Ti และ CD3 รับรู้แอนติเจนที่จำเพาะที่อยู่ร่วมกันเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนกับ MHC Class II บนผิวของ accessory cell (APC) แล้วจะเกิดสัญญาณที่ 1 (First signal) ในการกระตุ้น T cells ต่อมาเมื่อ APC หลั่ง IL-1 (น้ำหนักโมเลกุล 15,000 daltons) ออกมาก็จะได้สัญญาณที่ 2 ที่กระตุ้น T cell ภายในไม่กี่นาทีต่อมาจะมีการย่อยส่วน phospholipid ที่ผิวและ phosphorylation ของโปรตีนภายใน เซลล์จะเริ่มสร้าง mRNA ที่จะสร้างลิมโฟไคน์ต่าง ๆ ออกมาเช่น IL-2, IL-4 และแสดง IL-2 receptor ที่ผิวประมาณ 48 ชั่วโมงต่อมา DNA จะเริ่มสังเคราะห์เพื่อแบ่งเซลล์ขณะที่ IL-4, IL-5 จะกระตุ้น B cell ให้แปรรูปและเพิ่มจำนวนเพื่อสร้าง immunoglobulin ต่อไป

เมื่อ T-cell ถูกกระตุ้นแล้วจะหลั่งลิมโฟไคน์ ซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่จำเพาะต่อแอนติเจนแต่จะมีที่จับที่จำเพาะบนเซลล์ต่าง ๆ ที่มันมีผลต่อ ลิมโฟไคน์ เป็นกลุ่มหนึ่งของ cytokine (สารละลายที่ผลิตโดยเซลล์หนึ่งที่มีผลหลายอย่างต่อเซลล์อื่น) ส่วนสารที่ผลิตด้วยเม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งที่มีผลต่อเม็ดเลือดขาวอื่นเรียก interleukins ซึ่งก็เป็นลิมโฟไคน์ด้วย

ลิมโฟไคน์ จัดกลุ่มตามหน้าที่สำคัญมีดังนี้

ก. ที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของเซลล์ phagocyte ได้แก่ chemotactic factor (CF) สำหรับดึงดูด monocyte (CF-M) polymorph (CF-P) ลิมโฟไซต์ (CF-L) ให้เข้ามายังส่วนเนื้อเยื่อที่มีปฏิกิริยาตอบโต้เกิดอยู่ หรือห้ามการเคลื่อนที่โดยปกติของแมคโครฟาจ (macrophage inhibition factor; MIF) หรือของเม็ดเลือดขาว (leukocyte inhibition factor; LIF)

ข. ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น ทำให้ลิมโฟไซต์ทั่วไปแบ่งตัวคือ MF (mitogenic factor) ส่วน Immune interferon (IFN γ) ทำให้เมตาบอลิซึมของเซลล์มะเร็งเสียไป B cell growth factor (BCGF)

ทำให้ B cell แบ่งตัว IL-2 ทำให้ T cell เจริญและแบ่งตัว colony stimulating factor (CSF) ทำให้เซลล์ต้นตระกูลของ phagocyte ในไขกระดูกเปลี่ยนไปเป็น monocyte และ PMN

ค. ที่มีผลการทำงานของเซลล์ เช่น จะเพิ่มความสามารถของแมคโครฟาจ แบบทั่ว ๆ ไป ไม่จำเพาะ (macrophage activating factor; MAF) หรือแบบจำเพาะต่อแอนติเจน (SMAF) ที่คล้ายกันคือ IFN **γ** จะเพิ่มความสามารถของแมคโครฟาจ ในขบวนการ phagocytosis และ ADCC เพิ่มความสามารถของ NK cell ในการทำลายเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส

IL-2 กระตุ้น T lymphocyte ให้หลั่ง IFN และทำให้ Tc ทำงานได้ดีขึ้น (ยาที่มีฤทธิ์ขัดขวางการสร้าง IL-2 โดย T lymphocyte ก็คือ cyclosporine)

ง. ที่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ เช่น lymphotoxin ห้ามการเจริญของเซลล์เนื้องอก interferon ทำให้ NK cell ออกฤทธิ์ทำลายดียิ่งขึ้น

จ. การถ่ายทอดภูมิคุ้มกัน ได้แก่ Transfer factor (TF) ซึ่งเป็น single stranded polynucleotide ที่สามารถถ่ายทอดภูมิต้านทานได้

ความสัมพันธ์ของภูมิต้านทานชนิดต่าง ๆ

ปฏิกิริยาตอบสนองที่สำคัญของภูมิคุ้มกัน ระหว่าง CMIR และ HMIR ไม่สามารถแยกออกจากกันโดยเด็ดขาด เพราะเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับแอนติบอดีเช่น B cell ก็เป็นตัวเชื่อมโยงที่จำเป็นในปฏิกิริยา CMIR เช่น B cell เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจนให้ T cell ได้ Ag-Ab complex ที่เกิดในปฏิกิริยา HMIR จะกระตุ้นคอมพลีเมนท์ได้ chemotactic molecule ทำให้เซลล์มาชุมนุม และทำให้เกิดการอักเสบ หรือแอนติบอดีอาจปิดบัง antigenic determinant ที่จะถูกรับรู้โดย T cell หรือทำให้ determinant เปลี่ยนรูปร่างหรือหลุดออกไป

ในทำนองเดียวกัน ภูมิต้านทานโดยกำเนิดก็มีความเชื่อมโยงกับภูมิต้านทานจำเพาะที่ได้มาภายหลัง เช่น interferon จะมีบทบาทต่อทั้ง HMIR และ CMIR ในการทำลายไวรัส คอมพลีเมนท์ช่วยให้ฤทธิ์ของแอนติบอดีมีมากขึ้น แมคโครฟาจทำหน้าที่จับกินจุลชีพแบบไม่จำเพาะคือจับกินจุลชีพทุกชนิดแต่ถ้ามีฤทธิ์ของลิมโฟไคน์มาช่วย เช่น SMAF (specific macrophage activating factor) ก็สามารถทำงานโดยเจาะจงคือมีฤทธิ์ในการจับจุลชีพเฉพาะบางตัวได้ดีขึ้น

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 และการให้โดยวิธีการแช่พบอัตราการตายของปลามากที่สุดคือ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบการแช่ร่วมกับให้วัคซีนโดยการให้ทางปากในวันที่ 4, 11, 15, 30 และ หลังจาก 60 วัน ทำการเก็บส่วนของ ซีรัม เมือก และน้ำดีของปลามาวิเคราะห์เพื่อ

หาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่าการให้วัคซีนด้วยการผสมอาหารแก่ปลาที่เคยได้รับวัคซีนโดยการแช่มาแล้วมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอนติบอดี และปลามีความต้านทานต่อเชื้อได้ดี (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 และปลาที่ได้รับวัคซีนมี antibody titer ที่ 200 ส่วนปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนมีระดับ 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

งานวิจัยเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับการใช้วัคซีนป้องกันโรค 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. การผลิตวัคซีนชนิด Formalin killed whole cell (FKC)

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* VVB (Burapha) ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเติม 1.5 % เกลือ ชนิด TSA และชนิด TCBS เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว สุ่ม 10 โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาตรวจสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดี Dot Blot เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus*

1.1 เชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดียวกันกับที่ตรวจสอบด้วยแอนติบอดีมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (TSB + 1.5 % เกลือ) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร 48 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดี Dot Blot อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm 20 นาที แล้วปั่นล้างด้วย 1.5 % น้ำเกลือปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นเตรียมวัคซีนแบบ formalin kill โดยการใส่ 1-2 % formalin ลงไปในเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว ทำการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจาก 48 ชั่วโมง ทำการปั่นล้าง FKC จำนวน 3 ครั้ง ด้วย 1.5 % น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ทั้งนี้แบคทีเรียปริมาตร 400 มิลลิลิตรเมื่อทำการปั่นล้างเซลล์แล้วจะถูกเก็บไว้ใน Conical Tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร 1 หลอด และ resuspend เก็บไว้ด้วย 1.5 % น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะเป็น FKC แบบเปียกและทดสอบอีกครั้งว่าเชื้อแบคทีเรียจะไม่เจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ TSA และ TCBS อีกครั้งก่อนนำ FKC แบบเปียกเก็บที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอขั้นตอน freeze dryer ในข้อ 1.2 ต่อไป

1.2 ขั้นตอนการทำวัคซีน FKC แบบเปียกให้เป็นแบบแห้ง ในเครื่อง freeze dryer (Flexi-dry™ µD รุ่น FGS) ดังภาพที่ 2 (A) โดยเตรียมเครื่องให้ได้อุณหภูมิต่ำกว่า -40 องศาเซลเซียส และ vacuum ต่ำกว่า 500 mT จึงจะนำ FKC แบบเปียก จากข้อ 1.1 จำนวน 3 - 4 หลอดต่อรอบการทำ FKC แบบแห้ง ใส่ในกระบอก ดังภาพที่ 2 (B) เพื่อต่อเข้ากับ valves เพื่อดูดความชื้นออกไป ดังภาพที่ 2 (C) เมื่อ FKC แบบเปียกแห้ง (หลังจาก 24 - 48 ชั่วโมง) จะได้วัคซีน FKC แบบผงแห้งเพื่อใช้ในงานทดลองต่อไป

เครื่อง freeze dryer (ยี่ห้อ Flexi-dry™ µD รุ่น FGS) (A)

FKC แบบเปียก จำนวน 3 - 4 หลอด ใส่ลงในกระบอก (B)

ต่อกระบอกเข้ากับ valves เพื่อดูดความชื้นออกไป (C)

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการทำวัคซีน FKC แบบเปียกให้เป็นแบบแห้ง ในเครื่อง freeze dryer (ยี่ห้อ Flexi-dry™ µD รุ่น FGS)

แนวทางการบรรจุภัณฑ์วัคซีน FKC เชิงพาณิชย์แบบผง

ทำการศึกษารูปแบบการผลิตวัคซีนในสัตว์บก เช่นไก่ วัว หมู และปลา เพื่อนำเสนอจากบริษัท FishVet Group (Thailand) เพื่อพัฒนาวัคซีนเก็บรักษา แบบแช่เย็น (คำนึงถึงระยะเวลา และคุณภาพ) หรือแบบผง (Lyophilised protein) และ packaging (a pilot lot) เพื่อความเหมาะสมต่อการนำไปใช้จริงในฟาร์มปลากะพงขาว ช่วงอนุบาล และปลาเนื้อ จะประเมินจากเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของลูกปลาและปลาเนื้อรับวัคซีน ควรเพิ่มขึ้น อย่างน้อย 30% จากเปอร์เซ็นต์อัตรารอดเฉลี่ยในฟาร์มที่ทดสอบนั้น แนวทางการบรรจุภัณฑ์วัคซีนแบบผงเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ เพื่อเป็นการนำวัคซีน FKC แบบผงที่ผลิตจากงาน มาบรรจุในผลิตภัณฑ์ที่ปลอดเชื้อและบรรจุในสภาพสุญญากาศเพื่อเก็บรักษาให้ได้เป็นระยะเวลานาน

การจดอนุสิทธิบัตรวัคซีน FKC ในนามมหาวิทยาลัยบูรพา

ยื่นเรื่องจดอนุสิทธิบัตรวัคซีน FKC แบบตาย ของปลากะพงขาวต้านแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในนามมหาวิทยาลัยบูรพา

2. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในสภาพทดลองแบบจำลอง

การทดลองประสิทธิภาพของวัคซีน FKC จะศึกษาเฉพาะในปลากะพงขาวเท่านั้น เนื่องจากไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในปลากะรังจากการสำรวจของปีที่ 1

2.1 การใช้สถานที่ในการทดสอบประสิทธิภาพของ FKC ในสภาพทดลองแบบจำลอง

ได้รับความอนุเคราะห์ใช้สถานที่และพนักงานดูแลปลากะพงขาวนอกเวลา จากผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง 1 ตำบลท่าสะอ้าน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ให้ความอนุเคราะห์ใช้พื้นที่บ่อขนาด 15 ตัน จำนวน 4 บ่อ เพื่อใส่กระชังเลี้ยงปลากะพงขาว

2.2 รูปแบบการให้วัคซีนในปลากะพงขาว

- การทดลองวัคซีนแบบฉีด (injection) เข้าบริเวณช่องท้องของปลากะพงขาวในสภาพทดลองจำลอง ใช้เทคนิคการศึกษาแบบฉีดจาก Clark et al., 2010 (establishing safety and efficacy of an injectable form of a Vibrio vaccine for the orange-spotted Grouper) ส่วน adjuvant งานวิจัยนี้ใช้ Freund’s incomplete adjuvant ตามเทคนิคของ Jiao et al. (2010) ผสมกับวัคซีน FKC ที่ผลิตได้

- การทดลองวัคซีนแบบแช่ (immersion) โดยทดลองกับลูกปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 - 4 นิ้วเท่านั้น

2.3 การทดลองให้วัคซีน FKC ตามขนาดของปลากะพงขาว

2.3.1 โปรแกรม 1 ปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 – 4 นิ้ว

ใช้บ่อปูนขนาด 15 ตัน จำนวน 4 บ่อ เพื่อใส่กระชังเลี้ยงปลากะพงขาว ขนาด 1x1x0.8 เมตร จำนวน 18 กระชัง แบ่งการทดลองดังนี้

- การทดลองวัคซีนแบบแช่ (immersion) ใช้บ่อปูนจำนวน 1 บ่อ บรรจุกระชัง 6 กระชัง ประกอบด้วย 2 ชุดทดลองดังนี้

- แช่ปลาด้วยวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ $1x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร

- แช่ปลาด้วย 10 mM PBS ซึ่งจัดเป็น Negative control โดยทดลองกับลูกปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 - 4 นิ้วเท่านั้น จำนวน 50 ตัว ในแต่ละซ้ำการทดลอง ที่กำหนดไว้ 3 ซ้ำ แช่ปลาในอ่างน้ำที่มีวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ เจือจางเข้มข้น $1x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมแช่ด้วย 10 mM PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในกระชัง

- การทดลองวัคซีนแบบฉีด (injection) ใช้บ่อปูนจำนวน 3 บ่อ บรรจุกระชัง ขนาด 1x1x0.8 เมตร จำนวน 4 กระชังต่อบ่อ (รวม 12 กระชัง) ซึ่งในแต่ละบ่อประกอบด้วย 4 ชุดทดลองดังนี้

- ฉีดปลาด้วยวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ ปริมาณเซลล์ เท่ากับ $1x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร

- ฉีดปลาด้วยวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ ปริมาณเซลล์เท่ากับ $1x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ผสมกับ adjuvant (v/v)

- ฉีดปลาด้วยน้ำเกลือ 10 mM PBS จัดเป็น Negative control

- ฉีดปลาด้วย น้ำเกลือ 10 mM PBS ผสมกับ adjuvant (v/v) จัดเป็น Negative control ใช้ปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 - 4 นิ้ว จำนวน 50 ตัว ในแต่ละซ้ำการทดลอง ที่กำหนดไว้ 3 ซ้ำ ฉีดทดลองปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าบริเวณช่องท้องของปลากะพงขาว ก่อนนำไปเลี้ยงในกระชัง

- จำนวนชุดการทดลอง**แบบแช่** : ปลากะพงขาว 2 กลุ่มการทดลอง X 3 ซ้ำการทดลอง = 6 ชุดการทดลอง
- จำนวนชุดการทดลอง**แบบฉีด** : ปลากะพงขาว 4 กลุ่มการทดลอง X 3 ซ้ำการทดลอง = 12 ชุดการทดลอง

2.3.2 โปรแกรม 2 ปลากะพงขาวระยะ juvenile ขนาด 5 – 6 นิ้ว

การทดลองวัคซีนแบบฉีด (injection) เท่านั้น ใช้บ่อปูนจำนวน 2 บ่อ บรรจุกระชัง ขนาด 1x1x0.8 เมตร จำนวน 6 กระชังต่อบ่อ (รวม 12 กระชัง) ซึ่งในแต่ละบ่อประกอบด้วยชุดทดลองดังนี้

- ฉีดปลาด้วยวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ ปริมาณเซลล์ เท่ากับ $1x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร

- ฉีดปลาด้วยวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ ปริมาณเซลล์เท่ากับ $1x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ผสมกับ adjuvant (v/v)

- ฉีดปลาด้วยน้ำเกลือ 10 mM PBS จัดเป็น Negative control

- ฉีดปลาด้วย น้ำเกลือ 10 mM PBS ผสมกับ adjuvant (v/v) จัดเป็น Negative control ใช้ปลากะพงขาวระยะ juvenile ขนาด 5 - 6 นิ้ว จำนวน 50 ตัว ในแต่ละซ้ำการทดลอง ที่กำหนดไว้ 3 ซ้ำ ฉีดทดลองปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าบริเวณช่องท้องของปลากะพงขาว ก่อนนำไปเลี้ยงในกระชัง

- จำนวนชุดการทดลอง**แบบฉีด** : ปลากะพงขาว 4 กลุ่มการทดลอง X 3 ซ้ำการทดลอง = 12 ชุดการทดลอง

2.4 การเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนเพื่อทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน FKC ทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

2.4.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 1

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีน FKC แบบฉีดเท่านั้น จำนวน 3 ตัวในแต่ละชุดการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนทั้งหมด 4 ครั้ง โดยเริ่มนับการเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่เริ่มฉีดวัคซีน และแต่ละครั้งระยะเวลาห่างกัน 10 วัน ปลากะพงขาววัคซีน 1 ตัวจะถูกเก็บอวัยวะทั้งหมด 3 อวัยวะ ได้แก่ ไตส่วนหน้า, ตับ และม้าม เพื่อศึกษาการแสดงออกของ Immunoglobulin M (IgM), Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor-alpha (IFN) โดยเทคนิค quantitative Real time PCR

2.4.2 การสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 2

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 2 ที่ได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด จำนวน 5 ตัวในแต่ละชุดการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนทั้งหมด 5 ครั้ง โดยเริ่มนับการเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่เริ่มฉีดวัคซีน และแต่ละครั้งระยะเวลาห่างกัน 10 วัน ปลากะพงขาววัคซีน 1 ตัวจะถูกเก็บอวัยวะทั้งหมด 3 อวัยวะ ได้แก่ ไตส่วนหน้า, ตับ และม้าม โดยเก็บอวัยวะไตส่วนหน้าเพื่อนำมาตรวจผลการตอบสนองทาง innate immunity ค่า white blood cells, phagocytosis และ superoxide production ตรวจผลการตอบสนองทาง humoral immunity วัดแอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer response) ด้วยเทคนิค Indirect ELISA ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีหนูที่จำเพาะต่อ Immunoglobulin ปลากะพงขาว และเก็บอวัยวะตับและม้ามเพื่อศึกษาการแสดงออกของ Immunoglobulin M (IgM), Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor-alpha (IFN) โดยเทคนิค quantitative Real time PCR

2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของปลากะพงขาววัคซีน FKC ที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* VVB (Burapha) ด้วยการทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย (Challenge Test)

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย (Challenge test) เป็นการทดสอบเพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ที่ปลากะพงขาวได้รับในการสามารถต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha)

2.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของปลากะพงขาววัคซีน FKC โปรแกรม 1

ปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีน FKC แบบแช่ bath immunization และแบบฉีดภายหลัง 30 วันหลังได้รับวัคซีน ทำการทดสอบ Challenged Test โดยใช้ลูกปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน FKC จำนวน 20 ตัวในแต่ละซ้ำการทดลอง ได้รับปริมาณแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ตามระดับช่วง LC_{50} (ระหว่าง $10^3 - 10^{10}$ เซลล์/100 กรัมของน้ำหนักปลา ก่อการตาย +25% และ +75%) ในปริมาตร 0.05 - 0.1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าช่องท้อง IP นับการตายสะสมของปลากะพงขาวทดลองด้วยการนำเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* VVB (Burapha) ไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) รายงานผลประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในปลากะพงขาวระยะ nursing fry รูปแบบแช่และแบบฉีด

2.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของปลากะพงขาววัคซีน FKC โปรแกรม 2

หลังจากสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนครบทั้งหมด 5 ครั้งแล้ว ปลากะพงขาววัคซีนที่เหลือนำมาทดสอบ Challenged Test ใช้ปลากะพงขาว จำนวน 20 ตัวในแต่ละซ้ำการทดลอง ให้ปลาได้รับปริมาณแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ตามระดับ LC_{50} ระหว่าง $10^3 - 10^{10}$ เซลล์/100 กรัมของน้ำหนักปลา ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าช่องท้อง IP นับการตายสะสมของปลากะพงขาวทดลองด้วยการนำเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* VVB (Burapha) ไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) รายงานผลประสิทธิภาพของ FKC ในปลากะพงขาว ระยะ juvenile

$$RPS\ (\%) = 1 - \frac{\text{เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกลุ่มปลารับ FKC แบบแช่หรือฉีด}}{\text{เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของปลากลุ่มรับน้ำเกลือ PBS}} \times 100$$

3. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์

ทดลองในฟาร์มเลี้ยงปลากะพงขาว เป็นการติดตามประสิทธิภาพของวัคซีน FKC แบบแช่และแบบฉีด ในปลาชุดเดียวกัน ซึ่งรูปแบบการให้วัคซีนที่ได้ประสิทธิภาพที่สุดจากสภาพจำลองในข้อ 2 จะเป็นแนวทางการประยุกต์การให้วัคซีนในฟาร์มปลากะพงขาว โดยทำการศึกษาในฟาร์มที่มีรูปแบบการเลี้ยงแบบกระชังในแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยวางแผนการทดลองให้วัคซีน ดังนี้

3.1 การให้วัคซีนครั้งแรก ลูกปลากะพงขาว nursing fry ขนาด 3 - 4 นิ้ว จำนวน 5,000 ตัว แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดแรกลูกปลากะพงขาวจำนวน 2,500 ตัว ให้วัคซีน FKC แบบฉีดหรือแช่ (ดูผลประสิทธิภาพจากการสภาพทดลองจำลอง) จัดเป็นชุดทดลองปลาวัคซีน และปลากะพงขาวจำนวน 2,500 ตัว ที่เหลือจัดเป็นชุดควบคุม ติดตามตรวจสอบอัตราการตาย (mortality rate) และการเจริญเติบโตเมื่อสิ้นสุด 30 วัน เพราะจะมีการแยกขนาด grading ทุก ๆ 7 - 10 วัน จนได้ปลากะพงขาวขนาด 5 - 6 นิ้ว ก่อนขายสู่ Grow out แบบเลี้ยงในบ่อดิน หรือ กระชัง ถ้ามีปลาป่วยหรือตาย จะชันสูตรปลา เพื่อหาเชื้อ *V. vulnificus*

การทดลองใช้วัคซีนกับปลากะพงขาว จะทดลองในฟาร์มปลาที่อาสาให้ใช้วัคซีนทดลองจากตัวแทนระดับภูมิภาค

3.2 การให้วัคซีนครั้งที่สองแบบฉีด (1เดือนหลังจากให้วัคซีนครั้งแรก) ปลากะพงขาวระยะ juvenile (ขนาด 5 - 6 นิ้ว) ที่เลี้ยงให้เจริญเติบโตมาระยะ 1 เดือน จะถูกให้วัคซีนแบบฉีดอีกครั้ง โดยจำนวนลูกปลาที่มีอัตรารอด จะถูกแบ่งเลี้ยงใน 3 กระชังจำนวนเท่าๆกัน ปลากะพงขาวชุดควบคุมก็ถูกแบ่งเลี้ยงใน 3 กระชังเช่นเดียวกัน ติดตามตรวจสอบ mortality rate และการเจริญเติบโตจนถึงจับขาย ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 ตัว ในแต่ละชุดการทดลอง เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวทั้งหมด 4 ครั้ง โดยเริ่มนับการเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่ให้วัคซีนครั้งที่สอง แต่ละครั้งระยะเวลาห่างกัน 1 เดือน ปลากะพงขาววัคซีน 1 ตัวจะถูกเก็บอวัยวะทั้งหมด 3 อวัยวะ ได้แก่ ไตส่วนหน้า, ตับ และม้าม โดยเก็บอวัยวะไตส่วนหน้าเพื่อนำมาตรวจผลการตอบสนองทาง innate immunity ค่า white blood cells, phagocytosis และ superoxide production ตรวจผลการตอบสนองทาง humoral immunity วัดแอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer response) ด้วยเทคนิค Indirect ELISA ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีหนูที่จำเพาะต่อ Immunoglobulin ปลากะพงขาว และเก็บอวัยวะตับและม้ามเพื่อศึกษาการแสดงออกของ Immunoglobulin M (IgM), Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor-alpha (IFN) โดยเทคนิค quantitative Real time PCR ถ้ามีปลากะพงขาวป่วยหรือตายระหว่างการเลี้ยง จะชันสูตรปลา เพื่อหาเชื้อ *V. vulnificus*

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน (gene expression) ภายหลังการได้รับวัคซีน

การศึกษาการแสดงออกของ Immunoglobulin M (IgM), Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor-alpha (IFN) โดยเทคนิค quantitative Real time PCR เพื่อติดตามประสิทธิภาพของวัคซีนเช่นกัน โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 การเก็บอวัยวะไตส่วนหน้า ตับ และม้ามของปลากะพงขาวทดลอง

ปลากะพงขาวทดลอง 1 ตัว เก็บ 3 อวัยวะ คือไตส่วนหน้า ตับ และม้าม โดยเก็บแยกในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Trizol แช่เย็น หรือเก็บอวัยวะใน RNA later แช่เย็น หากตัวอย่างมีจำนวนมากและยังไม่ได้สกัดอาร์เอ็นเอในทันที

ปลากะพงขาวโปรแกรม 1 เก็บทั้ง 3 อวัยวะ โดย 1 อวัยวะ จะเก็บแบบ 3 ตัว pool รวมกัน ของแต่ละชุดการทดลอง ส่วนปลากะพงขาวโปรแกรม 2 และปลากะพงขาวในการทดลองเลี้ยงระดับฟาร์ม เก็บเพียงอวัยวะ ตับและม้าม เท่านั้น เนื่องจากไตส่วนหน้าจำเป็นต้องนำมาตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

4.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA Extraction)

นำอวัยวะที่เติม RNA later เติม Tri reagent (Trizol) 1 มิลลิลิตรใช้ Auto pipette ผสม ขึ้น-ลง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม Chloroform 0.2 มิลลิลิตร พลิกหลอด 15 - 20 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสลง eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Isopropanol 0.5 มิลลิลิตร พลิกหลอดเบาๆที่ อุณหภูมิห้อง 10 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ

12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% Ethanol 900 ไมโครลิตร (ดีดตะกอนให้อยู่ในแอลกอฮอล์) ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เททิ้งคว่ำบนทิชชู ประมาณ 10 นาที (Dry RNA) ละลาย อาร์เอ็นเอ ด้วย DEPC 25 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอน) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที ตรวจสอบอาร์เอ็นเอ (Check RNA) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 260 และ 280 นาโนเมตร ตรวจสอบความบริสุทธิ์ และปริมาณของอาร์เอ็นเอ และเช็คอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (1.2% agarose gel)

การคำนวณ ค่าความบริสุทธิ์ (คุณภาพ RNA) = 260/280

ความเข้มข้น (ปริมาณ RNA (ng/µl)) = ความยาวคลื่น 260 × 40 × dilution factor (100)

หมายเหตุ : RNA ที่มีคุณภาพควรอยู่ในช่วง 1.7- 2.0

4.3 การสังเคราะห์ First strand cDNA สายเดี่ยว สำหรับกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่แบบ (RT-PCR)

ละลาย RNA ที่สกัดได้ด้วย DEPC 5 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง 30 นาที นำไปสังเคราะห์เป็น cDNA ด้วย Sensiscript® Reverse Transcription Kit ตามวิธีบริษัท Qaigen ตรวจสอบ cDNA วัดค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่นเท่ากับ 260 และ 280 นาโนเมตร

การคำนวณ คุณภาพ DNA = 260/280

ปริมาณ DNA (ng/µl) = ความยาวคลื่น 260 × 50 × dilution factor (70)

หมายเหตุ : DNA 1 OD = 50

4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน (end point) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เจือจาง cDNA เป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
2. นำ cDNA ที่เจือจางแล้วมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการศึกษาและเตรียมส่วนผสม (pcr cocktail)
3. หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่เตรียมแล้วเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิ ดัง **ตารางที่ 1**
4. ตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

ตารางที่ 1 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอนการดำเนินงานในเครื่อง PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	30
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final Extension	72	3 นาที	1

4.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน โดยเทคนิค Quantitative Real time PCR (qPCR) ดังนี้

1. นำ cDNA ที่เจือจางแล้วมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการศึกษา และเตรียมส่วนผสม (pcr cocktail) สำหรับ Real time PCR

2. หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่เตรียมแล้วเข้าเครื่อง LightCycler®96 Roch โดยตั้งอุณหภูมิ ดัง

ตารางที่ 2 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอนการดำเนินงานในเครื่อง Real time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre-incubation	95	600	1
3step Amplification	95	30	40
	60	30	
	72	30	
Melting	95	10	1
	65	60	
	97	1	

3. นำข้อมูลที่ได้จากเครื่อง Real time PCR มาวิเคราะห์ข้อมูลผ่านโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1 และคำนวณการแสดงออกของ IgM, IL, IFN วิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) โดยใช้อัตราส่วนของยีนที่สนใจกับ Reference gene (actin gene) ทำการ Calibrate กับชุดควบคุม (Control)

5. การทดสอบทางภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน

การทดสอบทางภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน จะทำการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีน FKC โปรแกรม 2 และตัวอย่างปลากะพงขาวในการทดลองเลี้ยงระดับฟาร์มเท่านั้น

5.1 การเจาะเลือดปลากะพงขาวและแยกเก็บพลาสมา

ใช้เข็มเบอร์ 23G พร้อม syringe ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด saturated EDTA (อัตราส่วน 1:1) เจาะเลือดปลาบริเวณเส้นเลือด vein ในส่วนโคนหาง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่นแยกเก็บพลาสมาที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาพลาสมาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin; Ig) ด้วยเทคนิค Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) ในการทดสอบพลาสมาปลากะพงขาวในข้อ 5.2 ต่อไป

5.2 การตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ในพลาสมาปลากะพงขาวด้วยเทคนิค Indirect ELISA ดัดแปลงจากวิธีของ Cuesta et al. (2004)

5.2.1 การเคลือบจาน (96 well plate) ด้วยแอนติเจน (Coat plate)

เติม 0.001% Poly-L-Lysine ที่ละลายใน 0.01 M phosphate-buffer saline, pH 7.2 ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเท Poly-L-Lysine ออก จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย V. vulnificus VVB (Burupha) ปริมาณ 2 x 10^7 เซลล์ ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติม 5% Glutaraldehyde solution (เตรียมใน PBS แช่เย็น) ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มข้ามคืนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยให้ความชื้น เมื่อครบกำหนดเทของเหลวออกและล้าง plate 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M PBS เติม 100 ไมโครลิตร 5% สารละลายนม ลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง โดยให้ความชื้น เมื่อครบกำหนดเทของเหลวออกและล้าง plate 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M PBS แล้วผึ่งให้แห้ง

5.2.2 การทดสอบพลาสมาปลากะพงขาว

สุ่มเลือกพลาสมาปลากะพงขาวจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาเจือจางด้วย PBS เจือจาง 1:20000 1:30000 และ 1:40000 นำมาเติมลงใน 96 well plate ที่เคลือบด้วยแอนติเจนแล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร (ตัวอย่างละ 3 หลุม) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ล้างด้วย Wash Buffer Low Salt นาน 3 นาที 3 ครั้ง จากนั้นเติม 5% Non-fat Dry Milk ใน PBS ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย Wash Buffer High Salt นาน 3 นาที 3 ครั้ง เติมโพลีโคลนอลแอนติบอดีหนูที่จำเพาะต่อ Immunoglobulin ปลากะพงขาว (จันทร์จรัส และคณะ 2559) เจือจาง 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง ล้างด้วย Wash Buffer High Salt อีก 3 ครั้ง แล้วจึงเติมแอนติบอดีจำเพาะต่อโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Goat Anti Mouse Immunoglobulin) เจือจาง 1:1000 และ conjugate ด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย Wash Buffer High Salt 3 ครั้ง เติมสารละลายซับสเตรท 1% Chromagen (1 mg/ml O-Phenylenediamine (OPD), 0.06% H2O in 0.1 M Citrate Buffer pH 4.5) 100 ไมโครลิตร สังเกตปฏิกิริยาจากการเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีเหลืองภายในเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1N H2SO4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จึงนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader เฉลี่ยค่า O.D. ที่อ่านได้ในแต่ละ dilution พิจารณาเลือกค่าไตเตอร์จากค่า dilution ที่ให้ค่า O.D. มากกว่า 3 เท่าของค่า O.D. PBS (control)

5.3 การตรวจจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว (Differential white blood cells count)

นำเลือดปลากะพงขาว 10 ไมโครลิตร หยดบริเวณปลายสไลด์สะอาดที่ผ่านการล้างด้วยเอธานอล จากนั้น smear เลือดจากปลายสไลด์ไปจนสุดขอบสไลด์อีกด้าน ผึ่งสไลด์ให้แห้ง ก่อนนำไปตรึงเซลล์ด้วยเอธานอล เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปย้อมสี wright's dip quick stain set เพื่อรอการตรวจนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวต่อไป

5.4 การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมของปลากะพงขาวตามวิธีของ Noga (2000)

โดยนำเลือดมาย้อมสีในอัตราส่วน เลือด 1 ส่วน ต่อสีย้อมเม็ดเลือด (Natt-Herrick's stain) 200 ส่วน โดยเติมเลือด 20 ไมโครลิตร ลงในสีย้อมเม็ดเลือดปริมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้อง 5 นาที หยอดเลือดที่ย้อมสีลงใน haematocytometer ให้เต็มทั้งสองข้าง แล้วนำมานับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสง โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า และนำมาคำนวณด้วยสูตรคำนวณข้างล่างนี้

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือด} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่นับได้}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times 2000 \text{ เซลล์ / ไมโครลิตร}$$

5.5 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาว

ใช้เทคนิคการปลอดเชื้อ (sterile technique) ตัดไตส่วนหน้าปลากะพงขาว จากนั้นเติม HBSS 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตะแกรงลวดปลอดเชื้อ ใช้ใบมีดผ่าตัดขูดไตส่วนหน้าผ่านตะแกรงลวดจนหมด ใช้ syringe ดูด suspension ผ่านตะแกรงลวดเพื่อแยกเนื้อเยื่อออก ใส่ในหลอดทดลองวางทิ้งไว้ 5 – 10 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อตกตะกอน จากนั้นเทส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดทดลองอีกหลอดนึ่ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400 g เป็นเวลา 25 นาที ปั่นล้าง 3 ครั้งๆละ 5 นาที ด้วย HBSS ก่อนนำเซลล์ที่ติดก้นหลอดทดลองมา Resuspend ด้วย L-15 medium (sigma) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Viability check) ด้วยวิธี Dye exclusion test ในข้อ 5.6 ต่อไป

5.6 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Viability check)

ใช้วิธี Dye exclusion test ดังนี้ ผสมเซลล์ที่แยกได้จากไตส่วนหน้าปลากะพงขาวเข้ากับสี Trypan blue เข้มข้น 0.25% ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปหยอดลงใน Haemocytometer นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกนับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ติดสี (เซลล์ที่มีชีวิต) และคำนวณด้วยสูตรข้างล่าง

$$\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตที่นับได้}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{Dilution factor} \times 10^4 \text{ เซลล์/ มิลลิลิตร}$$

5.7 การทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity)

เตรียม Heat killed yeast ใน L-15 medium เข้มข้น 2.5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ตามวิธีของ Thiagarajan et al. (2006) จากนั้นนำมาทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวโดยดัดแปลงจากวิธีของ เยาวนิตย์ ดนยดล และคณะ (2543) ดังนี้ ผสม Heat killed yeast กับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวในหลอด eppendorf ด้วยอัตราส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีชีวิตต่อจำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 1 ต่อ 8 ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เซลล์ทั้งสองผสมกันอย่างทั่วถึง แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 50 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้เกิด

กระบวนการ Phagocytosis เมื่อครบเวลาดูดส่วนผสมดังกล่าวมาหยดเป็นวงกลมบนสไลด์แก้วที่สะอาด (หยด 2 วง ต่อตัวอย่าง) บ่มที่อุณหภูมิห้องในกล่องที่มีความชื้นเพียงพอ รอให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกาะติดแผ่นสไลด์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นจึงเทของเหลวส่วนเกินทิ้งและล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดสไลด์ออกด้วย 0.01M PBS pH 7.2 รอให้แห้งและตรึงเซลล์ด้วยเมธานอล นาน 5 นาที เมื่อสไลด์แห้งแล้วจึงย้อมเซลล์ด้วย wright's dip quick stain set เป็นเวลา 5 นาที นำมานับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสง เพื่อคำนวณหาเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการจับกินยีสต์ โดยนับทั้งหมด 100 เซลล์ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จับกินยีสต์ และจำนวนยีสต์ที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกินทั้งหมด จากนั้นคำนวณตามสูตรข้างล่างนี้

$$\text{Phagocytosis (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จับกินยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับทั้งหมด}} \times 100$$

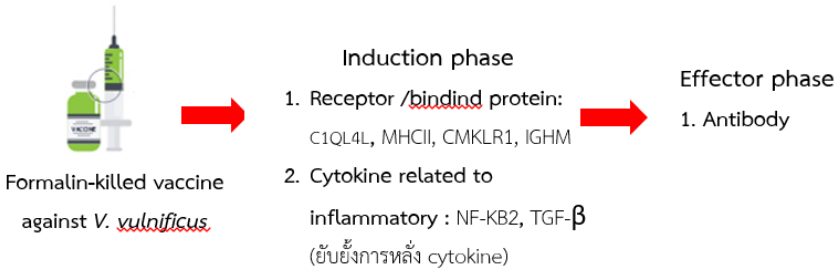
$$\text{Phagocytosis Index (PI)} = \text{PP} \times \frac{\text{จำนวนยีสต์ที่ถูกกินทั้งหมด}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับทั้งหมด}}$$

5.8 การทดสอบ Respiratory burst activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวด้วยเทคนิค Nitroblue tetrazolium assay ดัดแปลงจากวิธีของ Cook et al. (2003) และ Couso et al. (2003) ดังนี้

ภายหลังตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิตใน cell suspension ที่ได้จากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาว แล้วเติม Cell suspension ลงใน Microplate 96 wells หลุมละ 100 ไมโครลิตร (อย่างน้อย 6×10^5 เซลล์/หลุม) ในคอลัมน์และแถวที่ต้องการ บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะลงบนพื้นผิวของ Micropalte เมื่อครบเวลาแล้วล้างเซลล์ด้วย HBSS แช่เย็น เพื่อล้างเอาเซลล์ที่ไม่เกาะบนพื้นผิวออกไป แล้วจึงเติมสารละลาย NBT ใน HBSS (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม ต่อมาเติมสารละลาย PMA ใน HBSS เข้มข้น 10-5 M เพื่อใช้เป็น stimulant agent ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ทุกหลุมในแถวที่ต้องการ และเติม HBSS เพื่อใช้เป็น Non stimulant agent ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมในแถวที่ต้องการ บ่มในกล่องมืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ล้างด้วย HBSS แล้วตรึงเซลล์ด้วย Absolute methanol และล้างด้วยเมธานอล 70% อีก 2 ครั้ง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 2M KOH ปริมาณ 120 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนของ Formazan และตามด้วย DMSO ปริมาณ 140 ไมโครลิตร ในทุกหลุม เขย่าเบาๆ นาน 60 วินาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 655 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Micro plate reader

5,9 ศึกษาการแสดงออกของยีน (Immune-related gene expression)

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ชักนำ (induce phase หรือ affect (sensitization) phase) ให้เกิดกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ IGHM, C1QL4L, MHCII, TGF-β, CMKLR1 และ NF-KB2



RNA extraction and cDNA synthesis

สกัด total RNA จากเนื้อเยื่อตับ ไต และม้าม (n = 5 pool, 1 pool= 3 ตัว) ของปลาทดลอง โดยใช้ TRIzol (Invitrogen, USA) นำไปวัดความเข้มข้นของ RNA โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA reverse Transcription Kit (ABI, USA) วัดความเข้มข้นของ cDNA โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เจือจาง cDNA ให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม เก็บไว้ที่ -20 °C

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

วิเคราะห์การแสดงออกของ IGHM, C1QL4L, CMKLR1 (Xia and Yue, 2010), MHCII (Dan et al., 2013) TGF-β (Faliex et al., 2008) และ NF-kB2 (Azeredo et al., 2015) โดยมี β-actin เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) เตรียมปฏิกิริยาต่อ 1 reaction (10 µl) ดังนี้ น้ำกลั่น 1.5 µl, ไพรเมอร์ 0.5 µl (10 uM) (ตารางที่ 2), SYBR Green Real-time Master Mix 5 µl (Roche, Germany) และ cDNA template (25 ng) 2.5 µl และเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR 40 รอบ ดังนี้ 95 °C 15 วินาที 60 °C 20 วินาที 72 °C 25 วินาที โดยใช้ Roche LightCycler 96 Instrument และวิเคราะห์ค่า Relative quantification โดยใช้วิธีการคำนวณแบบ $2^{-\Delta\Delta CT}$ และทำการ normalization (Livax and Schmittgen, 2001)

ตารางที่ 3 ตารางแสดงไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา Quantitative Real-time PCR

Gene	Primer sequence	GENBANK	Ref.
β-actin	F: TACCACCGGTATCGTCATGGA	GU188683.1	Paria et al.
	R: CCACGCTCTGTCAGGATCTTC		(2016)
TGF-β	F: GACCTGGGATGGAAGTGGAT	AF140363	Faliex et al.
	R: CAGCTGCTCCACCTTGTGTTG		(2008)
MHCII	F: CACGCCAGCCTGAGAGAAC	FJ598318	Dan et al. (2013)
	R: CCAGCCAGAGATAAGACCAGAC		
NF-KB2	F: CTGGAGGAAACTGGCGGAGGAGC	KM225790	Azeredo et al.
	R: CAGGTACAGGTGAGTCAGCGTCATC		(2015)
C1QL4L	F: TGCCACAGGAGCAGCAAAGATAC	-	Xia and Yue
	R: ATTCAGCGCAGAGGCAGGAAG		(2010)
IGHM	F: ACATTGAAGGCCCCACGATGGAG	-	Xia and Yue
	R: AGTGGGGATCATTGCGGAACCAG		(2010)
CMKLR1	F: TACGAAAGGCATCCATTGTTGTTG	-	Xia and Yue
	R: GTGCGAAGCTTGAGGATGATGATTG		(2010)

บทที่ 4 ผลการวิจัย

1. การผลิตวัคซีนตายชนิด Folmalin killed whole cell (FKC) แบบผงและแบบเปียก

หลังจากทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในงานวิจัยปีที่ 1 โดยคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียจากตัวแทนในแต่ละภูมิภาคและทำการเปรียบเทียบความรุนแรงกับสายพันธุ์จากมหาวิทยาลัยบูรพา *(V. vulnificus* VVB (Burapha)) โดยฉีดเข้าช่องท้องของปลากะพงขาว ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) สามารถทำให้ปลากะพงขาวตายทันทีภายใน 5 - 6 ชั่วโมงหลังฉีดทดลอง แสดงว่าเชื้อมีความรุนแรงมาก จึงได้เลือกเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวผลิตเป็นวัคซีน FKC แบบเปียกดังภาพที่ 3 (A) และเมื่อผ่านการดูดความชื้นออกด้วยเครื่อง Freeze dry จะได้แบบผงดังภาพที่ 3 (B) โคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ที่ผ่านการทดสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดี Dot blot แล้วยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* จะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB + 1.5% เกลือ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.994 ± 0.095 และนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียได้เท่ากับ $2.178 \times 10^9 \pm 0.86$ CFU/มิลลิลิตร ดังนั้นจะใช้ค่า O.D. ดังกล่าวเป็นค่าเริ่มต้นสำหรับคำนวณปริมาณแบคทีเรียมีชีวิตในการผลิตวัคซีน FKC แบบเปียกหรือแบบผงในครั้งต่อไป

1.1 ผลิตวัคซีนแบบเปียก จากเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ได้ผลผลิตวัคซีน FKC แบบเปียก จำนวน 45 หลอด ภายใต้เงื่อนไขการผลิตรูปแบบเดียวกัน คือ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB + 1.5% เกลือ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่วโมง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้ค่า O.D. เฉลี่ยเท่ากับ 0.77 ± 0.21 มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเฉลี่ย $1.68 \times 10^9 \pm 0.53$ CFU/มิลลิลิตร ซึ่งการผลิตวัคซีน FKC ในแต่ละรอบนั้นจะได้ค่า O.D. ไม่เท่ากันแสดงดังภาคผนวกตารางที่ 1 จึงจำเป็นจะต้องบันทึกค่า O.D. ที่วัดได้ในครั้งนั้นๆ เพื่อคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียมีชีวิตก่อนการนำวัคซีน FKC แบบเปียกไปใช้ในปลากะพงขาว โดยมีวิธีการคำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตดังนี้

$$\text{ปริมาณแบคทีเรียมีชีวิต (CFU/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่า O.D. ที่ได้ในแต่ละรอบผลิต} \times \text{ปริมาณเซลล์แบคทีเรียค่าเริ่มต้น}}{\text{ค่า O.D. เริ่มต้น}}$$

* ค่า O.D. เริ่มต้น เท่ากับ 0.994 ± 0.095
* ปริมาณเซลล์แบคทีเรียค่าเริ่มต้น เท่ากับ $2.178 \times 10^9 \pm 0.86$ CFU/มิลลิลิตร

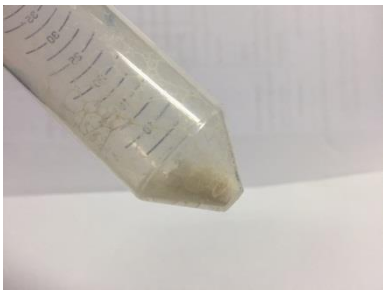
การนำวัคซีน FKC แบบเปียกไปใช้ทดลองในปลากะพงขาว เมื่อเติมน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ 0.85% ปราศจากเชื้อกลับลงไปปริมาตร 400 มิลลิลิตร จะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 1.68×10^9 CFU/มิลลิลิตร

1.2 ผลิตวัคซีนแบบผง จากเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ได้ผลผลิตวัคซีน FKC แบบผง จำนวน 34 หลอด เชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เมื่อผ่าน

กระบวนการทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง Freeze dry สามารถผลิตวัคซีน FKC แบบผงมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.26 ± 0.21 กรัม มีค่า O.D. เฉลี่ยเท่ากับ 0.695 ± 0.079 ซึ่งมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเฉลี่ย $1.52 \times 10^9 \pm 0.17$ CFU/มิลลิลิตร แสดงดังภาคผนวกตารางที่ 1

การนำวัคซีน FKC แบบผงไปใช้ทดลองในปลากะพงขาว วัคซีน FKC ปริมาณ 0.26 กรัม ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ 0.85% ปราศจากเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร จะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียอยู่ 1.52×10^9 CFU/มิลลิลิตร

(A)



(B)

ภาพที่ 3 ผลผลิตของวัคซีนชนิด Formalin killed whole cell (FKC) จากเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) แบบเปียก (A) และแบบผงด้วยเครื่อง Freeze dry (B)

วัคซีนเป็น เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและความคุ้มทุนสูงที่สุดในการป้องกัน ควบคุม และ กำจัดโรคระบาดสัตว์อันเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย รวมทั้งโปรโตซัวหรือพยาธิต่างๆดังจะเห็นได้ว่าสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ไก่ จะต้องได้รับวัคซีนตั้งแต่แรกเกิดเมื่ออายุเพียง 1 วันเลยทีเดียว เพื่อป้องกันโรคร้ายแรงที่มีระบาดอยู่ภายในประเทศ การใช้วัคซีนในการป้องกันโรคสัตว์ การผลิตจะขึ้นกับกรมปศุสัตว์จึงต้องขยายตัวตามไปด้วยจากอดีตที่มีการผลิตวัคซีน เพียง 1-2 ชนิด ปัจจุบันผลิตวัคซีนป้องกันโรคสำหรับสัตว์ต่างๆ จำนวน 12 โรค ใน ไก่ สุกร โค กระบือ แกะ แพะ (รัชนี อัตถิ 2546) ดังภาพที่ 4

แนวทางรูปแบบการผลิตวัคซีนในสัตว์น้ำ จำพวกปลา ยังไม่เกิดขึ้นในประเทศไทย เนื่องจากต้องมีโรงงานผลิตวัคซีนต้นแบบ ที่ได้มาตรฐาน GMP ในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชีย มีตัวแทนบริษัท FishVet Group (Thailand) ทำการขายวัคซีนในปลา ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ มีการจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร โดยมหาวิทยาลัยบูรพา ควรนำการพัฒนาวัคซีนเก็บรักษา แบบแช่เย็น (คำนึงถึงระยะเวลา และคุณภาพ) หรือแบบผง (Lyophilised protein) และ packaging (a pilot lot) ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้จริงในฟาร์มปลากะพงขาว ช่วงอนุบาล และปลาเนื้อ จะประเมินจากเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของลูกปลาและปลาเนื้อรับวัคซีน ควรเพิ่มขึ้น อย่างน้อย 30% จากเปอร์เซ็นต์อัตรารอดเฉลี่ยในฟาร์มที่ทดสอบนั้น แนวทางการบรรจุภัณฑ์วัคซีนแบบผงเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ เพื่อเป็นการนำวัคซีน FKC แบบผงที่ผลิตจากงาน มาบรรจุในผลิตภัณฑ์ที่ปลอดเชื้อและบรรจุในสภาพสุญญากาศเพื่อเก็บรักษาให้ได้เป็นระยะเวลานาน

ภาพที่ 4 บรรจุภัณฑ์แบบผงแห้งวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยใน สุกร โค-กระบือ จำหน่ายโดย กรมปศุสัตว์

2. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในสภาพทดลองแบบจำลอง

2.1 รูปแบบการให้วัคซีนในปลากะพงขาว

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของรูปแบบการให้วัคซีนในปลากะพงขาว โดยเปรียบเทียบรูปแบบการให้วัคซีน 2 แบบ คือแบบฉีดและแบบแช่ แบ่งออกเป็น โปรแกรม 1 และ 2 โดยคำนึงถึงขนาดของปลากะพงขาว ดังนี้ การทดลองวัคซีนแบบฉีด (injection) ทดสอบทั้ง 2 โปรแกรม จะฉีดวัคซีน FKC เข้าบริเวณช่องท้องของปลากะพงขาว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามขนาดปลากะพงขาว ขนาด 3 – 4 นิ้ว ในโปรแกรม 1 และขนาด 4 – 5 นิ้ว ในโปรแกรม 2 ส่วนการทดลองวัคซีนแบบแช่ (immersion) จะทดลองกับลูกปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 - 4 นิ้ว โปรแกรม 1 เท่านั้น

2.2 การทดลองให้วัคซีน FKC ตามขนาดของปลากะพงขาว

2.2.1 ปลากะพงขาวโปรแกรม 1

ปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 – 4 นิ้ว จำนวน 1,000 ตัว แบ่งลูกปลากะพงขาวเป็น 2 ชุดการทดลองตามรูปแบบการให้วัคซีนแบบแช่และแบบฉีด ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำๆ ละ 50 ตัว โดยจะมีการเก็บตัวอย่างเป็นรายครั้ง จำนวน 4 ครั้ง โดยนับครั้งแรกในวันที่ทดลองให้วัคซีน และแต่ละครั้งละยะเวลาห่างกัน 10 วัน เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 1 วัคซีนแบบฉีดเท่านั้น จำนวน ชุดการทดลองละ 3 ตัว เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนภายหลังได้รับวัคซีน ซึ่งตัวอย่างปลากะพงขาวที่ถูกสุ่มเก็บ ได้มีการบันทึกข้อมูลขนาดความกว้าง ยาว และน้ำหนักไว้ทุกครั้งที่มีการเก็บตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่ได้รับวัคซีนแบบแช่มีการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวครั้งเดียวเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่านั้น จึงไม่ได้มีบันทึกข้อมูลเป็นรายครั้งเหมือน

กลุ่มที่ได้รับวัคซีนแบบฉีด ซึ่งได้แสดงข้อมูลเปรียบเทียบขนาดความกว้าง ยาว และน้ำหนักของปลากะพงขาวแต่ละชุดการทดลองดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตที่ต่างกันในรูปของ น้ำหนัก ความกว้าง ความยาว ที่เพิ่มขึ้น ของปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีนต่างกันแต่ละชุดการทดลอง ตลอดการทดลองระยะเวลา 35 วัน

ชุดการทดลอง		ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	
			ปลากะพงขาววัคซีน FKC แบบแช่	ปลากะพงขาววัคซีน FKC แบบฉีด
Control	กว้าง (ซม.)	2.2 ± 0.1	3.6 ± 0.3	4 ± 0.2
	ยาว (ซม.)	8.1 ± 0.1	13.5 ± 0.6	14.3 ± 0.1
	น้ำหนัก (กรัม)	9.0 ± 0.8	36.7 ± 3.1	40 ± 3.1
Control Adjuvant	กว้าง (ซม.)	2.2 ± 0.2	3.6 ± 0.1	-
	ยาว (ซม.)	8.0 ± 0.7	13.4 ± 0.4	-
	น้ำหนัก (กรัม)	10 ± 2.9	36.7 ± 4.7	-
Vaccine	กว้าง (ซม.)	2.1 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.3
	ยาว (ซม.)	7.8 ± 0.2	13.7 ± 0.5	14.2 ± 0.7
	น้ำหนัก (กรัม)	9.9 ± 0.7	34.4 ± 3.1	38.9 ± 5.9
Vaccine + Adjuvant	กว้าง (ซม.)	2.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2	-
	ยาว (ซม.)	7.8 ± 0.5	12.7 ± 0.4	-
	น้ำหนัก (กรัม)	9.8 ± 1.5	28.9 ± 4.7	-

*แสดงค่า Mean ± S.D. (n = 3)

ตารางที่ 5 แสดงคุณภาพน้ำในบ่อปูนที่เลี้ยงปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ทำการวัดคุณภาพน้ำทุกครั้งหลังจากการคัดขนาด

ครั้งที่	บ่อที่	คุณภาพน้ำ					
		ความเค็ม (ppt)	ออกซิเจน (มก./ล.)	ความเป็นกรด – ด่าง (pH)	อัลคาไลน์ (มก./ล.)	แอมโมเนียอิสระ (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)
ครั้งที่ 1	1	16	4.1	8.39	281	NT	NT
	2	17	4.4	8.29	242	NT	NT
	3	19	4.3	8.19	193	NT	NT

	4	18	3.8	8.19	231	NT	NT
ครั้งที่ 2	1	17	4.5	8.47	190	0	0
	2	16	4.7	8.44	230	0.5	0
	3	16	4.4	8.39	220	1	0
	4	16	4.3	8.34	190	0	0
ครั้งที่ 3	1	18	3.9	8.01	130	0.5	0.05
	2	18	3.6	8.12	137	0.5	0.05
	3	15	3.9	8.36	246	0	0.05
	4	18	3.9	8.2	135	0.25	0.05
ครั้งที่ 4	1	28	4	8.09	137	1	0
	2	28	4	8.1	128	0.5	0
	3	28	4.5	7.59	133	0.75	0
	4	28	4.2	8.13	138	0.5	0

*NT คือ ไม่มีการวัดค่าคุณภาพน้ำนั้น

2.2.2 ปลากะพงขาวโปรแกรม 2

ปลากะพงขาวระยะ juvenile ขนาด 4 – 5 นิ้ว จำนวน 1,000 ตัว ให้วัคซีนแบบฉีดเท่านั้น โดยแบ่งปลากะพงขาวออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำๆ ละ 50 ตัว จะมีการเก็บตัวอย่างเป็นรายครั้ง จำนวน 5 ครั้ง โดยนับครั้งแรกในวันที่ทดลองให้วัคซีน และแต่ละครั้งละยะเวลาห่างกัน 10 วัน เก็บตัวอย่างชุดการทดลองละ 5 ตัว เพื่อนำไปตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและตรวจสอบการแสดงออกของยีนภายหลังได้รับวัคซีน ซึ่งตัวอย่างปลากะพงขาวที่ถูกสุ่มเก็บ ได้มีการบันทึกข้อมูลขนาดความกว้าง ยาว และน้ำหนักไว้ทุกครั้ง แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 6 แสดงอัตราการเจริญเติบโตที่ต่างกันในรูปของ น้ำหนัก ความกว้าง ความยาว ที่เพิ่มขึ้น ของปลากะพงขาวโปรแกรม 2 แต่ละชุดการทดลอง ตลอดการทดลองระยะเวลา 40 วัน

ชุดการทดลอง		ปลากะพงขาววัคซีน FKC แบบแช่	
		ก่อนทดลอง	หลังทดลอง
Control	กว้าง (ซม.)	2.5 ± 0.1	4.1 ± 0.2
	ยาว (ซม.)	9.9 ± 0.4	14.9 ± 0.6
	น้ำหนัก (กรัม)	9.2 ± 1.1	42 ± 4.8
Control Adjuvant	กว้าง (ซม.)	2.6 ± 0.2	4.1 ± 0.2
	ยาว (ซม.)	10.4 ± 0.5	15.2 ± 0.7
	น้ำหนัก (กรัม)	13.4 ± 3.3	39.7 ± 7.4
Vaccine	กว้าง (ซม.)	2.6 ± 0.1	4.2 ± 0.4
	ยาว (ซม.)	10.5 ± 0.5	15.5 ± 0.8

	น้ำหนัก (กรัม)	9.5 ± 2.5	43.3 ± 6.3
Vaccine + Adjuvant	กว้าง (ซม.)	2.7 ± 0.2	4.1 ± 0.3
	ยาว (ซม.)	10.8 ± 0.4	15.3 ± 0.4
	น้ำหนัก (กรัม)	11.4 ± 1.9	41.3 ± 4.7

*แสดงค่า Mean ± S.D. (n = 5)

ตารางที่ 7 แสดงคุณภาพน้ำในบ่อปูนที่เลี้ยงปลากะพงขาวโปรแกรม 2 ทำการวัดคุณภาพน้ำทุกครั้งหลังจากการคัดขนาด

		คุณภาพน้ำ					
ครั้งที่	บ่อที่	ความเค็ม (ppt)	ออกซิเจน (มก./ล.)	ความเป็นกรด – ด่าง (pH)	อัลคาไลน์ (มก./ล.)	แอมโมเนียอิสระ (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)
ครั้งที่ 1	1	18	3.8	8.13	128	0	0
	2	18	3.9	8.24	126	0	0
ครั้งที่ 2	1	18	4.8	7.71	128	1	0.1
	2	18	4.5	7.75	135	1	0.1
ครั้งที่ 3	1	14	4	8.04	124	1	0.1
	2	14	3.9	7.98	126	2	0.1
ครั้งที่ 4	1	16	3.9	8.21	147	2	0.1
	2	16	3.7	8.1	149	2	0.1
ครั้งที่ 5	1	15	5.1	8.8	143	1	0.1
	2	15	4.5	8.59	149	2	0.25

2.3 การเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนเพื่อทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน FKC ทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการแสดงออกของยีน

2.3.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 1

ปลากะพงขาว ที่ได้วัคซีน FKC แบบแช่ ไม่มีเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนเพื่อทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน FKC ทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มีอัตรารอด 60 – 80% (ชุดการทดลองละ 30 – 40 ตัว) อาจเนื่องมาจากอัตราความหนาแน่นในการปล่อยที่น้อยไปทำให้ปลากะพงขาวหาเหยื่อไม่เจอ หรือการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง ทำให้ปลากะพงขาวไม่กินอาหาร ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ทำให้เกิดโอกาสที่ปลากะพงขาวจะกินกันเอง

ปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด ทำการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนเพื่อทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน FKC ทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งหมด 4 ครั้ง ครั้งละ 3 ตัวในทุกชุด

และทุกซ้ำการทดลอง โดยเริ่มนับการเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่เริ่มฉีดวัคซีน และเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งระยะเวลาห่างกัน 10 วัน ปลากะพงขาววัคซีน 1 ตัวจะถูกเก็บอวัยวะทั้งหมด 3 อวัยวะ ได้แก่ ไตส่วนหน้า, ตับ และม้าม เพื่อศึกษาการแสดงออกของ Immunoglobulin M (IgM), Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor-alpha (IFN) โดยเทคนิค quantitative Real time PCR ตลอดการทดลองมีอัตราการตายเท่ากับ 0.83 %

2.3.2 การสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 2

ปลากะพงขาวโปรแกรม 2 ที่ได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด จำนวน 5 ตัวในแต่ละชุดการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาววัคซีนทั้งหมด 5 ครั้ง โดยเริ่มนับการเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่เริ่มฉีดวัคซีน และแต่ละครั้งระยะเวลาห่างกัน 10 วัน ปลากะพงขาววัคซีน 1 ตัวจะถูกเก็บอวัยวะทั้งหมด 3 อวัยวะ ได้แก่ ไตส่วนหน้า, ตับ และม้าม โดยเก็บอวัยวะไตส่วนหน้าเพื่อนำมาตรวจผลการตอบสนองทาง innate immunity ค่า white blood cells, phagocytosis และ superoxide production ตรวจผลการตอบสนองทาง humoral immunity วัดแอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer response) ด้วยเทคนิค Indirect ELISA ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีหนูที่จำเพาะต่อ Immunoglobulin ปลากะพงขาว และเก็บอวัยวะตับและม้ามเพื่อศึกษาการแสดงออกของ Immunoglobulin M (IgM), Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor-alpha (IFN) โดยเทคนิค quantitative Real time PCR ตลอดการทดลองมีอัตราการตายเท่ากับ 1.67 %

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของปลากะพงขาววัคซีน FKC ที่สามารถต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) (Challenge Test)

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย (Challenge test) เป็นการทดสอบเพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ที่ปลากะพงขาวได้รับในการสามารถต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha)

2.4.1 ความสามารถต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ในปลากะพงขาวโปรแกรม 1 (Challenge Test)

ปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน FKC รูปแบบแช่และแบบฉีด แบ่งตามชุดการทดลองละ 2 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว จากนั้นฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ความเข้มข้น 1 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บริเวณช่องท้องของปลากะพงขาว ฉีดจนครบตามชุดการทดลอง สังเกตและบันทึกผลการทดลองที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย

ปลากะพงขาววัคซีน FKC แบบแช่ ที่ 48 ชั่วโมง ปลากะพงขาวชุดที่ได้รับวัคซีน ตาย 6 ตัว และหลังจากผ่านไป 72 ชั่วโมง ปลากะพงขาวชุดที่ได้รับวัคซีนตายหมดทุกชุดการทดลอง ส่วนปลากะพงขาวชุดควบคุมมีการตายสะสม 34 ตัว และไม่มีการตายเพิ่มจนถึงชั่วโมงที่ 120 แสดงดังตารางที่ 7

ปลากะพงขาววัคซีน FKC แบบฉีดที่ 72 ชั่วโมง พบการตายมากที่สุดในชุดควบคุม ตาย 10 ตัว และไม่มีการตายเพิ่มจนถึงชั่วโมงที่ 120 มีเพียงชุดการทดลองให้วัคซีนเท่านั้นที่ตายสะสม 3 ตัว แสดงดังตารางที่ 7 คาดเดาว่าลูกปลากะพงขาวชุดที่ทำการทดลองนี้อาจเคยได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* มาก่อนแล้วรอดตายจึงเกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรคนี้ ทำให้มีความทนทานต่อเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

จากข้อมูลในตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายของปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีนรูปแบบฉีด ชุดที่ฉีดวัคซีน FKC และชุดที่ผสมวัคซีน FKC เข้ากับ Adjuvant มีอัตราการรอดตาย 70 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สูงกว่าปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนรูปแบบแช่ ที่มีอัตรารอดตาย 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถรายงานเปรียบเทียบประสิทธิภาพของรูปแบบการให้วัคซีน FKC ระหว่างรูปแบบแช่และแบบฉีด ซึ่งมีส่วนสำคัญในการพิจารณาการให้วัคซีน FKC ครั้งแรกในการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน FKC ในระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์

ตารางที่ 8 การตายสะสมของปลากะพงขาววัคซีน FKC โปรแกรม 1 หลังทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) (Challenge Test) ภายใน 120 ชั่วโมง (n=60)

รูปแบบการให้วัคซีน	ชุดการทดลอง	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	อัตราการตายสะสม	% การตายสะสม	% RPS
แบบแช่	Control	72	ตาย 34 ตัว และไม่ตายเพิ่มจนถึงชั่วโมงที่ 120	56.6	12
	Vaccine	72	ตาย 30 ตัว และไม่ตายเพิ่มจนถึงชั่วโมงที่ 120	50	
แบบฉีด	Control	72	ตาย 10 ตัวและไม่ตายเพิ่มจนถึงชั่วโมงที่ 120	16.6	70
	Vaccine	72	ไม่มีการตายที่ 72 ชั่วโมง	5	
		120	ตาย 3 ตัว		
	Adjuvant	120	ไม่มีการตายตลอดการทดลอง	0	100
	Vaccine + Adjuvant	120	ไม่มีการตายตลอดการทดลอง	0	

2.4.2 ความสามารถต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ในปลากะพงขาวโปรแกรม 2 (Challenge Test)

แบ่งปลากะพงขาววัคซีนออกเป็น 3 ซ้ำๆละ 20 ตัว จากนั้นฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) ปริมาณ 1 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บริเวณช่องท้องของปลากะพงขาว ฉีดจนครบตามชุดการทดลอง สังเกตและบันทึกผลการทดลองที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบการตายของปลากะพงขาวตั้งแต่ 24 ชั่วโมง ชุดควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือและฉีดด้วย Adjuvant ปลากะพงขาวตาย 18 และ 21 ตัวตามลำดับ ส่วนชุดที่ฉีดด้วยวัคซีน FKC และชุดผสมวัคซีนด้วย Adjuvant ปลากะพงขาวตาย 20 และ 18 ตัวตามลำดับ ปลากะพงขาวทุกชุดการทดลองมีอัตราการตายสะสมเรื่อยมาแสดงดังตารางที่ 8 จนถึงชั่วโมงที่ 120 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของปลากะพงขาวชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและชุดวัคซีน FKC ได้เท่ากับ 85 และ 76.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปลากะพงขาวชุดควบคุมที่ฉีดด้วย

Adjuvant และชุดที่ฉีดด้วยวัคซีน FKC ผสมกับ Adjuvant มีการตายสะสมเท่ากับ 80 และ 86.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการให้วัคซีน FKC แบบฉีด ทั้งที่ผสมและไม่ผสมกับ Adjuvant ปลากะพงขาวชุดที่ได้รับวัคซีน FKC แบบฉีดที่ไม่ผสม Adjuvant มีอัตรารอดตายสูงกว่าปลากะพงขาวชุดที่ได้รับวัคซีน FKC แบบฉีดที่ผสม Adjuvant เท่ากับ 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในท้ายที่สุดแล้วผลการทดลองความสามารถต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในทางปฏิบัตินั้น เปอร์เซ็นต์การรอดตายของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด โปรแกรม 2 ถือว่าน้อยกว่าที่ได้คาดหวังเอาไว้ ซึ่งจำเป็นต้องนำผลการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการตอบสนองการแสดงออกของยีน มาช่วยประกอบการรายงานผลประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ซึ่งถ้าหากผลทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการตอบสนองการแสดงออกของยีน ในผลไปในทิศทางเดียวกันกับผล Challenge ก็ถือได้ว่าวัคซีน FKC ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* แต่ถ้าหาก พบว่ากลุ่มปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน FKC มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการแสดงออกของยีนสูงกว่ากลุ่มควบคุม ก็อาจจะบอกได้ว่าวัคซีน FKC มีประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* เพียงแต่ช่วงเวลาที่ปลากะพงขาวมีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแบคทีเรียอาจจะมีการปรับเปลี่ยนรูปแบบหรือเพิ่มการให้วัคซีนในปลากะพงขาวจากเดิมนั้น ฉีดวัคซีน FKC หลังจากนั้น 30 วันจึงนำมาทดสอบความสามารถต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอาจจะลดลง

ตารางที่ 9 การตายสะสมของปลากะพงขาววัคซีน FKC โปรแกรม 2 หลังทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) (Challenge Test) ภายใน 120 ชั่วโมง (n=60)

วัคซีน	ชุดการทดลอง	อัตราการตายสะสม (ตัว) / ระยะเวลา (ชั่วโมง)					% การตายสะสม	% RSP
		24	48	72	96	120		
แบบฉีด	Control	18	43	49	51	51	85	10
	Vaccine	20	37	45	45	46	76.6	
	Adjuvant	21	41	46	48	48	80	0
	Vaccine + Adjuvant	18	40	46	50	52	86.6	

3. การทดสอบทางภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC หลังทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) โปรแกรม 1

การตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ด้วยเทคนิค Indirect ELISA ดัดแปลงจากวิธีของ Cuesta et al. (2004) ในพลาสมาปลากะพงขาว ณ วันที่ 30 ของชุดทดลอง ที่มีการเจือจาง 1/30000 และ 1/40000

พบว่าการเจือจางที่ 1/30000 มีความเหมาะสม ในการเปรียบเทียบ ให้ค่าการดูดกลืนแสง (OD, optical density) มากกว่า การเจือจาง 1/40000 และไม่เหมาะสมในการเจือจางที่ 1/25000 เนื่องจากให้ค่าไม่แตกต่างกันทุกชุดทดลอง

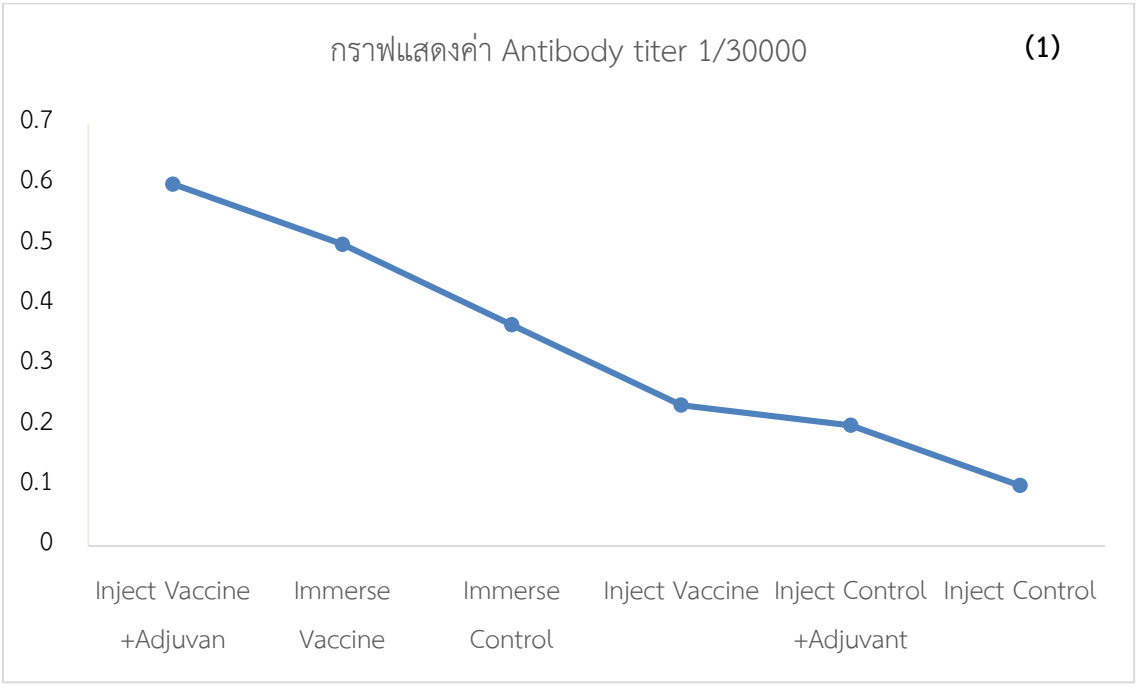
ค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาว การเจือจาง 1/30000 ของชุดทดลองฉีดวัคซีนและผสมสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) Inject vaccine + adjuvant ให้ค่า OD สูงที่สุด และและแตกต่างมากกว่าชุดทดลอง ที่ฉีดเฉพาะวัคซีน และชุดควบคุมฉีดเฉพาะสารสื่อ แสดงดังตารางที่ 10 และภาพที่ 5 อย่างไรก็ตาม การแช่วัคซีน ก็มีประสิทธิภาพ เช่นกัน

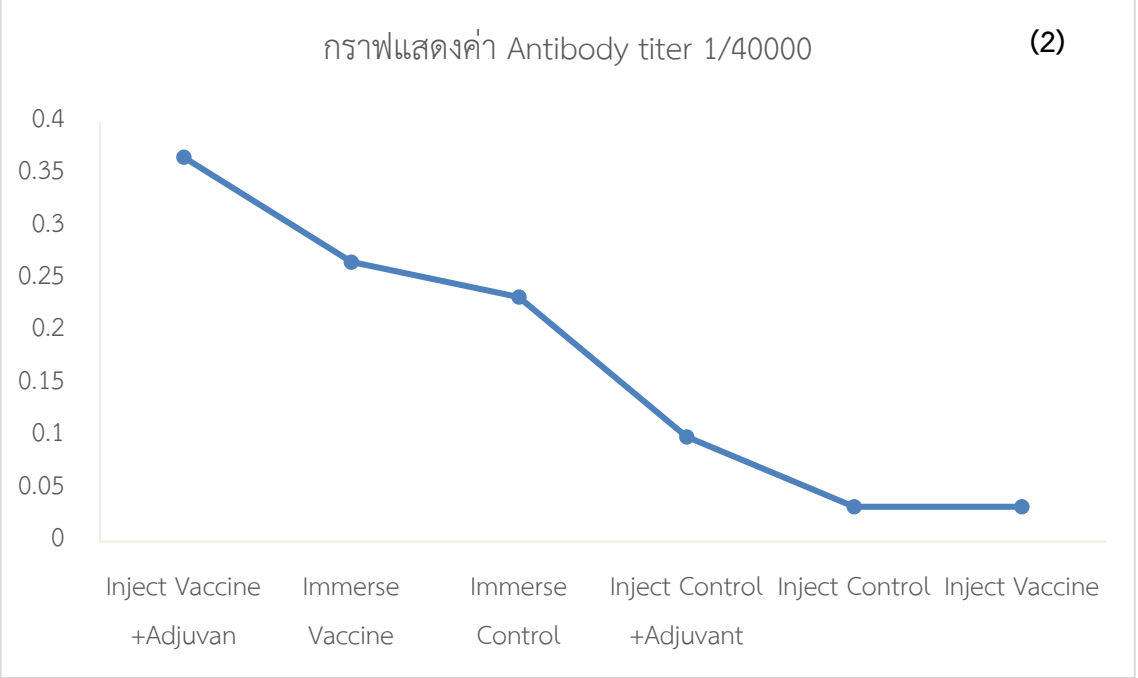
ตารางที่ 10 ตารางแสดงค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาว ภายหลังการฉีด และแช่วัคซีน FKC โปรแกรม 1

Titer / Treatment	1/25000	1/30000	1/40000
Immerse control	-	0.366^{abc}	0.233^{ab}
Immerse vaccine	-	0.500^{ab}	0.266^{ab}
Inject Control	-	0.100^{c}	0.033^{b}
Inject Vaccine	-	0.233^{bc}	0.033^{b}
Inject control + Adjuvant	-	0.200^{bc}	0.100^{b}
Inject vaccine + adjuvant	-	0.600^{a*}	0.366^{a}

วิเคราะห์แบบ LSD Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %





ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่า Antibody titer ที่ 1/30000 (1) และ 1/40000 (2) ในซีรั่มปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC โปรแกรม 1

4. การทดสอบทางภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC หลังทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) โปรแกรม 2

4.1 การตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในพลาสมาปลากะพงขาว แสดงค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาวที่เจือจาง 1:25000 ในวันที่ 10 พบว่าค่า OD สูงสุดเฉลี่ยของทุกชุดทดลองคือ 0.383±0.248

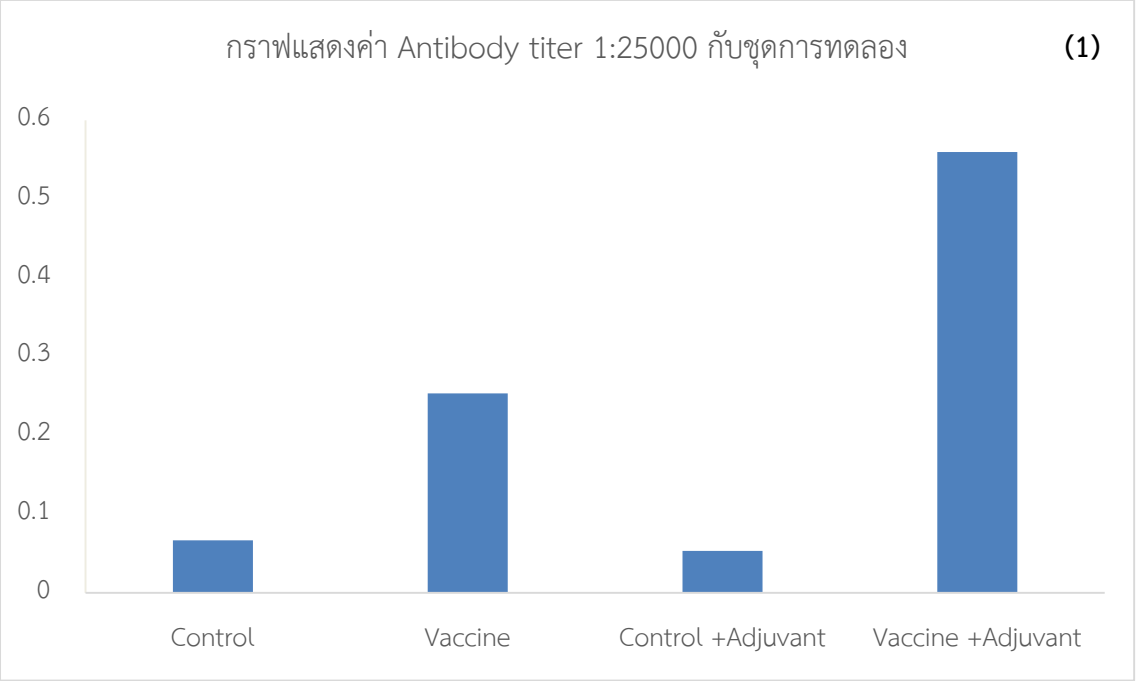
โดยวันที่ 10 นี้ ชุดทดลองฉีดวัคซีนและผสม สารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Vaccine +Adjuvant) นี้ ให้ค่า OD สูงสุดเฉลี่ย 0.560±0.241 สูงมากกว่าชุดทดลองอื่นและชุดควบคุม อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ แสดงดังตาราง 11 และภาพที่ 6

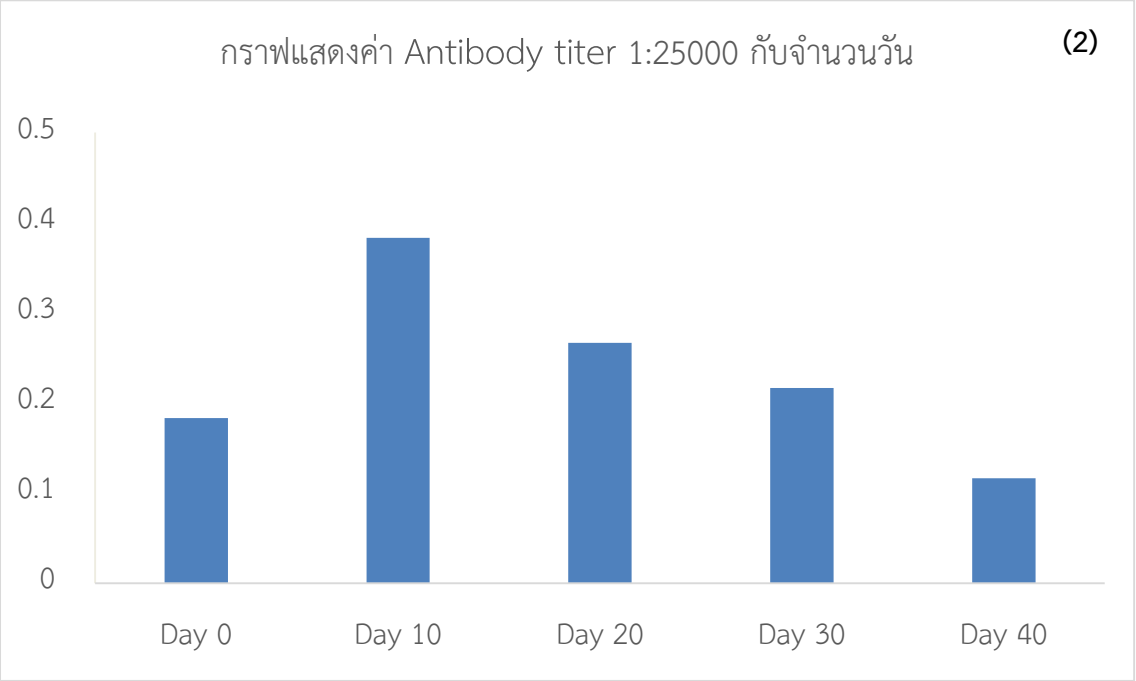
ตารางที่ 11 ตารางแสดงค่า Antibody titer ที่ 1:25000 ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด โปรแกรม 2

Treatment	Mean	Treatment	Mean
Day 0	0.183±0.158^{ab}	Control	0.066±0.051^{c}
Day 10	0.383±0.248^{a}	Vaccine	0.253±0.082^{b}
Day 20	0.266±0.090^{ab}	Control +Adjuvant	0.053±0^{c}
Day 30	0.216±0.057^{ab}	Vaccine +Adjuvant	0.560±0.241^{a}
Day 40	0.116±0^{b}		

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %





ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่า Antibody titer 1:25000 ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีดเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง (1) และค่า ELISA 1:25000 กับจำนวนวัน (2)

4.2 การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวรวม (Total white blood cells count) ของปลากะพงขาวตามวิธีของ Noga (2000) ผลการนับจำนวนเม็ดเลือดขาว ในทุกชุดการทดลองและชุดควบคุม เริ่มต้นการทดลองที่ 0 วัน มีความแตกต่างกัน อันเนื่องจากความเครียดหลังการฉีดในทันที ซึ่งในวันที่ 10 และ 20 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมในภาพวม ไม่มีผลการเปลี่ยนแปลง ในทุกชุดการทดลองและชุดควบคุม ในทุกช่วงเวลา ในวันที่ 10, 20, 30 และ 40 วัน แสดงดังตารางที่ 12 และภาพที่ 7

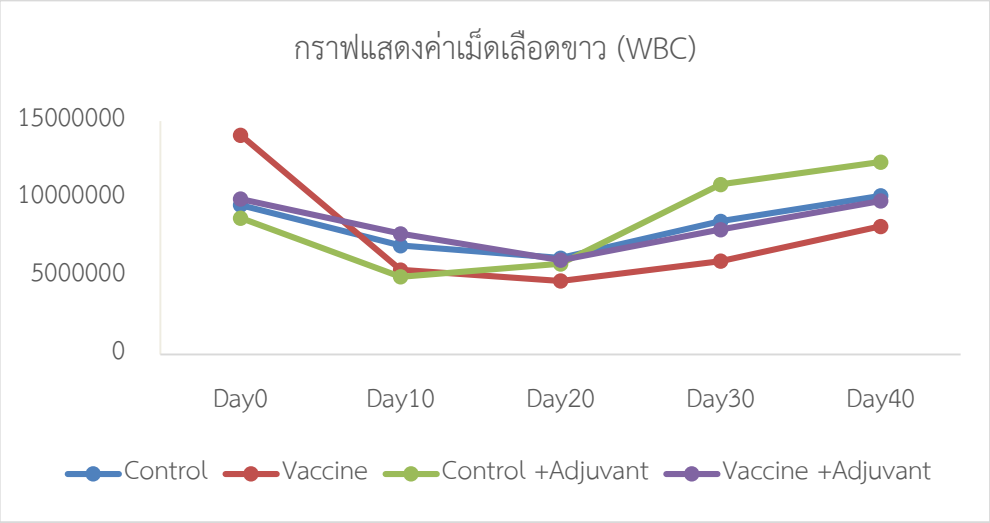
ตารางที่ 12 ตารางแสดงค่าเม็ดเลือดขาวรวม (WBC) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

WBC / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	9,600,000± 1,931,321^{b}	7,000,000± 1,769,181^{a}	6,200,000± 1,058,301^{a}	8,566,667± 115,470^{ab}	10,200,000 ±781,025^{ab}
Vaccine	14,100,000 ±2497,999^{a}	5,433,333± 1,677,299^{a}	4,733,333± 1,167,619^{a}	6,000,000± 700,000^{b}	8,233,333± 950,438^{b}
Control +Adjuvant	8,766,667± 3,894,012^{b}	5,000,000± 1,513,275^{a}	5,833,333± 802,081^{a}	10,933,333 ±907,377^{a}	12,366,667 ±416,333^{a}

Vaccine +Adjuvant	10,000,000 ±3,675,595[b]	7,766,667± 2,809,508[a]	6,066,667± 1,069,268[a]	8,033,333± 929,157[ab]	9,866,667± 1,401,190[ab]

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่าเม็ดเลือดขาวรวม (WBC) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

4.3 การแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential white blood cells count) ของปลากะพงขาว

ชนิดเม็ดเลือดขาว ถูกแบ่งเป็น 5 ชนิด ดังนี้ Small Lymphocyte, Large Lymphocyte, Monocyte, Neutrophill และ Eosinophil ผลการนับจำนวนแต่ละชนิดของปลากะพงขาวแต่ละตัวจากชุดทดลองและชุดควบคุม จะแสดงผลแยกชนิดเป็น % หลังจากนั้นค่า % ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด จะถูกเปรียบเทียบเพื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติ ผลการจำแนก % และผลทางสถิติของการทดลอง มีดังนี้

- % เม็ดเลือดขาว Small Lymphocyte ผลการนับ ในทุกชุดการทดลองและชุดควบคุม เริ่มต้นการทดลองที่ 0 วัน มี % แตกต่างกัน อันเนื่องจากความเครียดหลังการฉีดในทันที ซึ่งในวันที่ 10 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น ในชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ในวันที่ 10 เนื่องจากเซลล์ถูกใช้ไปในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม แต่ในวันที่ 40 ชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant มีค่าสูงกว่ากว่าชุดควบคุม แตกต่างกันแบบมีนัยยะสำคัญทางสถิติ เนื่องจากมีการเปลี่ยน Small Lymphocyte ถูกสร้างแบบ memory small Lymphocyte ออกมาในกระแสเลือดด้วย แสดงดังตารางที่ 13 และภาพที่ 8

- % เม็ดเลือดขาว Large Lymphocyte ผลการนับ ในชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant และ Control +Adjuvant มีค่าสูงกว่า ชุดการทดลอง vaccine และชุดควบคุม Control มีความแตกต่างกันทาง

สถิติ ตลอดการทดลอง 40 วัน แสดงว่าสารสื่อ Adjuvant มีผลในกระตุ้นให้ ปลากะพงขาวตอบสนองต่อวัคซีน แสดงดังตารางที่ 14 และภาพที่ 9

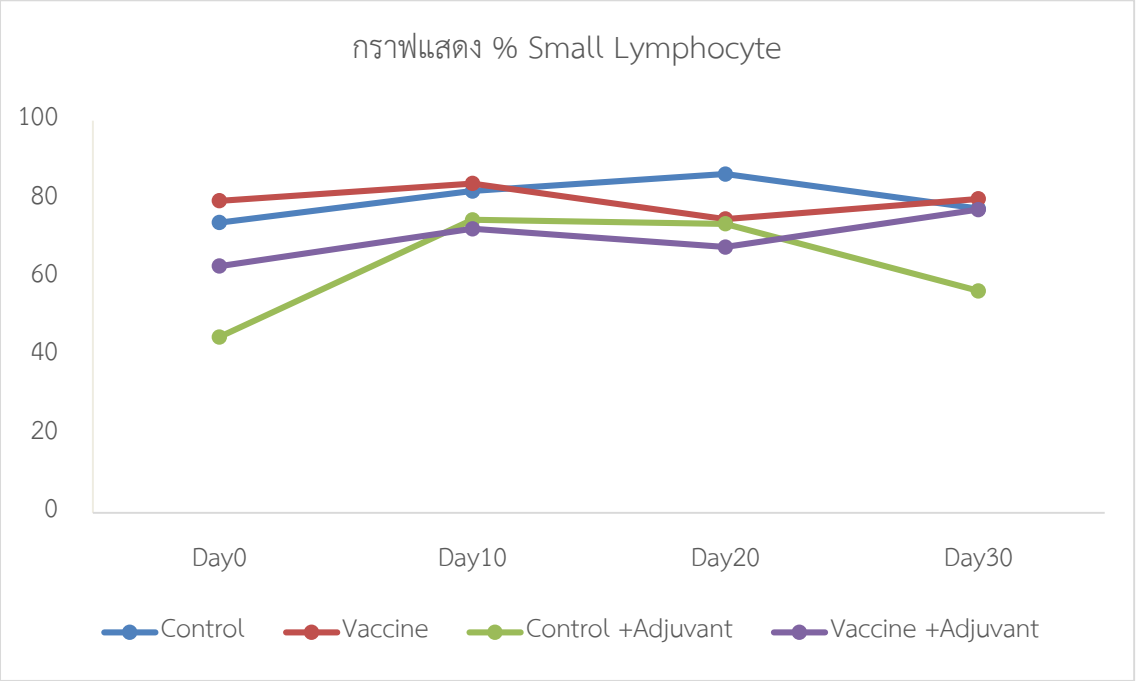
- % เม็ดเลือดขาว Monocyte ผลการนับ ในทุกชุดการทดลองและชุดควบคุม ในทุกช่วงเวลา ในวันที่ 10, 20 และ 30 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้น ที่ 40 วัน ที่ ชุดการทดลอง vaccine และชุดควบคุม Control มีค่าสูง ซึ่งคาดว่าปลากะพงขาวทดลอง น่าจะมีการติดเชื้อโรค แสดงดังตารางที่ 15 และภาพที่ 10

- % เม็ดเลือดขาว Neutrophill ผลการนับ ในทุกชุดการทดลองและชุดควบคุม เริ่มต้นการทดลองที่ 0 วัน มีความแตกต่างกัน อันเนื่องจากความเครียดหลังการฉีดในทันที่ โดยเฉพาะ Control +Adjuvant ซึ่งในวันที่ 10, 20 , 30 และ 40 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 16 และภาพที่ 11

ตารางที่ 13 ตารางแสดง %Small Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

%Small Lymphocyte / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	74.050± 1.272^{ab}	82.066± 1.900^{a}	86.4± 3.218^{a}	77.6± 5.173^{a}	57.733± 5.080^{b}
Vaccine	79.6± 1.833^{a}	84± 4.507^{a}	74.933± 2.722^{ab}	80.066± 2.318^{a}	52.8± 3.995^{b}
Control +Adjuvant	44.866± 18.296^{c}	74.733± 7.128^{a}	73.733± 7.710^{ab}	56.6± 1.681^{b}	83± 4.454^{a}
Vaccine +Adjuvant	62.933± 5.493^{b}	72.466± 4.460^{a}	67.8± 7.302^{b}	77.333± 6.463^{a}	80.4± 4.503^{a}

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%



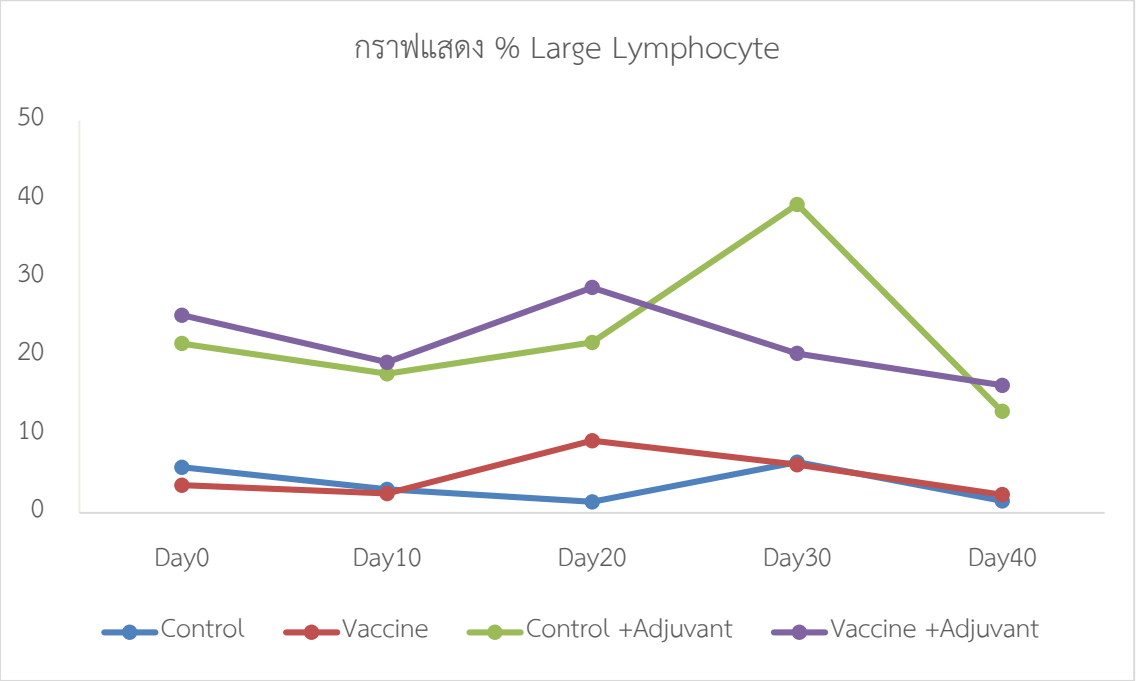
ภาพที่ 8 กราฟแสดง %Small Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

ตารางที่ 14 ตารางแสดง % Large Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

%Large Lymphocyte / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	5.814± 1.410[b]	3.0± 1.400[b]	1.4± 0.529[c]	6.466± 0.832[c]	1.533± 0.305[b]
Vaccine	3.533± 1.814[b]	2.466± 0.986[b]	9.2± 0.200[b]	6.133± 2.052[c]	2.333± 0.808[b]
Control +Adjuvant	21.6± 5.211[a]	17.733± 4.908[a]	21.733± 6.812[a]	39.333± 6.721[a]	12.933± 2.386[a]
Vaccine +Adjuvant	25.2± 4.503[a]	19.2± 3.328[a]	28.733± 6.658[a]	20.333± 5.390[b]	16.266± 3.971[a]

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



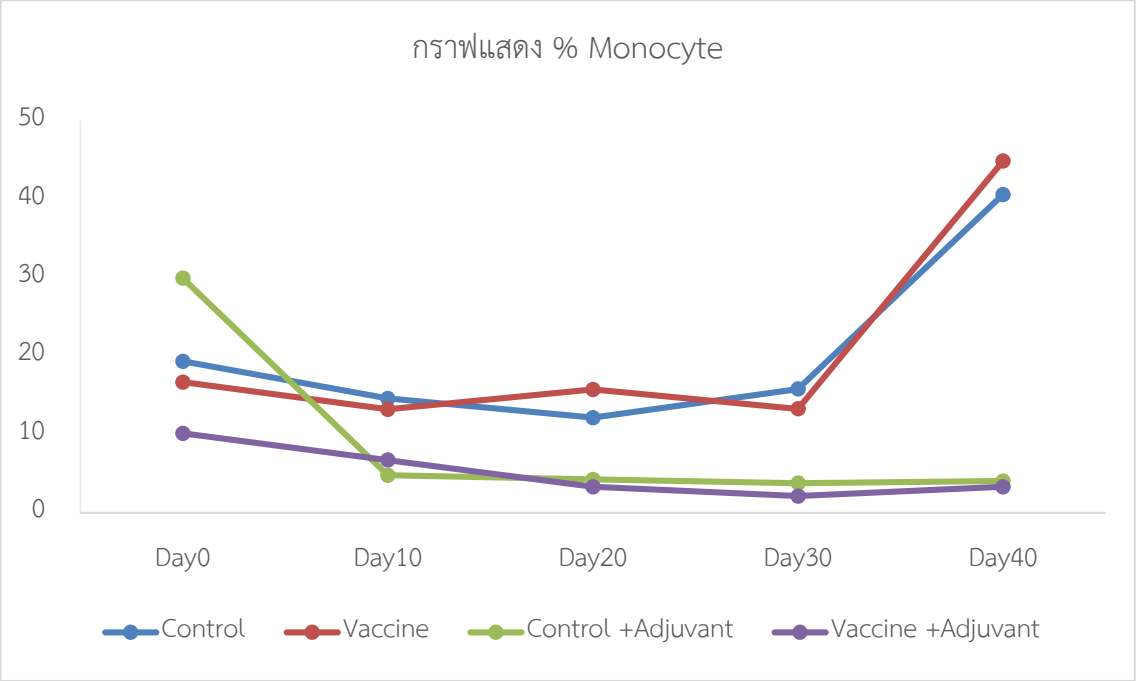
ภาพที่ 9 กราฟแสดง %Large Lymphocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

ตารางที่ 15 ตารางแสดง % Monocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

%Monocyte / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	19.321± 2.983^{b}	14.6± 0.529^{a}	12.133± 2.844^{ab}	15.8± 6.122^{a}	40.6± 5.200^{a}
Vaccine	16.666± 1.205^{bc}	13.2± 3.939^{a}	15.733± 2.730^{a}	13.266± 1.474^{a}	44.866± 3.189^{a}
Control +Adjuvant	29.933± 10.625^{a}	4.8± 1.969^{b}	4.266± 1.665^{b}	3.8± 0.200^{b}	4.066± 2.610^{b}
Vaccine +Adjuvant	10.133± 2.610^{b}	6.733± 2.730^{ab}	3.333± 0.832^{c}	2.133± 1.101^{b}	3.333± 1.501^{b}

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



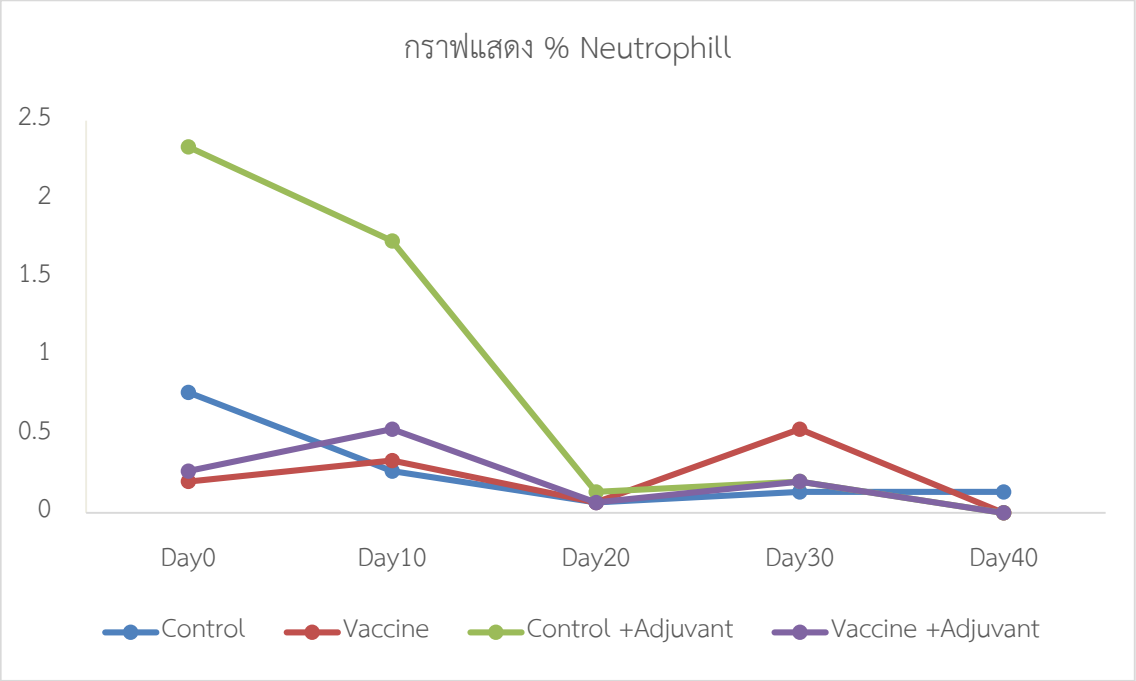
ภาพที่ 10 กราฟแสดง % Monocyte ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

ตารางที่ 16 แสดง % Neutrophill ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

%Neutrophill / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	0.768± 0.496^{ab}	0.266± 0.305^{b}	0.066± 0.115^{a}	0.133± 0.230^{a}	0.133± 0.115^{a}
Vaccine	0.2±0.2 ^{b}	0.333± 0.416^{b}	0.066± 0.115^{a}	0.533± 0.305^{a}	0±0^{a}
Control +Adjuvant	2.333± 2.119^{a}	1.733± 0.702^{a}	0.133± 0.115^{a}	0.2± 0.346^{a}	0±0^{a}
Vaccine +Adjuvant	0.266± 0.230^{b}	0.533± 0.305^{ab}	0.066± 0.115^{a}	0.2± 0.346^{a}	0±0^{a}

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



ภาพที่ 11 กราฟแสดง %Neutrophill ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

4.4 ปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Viability check) ค่า เฉลี่ย *Viability (N)* cell/ml ของชุดทดลอง ในวันที่ 30 และ 40 วัน จะสูง วันเริ่มทดลอง 0 วัน และ 10 และ 20 วัน แสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ตารางแสดงค่า *Viability (N)* cell/ml ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีน FKC แบบฉีด โปรแกรม 2

Treatment	Mean	Treatment	Mean
Day 0	13,445,417±3,349,030^{c}	Control	34,318,667±18,699,063^{a}
Day 10	37,858,750±10,068,212^{b}	Vaccine	37,974,667±19,935,122^{a}
Day 20	29,762,917±6,819,559^{b}	Control +Adjuvant	36,999,667±15,759,759^{a}
Day 30	46,549,167±13,151,739^{a}	Vaccine +Adjuvant	37,887,667±17,030,815^{a}
Day 40	56,359,583±12,026,790^{a}		

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

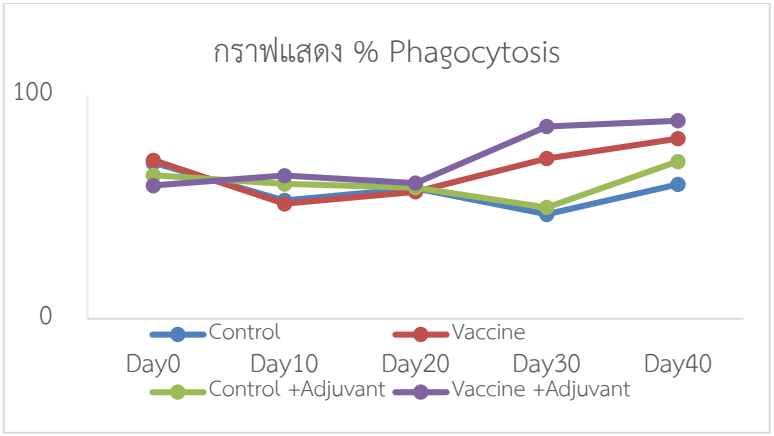
4.5 การทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity and Phagocytic index) ผลการประเมิน เริ่มต้นการทดลองที่ 0 วัน มี % แตกต่างกัน อันเนื่องจากความเครียดหลังการฉีดในทันที ซึ่งในวันที่ 10 และ 20 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ในวันที่ 30 และ 40 ชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant มีค่าสูงกว่าชุดทดลองและชุดควบคุม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ชุดการทดลอง Vaccine ค่าสูงกว่าชุดควบคุมเฉพาะวันที่ 30 เท่านั้น แสดงดังตารางที่ และภาพที่ และการประเมิน Phagocyte index (PI) แสดงดังตารางที่ และภาพที่ ก็ให้ผลไปในทำนองเดียวกันกับ % Phagocytic activity

ตารางที่ 18 ตารางแสดง % Phagocytosis ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

%Phagocytosis / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	69.918± 1.891^{ab}	53.045± 6.621^{ab}	58.523± 4.007^{a}	46.857± 5.446^{c}	60.254± 2.005^{c}
Vaccine	71.064± 4.283^{a}	51.551± 6.055^{b}	56.953± 7.163^{a}	71.846± 10.493^{b}	80.744± 5.554^{ab}
Control +Adjuvant	64.341± 2.847^{ab}	60.433± 0.449^{ab}	58.789± 3.0723^{a}	49.884± 7.236^{c}	70.486± 8.388^{bc}
Vaccine +Adjuvant	59.769± 2.533^{b}	64.192± 5.553^{a}	60.840± 1.697^{a}	86.213± 0.493^{a}	88.730± 0.485^{a}

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



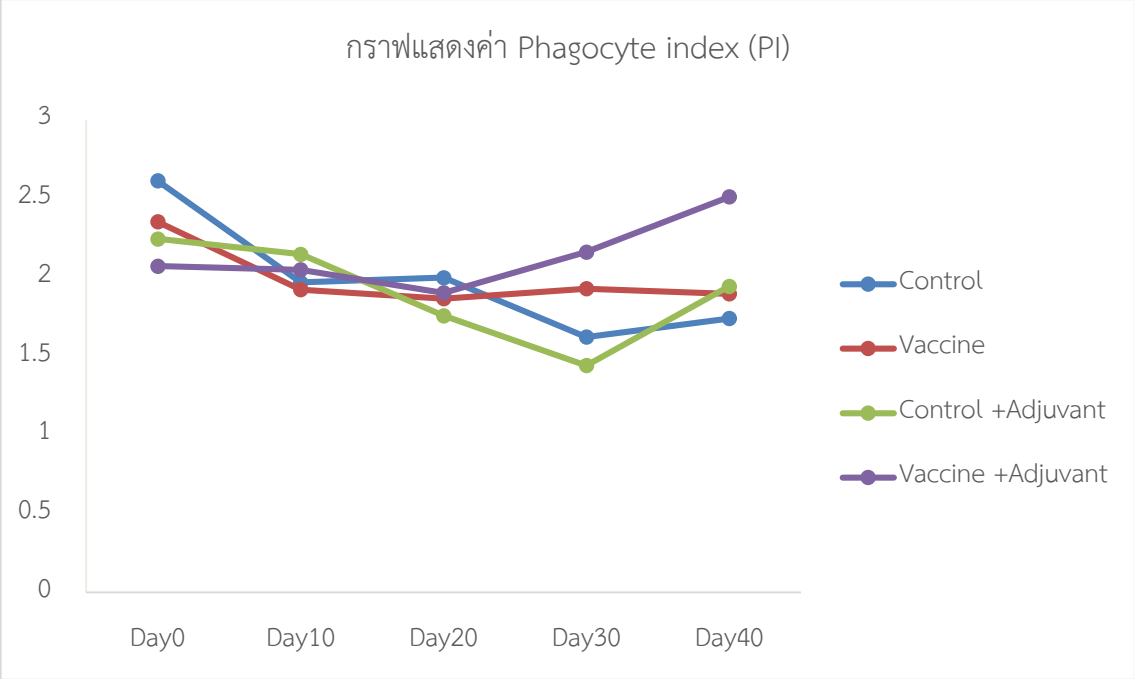
ภาพที่ 12 กราฟแสดง % Phagocytosis ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

ตารางที่ 19 แสดงค่า Phagocyte index (PI) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

PI (N) / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	2.613± 0.207^{a}	1.968± 0.253^{a}	1.998± 0.054^{a}	1.621± 0.037^{b}	1.739± 0.122^{b}
Vaccine	2.353± 0.135^{ab}	1.922± 0.068^{a}	1.865± 0.066^{a}	1.928± 0.184^{a}	1.895± 0.087^{b}
Control +Adjuvant	2.244± 0.111^{bc}	2.146± 0.098^{a}	1.757± 0.132^{a}	1.440± 0.125^{b}	1.943± 0.056^{b}
Vaccine +Adjuvant	2.071± 0.116^{c}	2.047± 0.074^{a}	1.901± 0.112^{a}	2.161± 0.068^{a}	2.511± 0.049^{a}

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่า Phagocyte index (PI) ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

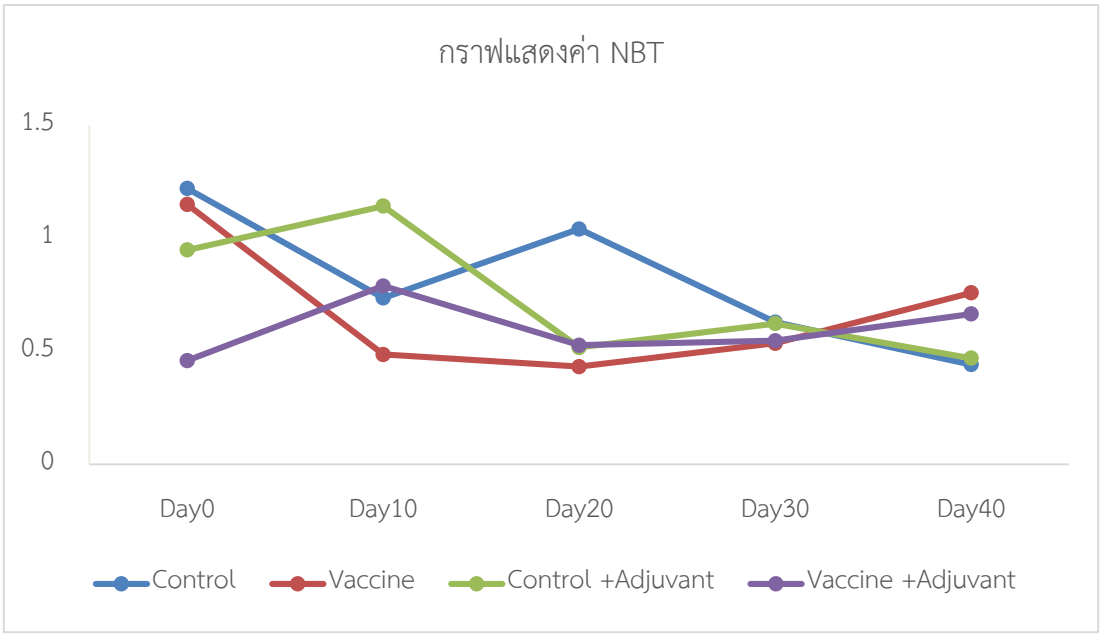
4.6 การทดสอบ Respiratory bust activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวด้วยเทคนิค Nitroblue tetrazolium assay ผลการประเมิน ในทุกชุดการทดลองและชุดควบคุม เริ่มต้นการทดลองที่ 0 วัน มีความแตกต่างกัน อันเนื่องจากความเครียดหลังการฉีดในทันที ซึ่งในวันที่ 10, 20 , 30 และ 40 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 20 และภาพที่ 14

ตารางที่ 20 ตารางแสดงค่า NBT ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

NBT / Treatment	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40
Control	1.220± 0.818^{a}	0.735± 0.125^{ab}	1.041± 0.315^{a}	0.628± 0.079^{a}	0.441± 0.171^{a}
Vaccine	1.149± 0.285^{a}	0.485± 0.172^{b}	0.432± 0.142^{b}	0.535± 0.116^{a}	0.758± 0.193^{a}
Control +Adjuvant	0.948± 0.087^{ab}	1.142± 0.107^{a}	0.516± 0.315^{ab}	0.622± 0.171^{a}	0.469± 0.040^{a}
Vaccine +Adjuvant	0.459± 0.120^{b}	0.789± 0.210^{ab}	0.526± 0.070^{ab}	0.546± 0.155^{a}	0.665± 0.234^{a}

จัดกลุ่มโดยใช้ Tukey Method ที่ความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ: * ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



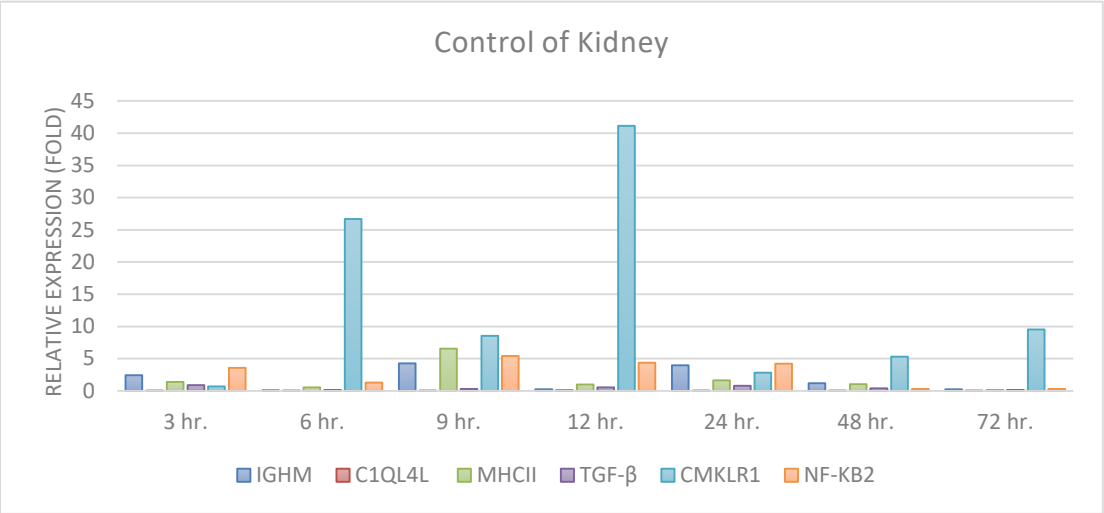
ภาพที่ 14 กราฟแสดงค่า NBT ของปลากะพงขาวภายหลังการได้รับวัคซีนแบบฉีด

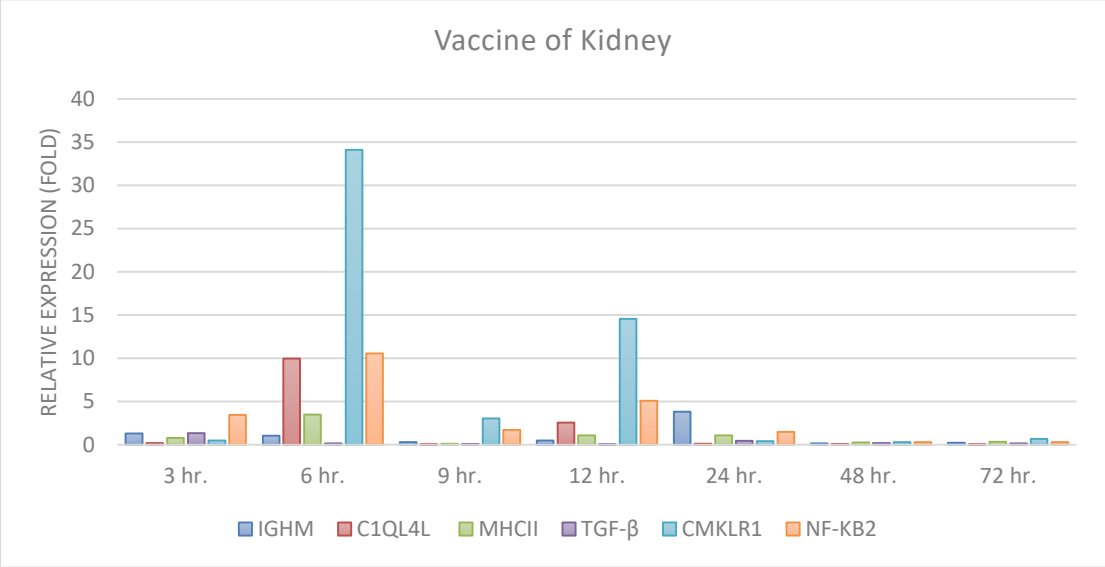
5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน (gene expression) ภายหลังการได้รับวัคซีน FKC โปรแกรม 2

1. การแสดงออกของยีน (Immune-related gene expression) หลังจากปลากะพงขาวได้รับวัคซีน FKC ตามช่วงเวลาระดับชั่วโมง ของโปรแกรม 2 ติดตามการแสดงออกของยีนในระดับชั่วโมง ในไตส่วนหน้าและม้ามของปลาขนาด 4-5 นิ้ว **(n=10)** ได้ผลดังต่อไปนี้

1.1 การแสดงออกของยีนในปลาที่ฉีดน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อตาย

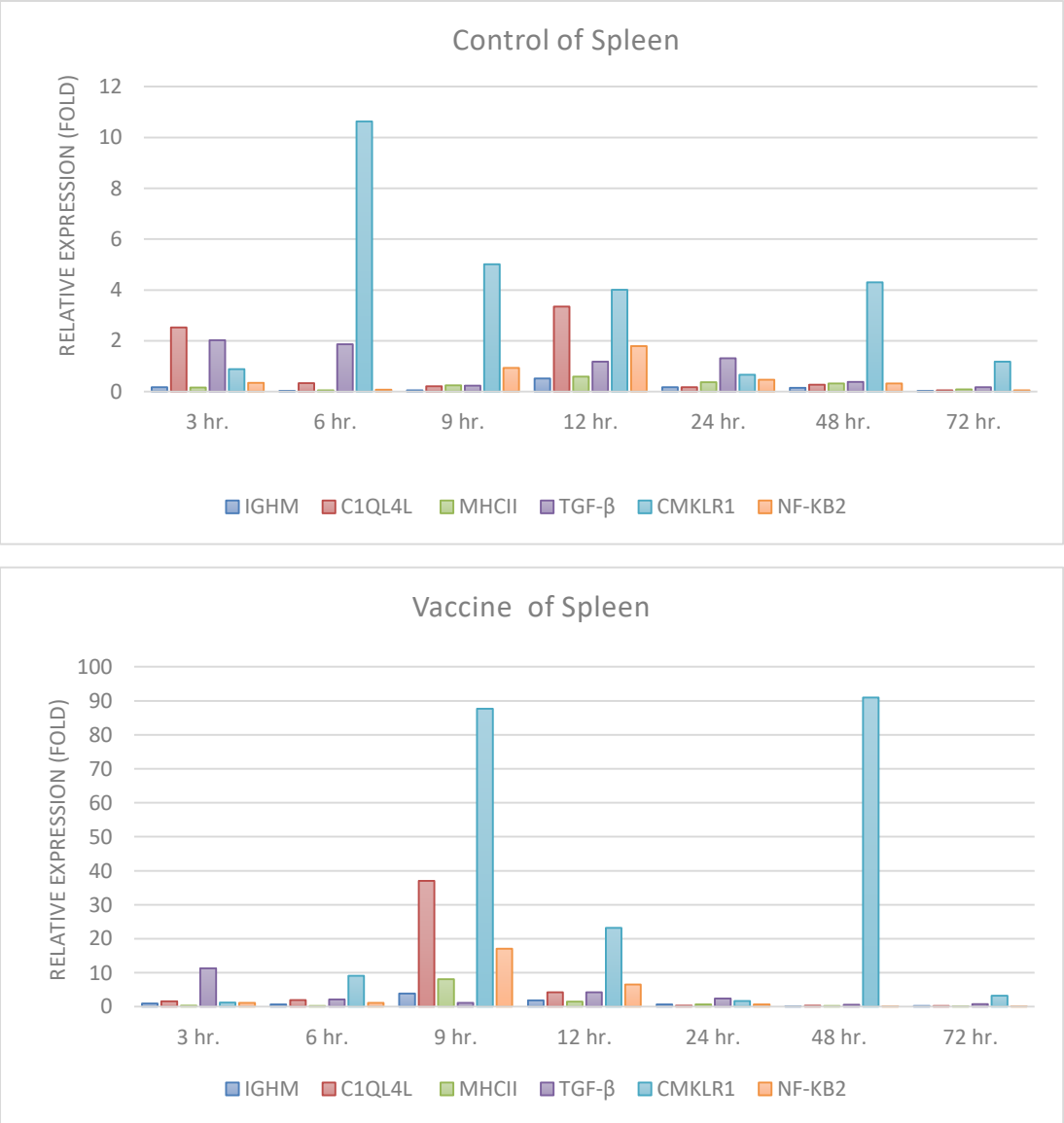
การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าของปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ พบว่ามีการแสดงออกของยีน (up-regulated) CMKLR1, NF-KB2, MHCII และ IGHM ตามช่วงเวลาต่าง ๆ ยีน CMKLR1 มีระดับการแสดงออกมากที่สุด ภายหลังการฉีดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 , 9, 12, 24, 48 และ 72 h ส่วนยีน C1QL4L และ TGF-β ไม่มีการแสดงออกของยีน (down-regulated) ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเชื้อตาย พบว่ามีการแสดงออกของยีน (up-regulated) C1QL4L , CMKLR1, NF-KB2, MHCII และ IGHM เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ภายหลังการฉีดวัคซีนที่ 6 h. และลดลงเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น ยีน CMKLR1 มีระดับการแสดงออกสูงสุดเช่นกัน ส่วน TGF-β ไม่มีการแสดงออกของยีน (down-regulated) แสดงดังภาพที่ 15





ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับชั่วโมง

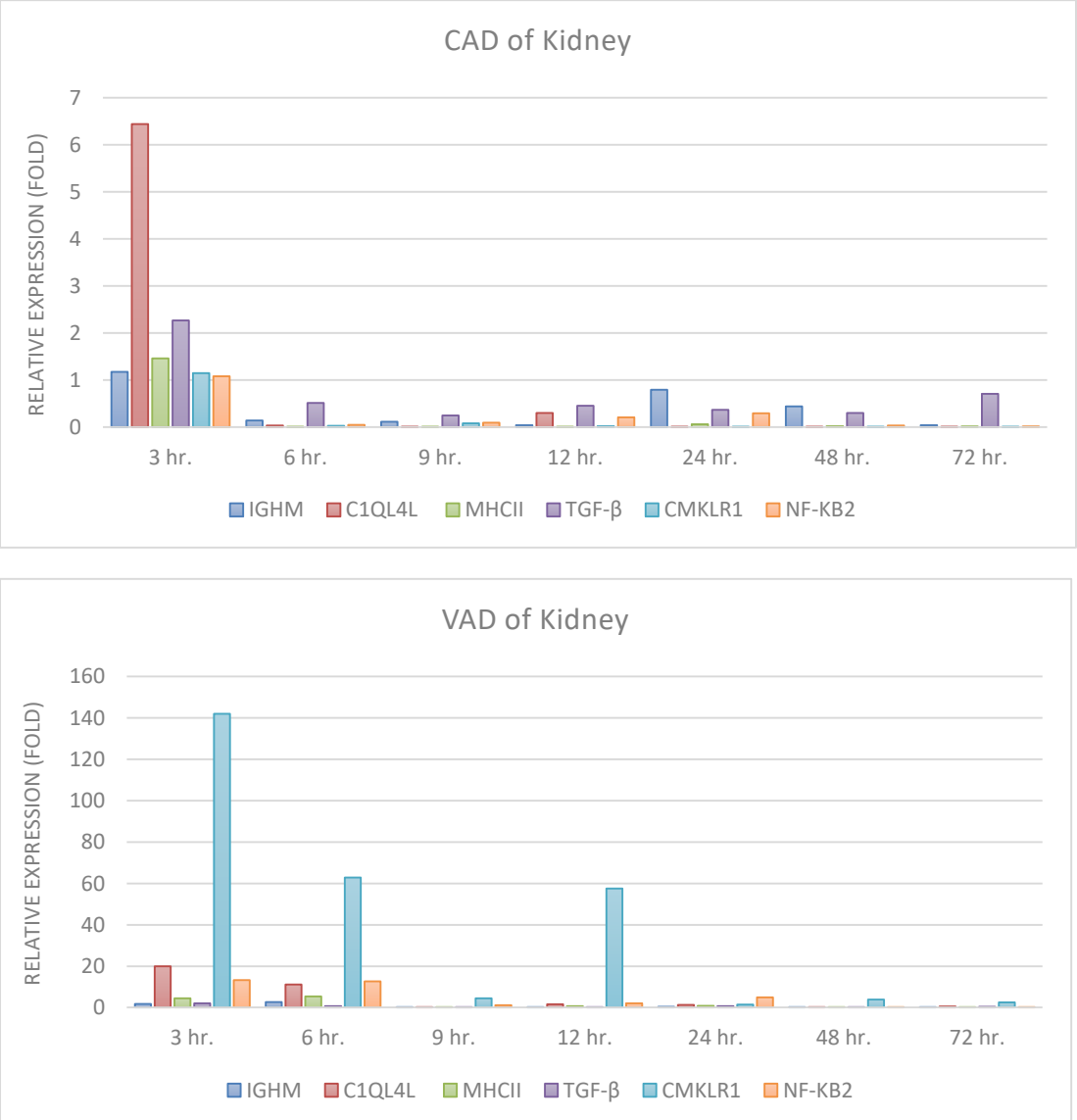
การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลองที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ พบว่ามีการแสดงออกของยีน CMKLR1 อย่างชัดเจน และเริ่มพบการแสดงออกของยีน TGF-β เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มที่ฉีดวัคซีน พบว่าที่ม้ามปลามีการแสดงออกของยีน ทั้ง 6 ยีนนี้ อย่างชัดเจน ภายหลังการฉีดเชื้อที่ 9 และ 12 ชั่วโมง โดยยีน CMKLR1 มีระดับการแสดงออกสูงสุดเช่นกัน แสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับชั่วโมง

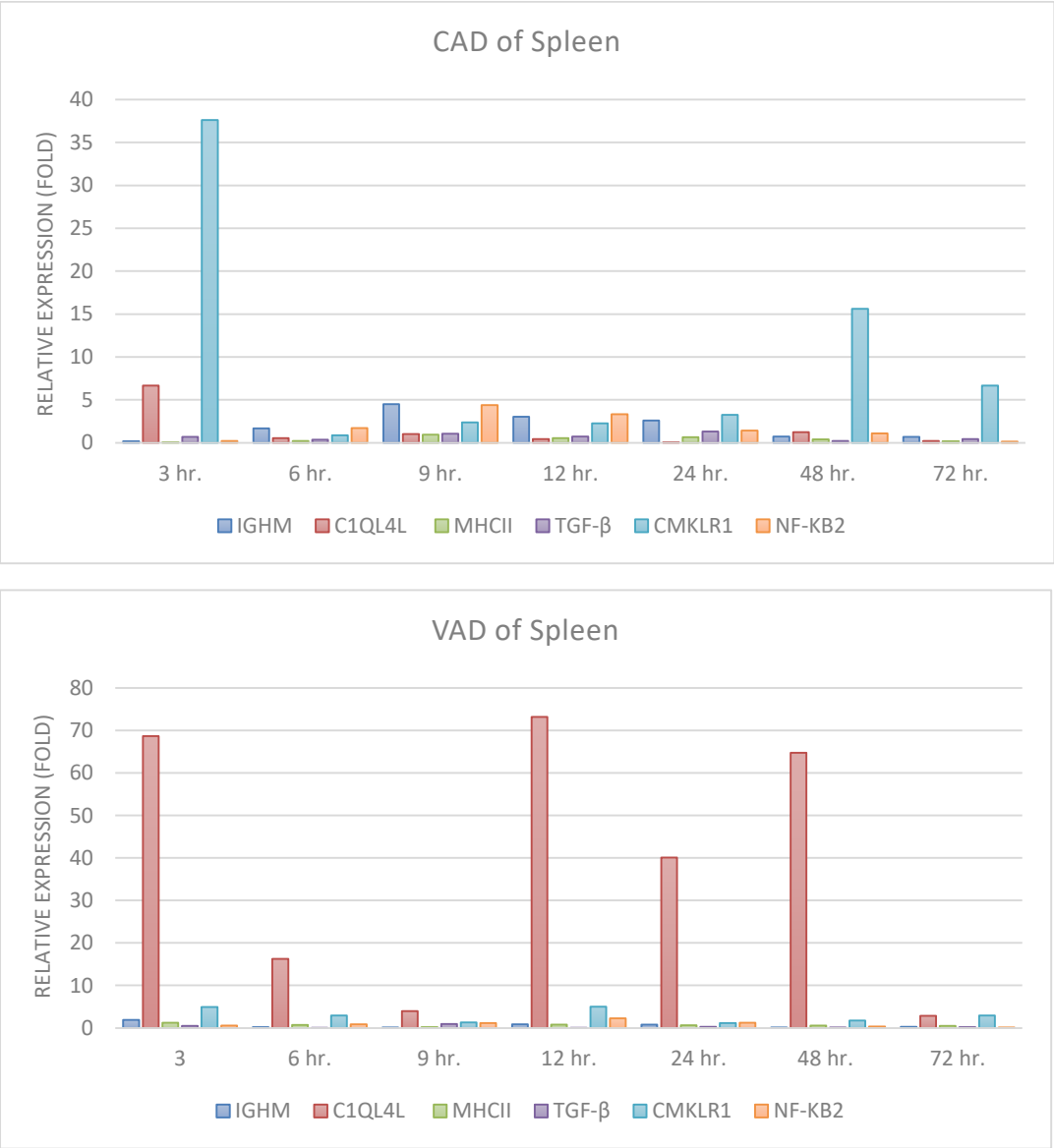
1.2 การแสดงออกของยีนในปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD)

การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าของปลาทดลองที่ฉีด CAD พบว่ามีการแสดงออกของยีน IGHM, C1QL4L, MHCII, TGF-β, CMKLR1 และ NF-KB2 ในชั่วโมงที่ 3 และลดลงเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มทดลองฉีด VAD พบว่ามีการแสดงออกของยีน IGHM, C1QL4L, MHCII, TGF-β, CMKLR1 และ NF-KB2 ภายหลังการฉีดที่ 3 และ 6 h โดยยีนCMKLR1 เป็นยีนเด่นที่มีการแสดงออกสูงสุดตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการทดลอง แสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับชั่วโมง

การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลองที่ฉีด CAD พบว่ามีการแสดงออกของยีน CMKLR1 ในระดับที่ชัดเจนตลอดช่วงเวลาที่ทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มทดลองฉีด VAD พบว่ามีการแสดงออกของยีน C1QL4L และ CMKLR1 อย่างชัดเจน โดยเฉพาะยีน C1QL4L มีการแสดงออกในระดับที่สูงมากในปลาทดลองกลุ่มนี้ แสดงดังภาพที่ 18

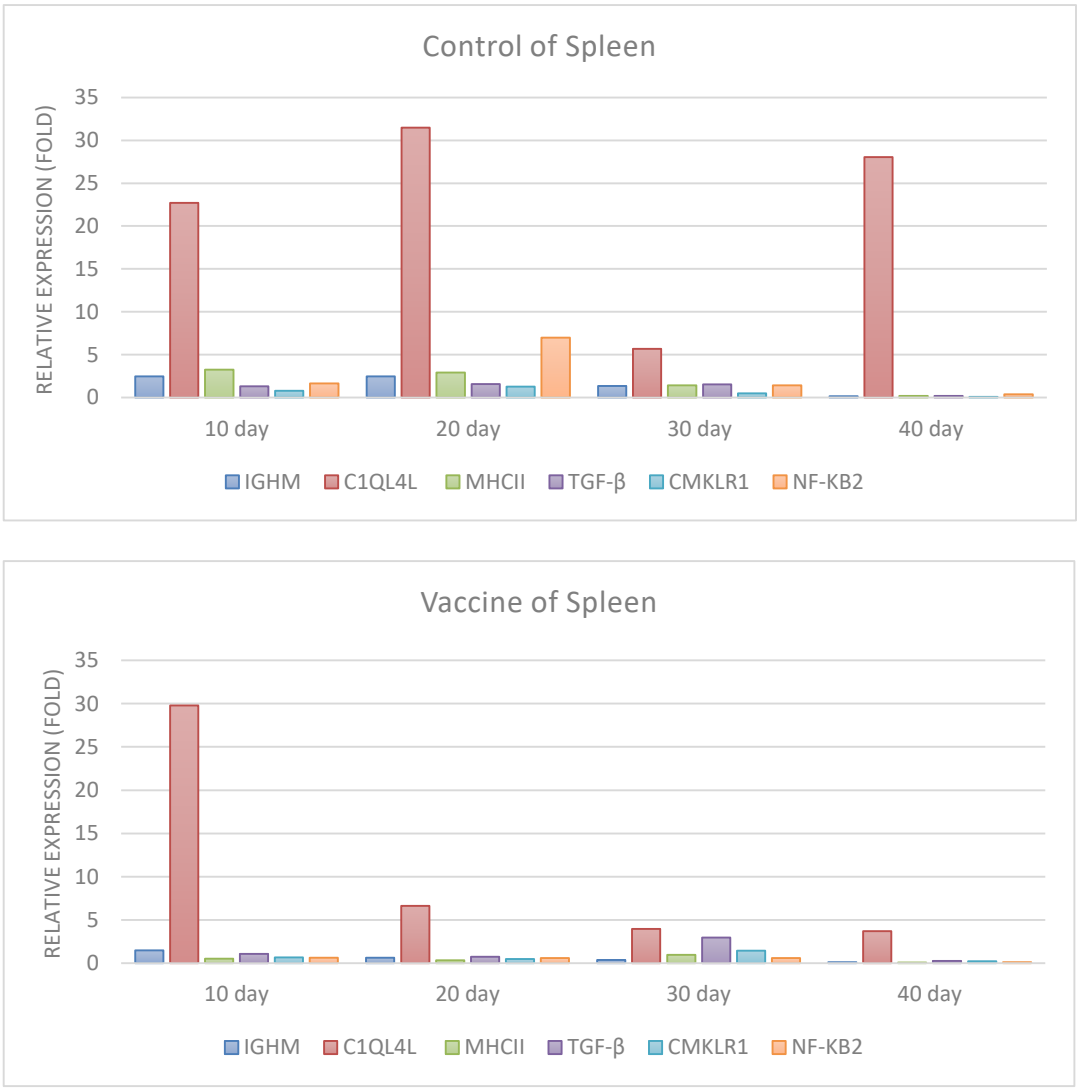


ภาพที่ 18 การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับชั่วโมง

2. การแสดงออกของยีน (Immune-related gene expression) หลังจากได้รับวัคซีนตามช่วงเวลาระดับวัน (โปรแกรมที่ 2) ติดตามการแสดงออกของยีนในระดับวัน ใน ม้าม และตับของปลาขนาด 4-5 นิ้ว **(n=10)** ได้ผลดังต่อไปนี้

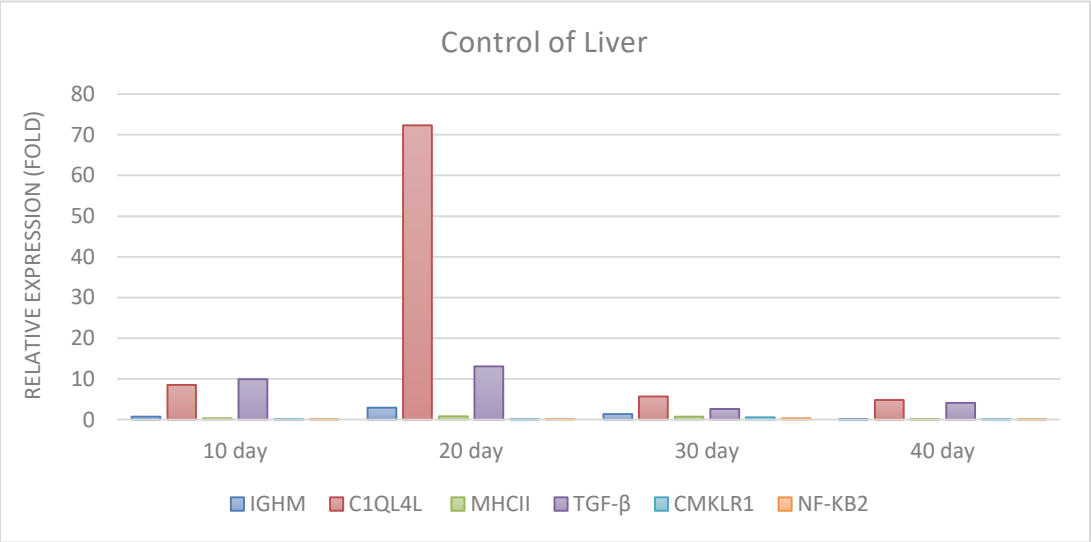
2.1 การแสดงออกของยีนในปลาที่ฉีดน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อตาย

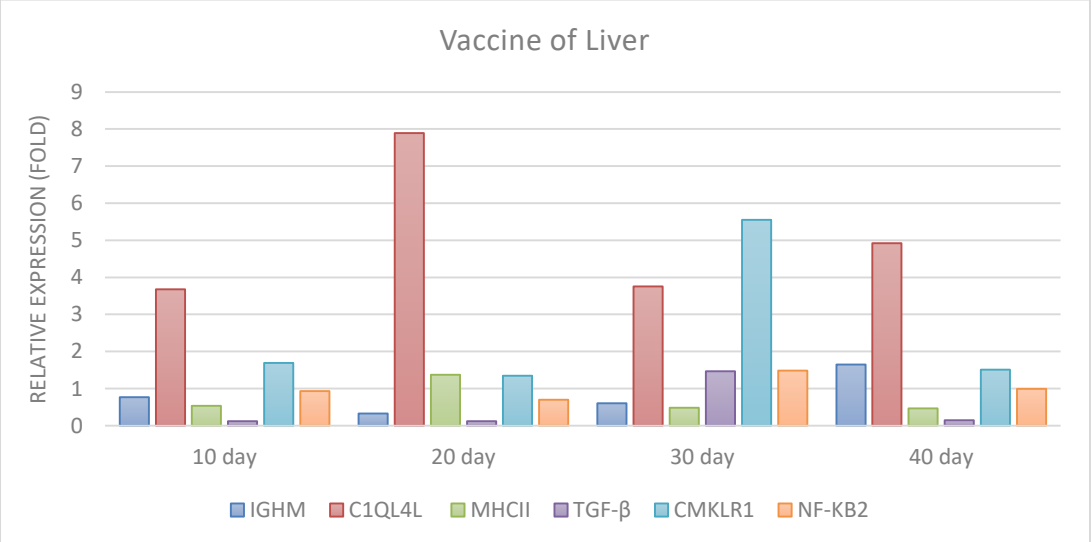
การแสดงออกของยีนในม้ามปลาทดลองที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ในระดับวัน พบว่ามีการ แสดงออกของยีน CMKLR1 ที่เด่นชัดตลอดช่วงระยะเวลาของการทดลอง รวมทั้งมีการแสดงออกของยีนนี้ในระดับสูงภายหลังการฉีดที่ 10 และ 20 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับปลาทดลองฉีดวัคซีน พบว่า ให้ผลคล้ายกัน แสดงดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับวัน

การแสดงออกของยีนในตับปลาทดลองที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ในระดับวัน พบว่ามีการ แสดงออกของยีน C1QL4L และ TGF- β ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง โดยยีน C1QL4L มีการแสดงออกในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาทดลองกลุ่มฉีดวัคซีน พบว่ามีการแสดงออกของยีน C1QL4L และ CMKLR1 ที่ชัดเจนตลอดช่วงเวลาของการทดลอง ส่วนยีน TGF-β ไม่มีการแสดงออกแสดงดังภาพที่ 20

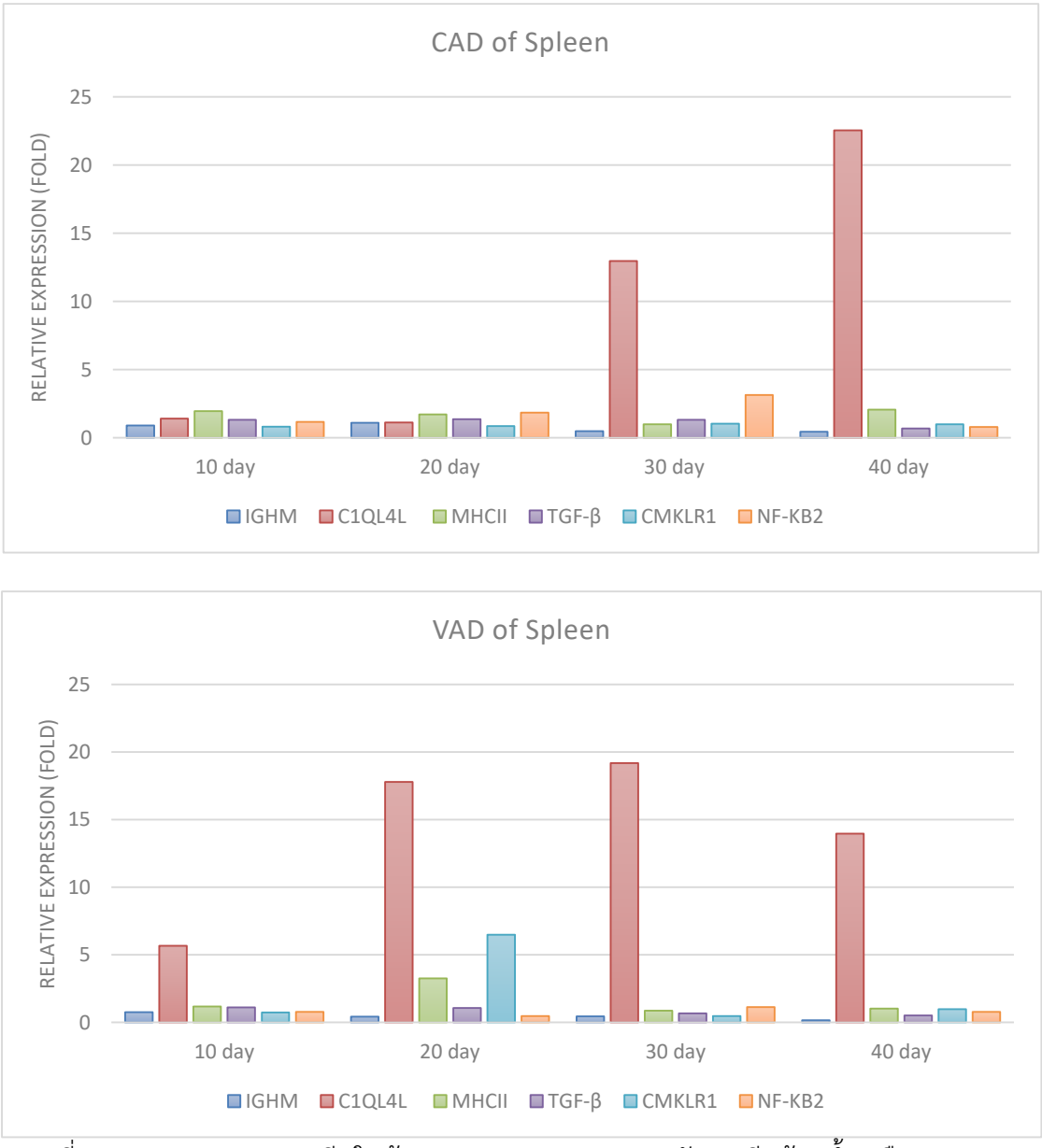




ภาพที่ 20 การแสดงออกของยีนในตับของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) และวัคซีนเชื้อตาย ในระดับวัน

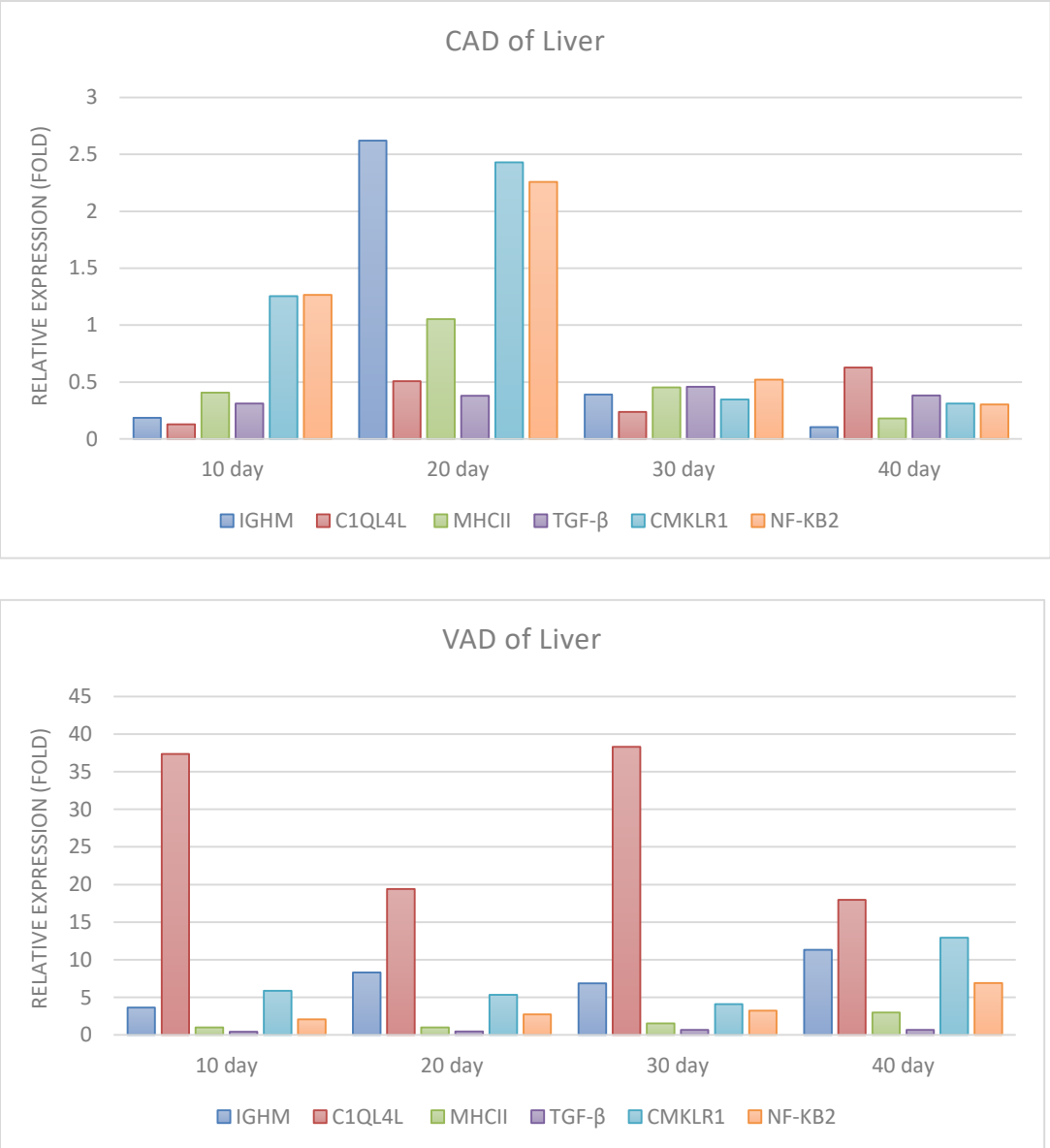
2.2 การแสดงออกของยีนในปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD)

การแสดงออกของยีนในม้ามปลาทดลองที่ฉีดด้วย CAD ในระดับวัน พบการแสดงออกของยีน C1QL4L สูงสุดที่ 30 และ 40 วันหลังการฉีด เมื่อเปรียบเทียบกับปลาทดลองที่ฉีดด้วย VAD พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน แสดงดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 การแสดงออกของยีนในม้ามของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับวัน

การแสดงออกของยีนในตับปลาทดลองที่ฉีดด้วย CAD ในระดับวัน พบการแสดงออกของยีน CMKLR1 และ NF-KB2 ใน 10 วัน และ 20 วัน มีการ up-regulated ยีน IGHM, MHCII และ CMKLR1 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่ม VAD พบว่า มีการแสดงออกของยีน IGHM, C1QL4L, MHCII, CMKLR1 และ NF-KB2, C1QL4L สูงสุดที่ 30 และ 40 วันหลังการฉีด ส่วนยีน TGF-β ไม่มีการแสดงออก แสดงดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 การแสดงออกของยีนในตับของปลาทดลอง ภายหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ + Adjuvant (CAD) และปลาที่ฉีด Vaccine + Adjuvant (VAD) ในระดับวัน

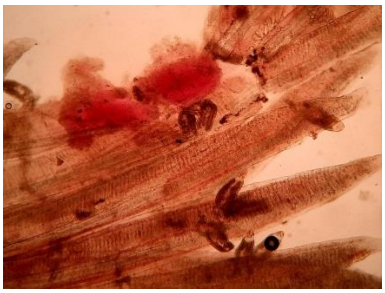
6. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์ และการประเมินประสิทธิภาพ

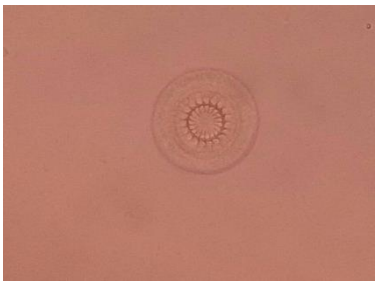
การทดลองระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์นั่น มีการวางแผนโดยจะให้วัคซีนแบบฉีด 2 ครั้ง ในปลากะพงขาว ชุดเดียวกัน จำนวน 5,000 ตัว แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองแรกฉีดวัคซีน FKC ลูกปลากะพงขาว ระยะ nursing fry จำนวน 2,500 ตัว ถือว่าเป็นวัคซีนเข็มแรกเพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันของลูกปลากะพงขาวได้รู้จักแอนติเจนของเชื้อแบคทีเรียและมีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะขึ้นมา แอนติบอดีจำเพาะนี้จะกำจัดเชื้อแบคทีเรียหากมีการติดเชื้อในภายหลัง และลูกปลากะพงขาวอีกชุด จำนวน 2,500 ตัว จัดเป็นชุดควบคุม ในระยะแรกนั้นทำการเลี้ยงลูกปลากะพงขาวในแต่ละชุดการทดลองรวมกัน เนื่องจากลูกปลากะพงขาวยังมีขนาดเล็กและกระชังเลี้ยงมีขนาดใหญ่ (ขนาด 4 x 4 เมตร ลึก 2.5 เมตร) จำเป็นจะต้องมีการฝึกลูกปลากะพงขาวให้กินเหยื่อ ซึ่งหากแยกลูกปลากะพงขาวแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 3 ซ้ำตามแผนการทดลองตั้งแต่แรก จะทำให้ลูกปลากะพงขาวหาเหยื่อหรืออาหารไม่เจอ ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตช้าทำให้เพิ่มต้นทุนอาหารและระยะเวลาในการเลี้ยงจนถึงจับขายได้นานขึ้น ซึ่งจะเป็นผลเสียต่อเกษตรกร ข้อมูลที่ได้จากเกษตรกรระยะเวลาจากลูกปลากะพงขาวระยะ nursing fry ไปจนระยะ juvenile ขนาด 5 – 6 นิ้ว ใช้เวลาประมาณ 25 – 30 วัน ได้ทำการฉีดวัคซีน FKC เข็มแรก เมื่อ วันที่ 29 มีนาคม 2561จากนั้นจึงทำการฉีดวัคซีน FKC เข็มที่สอง (22 เมษายน 2561) เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกครั้งในปลาทดลองชุดที่ได้รับวัคซีน FKC เข็มแรกที่เหลือรอดจำนวน 2,100 ตัว จะทำการคัดขนาดปลากะพงขาวออกเป็นชุดการทดลองละ 3 ซ้ำตามแผนการทดลองภายใน 7 – 10 วัน

แต่เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยระหว่างการทดลองในช่วงเดือน พฤษภาคม พ.ศ.2561 หลังจากฉีดวัคซีน FKC ในปลากะพงขาว เข็มที่สองผ่านไปประมาณ 2 อาทิตย์ ปลากะพงขาวทดลองทยอยตายวันละ 8 – 20 ตัว จึงได้วินิจฉัยโรคเบื้องต้น ผลการชันสูตรพบว่าเกิดจากการระบาดของปรสิตภายนอกพบปลิงใสจำนวนมากเกาะอยู่บริเวณซี่เหงือกปลากะพงขาว ภาพที่ 23(A) พบเห็บระฆัง ภาพที่ 23(B) และกระสวย 2 หาง (*Henneguya* sp.) ภาพที่ 23(C) ในเมือกปลากะพงขาวจำนวนมาก จึงทำการรักษาเบื้องต้นด้วยการนำปลากะพงขาวทดลองขึ้นมาแช่ฟอร์มาลิน เข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 20 นาที ก่อนปล่อยเลี้ยงตามปกติ แต่ก็ยังพบการตายอย่างต่อเนื่อง โดยอาการที่พบในปลากะพงขาวที่ตายมีตัวด่าง เกล็ดหลุด แต่ไม่พบอาการตกเลือด จึงทำการตรวจหาปรสิตภายนอกอีกครั้งโดยสุ่มปลากะพงขาวชุดการทดลองละ 3 ตัว ที่แสดงอาการว่ายลอยผิวน้ำ พบว่าบริเวณซี่เหงือกกลุ่มปลาที่ได้รับวัคซีนยังคงพบปลิงใส เห็บระฆัง และกระสวย 2 หางในระยะ Cyst อยู่พอประมาณ ส่วนปลากลุ่มควบคุมมีอาการตาแดง ตกเลือดเป็นวงบริเวณท้องและครีบหาง ภาพที่ 24 ตรวจซี่เหงือกพบปลิงใสและกระสวย 2 หาง จำนวนมากเด่นชัด สามารถตรวจวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำได้ 0.9 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าความเค็ม 12.8 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ 6.2

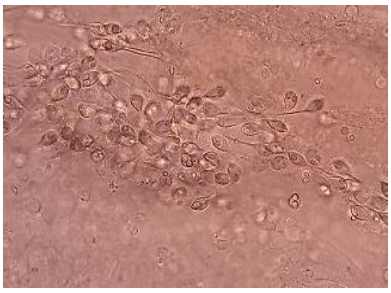
ผ่านไปประมาณ 1 เดือนหลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่สอง เหตุการณ์ฝนตกหนักติดต่อกัน ประกอบกับมีการระบายน้ำจากประตูน้ำช่วงต้นของแม่น้ำบางปะกง ทำให้สภาพแม่น้ำบางปะกงมีตะกอนขุ่นจำนวนมาก ซึ่งตะกอนเหล่านี้จะไปเกาะติดกับกระชังเลี้ยงปลาทำให้ออกซิเจนในน้ำไม่สามารถไหลผ่านกระชังปลาได้ และถ้าหากใช้เครื่องตีอากาศตะกอนก็จะฟุ้งกระจายไปทั่วกระชัง ทำให้ปลากะพงขาวมีอาการตัวดำจากความเครียด ไม่กินอาหาร พบการตายอย่างต่อเนื่องจำนวนวันละหลายร้อยตัวทั้ง 2 ชุดการทดลองและในกระชังเลี้ยงปลาของเกษตรกรละแวกเดียวกัน ภาพที่ 25 วัดค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำได้ 0.9 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าความเค็ม 1.0 ppt เกษตรกรแจ้งว่าระดับน้ำขึ้น-น้ำลง ต่างกันอย่างมากและจะดำเนินไปอีก 2-3 วัน สอบถามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลากะพงขาวละแวกใกล้เคียงกันก็ประสบปัญหาเช่นเดียวกันจึงทำให้ปลากะพงขาวทดลองและปลาเลี้ยงกระชังของชาวบ้านเสียหายเป็นจำนวนมาก จากเดิมปลากะพงขาวชุดทดลองละ 2,100 ตัว ภายหลังจากเกิดวิกฤตการณ์ปลากะพงขาววัคซีนเหลือ 298 ตัว และปลาชุดควบคุมเหลือ 214 ตัว เป็นจำนวนที่น้อยกว่าที่เกษตรกรเคยเลี้ยงไว้ ซึ่งปกติเคยลงปลากะพงขาว 5 นิ้ว 800 ตัว/กระชัง (4 x 4 เมตร) จึงไม่สามารถทำการแยกปลากะพงขาวออกเป็นซ้ำการทดลองได้ เนื่องจากเกรงว่าเวลาให้อาหารเหยื่อปลากะพงขาวจะหาเหยื่อไม่เจอ อาหารเหยื่อที่เหลือจะตกลงก้นกระชังเกิดการสะสมเน่าเสีย จึงจัดซ้ำการทดลองใหม่ภายหลังโดยสุ่มปลากะพงขาวชุดการทดลองละ 15 ตัว แยกใส่ถังน้ำถังละ 5 ตัว ซึ่งจัดเป็นซ้ำการทดลอง ขนย้ายกลับมาตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ห้องปฏิบัติการโรคและภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

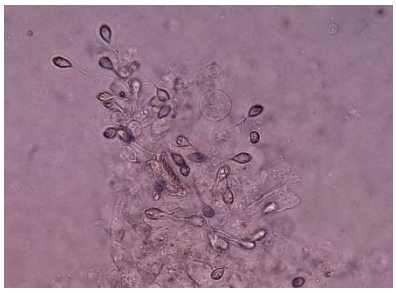
(ปลิงใสบริเวณซี่เหงือกปลากะพงขาว) (A)





(เห็บระฆังในเมือกปลากะพงขาว) (B)





(กระสวย 2 หาง (*Henneguya* sp.) ในเมือกปลากะพงขาว) (C)

ภาพที่ 23 ตรวจหาปรสิตภายนอกของปลากะพงขาว พบปลิงใสจำนวนมากเกาะอยู่บริเวณซี่เหงือก (A) และพบเห็บระฆัง (B) และกระสวย 2 หาง (*Henneguya* sp.) (C) ในเมือกปลากะพงขาวเป็นจำนวนมาก

ภาพที่ 24 ปลากะพงขาวที่ตายอย่างต่อเนื่องจากการระบาดของปรสิต อาการที่พบชัดเจน ส่วนใหญ่ปลากะพงขาวมีอาการตาแดง ตัวด่าง ตกเลือดบริเวณช่องท้อง ครีบหาง ครีบหลัง และบริเวณครีบหางกร่อน

ภาพที่ 25 ปลากะพงขาวที่ตายอย่างต่อเนื่องวันละหลายร้อยตัว เนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ฝนตกหนักติดต่อกันทำให้สภาพแม่น้ำบางปะกงมีตะกอนขุ่นไหลผ่านจำนวนมาก ซึ่งตะกอนเหล่านี้จะไปเกาะติดกับกระชังเลี้ยงปลาทำให้ออกซิเจนในน้ำไม่สามารถไหลผ่านกระชังปลาได้เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายอย่างต่อเนื่องและเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้ปลากะพงขาวเกิดความเครียดทำให้ยอมรับเชื้อก่อโรคที่อยู่ในธรรมชาติได้ง่าย

ตารางที่ 21 แสดงคุณภาพน้ำในแม่น้ำบางปะกงในระหว่างการทดลองให้วัคซีน FKC ระดับฟาร์ม ทำการวัดคุณภาพน้ำทุกครั้งที่มีการเก็บตัวอย่าง ในช่วงเดือน เมษายน - พฤษภาคม พ.ศ. 2561

จำนวนครั้ง	ค่าคุณภาพน้ำ					
	ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	% ออกซิเจนละลายน้ำ (ลิตร)	การนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมนต์/เซนติเมตร)	ความเค็ม (ppt)	อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด – ด่าง (pH)
ครั้งที่ 1	3	44	21330	11	32.4	NT
ครั้งที่ 2*	0.9	NT	NT	12.8	NT	6.2
ครั้งที่ 3	1.8	25	3416	1.6	31.6	7.65
ครั้งที่ 4*	0.9	NT	NT	1.0	NT	NT
ครั้งที่ 5	2.8	38	735	0.3	31.3	7.3
ครั้งที่ 6	3.2	43	348.7	0.2	29.9	8.24

NT คือ ไม่มีการวัดค่าคุณภาพน้ำนั้น

* ครั้งที่ 2 และ 4 เป็นการวัดคุณภาพน้ำ เนื่องจากเกิดปัญหามีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเข้ามาทำให้ปลากะพงขาวทดลองตายเป็นจำนวนมาก

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

1. การผลิตวัคซีนแบบผงและแบบเปียกชนิด Folmalin killed whole cell (FKC)

วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียก สามารถมาทำให้เป็นแบบแห้ง ด้วยเครื่องทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) โดยนำมาผ่านกระบวนการทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่องทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) โดยเตรียมเครื่องให้ได้อุณหภูมิ -50 ถึง -40 องศาเซลเซียส และมีความดันสุญญากาศ อยู่ในช่วง 80-500 มิลลิทอร์ (millitorr) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบแห้ง เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อยู่ได้นาน และไม่เสื่อมคุณภาพด้วยอากาศและความชื้น แล้วนำไปใช้งานโดยนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกหรือ แบบแห้ง อย่างใดอย่างหนึ่ง ไปละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว การนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้งไปใช้งาน ซึ่งมีวิธีการใช้เหมือนกันคือนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้งอย่างใดอย่างหนึ่ง มาทำการละลายด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาตรเท่ากับ 400 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว หรือน้ำหนักตัว 10-15 กรัม ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เพื่อให้ปลากะพงขาวป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทย ทั้งในกลุ่มที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง ความรุนแรงปานกลาง และความรุนแรงน้อยได้

2. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในสภาพทดลองแบบจำลอง โปรแกรม 1

การใช้วัคซีน FKC ในปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 – 4 นิ้ว (15 – 35 กรัม)เป็นการทดสอบเบื้องต้น เพื่อให้ทราบสร้างภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวได้รับวัคซีน FKC แบบตาย ในสภาพทดลองแบบจำลองนี้ ผู้วิจัยได้ทำการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เป็นระดับเซลล์จากสารโปรตีนแอนติบอดี และมีการทดสอบประสิทธิภาพของปลากะพงขาวได้รับวัคซีน FKC ในการต้านทานความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* VVB (Burapha) (Challenge Test) โดย ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย ภายใน 120 ชั่วโมง (n=60) จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายของปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีนรูปแบบฉีดครั้งเดียว ดีที่สุด คือชุดที่ผสมวัคซีน FKC กับสารสื่อ Adjuvant มีอัตราการรอดตาย %RPS ที่ 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ฉีด Adjuvant รองลงมาคือชุดที่วัคซีน FKC มีอัตราการ

รอดตาย %RPS ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับฉีดน้ำเกลือ ส่วนการให้วัคซีน FKC แบบแช่ มีประสิทธิภาพต่ำสุด เนื่องจากมี ตาย %RPS อัตรารอดตายที่ 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพของรูปแบบการให้วัคซีน FKC แบบฉีดให้ประสิทธิภาพดีกว่ารูปแบบแช่ จะทำการทดลอง ในโปรแกรม 2 ให้วัคซีนในปลากะพงขาวขนาดใหญ่ขึ้น juvenile 5 – 6 นิ้ว และ ในระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์

การตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Humoral immunity) ในปลากระดูกแข็ง เป็นสารโปรตีนแอนติบอดี ที่สามารถวัดได้ในค่า Antibody titer คือเป็นการตรวจวัดจำนวนแอนติบอดีที่ปลาสร้างขึ้น เป็นชนิด IgM ซึ่งจะจำ epitope ที่เจาะจงแสดงเป็นผกผันของการเจือจางที่มากที่สุด (ในการเจือจางต่อเนื่อง) และยังคงให้ผลบวก ด้วยเทคนิค ELISA เป็นวิธีการทั่วไปในการหาระดับแอนติบอดีจาดสัตว์ทดลอง ดังนั้นการตรวจสอบสารน้ำโปรตีนแอนติบอดี ในรูป ค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาว ต้องทำการเจือจางอย่างต่อเนื่อง จากน้อยไปจนเจือจางสิ้นสุดหมดประสิทธิภาพของแอนติบอดดีที่สามารถจับกับแอนติเจนและสามารถวัดได้ ให้ค่า เป็น OD (Optical density) ดังนั้นค่าที่เจือจางนั้นยังวัดได้ ให้ค่า OD ยังสูงกว่า 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ blank จะเรียกว่าค่า ไตเตอร์ (Titer) ผลการตรวจสอบสารน้ำโปรตีนแอนติบอดี สามารถการเจือจางให้ ไตเตอร์ที่ 1/40000 แต่ผลเจือจางที่ 1/30000 สามารถใช้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดทดลองได้ ซึ่งให้ผลของชุดทดลองฉีดวัคซีนและผสมสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund’s incomplete adjuvant) Inject vaccine + adjuvant ให้ค่า OD สูงที่สุด โดยสามารถคุ้มครองโรค หลังการฉีดเชื้อมีชีวิต %RPS อัตรารอดตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์และและแตกต่างมากกว่าชุดทดลอง ที่ฉีดเฉพาะวัคซีน โดยสามารถคุ้มครองโรค หลังการฉีดเชื้อมีชีวิต %RPS อัตรารอดตายที่ 70 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การแช่วัคซีนในปลากะพงขาวก็มีการตอบสนองสร้างแอนติบอดี แต่ไม่สามารถคุ้มครองโรค หลังการฉีดเชื้อมีชีวิต เข้าไปในร่างกาย โดย %RPS อัตรารอดตายที่ 12 เปอร์เซ็นต์

การพัฒนาวัคซีน FKC เชื้อตาย *V. vulnifcus* ในปลากะพงขาวระยะ nursing fry และ juvenile มีประสิทธิภาพ คุ้มครองให้ปลากะพงขาวแบบฉีดดีกว่าแบบแช่ ต่างจากการพัฒนาวัคซีน FKC เชื้อตาย V. vulnifcus ในปลาไหล (*Anguilla Anguilla* L.) รับวัคซีนแบบแช่สามารถคุ้มครองโรค หลังการฉีดเชื้อมีชีวิต %RPS อัตรารอดตายที่ 35 - 57 เปอร์เซ็นต์ แต่การฉีดวัคซีน %RPS อัตรารอดตายที่ 80 - 100 เปอร์เซ็นต์ (Esteve-Gassent, et al., 2004) โดยประเมินประสิทธิภาพที่ได้ผลใน ซีรั่ม เมือกที่ผิวหนังและลำไส้ ด้วยเทคนิค enzyme Lysozyme activity ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้ใช้การสร้างสารโปรตีนแอนติบอดี ด้วยเทคนิค ELISA

3. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในสภาพทดลองแบบจำลอง โปรแกรม 2

การใช้วัคซีน FKC ในปลากะพงขาวระยะ juvenile ขนาด 5 - 6 นิ้ว (40 – 55 กรัม)เป็นสร้าง

ภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวได้รับวัคซีน FKC แบบฉีดครั้งเดียว ของโปรแกรม 2 ในการทดลองแบบจำลองนี้ ผู้วิจัยได้ทำการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เป็นระดับเซลล์และสารน้ำโปรตีนแอนติบอดี และระดับกลุ่มยีนทางภูมิคุ้มกัน ดังนี้

3.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ระดับเซลล์และสารโปรตีนแอนติบอดี

การตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในพลาสมาปลากะพงขาว แสดงค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาวที่เจือจางมากที่สุดคือที่ 1:25,000 ในวันที่ 10 พบว่าค่า OD สูงสุดเฉลี่ยของทุกชุดทดลอง สูงกว่าวันที่ 0, 20, 30 และ 40 อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ โดยวันที่ 10 นี้ ชุดทดลองฉีดวัคซีนและผสม สารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Vaccine +Adjuvant) นี้ ให้ค่า OD สูงสุดเฉลี่ย 0.560±0.241 สูงมากกว่าชุดทดลองอื่นและชุดควบคุม อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ดังนั้นประสิทธิภาพการตอบสนองของปลากะพงขาวรับวัคซีน ชุดทดลองฉีดวัคซีนและผสม สารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Vaccine +Adjuvant) จึงดีที่สุด อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย ต่อปลากะพงขาวรับวัคซีนภายใน 120 ชั่วโมง (n=60) หลังการฉีดเชื้อมีชีวิต พบ %RPS อัตรารอดตายต่ำที่ 0 - 10 เปอร์เซ็นต์

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาวรับวัคซีน FKC แบบครั้งเดียว วัคซีนโปรแกรม 1 (ฉีดหรือแช่) กับ วัคซีนโปรแกรม 2 (ฉีด) พบว่า โปรแกรม 1 แบบฉีด ปลากะพงขาว nursing fry ขนาด 3 – 4 นิ้ว มีการตอบสนองให้สารโปรตีนสูง (1/25,000) และดีกว่า แบบแช่ และ มีประสิทธิภาพดีกว่า วัคซีนโปรแกรม 2 แบบฉีดปลากะพงขาว juvenile ขนาด 5 – 6 นิ้ว เมื่อเจือจางที่ 1/30,000 โดยผลสอดคล้องกับการทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย ต่อปลากะพงขาวรับวัคซีน ดังนั้นการประยุกต์โปรแกรมวัคซีนในปลากะพงขาว แบบฉีดครั้งเดียว คือปลากะพงขาว ขนาด 4 -5 นิ้ว (30 – 40 กรัม) ซึ่งเป็นขนาดเหมาะสม โดยเฉพาะสามารถนำไปเลี้ยงในกระชังปลาเลี้ยง ที่มีตาข่ายขนาดไม่ให้ปลารอดออกจากกระชังได้

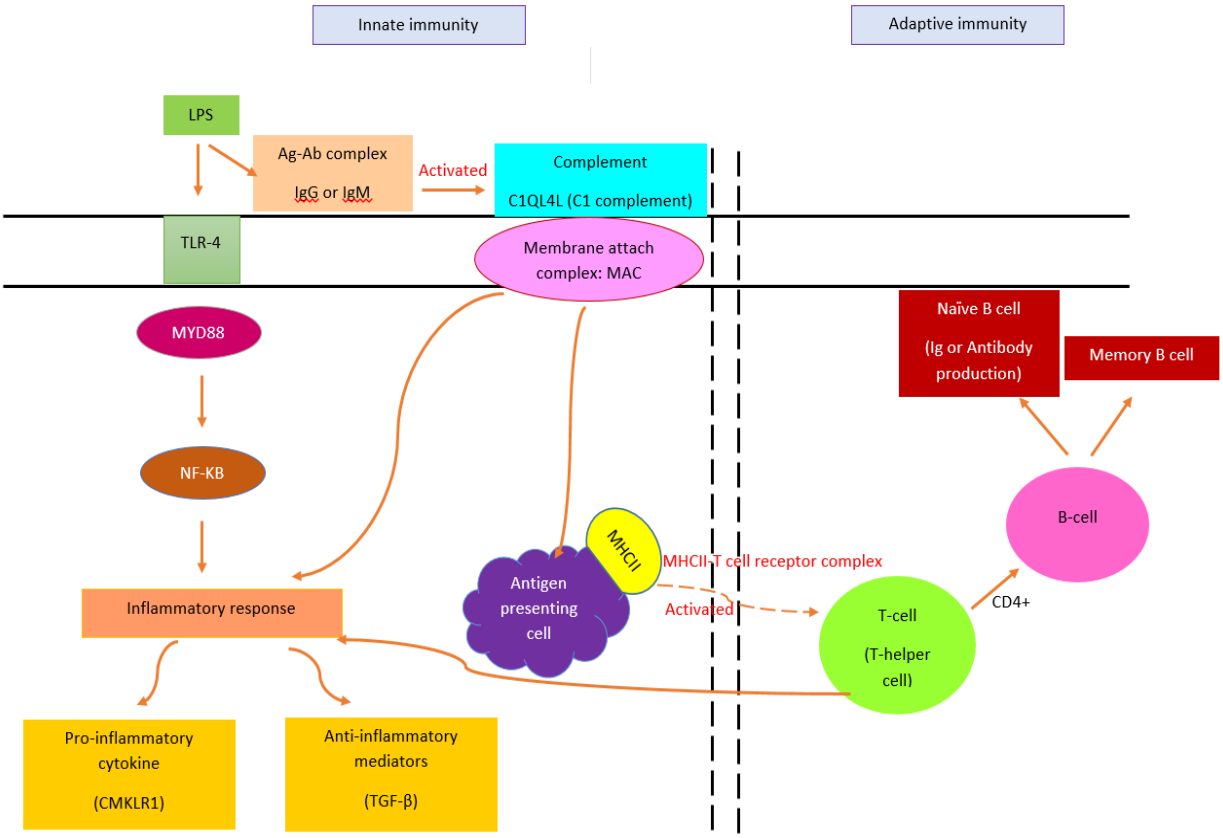
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ innate immunity ทดสอบในการทดลองในโปรแกรม 2 ที่มีความแตกต่างกัน 2 การทดสอบเท่านั้น ได้แก่ 1) การทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity and Phagocytic index) ผลการประเมิน ในวันที่ 30 และ 40 ชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant มีการตอบสนองสูงสุด ที่วัคซีนเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ตาย มีการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวในการจับกินเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ชุดการทดลอง Vaccine ค่าสูงเฉพาะวันที่ 30 เท่านั้น และการประเมิน Phagocyte index (PI) ก็ให้ผลไปในทำนองเดียวกันกับ % Phagocytic activity ส่วนทดสอบการตอบสนอง innate immunity ของปลากะพงขาวรับวัคซีน ภายใน 40 วัน 2) ชนิดเม็ดเลือดขาว Small Lymphocyte ในชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant มีค่าต่ำ ในวันที่ 10 เนื่องจากเซลล์ถูกใช้ไปในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม แต่ในวันที่ 40 ชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant มีค่าสูงกว่ากว่าชุดควบคุม แตกต่างกันแบบมีนัยยะสำคัญทางสถิติ เนื่องจากมีการเปลี่ยน Small Lymphocyte ถูกสร้างแบบ memory small Lymphocyte ออกมาในกระแสเลือดด้วยและเป็นเม็ดเลือดที่สำคัญในการสร้างสารโปรตีนแอนติบอดีสู่กระแสเลือด และสอดคล้องกับเม็ดเลือดขาว Large Lymphocyte ในชุดการทดลอง Vaccine +Adjuvant และ

Control +Adjuvant มีค่าสูงกว่า ชุดการทดลอง vaccine และชุดควบคุม Control มีความแตกต่างกันทางสถิติ ตลอดการทดลอง 40 วัน แสดงว่าสารสื่อ Adjuvant มีผลในกระตุ้นให้ ปลากะพงขาวตอบสนองต่อวัคซีน ด้วยเช่นกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ การคุ้มครองโรคจากการตอดเชื้อ *V. vulnifcus* ในปลากะพงขาว ด้วยการรับวัคซีน FKC เชื้อตาย ในระยะ juvenile ด้วยการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากสารโปรตีนแอนติบอดีจากค่า Antibody titer ในซีรั่มปลากะพงขาว ตั้งแต่ 1/25,000 เป็นต้นไป ในขณะที่ประสิทธิภาพ คุ้มครองให้ปลาวัคซีน FKC เชื้อตาย *V. vulnifcus* ในปลาไหล (*Anguilla Anguilla* L.) อยู่ที่เมือก (Esteve-Gassent, et al., 2004) โดยประเมินประสิทธิภาพที่ได้ผลเมือกที่ผิวหนังและลำไส้ คุ้มครองโรค (อัตรารอดตาย 80%) เมื่อค่า Antibody titer ในซีรั่มที่ >5,000 ซีรั่ม และสามารถให้ ค่าได้สูงสุดที่ 1/25,000 เนื่องจากสารโปรตีนแอนติบอดีที่เหงือกจากปกป้องการเพิ่มประชากรของแบคทีเรียที่เหงือก ป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต ((Esteve-Gassent, et al., 2003)

ผลตรวจสอบทุกชุดทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ได้แก่ ปริมาณจำนวนเม็ดเลือดขาวรวม เปอร์เซ็นต์ของชนิดเม็ดเลือดขาว ต่อไปนี้ Neutrophile, Monocyte และไม่พบ Eosinopile และการทดสอบ Respiratory bust activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาว ผลการประเมิน ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง ภายใน 40 วันของการทดลอง

3.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การแสดงออกของยีนในกลุ่ม Induce phase หรือ Affect (sensitization) phase มีทั้งหมด 6 ยีน ได้แก่ IGHM, C1QL4L, MHCII, CMKLR1, TGF-β และ NF-KB2 ซึ่งแบ่งหน้าที่ของยีนเหล่านี้ ออกเป็น 2 กลุ่ม คือยีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับ (receptor protein; CMKLR1) หรือตัวจับ (binding protein; IGHM, MHCII, C1QL4L) กับแอนติเจน หรืออื่น ๆ ทำให้เกิดกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง และยีนในกลุ่มที่ทำให้เกิดการอักเสบ ได้แก่ NF-KB2 และ TGF-β ลำดับการทำงานของยีนที่ทำการศึกษา แสดงดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 แสดง pathway ของยีน (immune related gene) ที่ทำการศึกษา

จากภาพที่ 26 ระบบภูมิคุ้มกันจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ ภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) และภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง (Adaptive immunity หรือ acquired immunity) การใช้วัคซีนในปลาจัดเป็นภูมิคุ้มกันแบบที่ได้มาโดยก่อให้เกิดขึ้น (Active artificially acquired immunity) โดยกระตุ้นการทำงานของลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) นำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 แบบ ได้แก่ การตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบฮิวเมอรัล (Humoral immune response, HIR) โดยจะอาศัยแอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig) และการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (Cellular immune response, CIR)

ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันเริ่มต้นได้จาก 2 กลไก กลไกแรกเป็นการกระตุ้นโดยตรง โดยแอนติเจนจะเข้าจับกับ Toll-receptor และเกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน โดยการอักเสบ ซึ่งจะมีการหลั่งไซโตไคน์ ออกมาเพื่อทำลายเชื้อต่อไป กลไกที่สองจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Ag-และ Ab (IGHM) complex) ซึ่งจะกระตุ้นให้คอมพลีเมนท์ (C1q) ในสภาพ inactive เปลี่ยนเป็น active ทำให้สภาพการจับกันแน่นมากขึ้น กระตุ้นให้ลิมโฟไซต์ทำงาน เซลล์ลิมโฟไซต์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิดสำคัญคือ B และ T cells โดย T cells แบ่งออกเป็น CD4+ และ CD8+ T cells หน้าที่ของ T cells ทั้ง 2 กลุ่มคล้ายกับในสัตว์ชั้นสูง คือ CD4+ T cells ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น และ CD8+ T cells คอยตรวจและทำลายเซลล์ที่ติด

เชื้อไวรัส การตอบสนองของ T cells อาศัยการนำเสนอแอนติเจนบนโมเลกลุเรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) ทั้ง class I และ II โดยที่ dendritic cells (macrophage cell) เป็นเซลล์สำคัญในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T cells นอกจากเซลล์ และ สารชนิดต่าง ๆ แล้วการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และการกระตุ้นกระบวนการอักเสบในปลายังถูกควบคุมผ่านไซโตไคน์หลายชนิด เช่น interleukine1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-2, IL-6, IL-18, และ type I and type II interferon (วิน สุรเชษฐพงษ์, 2561)

การใช้วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันในไตส่วนหน้า และม้ามของปลากะพงขาวในระดับชั่วโมงได้ จากการตรวจหาการแสดงออกของยีน พบว่าการแสดงออกของยีน CMKLR1 มีระดับสูงในปลาทดลองทุกกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าปลากะพงขาวมีการอักเสบภายหลังจากการฉีดสารเข้ากล้ามเนื้อ ยีนนี้เป็นโปรตีนตัวรับในกลุ่มไซโตไคน์ มีหน้าที่ตอบสนองต่อการอักเสบ เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจง และเกิดขึ้นได้เร็ว และมีระดับสูง ในช่วง 3-12 ชั่วโมงแรกการหลังการฉีด เนื่องจากเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยตรง โดยแอนติเจนเข้าจับกับ toll receptor และทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเวลาต่อมา อย่างไรก็ตามระดับของยีนนี้จะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป การฉีดวัคซีนเชื้อตายร่วมกับแอดจูแวนท์ สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงได้ดีที่สุด เนื่องจากปลาในกลุ่มทดลองนี้มีการแสดงออกของยีน IGHM, C1QL4L และ MHCII สูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าปลาทดลองกลุ่มนี้มีการจับอย่างจำเพาะของแอนติเจน และแอนติบอดี (Ag-Ab complex) ที่กระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนท์ ทำให้เกิดการจับกันกับแอนติเจนที่จำเพาะมากขึ้น นำไปสู่การกระตุ้นทำงานของ APC ร่วมกับ MHCII, T-cell และ B-cell ซึ่งสุดท้ายจะมีการผลิตแอนติบอดี และเซลล์ที่มีความจำต่อไป สอดคล้องกับ Dash et al. (2017) ที่ทำการศึกษาวัคซีนต้านเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบว่า ในระหว่าง 0 ถึง 12 ชั่วโมง มีการ up-regulated ของยีน MHCII ส่วนยีน TGF-β จะมีการ up-regulated ของปลาในกลุ่มควบคุมมากกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีน รวมทั้งสอดคล้องกับ Raida and Buchmann (2008) ที่ทำการศึกษาการแช่วัคซีนต้านแบคทีเรีย *Yersinia ruckeri* ในปลา Rainbow trout พบว่า TGF-β มีการ down-regulated ในปลาที่ได้รับวัคซีน และยีน CMKLR1 จะมีการ up-regulated ในปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมากกว่ากลุ่มควบคุม

การแสดงออกของยีน C1QL4L จะพบในม้ามมากกว่าในไตส่วนหน้า ในสภาวะปกติม้ามเป็นแหล่งสร้างเม็ดเลือดในลูกปลามีลิมโฟไซต์ และทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันปลา (Genten et al., 2008; Roberts, 2012) จากผลการทดลองนี้เป็นไปได้ว่า เมื่อมีการกระตุ้นด้วยวัคซีนเชื้อตายร่วมกับแอดจูแวนท์ คอมพลีเมนท์จะมีการสร้างขึ้นที่ม้ามมากกว่าไตส่วนหน้า

จากการติดตามการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในม้ามของปลา ทั้งในระดับชั่วโมง และในระดับวัน พบว่าปลาทั้ง 4 กลุ่มทดลองมีการแสดงออกของยีน CMKLR1 และ C1QL4L ที่ชัดเจน ที่โดยยีน CMKLR1 มีการแสดงออกในระดับ 3-72h เท่านั้น ในขณะที่ยีน C1QL4L มีการแสดงออกในระดับวัน ยกเว้นปลาชุดทดลองฉีดด้วยวัคซีนเชื้อตายร่วมกับแอดจูแวนท์ มีการแสดงออกของยีน C1QL4L ทั้งในระดับชั่วโมงและระดับวัน ซึ่ง

หน้าที่ของคอมพลีเมนท์นี้จะช่วยให้มีความจำเพาะในการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ส่งผลให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวัคซีนเชื้อตายผสมแอดจูแวนท์ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลากะพงขาว Xia and Yue (2010) รายงานไว้ว่า ยีน CMKLR1 มีการ up-regulated ที่บริเวณตับ ไต และม้าม ในปลากะพงขาวที่ฉีด lipopolysaccharide ของแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น

การแสดงออกของยีนในตับปลาในระดับวัน พบการแสดงออกของยีน IGHM, MHCII, C1QL4L, CMKLR1 และ NF-KB2 โดยจะพบมากในช่วง 20, 30 และ 40 วันภายหลังการฉีดวัคซีนเชื้อตายร่วมกับสารสื่อแอดจูแวนท์ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวัคซีนนี้ ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ในตับและม้ามปลากะพงขาว พบว่ายีนเหล่านี้มีการแสดงออกในตับสูงกว่าม้ามอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับ Huttenhuis et al. (2006) ที่รายงานว่าบริเวณตับของปลาทำหน้าที่ผลิตสารน้ำที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน โปรตีนเฉียบพลัน (acute phase proteins) ซีรั่มโปรตีน และส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบคอมพลีเม้นท์ (complement proteins)

จากการทดลองนี้มีการพบการแสดงออกของยีนปริมาณที่สูง ในบางช่วงเวลา ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยคุณภาพน้ำที่เลี้ยง ความเครียดจากการฉีด ที่ส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน และปลาในบางชุดทดลองมีการป่วย-ตายในระหว่างการทดลอง ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของยีนด้วยเช่นกัน การศึกษาภูมิคุ้มกันควรระมัดระวังผลกระทบในข้างต้นในระหว่างการทดลอง การใช้วัคซีนในปลา เป็นการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งยังช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และลดผลจากการดื้อยาของเชื้อในสิ่งแวดล้อมด้วย การใช้วัคซีนในปลาจึงเป็นหัวข้อที่น่าสนใจ และควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีน วิธีการใช้ รวมทั้งระยะเวลาการใช้ และวิธีการ boot วัคซีนในปลา

4. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน FKC ในฟาร์มเชิงพานิชย์ในสภาพการเลี้ยงแบบกระชัง ในแม่น้ำบางปะกง

การใช้วัคซีน FKC ในปลากะพงขาวระยะ nursing fry ขนาด 3 – 4 นิ้ว เลี้ยงในกระชัง ระยะ 1 เดือน เมื่อปลากะพงขาวระยะ juvenile ทำการฉีดวัคซีน FKC ครั้งที่ 2 ผลการประเมินทางภูมิคุ้มกัน และน้ำหนักรายเดือน ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากเกิดการตายของปลาทดลองเกือบทั้งหมด เนื่องจากเกิดปัญหาคุณภาพน้ำเสีย ในแม่น้ำบางปะกง ค่าอ๊อกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 2 ppm ทำให้ปลากะพงขาวทดลองขาดอ๊อกซิเจน มีอาการป่วย อ่อนแอ ปรสิต จำพวกปลิงใส เห็บระฆังและกระสวยสองหาง จึงทะยอยตายภายในเดือนที่ 2 ของการทดลอง ทำให้ไม่สามารถประเมินทางภูมิคุ้มกัน และน้ำหนักรายเดือน ตลอดการทดลองที่คาดไว้ประมาณ 4 เดือน จนจับขาย

สรุปการศึกษา

1. การผลิตวัคซีนแบบผงแห้งและแบบเปียกชนิด Folmalin killed whole cell (FKC)

สามารถนำไปใช้งานฉีดในลูกปลากะพงขาวได้ แต่แบบผงแห้งมีความสะดวกในภาคสนามและบรรจุภัณฑ์

2. การฉีดวัคซีนเชื้อตายร่วมกับสารสื่อแอดจูแวนท์เข้าสู่กล้ามเนื้อปลากะพงขาว ส่งเสริมให้เกิดการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ให้ผลการกระตุ้นการแสดงออกในระบบภูมิคุ้มกัน humoral immunity ได้ดีที่สุด โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Ag-Ab complex) ค่า antibody titer เจือจางที่ 1/30,000 จากการที่ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภท small and large lymphocyte เพิ่มขึ้นใน 40 วัน และกระตุ้นการแสดงออกในระบบภูมิคุ้มกัน innate immunity ของขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว

3. การฉีดวัคซีนเชื้อตายร่วมกับแอดจูแวนท์เข้าสู่กล้ามเนื้อปลากะพงขาว เหมาะสมกับลูกปลากะพงขาวขนาด 4 – 5 นิ้ว น้ำหนัก 30 – 40 กรัม

4. การฉีดวัคซีนเชื้อตายร่วมกับแอดจูแวนท์เข้าสู่กล้ามเนื้อปลากะพงขาว ให้ผลการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับ (receptor protein) คือ CMKLR1 เพื่อให้ขบวนการอักเสบเกิดขึ้นในระบบภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด

5. การแสดงออกของยีนที่ศึกษานี้ มีการแสดงออกในอวัยวะ ตับ ไต และม้าม โดยการแสดงออกของยีนการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ตัวจับกับแอนติเจน (binding protein) คือ IGHM, C1QL4L และ MHCII จะแสดงออกอย่างชัดเจนภายหลังการฉีดเชื้อที่ระดับวัน ในช่วง 20-30 วัน

6. ยังไม่สามารถได้ผลการทดลองวัคซีนเชื้อตาย FKC ของปลากะพงขาวในระดับฟาร์ม

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.

รัชนี อัตถิ. บทบาทของวัคซีนสัตว์ต่อการปศุสัตว์ในประเทศไทย. รายงานประจำปี 2546 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 49-55

รับพร กิตติวัชร. (2556). เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิน สุรเชษฐพงษ์. (2561). วิทยาภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำและการประยุกต์ใช้ (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เอเชีย ดิจิตอลการพิมพ์ จำกัด.

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

Azeredo, R., Perez-Sanchez, J., Sitja-Bobadilla, A., Fouz, B., Tort, L., Aragao, C., Oliva-Teles, A. and Costas, B. (2015). European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Immune Status and

Disease Resistance Are Impaired by Arginine Dietary Supplementation. *PLoS ONE*, 10(*10*). 110-118.

Kanchanopas-Barnette, P., 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.

Dan, X. M., Zhang, T. W., Li, Y. W. and Li, A. X. (2013). Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 885-891.

Dash, P., Yadav, S. K., Garg, L. C., Dixit, A. and Sahoo, P. K. (2017). Post-challenge immune gene expression profiling in rohu, *Labeo rohita* vaccinated with modified adjuvant-based *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein R formulation. *VERERINARSKI ARHIV*, 87(*5*), 607622.

Esteve-Gassent, M.D., Fouz, B. and Amaro, C. 2004. Efficacy of a bivalent vaccine against eel Diseses caused by Vibrio vulnificus after its administration by four different routes. Fish & Shellfish immunology. 16: 93 – 105.

Esteve-Gassent, M.D., Fouz, B. and Amaro, C. 2003. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla Anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus* : development of a new method for antibody quantification in skin mucus. Fish & Shellfish immunology. 15:51 - 61.

Faliex, E., Silva, C. D., Simon, G. and Sasal, P. (2008). Dynamic expression of immune response genes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, experimentally infected with the monogenean *Diplectanum aequans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24, 759-767.

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.

Genten, F., Terwinghe, E. and Danguy, A. (2008). Atlas of Fish Histology. Florida: CRC Press.

Huttenhuis, H. B., Grou, C.P., Taverne-Thiele, A. J., Taverne, N. and Rombout, J. H. (2006). Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present beforehatching. Fish Shellfish Immun. 20 (4). 586-596.

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.

Jiang, J., Miyata, M., Chan, C., Ngoh, S. Y., Liew, W. C., Saju, J. M., Ng, K. S., Wong, F. S., Lee, Y. S., Chang, S. F. and Orban, L. (2014). Differential Transcriptomic in the Spleen and Head Kidney Following Vaccination and Infection of Asian Seabass with *Streptococcus iniae*. *PLoS ONE*, 9(*7*). 120-131.

Kenneth, J. L., Thomas, D.S. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. Methods, *25*. 402-408.

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.

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)

Raida, M. K. and Buchmann, K. (2008). Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26(*8*), 1050-1062.

Roberts, J. R. (2012). Fish Pathology. (4th ed.). New Jersey: Wiley-Blackwell.

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).

Sasmita, R, Praparsiri Kanchanopas-Barnette 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.

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.

Xia, J. H. and Yue, G. H. (2010). Identificatioon and analysis of immune-related transcriptome in Asian seabass *Lates calcarifer*. *BMC Genomics*, 11(*356*). 142-159.

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 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ปริมาณแบคทีเรียมีชีวิต ของวัคซีน FKC ที่ผลิตได้ในรูปแบบเปียก และน้ำหนักแห้งหลังผ่านกระบวนการทำเป็นผงด้วยเครื่อง Freeze dry

วัคซีน FKC ที่ผลิตได้ในรูปแบบเปียก

หลอดที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร	ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (x 10^9 CFU/มิลลิลิตร)
1	0.81	1.78
2	0.73	1.61
3	0.75	1.64
4	0.72	1.57
5	0.95	2.09
6	1.02	2.24
7	1.06	2.32
8	0.97	2.13
9	0.79	1.72
10	0.81	1.78
11	0.78	1.71
12	0.80	1.74
13	0.87	1.91
14	1.04	2.27
15	0.99	2.17
16	1.08	2.38
17	0.64	1.40
18	0.45	0.98
19	0.72	1.57
20	0.68	1.49
21	0.81	1.77
22	0.83	1.81
23	0.83	1.81
24	0.80	1.76
25	0.73	1.60
26	0.77	1.68
27	0.84	1.84
28	0.72	1.57
29	0.68	1.49
30	0.33	0.72
31	1.00	2.20

32	0.32	0.69
33	0.66	1.44
34	0.98	2.14
35	1.20	2.64
36	1.03	2.27
37	0.51	1.12
38	0.55	1.20
39	0.51	1.12
40	0.35	0.76
41	0.43	0.94
42	0.60	1.32
43	0.71	1.55
44	0.76	1.66
45	0.94	2.06

***** ค่า O.D. เฉลี่ยเท่ากับ 0.77 ± 0.21 มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเฉลี่ย 1.68 x 10^9 ± 0.53 CFU/มิลลิลิตร

วัคซีน FKC ที่ผลิตได้ในรูปแบบผง

หลอดที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร	ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (x 10^9 CFU/มิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
1	0.70	1.52	0.16
2	0.73	1.60	0.17
3	0.78	1.71	0.17
4	0.77	1.69	0.17
5	0.76	1.67	0.17
6	0.81	1.77	0.17
7	0.69	1.50	0.21
8	0.66	1.44	0.21
9	0.73	1.60	0.21
10	0.77	1.68	0.21
11	0.47	1.02	0.15
12	0.55	1.20	0.15
13	0.59	1.29	0.15
14	0.62	1.35	0.15

15	0.69	1.51	0.31
16	0.71	1.55	0.31
17	0.67	1.47	0.43
18	0.67	1.46	0.43
19	0.78	1.72	0.47
20	0.80	1.74	0.47
21	0.73	1.60	0.21
22	0.75	1.64	0.21
23	0.62	1.36	0.23
24	0.61	1.35	0.23
25	0.58	1.27	0.32
26	0.59	1.28	0.32
27	0.74	1.63	0.37
28	0.81	1.77	0.37
29	0.69	1.50	0.28
30	0.72	1.58	0.28
31	0.72	1.58	0.25
32	0.71	1.55	0.25
33	0.73	1.59	0.35
34	0.72	1.59	0.35

*สามารถผลิตวัคซีน FKC แบบผงมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.26 ± 0.21 กรัม มีค่า O.D. เฉลี่ยเท่ากับ 0.695 ± 0.079 ซึ่งมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเฉลี่ย $1.52 \times 10^{9} \pm 0.17$ CFU/มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตในรูปของน้ำหนัก ขนาดความกว้าง ยาว ของปลากะพงขาว โปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีน FKC รูปแบบฉีดและแบบแช่

ชุดการทดลอง	ตัวที่	อัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวในรูปความกว้าง (เซนติเมตร) ตั้งแต่วันที่ 0 - 35			
		วันที่ 0	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 35
PBS R1	1	2.5	2.5	3.2	3.7
	2	2.1	2.3	2.8	3.4
	3	2.3	2	2.8	2.9
PBS R2	1	2	2.5	2.8	4
	2	2.2	2.3	2.4	3.4
	3	1.9	2.1	2.3	3.6
PBS R3	1	2.2	2.8	3.2	4
	2	2.1	2.3	2.6	3.7
	3	2.1	1.8	2	3.5
PBS+Adjuvant R1	1	2.2	2.5	3	3.7
	2	2.5	2.3	2.8	3.7
	3	1.8	2.3	2.6	3.5
PBS+Adjuvant R2	1	2.7	2.5	3.2	3.8
	2	2.1	2.3	3	3.4
	3	1.9	2	2.5	3.7
PBS+Adjuvant R3	1	2	2.5	3	3.7
	2	2.2	2.2	2.8	3.6
	3	2	2.2	2.5	3.6
Vaccine R1	1	1.9	2.6	3.2	3.8
	2	2.1	2.5	3	3.4
	3	1.9	2.2	2.8	3.8
Vaccine R2	1	2.2	2.5	3	3.7
	2	2.2	2.4	2.8	3.7
	3	2.4	2.5	2.7	3.8
Vaccine R3	1	2	2.5	3.4	3.8
	2	2	2.2	2.7	3.8
	3	2	2	2.5	3.5
Vaccine+Adjuvant R1	1	1.8	2.5	3	4.4
	2	2.4	2	2.7	4
	3	2.3	1.8	2.7	3.8
Vaccine+Adjuvant R2	1	2.3	2.7	3.7	3.7
	2	2	1.8	3.3	3.3
	3	2.5	2	2.6	3.4
Vaccine+Adjuvant R3	1	2.2	2.4	3.4	3.7

	2	2	2.5	2.9	3.4
	3	2	2.4	2.5	3.4

ปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีนแบบฉีด (วันที่ 20 – 35)

ชุดการทดลอง	ตัวที่	20 วัน			35 วัน		
		กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)
PBS R1	1	3.2	11.5	20	3.7	13.7	40
	2	2.8	10	12	3.4	14	40
	3	2.8	10	11	2.9	13.8	40
PBS R2	1	2.8	10.1	18	4	14.8	40
	2	2.4	10	12	3.4	12	30
	3	2.3	10	10	3.6	14	30
PBS R3	1	3.2	11.5	19	4	12.3	30
	2	2.6	9.5	11	3.7	13.5	40
	3	2	8.4	9	3.5	13.7	40
PBS+Adjuvant R1	1	3	11	20	3.7	13	30
	2	2.8	10.8	18	3.7	12.7	40
	3	2.6	10.2	17	3.5	13.4	40
PBS+Adjuvant R2	1	3.2	10.6	19	3.8	12.6	40
	2	3	9.5	18	3.4	13	30
	3	2.5	9.6	12	3.7	13.4	40
PBS+Adjuvant R3	1	3	11.1	20	3.7	14.7	30
	2	2.8	10	10	3.6	13.5	40
	3	2.5	9.2	8	3.6	14.5	40
Vaccine R1	1	3.2	12	13	3.8	13	40
	2	3	10.9	12	3.4	12.8	30
	3	2.8	10.7	11	3.8	13.3	40
Vaccine R2	1	3	10.9	13	3.7	14.4	30
	2	2.8	10.5	12	3.7	14.3	30
	3	2.7	9.6	11	3.8	13	30
Vaccine R3	1	3.4	12.1	19	3.8	14.7	40
	2	2.7	9.3	12	3.8	14.4	40
	3	2.5	10.2	12	3.5	13	30
Vaccine+Adjuvant R1	1	3	10.8	19	4.4	13	40
	2	2.7	9.2	12	4	12.3	40

	3	2.7	9.2	12	3.8	13	30
Vaccine+Adjuvant R2	1	3.7	11.5	22	3.7	13	30
	2	3.3	10.8	20	3.3	12.3	20
	3	2.6	9.6	10	3.4	13	30
Vaccine+Adjuvant R3	1	3.4	10.7	19	3.7	13.5	30
	2	2.9	10.1	12	3.4	12.5	20
	3	2.5	8.6	10	3.4	12	20

ปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีนแบบแช่ (วันที่ 35)

ชุดการทดลอง	ตัวที่	0 วัน			35 วัน		
		กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)
PBS R1	1	-	-	-	4.3	14.5	40
	2	-	-	-	3.8	14.3	40
	3	-	-	-	4.2	14.7	50
PBS R2	1	-	-	-	4.2	14.3	40
	2	-	-	-	4	14.5	40
	3	-	-	-	4	14.5	40
PBS R3	1	-	-	-	3.4	13.9	30
	2	-	-	-	4	14	40
	3	-	-	-	4	14.3	40
PBS R1	1	-	-	-	4.1	15.7	40
	2	-	-	-	3.3	14.3	40
	3	-	-	-	4	15.5	50
PBS R2	1	-	-	-	3.4	13	30
	2	-	-	-	3.8	14	40
	3	-	-	-	3.4	12.4	30
PBS R3	1	-	-	-	3.8	14	40
	2	-	-	-	3.5	13.3	30
	3	-	-	-	4.3	15.5	50

* ตัวอย่างปลากะพงขาวโปรแกรม 1 ที่ได้รับวัคซีนแบบแช่ เนื่องจากไม่มีการสุ่มเก็บตัวอย่างมาตรวจผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นรายสัปดาห์ จึงไม่มีข้อมูลตัวอย่างปลากะพงขาวก่อนการทดลอง (0วัน)

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตในรูปของน้ำหนัก ขนาดความกว้าง ยาว ของปลากะพงขาวโปรแกรม 2 ที่ได้รับวัคซีน FKC รูปแบบฉีด

ปลากะพงขาวโปรแกรม 2 ที่ได้รับวัคซีนแบบฉีด (วันที่ 0 – 10)

ชุดการทดลอง	ตัวที่	0 วัน			10 วัน		
		กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)
PBS R1	1	2.5	10.6	10	3	11.6	20
	2	2.6	9.7	9	3.2	12.2	30
	3	2.5	10	10	3.3	11.4	25
	4	2.5	10	10	3.2	11.5	25
	5	2.5	10.5	10	3.5	11.4	30
PBS R2	1	2.4	10	9	3.5	12.3	20
	2	2.4	9.6	5	2.7	11.7	30
	3	2.4	9.7	9	3.5	11.9	35
	4	2.3	8.9	8	3.4	11.5	20
	5	2.4	9.8	9	3.4	11.5	30
PBS R3	1	2.6	10.1	12	3.3	12.2	30
	2	2.5	10.5	10	3	11.3	25
	3	2.5	10	10	3.3	12	30
	4	2.4	10	9	3.3	11.6	20
	5	2.4	9	8	3	10.5	15
PBS+Adjuvant R1	1	2.3	10.5	20	3	11.3	20
	2	2.7	10.4	10	3	11	20
	3	2.5	10.1	10	3	11.2	23
	4	2.6	9.9	10	3.1	12	23
	5	2.6	10.4	11	3	11.1	20
PBS+Adjuvant R2	1	2.5	10	11	3	10.5	19
	2	2.5	10.2	15	3.2	11.5	20
	3	2.8	11.1	19	2.5	10.5	15
	4	3	11.5	20	2.9	11.4	19
	5	2.5	9.5	10	2.8	11	18
PBS+Adjuvant R3	1	2.6	10.2	15	3.2	11.6	19
	2	2.9	11	12	2.9	10.6	15
	3	2.9	10.5	15	2.8	10.8	10

	4	2.2	11.3	13	3.2	11.3	15
	5	2.8	10	10	3.5	11	15
Vaccine R1	1	2.8	11	10	3.5	12.3	20
	2	2.9	11	10	3.2	11.3	20
	3	2.5	10.5	10	3.2	10.5	20
	4	2.7	12	20	3.2	11.7	25
	5	2.8	11.2	10	3.4	11.7	25
Vaccine R2	1	3	11.5	10	3.5	12.8	30
	2	2.6	11	9	3.2	12	20
	3	2.5	10.5	8	2.8	11.7	25
	4	2.5	10	8	2.8	11.7	25
	5	2.4	10	5	3.8	12.3	30
Vaccine R3	1	2.6	10.5	10	3.4	11.7	30
	2	2.4	9.5	5	3.5	11.9	25
	3	2.4	10	9	3	11	20
	4	2.4	9.5	8	3.3	11.7	25
	5	2.5	9.7	10	3.2	10.3	20
Vaccine+Adjuvant R1	1	2.6	11	11	3.1	10.5	10
	2	2.5	10.7	10	3.5	12.6	20
	3	3	11.6	19	3	12	20
	4	3	11.5	19	3	11.2	15
	5	2.7	10.5	11	3.5	11.5	20
Vaccine+Adjuvant R2	1	2.2	11	10	3	11.5	15
	2	3	11	10	3.2	11.2	19
	3	2.8	11	10	3.2	12.2	16
	4	2.9	10.5	9	3	11	15
	5	2.8	11.7	12	2.8	11	10
Vaccine+Adjuvant R3	1	2.7	10.9	10	3.2	11.6	20
	2	2.5	10.1	9	2.5	11	10
	3	2.5	10	10	3	10.5	15
	4	2.5	10	10	2.9	11	15
	5	2.6	10.2	11	2.9	10.5	15

ปลากะพงขาวโปรแกรม 2 ที่ได้รับวัคซีนแบบฉีด (วันที่ 20 – 40)

ชุดการทดลอง	ตัวที่	20 วัน			30 วัน			40 วัน		
		กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)
PBS R1	1	3.5	12.7	22	4	14	30	4.6	15.5	50
	2	3	11.2	15	3.3	11.8	20	4	15	40
	3	3.5	13	22	4	14	45	3.7	14	30
	4	3.4	12	20	4.3	14.6	50	4	13.7	40
	5	3.3	11.5	15	4	13.4	30	4.2	14.5	40
PBS R2	1	3.2	12	19	3.8	13.6	30	4.5	15	50
	2	3.6	13	20	3.7	13.8	30	4	15	40
	3	3.4	13.1	24	4	14.5	30	4.4	16	50
	4	3.4	12.5	19	3.5	13	20	4	14.5	40
	5	3.5	13	19	3.5	11.5	20	4	15.6	50
PBS R3	1	3.5	13.5	22	3.5	13.2	25	4	15.5	40
	2	3	12.5	20	3.5	12.8	20	4	15.5	45
	3	3.2	12.5	20	3	14.2	30	4	15	40
	4	3.3	12	20	3.4	12.6	30	4	14	35
	5	3.4	12	20	3.9	14.6	30	4	14.3	40
PBS + Adjuvant R1	1	3.2	11.8	20	4.1	14	20	4.7	16.3	60
	2	3.7	13.5	30	4	14.5	25	4	15	40
	3	3.7	13.9	20	3.5	13.5	22	4.5	16.5	55
	4	3.3	12.4	20	3.9	13.5	22	4	15	40
	5	3.6	13.3	30	3.5	13.5	20	4.5	16.5	60
PBS + Adjuvant R2	1	3.4	13.8	30	4.6	14.6	30	3.9	14	30
	2	3.7	13.5	22	4	14.5	35	4	16.5	50
	3	2.8	11.9	18	4	14.6	40	4	14	30
	4	3.4	13.2	21	3.5	13.5	30	4	14.5	30
	5	3.1	11.8	19	3.1	13.2	20	4	15.5	30
PBS + Adjuvant R3	1	2.9	11.4	19	3.5	13.2	30	4	15.5	40
	2	3.1	11.8	18	3.5	13.3	30	3.9	15	30
	3	2.9	11.5	15	3.4	12.5	30	4	15.3	30
	4	2.9	11.3	15	3	12.3	20	4.4	15	40
	5	2.8	10.7	19	3.4	12.4	20	3.7	14	30
	1	3.3	13	20	4.2	14.7	30	4.3	15	40

Vaccine R1	2	3.5	13.5	30	3.7	13.5	30	4.5	15.6	50
	3	3	11.9	19	3.7	14.2	30	4	15	40
	4	3.4	12.3	20	4.2	15.2	45	4.5	16	50
	5	3.6	13	22	3.5	13.5	35	4	15.5	40
Vaccine R2	1	3	11.6	18	4	16.5	50	4.2	15.5	35
	2	2.9	10.9	10	3.5	13.5	25	4.7	17	50
	3	3	12	20	4.2	14	30	4.7	16.5	40
	4	3.5	12.5	20	4	13.5	25	4.5	14.5	40
	5	2.9	11.3	19	3.8	14	30	3	14	30
Vaccine R3	1	3	11.5	18	3.4	13.5	25	4.2	15	40
	2	3	12	20	3.8	13.8	30	4	15	40
	3	2.9	11.4	15	3.2	13.4	20	4.5	16	50
	4	3.5	12.4	20	4	13.5	30	4	15.4	45
	5	3	11.2	20	3.4	12.5	20	4.5	17	60
Vaccine + Adjuvant R1	1	3.4	13.5	21	4	14.5	30	4.2	15.5	40
	2	3.7	14.5	31	3.9	14	30	4	15	40
	3	3.5	13.4	22	4	14	30	4.5	15.3	40
	4	3.3	13.5	22	3.5	14	30	4.8	16.2	55
	5	3.3	12.5	21	3.5	13.5	30	4	15.2	40
Vaccine + Adjuvant R2	1	3.2	11.8	20	3.9	13.5	30	4.5	16	50
	2	3.3	12.3	21	3.1	12.5	30	4	15.5	40
	3	3.4	12.5	20	3.5	14.2	30	4	15.7	50
	4	3.3	11.8	20	3.5	13.6	25	4	15.5	50
	5	3.3	12.2	20	3.4	11.5	25	4.5	16	50
Vaccine + Adjuvant R3	1	3.2	10.7	19	3.4	12	20	4.3	15.5	40
	2	3.3	12.6	20	3	12.5	15	3.8	14	30
	3	2.9	11.6	15	3	12.3	20	4	15	35
	4	2.9	11.6	18	3.5	12.3	20	3.5	14	30
	5	2.9	11.4	18	3.5	13.2	25	3.8	14.5	30

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตในรูปของน้ำหนัก ขนาดความกว้าง ยาว ของปลากะพงขาวทดลองระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์ ที่ได้รับวัคซีน FKC รูปแบบฉีด

ชุดการทดลอง	ตัวที่	0 วัน			1 เดือน		
		กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)
Control R1	1	3	12.5	20	3.8	14	30
	2	3.5	12.7	25	4.2	16.7	50
	3	3	11.5	20	3	15.5	30
	4	2.9	11.2	20	3.4	14	30
	5	3.5	11.9	25	3.7	14	28
Control R2	1	3	11.5	20	3	14.2	29
	2	3.4	13	25	3.4	13.7	28
	3	3.3	13	30	3.4	13.6	25
	4	2.9	12.3	29	3.4	13.5	30
	5	2.1	11.4	19	3.5	13.5	29
Control R3	1	2.9	12	20	3.5	14.4	30
	2	3.7	13	30	3.4	13.5	20
	3	2.4	10.9	15	3.5	13.4	25
	4	2.8	10.3	20	3.5	14.5	28
	5	3	11	20	3.4	13.4	23
Vaccine R1	1	3.2	13	21	3.5	13.6	25
	2	3.5	14	30	3.5	14.1	25
	3	3.4	13.5	25	3.6	13.6	20
	4	3.2	12.8	25	3.5	14.5	30
	5	3.1	12.6	25	3.6	13.6	30
Vaccine R2	1	3.2	13.8	30	2.9	13.9	25
	2	3.4	13	25	3.2	12.6	25
	3	3.4	12.7	25	3.5	14	30
	4	3.5	12	30	3.4	13.8	29
	5	3.7	14.3	30	3.5	14	30
Vaccine R3	1	3.5	14.3	30	3.2	13.1	22
	2	3.5	12.2	20	3.4	13	30
	3	3.2	12.4	20	3.3	13.5	25
	4	3.2	12.5	20	3	12.8	20
	5	3	12	25	3	12.9	20

ชุดการทดลอง	ตัวที่	2 เดือน			3 เดือน		
		กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	กว้าง (ซม.)	ยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)
Control R1	1	5.2	18.5	60	5.8	23.5	140
	2	4	15.8	40	5.3	22	120
	3	4.5	16.5	50	5.8	23.5	130
	4	4.5	16.3	30	5.5	22.2	120
	5	4.6	16.7	40	5.8	22.5	120
Control R2	1	4.5	15.6	30	5.5	22.4	110
	2	4.5	16	40	5.5	22.6	120
	3	4	15.6	40	5.4	21	100
	4	4.5	15	30	5.6	24.2	140
	5	4.1	15	30	5.5	21	100
Control R3	1	4.2	14.5	30	5.5	21	100
	2	4.3	14.5	30	5.8	23.2	130
	3	4.2	14.1	30	5.5	21.6	110
	4	4.1	13.3	20	5.4	20	90
	5	3.5	13.2	20	5.6	22	110
Vaccine R1	1	4.2	17.2	50	5.6	23.5	130
	2	4.5	16.2	40	5.6	22	120
	3	4.9	18	60	6	22.8	130
	4	4.1	17.5	50	5.5	22	120
	5	4.3	17	50	5.5	22.3	120
Vaccine R2	1	4.2	17.5	50	5.5	22	110
	2	5.3	19	60	5.5	23.2	140
	3	4.3	16.2	50	5.4	23	120
	4	4.6	16.3	40	5.5	21.5	100
	5	4.3	16	50	5.6	21.8	120
Vaccine R3	1	4.3	16.2	50	5.4	22.5	110
	2	4.3	15.9	30	5	20.5	90
	3	4.3	17.3	50	5.5	22.3	130
	4	3.9	15.6	40	5.2	21.2	110
	5	4.4	15.2	40	5.2	20.2	90

ภาพกิจกรรม

ภาพการทดลอง โปรแกรม 1 กระชังเลี้ยงปลากะพงขาว และการแช่ลูกปลาด้วยวัคซีน FKC

ภาพการทดลอง โปรแกรม 2 กระชังเลี้ยงปลากะพงขาว และการฉีดลูกปลาด้วยวัคซีน FKC

ภาพการทดลอง โปรแกรม 3 กระชังเลี้ยงปลากะพงขาวในแม่น้ำบางปะกง การฉีดลูกปลาด้วยวัคซีน FKC

ภาพการตายของปลา และตัดอวัยวะตับ ม้าม และไตส่วนหน้า เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน

สาเนา

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก
หน้า 1 ของจำนวน 3 หน้า

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ยื่นทางไปรษณีย์
สว 6/4/62

☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535
และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่	
วันรับคำขอ 14 ส.ค. 2562	เลขที่คำขอ 1903002077
วันยื่นคำขอ 6 ส.ค. 2562	
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ วัคซีนเชื้อตายสำหรับต้านการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☐ นิติบุคคล ☐ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ
ชื่อ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่ 169 ถนนลงหาดบางแสน
ตำบล/แขวง แสนสุข อำเภอ/เขต เมือง จังหวัด ชลบุรี รหัสไปรษณีย์ 20131 ประเทศ ไทย
อีเมล tlo.buu.n@gmail.com
☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☑ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 0 9 4 0 0 0 2 4 9 3 5 7 ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)
ในกรณีที่กรมฯ สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☐ อีเมลตัวแทน

3.1 สัญชาติ ไทย
3.2 โทรศัพท์ 038-102287
3.3 โทรสาร 038-102287

ยกเว้นค่าธรรมเนียม
ตามประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ฯ ๒๕๔๗ ว่าด้วย อัตราค่าธรรมเนียมและการยกเว้นค่าธรรมเนียม
ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร และประกาศคณะกรรมการสิทธิบัตร

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☑ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)
ชื่อ
ที่อยู่
ตำบล/แขวง อำเภอ/เขต จังหวัด รหัสไปรษณีย์ ประเทศ
อีเมล
เลขประจำตัวประชาชน ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

5.1 ตัวแทนเลขที่
5.2 โทรศัพท์
5.3 โทรสาร

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกันกับผู้ขอ
ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปภาศิริ บาร์เนท
ที่อยู่ คณะวิทยาศาสตร์
ตำบล/แขวง แสนสุข อำเภอ/เขต เมือง จังหวัด ชลบุรี รหัสไปรษณีย์ 20131 ประเทศ ไทย
อีเมล tlo.buu.n@gmail.com
เลขประจำตัวประชาชน 3 1 2 0 1 0 0 9 7 7 9 5 6 ☑ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ กลุ่มวิศวกรรม
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ฟิสิกส์)

☐ กลุ่มเคมี
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)

สิทธิบัตรการออกแบบ
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)

อนุสิทธิบัตร
☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)
☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก (ใบต่อ)
หน้า 2 ของจำนวน 3 หน้า

8. การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร ☐ PCT ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☑ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ

11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ

12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเรียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา

13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย

ก. แบบพิมพ์คำขอ			3	หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์			4	หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ			1	หน้า
ง. รูปเรียน	2	รูป	1	หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์				
☐ รูปเรียน		รูป		หน้า
☐ ภาพถ่าย		รูป		หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์			1	หน้า

14. เอกสารประกอบคำขอ
☑ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☑ เอกสารอื่นๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก

16. ลายมือชื่อ
☑ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ ตัวแทน
(รองศาสตราจารย์สมนึก ธีระกุลพิศุทธิ์)

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบต่อแนบท้าย แบบ สป/สผ/อสป/001-ก

5. ชื่อผู้ประดิษฐ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์มลฤดี สนธิ เลขประจำตัวประชาชน 3 6706 00493 68 6

ที่อยู่ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ตำบลโขมง อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี 22170

หน้า 1 ของจำนวน 4 หน้า

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

วัคซีนเชื้อตายสำหรับต้านการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับวัคซีนเชื้อตายสำหรับป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ปลากะพงขาว (Sea bass, *Latest calcarifer*) เป็นปลาน้ำกร่อยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดที่มีบริเวณชายฝั่งติดกับทะเล โดยรูปแบบการเลี้ยงปลาชนิดนี้มีทั้งการเลี้ยงในกระชัง และบ่อดิน ซึ่งในปัจจุบันเกษตรกรซื้อลูกปลามาอนุบาลในบ่อซีเมนต์หรือบ่อดิน เมื่อได้ขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว จะเริ่มย้ายไปเลี้ยงในกระชังที่อยู่ในบริเวณปากแม่น้ำ หรือน้ำทะเล และบ่อดิน ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดการป่วยและตายของปลากะพงขาวขนาดเล็กในช่วงอนุบาล คือการติดเชื้อแบคทีเรีย จากการสอบถามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลากะพงขาว พบว่าการระบาดของแบคทีเรียก่อโรค เป็นปัญหาหลักของการเลี้ยงปลาชนิดนี้ โดยเมื่อปลาป่วยแสดงลักษณะอาการ เช่น เกล็ดกร่อน ร่วมกับการมีแผลตกเลือด ครีบกร่อน จะทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมาก โดยในช่วง 1-3 วันแรกที่ปลาแสดงอาการป่วย จะมีอัตราการตายประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และหากไม่มีการจัดการสุขภาพและรักษา ปลาจะมีอัตราการตายถึง 100% ภายใน 7 วัน คณะผู้ประดิษฐ์ได้ออกเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวเลี้ยง ที่ป่วยและไม่ป่วย ในภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ เพื่อมาตรวจสอบการปรากฏของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) ในปลากะพงขาวและปลากะรัง ซึ่งในประเทศไทย มีรายงานการระบาด ของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) ในปลากะรัง (*Epinephelus fuscoguttatus*) ที่เลี้ยงทางภาคใต้ในปี พ.ศ. 2555 และสามารถจัดเป็นไบโอไทป์หนึ่ง (biotype 1) ซึ่งมียีนก่อความรุนแรงในการเกิดโรค คล้ายคลึงกับการติดเชื้อในมนุษย์ มนุษย์ (Thawonsuwan, J., Kasornchandra, J., Soonsan, P. and Keawtapee, C. 2016 Isolation of Vibrio vulnificus Biotype I from Disease Outbreaks on Cultured Tiger Grouper *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775 Special issues Fish Pathology, 51: 39-45) คณะผู้ประดิษฐ์ได้ทำการศึกษาทางระบาดวิทยาลักษณะอาการป่วยของปลาร่วมกับการแยกและพิสูจน์ไอโซเลท (Isolate) ของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น โดยเทคนิคอิมมูโนดอท บล็อททิ่ง (Immunodot blotting) ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) ร่วมกับการยืนยันชนิดของเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และการตรวจหายีนในตำแหน่ง 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA) จากผลการทดสอบพบเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาว คือ เชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส *(Vibrio vulnificus)* จึงได้ศึกษาความรุนแรงของเชื้อวิบริโอ วัลนิฟิคัส *(Vibrio vulnificus)* ที่ได้จากภูมิภาคต่างๆ พบว่าเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุดในปลากะพงขาวในสภาพทดลอง ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 5.4 x 10^6 โคโลนี ฟอร์มมิ่ง ยูนิต (Colony forming unit) ต่อน้ำหนักตัวปลา (กรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) ไอโซเลท (isolate) ที่ได้จากจังหวัดจันทบุรี จังหวัดฉะเชิงเทรา และจังหวัดสตูล ดังนั้นการแก้ปัญหาการตายของปลากะพงขาวเลี้ยง และลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคจากการใช้ยาปฏิชีวนะ การผลิตวัคซีนต้านแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยและเหมาะสม

ผู้ประดิษฐ์จึงได้ผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) จากเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) ที่ก่อโรครุนแรงในปลากะพงขาว พร้อมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการต้านทานโรคจากแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส *(Vibrio vulnificus)* ในปลากะพงขาว ภายหลังการได้รับวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบฉีด ข้อดีของวัคซีนที่ประดิษฐ์ได้ในครั้งนี้ คือ เป็นวัคซีนเชื้อเซลล์ตายชนิดผงที่มีกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก มีราคาถูก มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาทั้งในระดับเซลล์ และสารน้ำ และให้ความคุ้มโรคปลากะพงขาวอนุบาลขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว เป็นระยะเวลาอย่างน้อยหนึ่งเดือน ซึ่งจะช่วยลดอัตราการตายของปลากะพงขาวเมื่อจะเลี้ยงในฟาร์มทั้งบ่อดิน และกระชัง นำไปสู่การเพิ่มศักยภาพในการผลิตปลากะพงขาวให้กับเกษตรกรไทย

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

วัคซีนเชื้อตายสำหรับต้านการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว ซึ่งมีกรรมวิธีการผลิตโดยนำเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทริปปิค ซอย อะการ์ (Tryptic Soy Agar, TSA) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งไทโอซัลเฟต ซิเตรท ไบล์ ซอลต์ ซูโครส อะการ์ (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TCBS) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 โคโลนี (Colony) ของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทริปปิค ซอย บรอท (Trypic Soy Broth, TSB) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นล้างด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเตรียมวัคซีนชนิดเชื้อตาย โดยฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยฟอร์มาลิน (Formalin) ด้วยการใส่ฟอร์มาลิน (Formalin) ความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นล้างเซลล์จำนวน 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียก จากนั้นนำมาทำให้เป็นแบบแห้งด้วยเครื่องทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบแห้ง แล้วนำไปใช้งานโดยนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้ง อย่างใดอย่างหนึ่งไปละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

การประดิษฐ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) ที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) ซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียปลากะพงขาวในช่วงอนุบาลลูกปลาและการเลี้ยงปลาขนาดตลาดได้นำไปสู่การเพิ่มศักยภาพในการผลิตปลากะพงขาวให้กับเกษตรกรไทย และวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบแห้งมีข้อดีคือเก็บได้ในระยะเวลานาน

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงระดับของแอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody titer) (1/25,000) ในซีรั่ม (Serum) ของปลากะพงขาวของชุดทดลองสูงสุดที่ 10 วัน

รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ของชุดทดลองที่ฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) ผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

วัคซีนเชื้อตายสำหรับต้านการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส *(Vibrio vulnificus)* สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว ประกอบด้วย

1. การแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) ซึ่งทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวหนัง กล้ามเนื้อ ตับ ไต และม้าม ของปลากะพงขาวที่ป่วย ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งทริปติค ซอย อะการ์ (Tryptic Soy Agar, TSA) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ไทโอซัลเฟต ซิเตรท ไบล์ ซอลต์ ซูโครส อาการ์ (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TCBS) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio*) จากนั้นทดสอบเชื้อเบื้องต้นโดยเทคนิคอิมมูโนดอท บล็อททิ่ง (Immunodot blotting) ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) ร่วมกับยืนยันชนิดของเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และการตรวจหายีนในตำแหน่ง 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA)

2. ทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส *(Vibrio vulnificus)* เริ่มจากเตรียมปลากะพงขาวที่มีสุขภาพดีขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว น้ำหนัก 10-15 กรัม แบ่งออกเป็น 8 ชุดการทดลอง เตรียมเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส *(Vibrio vulnificus)* ไอโซเลท (Isolate) ที่แยกได้มาจากปลาป่วยในภูมิภาคต่างๆ ทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังนี้ 1) สายพันธุ์จากมหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี รหัส VVB 2) สายพันธุ์จากภาคตะวันออก จังหวัดจันทบุรี รหัส ES1106LGL3 3) สายพันธุ์จากภาคใต้ จังหวัดสตูล รหัส SS404KGS8 และ 4) สายพันธุ์จากภาคตะวันออก จังหวัดฉะเชิงเทรา รหัส ES503LGS9 เตรียมเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ คือ $1x10^2$-10^8 โคโลนี ฟอร์มมิ่ง ยูนิต (Colony forming unit) ต่อมิลลิลิตร มาฉีดในช่องท้องปลากะพงขาวตัวละ 0.5 มิลลิลิตร โดยกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บันทึกผลการตายของปลา ที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง และคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Dose 50; LD_{50}) จากการทดสอบความรุนแรงพบว่าเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มีความรุนแรงมากที่สุด โดยค่าความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้ปลากะพงขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Dose 50; LD_{50}) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง คือ $5.4x10^6$ โคโลนี ฟอร์มมิ่ง ยูนิต (Colony forming unit) ต่อน้ำหนักตัวปลา (กรัม)

3. กรรมวิธีการผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้ง มีขั้นตอนดังนี้

3.1 นำเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทริปติค ซอย อะการ์ (Tryptic Soy Agar, TSA) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งไทโอซัลเฟต ซิเตรท ไบล์ ซอลต์ ซูโครส อะการ์ (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TCBS) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 โคโลนี (Colony) ของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทริปติค ซอย บรอท (Tryptic Soy Broth, TSB) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) ด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate reader)

ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) ต้องเท่ากับ 0.994 ± 0.095 จะได้ปริมาณแบคทีเรียมีชีวิตที่เหมาะสมแก่การนำมาผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบเปียก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (High speed centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นล้างเซลล์จำนวน 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

3.2 นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.1 มาใส่ฟอร์มาลิน (Formalin) ที่มีความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นล้างเซลล์จำนวน 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบเปียก และนำมาทำการทดสอบโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิดทริปปิค ซอย อะการ์ (Tryptic Soy Agar, TSA) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งไทโอซัลเฟต ซิเตรท ไบล์ ซอลต์ ซูโครส อะการ์ (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TCBS) ซึ่งต้องไม่มีเชื้อแบคทีเรียจากวัคซีนเชื้อตายเจริญบนอาหารแข็งทั้งสองชนิดจึงนำไปใช้งานได้

3.3 นำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบเปียกที่ได้จากข้อ 3.2 มาทำให้เป็นแบบแห้ง โดยนำมาผ่านกระบวนการทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่องทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) โดยเตรียมเครื่องให้ได้อุณหภูมิ -50 ถึง -40 องศาเซลเซียส และมีความดันสุญญากาศอยู่ในช่วง 80-500 มิลลิทอร์ (millitorr) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบแห้ง

4. การนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้งไปใช้งาน ซึ่งมีวิธีการใช้เหมือนกันคือนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้งอย่างใดอย่างหนึ่ง มาทำการละลายด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาตรเท่ากับ 400 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว หรือน้ำหนักตัว 10-15 กรัม ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เพื่อให้ปลากะพงขาวป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทย ทั้งในกลุ่มที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง ความรุนแรงปานกลาง และความรุนแรงน้อยได้

จากผลการวิเคราะห์หลังจากการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) ระยะเวลา 10-30 วัน ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอวัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) ปริมาณ 1×10^8 โคโลนี ฟอร์มมิ่ง ยูนิต (Colony forming unit) ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร บริเวณช่องท้องของปลากะพงขาว พบว่าภายหลังการได้รับวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) ผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 ในปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว ให้ประสิทธิผลในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีระดับของแอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody titer) 1/25,000 พบสูงสุดที่ 10 วัน ตามรูปที่ 1 และชุดทดลองฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) ผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody titer) สูงที่สุด และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และชุดทดลองอื่นๆ ตามรูปที่ 2

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. วัคซีนเชื้อตายสำหรับต้านการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว ที่ซึ่งมีกรรมวิธีการผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้ง ดังนี้

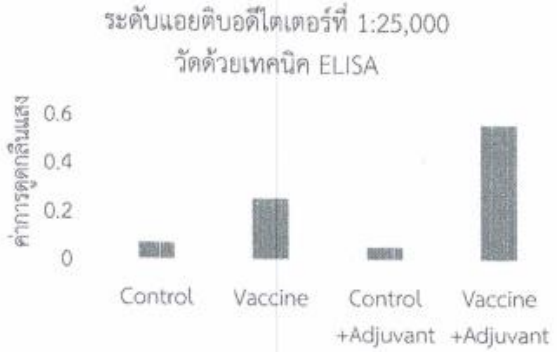
ก. นำเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทริปปิค ซอย อะการ์ (Tryptic Soy Agar, TSA) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งไทโอซัลเฟต ซิเตรท ไบล์ ซอลต์ ซูโครส อะการ์ (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TCBS) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 โคโลนี (Colony) ของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพา (*Vibrio vulnificus* Burapha strain) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทริปปิค ซอย บรอท (Tryptic Soy Broth, TSB) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) ด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) ต้องเท่ากับ 0.994 ± 0.095 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (High speed centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นล้างเซลล์จำนวน 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์แล้วนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาใส่ฟอร์มาลิน (Formalin) ที่มีความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นล้างเซลล์จำนวน 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบเปียก

ข. นำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบเปียกที่ได้จากข้อ ก. มาทำให้เป็นแบบแห้ง โดยนำมาผ่านกระบวนการทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่องทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) โดยเตรียมเครื่องให้ได้อุณหภูมิ -50 ถึง -40 องศาเซลเซียส และมีความดันสุญญากาศอยู่ในช่วง 80-500 มิลลิทอร์ (millitorr) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ซึ่งได้เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell vaccine, FKCV) แบบแห้ง

2. วัคซีนเชื้อตายสำหรับต้านการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่งการนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้งไปใช้งาน เริ่มจากนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้งอย่างใดอย่างหนึ่ง มาทำการละลายด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาตรเท่ากับ 400 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว หรือน้ำหนักตัว 10-15 กรัม ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

รูปที่ 1



รูปที่ 2

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

บทสรุปการประดิษฐ์

วัคซีนเชื้อตายสำหรับต้านการติดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส (*Vibrio vulnificus*) สายพันธุ์ไทยในปลากะพงขาว มีกรรมวิธีการผลิตคือนำ 1 โคโลนี (Colony) ของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ วัลนิฟิคัส สายพันธุ์บูรพามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทริปปิค ซอย บรอท (Trypic Soy Broth, TSB) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและปั่นล้างด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ จากนั้นนำมาใส่ฟอร์มาลิน (Formalin) และนำไปบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียก แล้วนำมาทำให้เป็นแบบแห้งด้วยเครื่องทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบแห้ง แล้วนำไปใช้งานโดยนำวัคซีนชนิดเชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed cell, FKC) แบบเปียกและแบบแห้งอย่างใดอย่างหนึ่ง ไปละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมกับสารสื่อชนิดฟรอยด์ อินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัว 4-5 นิ้ว ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. ปภาศิริ บาร์เนท

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. PRAPARSIRI BARNETTE

   เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3120100977956

   ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

   โทรศัพท์ 087-0262612

   โทรสาร 038-393491

   ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) PRAPARSI@BUU.AC.TH

2. ประวัติการศึกษา

   June/1997-December/2002 Clemson University, SC, USA PhD (Aquaculture)

   April/1982-June/1984 Kasetsart University, Thailand MS (Fishery Sciences)

   March/1979-March/1982 Kasetsart University, Thailand BS (Fishery Biology)

3. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

   - โรคและพยาธิ และภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ เช่น ปลา กุ้ง ปู และ หอย
   - วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

4. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

1. แผนงานวิจัยการใช้ตัวชี้วัดชีวภาพในการประเมินทรัพยากรสิ่งมีชีวิตแนวชายฝั่งทะเลของจังหวัดชลบุรี

5. หัวหน้าโครงการวิจัย

1. โครงการวิจัยการสำรวจทางชีวภาพในสัตว์น้ำเศรษฐกิจตามแนวชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรีและการจัดการความเสี่ยงเบื้องต้นต่อสาร PAHs ในหอยแมลงภู่

6. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Varaporn Cholumpai, Malin C. Celander and Praparsiri Kanchanopas-Barnette. 2015. Accumulation and clearance of PAHs and CYP1A levels in farmed green mussels (*Perna viridis* L.) from a coastal industrial area in Thailand.EnvironmentAsia.Vol.8 No.2: 109-117.

วราพร ชลอำไพ ปภาศิริกาญจโนภาศ-บาร์เนท สุวรรณา ภาณุตระกูล. 2557. ระดับแคดเมียมในหอยแมลงภู่ที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มบริเวณชายฝั่งทะเลเขตนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยองเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลาจังหวัดชลบุรี ปีพ.ศ.2555-2557. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ครั้งที่ 22ระหว่างวันที่ 30 มิถุนายน - 2กรกฎาคม2557. โรงแรมมิราเคิล แกรนด์คอนเวนชั่นกรุงเทพมหานคร.268-269.

พอจิตร นันทนาวัฒน์ นันทิกา คงเจริญพร วิชชุดา ประสาทแก้ว และปภาศิริกาญจโนภาศ-บาร์เนท. 1997. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไซโตโครม P450 (CYP1A) ในปลากะพงขาว ที่ได้รับสารเบนโซ[เอ]ไพรีน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 19 (ฉบับที่ 2) กรกฎาคม – ธันวาคม 2557. 1-12.

จีรรัตน์ เกื้อแก้ว อัตรา ไชยมงคล กมลรัตน์ ยงเจริญ สุพล ตั่นสุวรรณ และ ปภาศิริ บาร์เนท. 2557. การเสริมกรดโพรพิโอนิกและแคลเซี่ยมโพรพิโอเนตในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของปลากะพงขาว *Latescalcarifer* (Bloch, 1790). เอกสารวิชาการฉบับที่ 10/2557. กรมประมง 22 หน้า.

NasrullahBaiArifin, **PraparsiriKanchanopas-Barnette**, KarnjanaHrimpeng[b], Chalatip junchompoo, ChatchaiPenpain, and SukandaTubmeca. 2014. Pathogenic bacterial contamination of eggs and sand samples from hawksbill turtle *Eretmochely simbricata* nesting area on Khram Island, Chonburi, Thailand. Burapha University International Conference 2014 Burapha University, Thailand July 3-4, 2014.

ChutimaThanomsit, PhochitNantanawat, Britt Wassmur, Johanna Gräns, Malin C. Celanderand **PraparsiriKanchanopas-Barnette**.2013. Characterization of

metallothioneinfromAsianseabass (*Latescalcarifer*, Bloch) and application as a biomarker for heavymetalexposure in Thailand. **Asian Journal of water,** environment and pollution. 10 (4): 53-64.

Praparsiri Kachanopas-Barnette, ChatchaiThimkrajang and KashaneChalermwat. 2012. Mobilizing stakeholder participation and ownership through ICM: Lessons from Chonburi, Thailand.**Tropical Coasts Megazine**. 17(2): 13-21.http://pemsea.org/publications/tropical-coasts-magazine.

Budianto, **PraparsiriKachanopas-Barnette,** RungnaphaSaeeng, and Sukanda Tubmeca.2012. The in vitro effect of *Andrographispaniculata* extracts on the innate Immune response of hybrid catfish (*Clariasmacrocephalus* X *Clarias Garripienus*) and Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*).Burapha University International Conference 2012.Burapha University, Thailand, July 9-11, 2012. 543-551.

ChutimaThanomsit,TiantipBoonchuay, SukandaTubmeca, VarapornCholumpai, JakkaphunNanuam, Budianto, **Praparsiri Barnette**. 2011 Potential of Histological alteration and MT protein elevation using as biomarker for Cadmium contamination. Proceedings of the Conference on Perspectives in Environmental Health Research, August 21th, 2011.Chulabhorn Research Institute, Bangkok,Thailand.

สุกานดา ทับเมฆา, ปภาศิริ บาร์เนท, แววตา ทองระอาและชุติมา ถนอมสิทธิ์.2555. การพัฒนาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Cadmium-Binding Protein จากปลากะพงขาว (*Latescalcarifer*, Bloch) และการนำไปประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 8(1):32-43.

DilaFahriyanti, **Praparsiri-KamchanopasBarnette**, VipoositManthachitra, SukandaTubmeca and QurrotaA'yunin. 2555. Effect of salinity changes on the immune response of Asian Seabass (*Latescalcarifer*, Bloch) and its susceptibility to *Vibrio harveyi*. The 4th Proceeding of **National Research**, March, 12-13, 2012.341-346.

QurrotaA'yunin, **Praparsiri-KamchanopasBarnette**, VipoositManthachitra DilaFahriyanti, and SukandaTubmeca. 2555. Effect of Turbellaria infection on immune Response and condition index of green mussel (*Pernaviridis*) in Chonburi, Thailand. The 4th Proceeding of **National Research**, March, 12-13, 2012.347-352.

Praparsiri Kachanopas-Barnette, PhaithoonMokkongpai, Britt Wassmur, Malin C. Celanderand PichanSawangwong. 2010. Molecular characterization of cytochrome P450 1A (CYP1A) in Asian sea bass (*Latescalcalifer*Bloch) and

its application as a biomarker in the Gulf of Thailand. Asian Journal of water, environment and pollution. 7 (2): 43-51.

W. Senanan, S**.** Panutrakul, **P.Barnette**, V. Mantachitr, S. Chavanich, A.R. Kapuscinski, N. Tangkrock-Olan, P. Intacharoen, V. Viyakan, C. Wongwiwatanawute, and K. Padetpai. 2010. Ecological risk assessment of an alien aquatic species: a case study of *Litopenaeusvannamei* (Pacific whiteleg shrimp) aquaculture in the Bangpakong River, Thailand. In. Tropical Deltas and Coastal Zones Food Production, Communities and Environment at the Land–Water Interface(eds C.T. Hoanh*et al.*) CAB International 2010. 64-79.

Senanan,W., Panutrakul, S**.,** **Barnette, P**., Chavanich, S., Mantachitr, V., Tangkrock-Olan, N., andViyakarn, V. 2009. Preliminary risk assessment of Pacific whiteleg shrimp (*P. vannamei*) introduced to Thailand for aquaculture. Aquaculture Asia Magazine. Volume XIV No.4, October-December 2009, p. 18-32

Sasmita,R., Praparsiri-Kanchanopas-Barnette and KashaneChalermwat. 2009. Effects of monovalent and bivalent vaccines from *photobacteriumdamselae subsp. damselae*and *vibrio harveyi*on innate immune system of the asian seabass, *latescalcarifer*bloch. The second UKM-UI joint seminar 2009, Malaysia.465-473.

สุกานดา ทับเมฆา, **ปภาศิริกาญจโนภาศ-บาร์เนท** และไพศาล สิทธิกรกุล. 2553. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจำแนก *Vibrio harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรงจากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 14(2): 61-69.

กัญช์ เกล็ดมณี, **ปภาศิริกาญจโนภาศ-บาร์เนท**, คเชนทร เฉลิมวัฒน์, วิชชุดา ประสาทแก้ว, สุกานดา ทับเมฆาและหยาดเพชร โอเจริญ. 2553. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว (*Latescalcarifer*, Bloch) ต่อการเสริมอาหารด้วยไคโตซาน.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, หน้า 55 - 63.

ทัศนีย์ คชสีห์, **ปภาศิริบาร์เนท**, อรพินท์ จินตสถาพร, วรมิตร ศิลปชัย และสุรเชษฐ์ จันทร์ประเสริฐ. 2553. ผลการเสริมบัวบก (*Centellaasiatica*) และไพล (*Zingiber montanum*) ในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตและสุขภาพโดยรวมของกบนา (*Ranarugulosa*). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, หน้า 336 - 344.

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

Barnette, P., Khururat, O., Sananan, W., Tangkrock-olan, N. and Wongwiwatanawute, C. 2008.prevalence of an alien pathogen, taura syndrome virus, in local shrimp species in the bangpakong estuary, thailand, during 2005-2007. Tropical Aquaculture: Application, Environmental and Social impacts. March 27th – 29th, 2008, Rayong, Thailand.32-34.

Wansuk Senanan, Nongnud Tangkrock-olan, Suwanna Panutrakul, **PraparsiriBarnette**. CharanWongwiwatanawute, NopparmardNiphonkit, David J. Anderson. 2007. The presence of the PaciificWhiteleg shrimp (Litopenaeusvannanmei, BOONE, 1931) in the wild in Thailand. Journal of Shellfish Research. 26(4): 1187-1192.

NongnudTangkrock-olan, WansukSenanan, Suwanna Panutrakul, **PraparsiriBarnette**. 2007. Species and distribution of Penaeoid shrimps in Thailand. Journal of Shellfish Research.26(4): 1239-1246.

PraparsiriBarnette, KadssaraPunsiri, and SuriyanTunkijjanukij. 2007. Infection and Treatment of ulcer disease in Green Turtle (*Cheloniamydas*).The Proceeding of JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar 2007. 17-18 December 2007. Kasetsart University, Thailand. 499-510.

ปภาศิริ บาร์เนท, ไพฑูรย์ มกกงไผ่ พิชาญ สว่างวงศ์Malin C. 2550. การพัฒนาแอนติบอดีต่อ Cytochrome P450 (CYP1A) และการนำไปประเมินแหล่งเสี่ยงมลภาวะน้ำมันตามแนวชายฝั่ง จังหวัดชลบุรี. การประชุมทางวิชาการ สิ่งแวดล้อมนเรศวร ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก. หน้า 243-256.

ปภาศิริ บาร์เนท, อมรเทพ โชติช่วง,กุลวลา แสงรุ่งเรือง, สมพิศ แย้มเกษม และ ไพศาล สิทธิกรกุล. 2549. การเปรียบเทียบการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิคทาง PCR และ Immunodot blot. การประชุมวิชาการกรมประมงประจำปี 2006. หน้า 247-256.

Parang Kush Subed, **PraparsiriBarnette**, and Sudip K. Rakshit. 2005. Rapid detection of three pathogenic Vibrio species in shrimp and crab using multiplex PCR. Proceeding of the International Conference on Shrimp Biotechnology: New Challenges through Thai Shrimp Industry. 4-5 November 2005. Bangkok, Thailand. p 131-137.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ และ **ปภาศิริ บาร์เนท.** 2548. ความเป็นไปได้ในการเลี้ยงปูนิ่ม. การประชุมวิชาการ “อุตสาหกรรมเกษตร พืช และสัตว์น้ำไทย “18-20 มกราคม 2548 จังหวัดตรัง. หน้า 38-40.

วิชชุดา ประสาทแก้ว, **ปภาศิริ บาร์เนท** และ บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2005. ผลของพีเอชที่เป็นกรดต่อการยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ*Penaeusmonodon*. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. หน้า 25-33.

7. งานวิจัยที่กำลังทำ

- การปนเปื้อนพีเอเอชและตัวชี้วัดชีวภาพในปลาทะเลจากน้ำมันรั่ว จังหวัดระยองบริษัท PTTGC ประจำปี 2556 หัวหน้าโครงการวิจัย การวิจัยลุล่วงแล้ว 100 %

- การประเมินผลกระทบของโลหะหนักและสารอินทรีย์ไฮโดรคาร์บอนต่อสัตว์ทะเลตามแนวชายฝั่งทะเลอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง สภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2556 หัวหน้าโครงการวิจัย การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 100 % % (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ แล้ว)

- การปนเปื้อนและการลดสาร polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)และการแสดงออกของ CYP1A ในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis* L.) จากฟาร์มชายฝั่งทะเลนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยองศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมและพิษวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดลประจำปี 2557 หัวหน้าโครงการวิจัย การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 90 %

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) : นางสาวมลฤดี สนธิ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) : Miss Molruedee SONTHI
   เลขบัตรประจำตัวประชาชน 36706 00493 686
   ตำแหน่ง อาจารย์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
   57 หมู่ 1 ถนนชลประทาน ต. โขมง อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี 22170
   โทรศัพท์ที่ทำงาน: 039-310000
   โทรศัพท์มือถือ: 086-1569561
   โทรสาร: 039-310128
   E-mail: mamsonthi@gmail.com
2. ประวัติการศึกษา
   พ.ศ. 2543 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา
   พ.ศ. 2547 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วาริชศาสตร์) มหาวิทยาลัยบูรพา
   พ.ศ. 2556 Ph.D (Parasitology/ Microbiology) Montpellier University, ประเทศฝรั่งเศส

3. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

- โรคสัตว์น้ำ (Fish and shellfish diseases)
- ภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ (Fish and shellfish immunology)
- Host-pathogen interaction

4. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

1. ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อม ปริมาณและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550

5. หัวหน้าโครงการวิจัย และแหล่งทุน

1. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสตัวแดงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) กับการถ่ายทอดโรคในกุ้งกุลาดำ แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550

2. การศึกษาภูมิคุ้มกันและการประยุกต์ใช้บีต้ากลูแคนในหอยหวาน *Babylonia areolata* Link 1807 แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550

3. ลักษณะพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei)* ที่เป็นโรคตายด่วน. แหล่งทุน: คณะเทคโนโลยีทางทะเล ประจำปีงบประมาณ 2555 งบประมาณ 50,000 บาท

4. รูปแบบการจัดการฟาร์ม และการควบคุมอินทรีย์สารในบ่อกุ้งของเกษตรกร เพื่อป้องกันโรคตายด่วน ในกุ้งทะเล แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2557 งบประมาณ 222,000 บาท

5. การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2557 งบประมาณ 580,000 บาท และ 2558 (ต่อเนื่อง) งบประมาณ 690,000 บาท

6. การปรากฏของ Covert Mortality Nodavirus ในกุ้งขาวที่เลี้ยงในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี แหล่งทุน: คณะเทคโนโลยีทางทะเล ประจำปีงบประมาณ 2558 งบประมาณ 60,000 บาท

6. ผลงานวิชาการ

สุทัศน์ แดงสมสุขเจริญ, นภาพร เลียดประถม, บัญชา นิลเกิด และ**มลฤดี สนธิ.** (2550). ผลของแอมโมเนียต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวาน. การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2550 กรุงเทพ.

วศิน ยุวนะเตมีย์ และ **มลฤดี สนธิ.** (2552). ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสตัวแดงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) กับการถ่ายทอดโรคในกุ้งกุลาดำ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณปี 2550-2551 เสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชลี ไพบูลย์กิจกุล, **มลฤดี สนธิ**, เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล และ บัญชา นิลเกิด. (2552). การศึกษาภูมิคุ้มกันและการประยุกต์ใช้เบต้ากลูแคนในหอยหวาน *Babylonia areolata* Link 1807. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณปี 2550-2551 เสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

มลฤดี สนธิ และ กรรณิการ์ เชี่ยวชาญยนต์. (2555). ลักษณะพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei)* ที่เป็นโรคตายด่วน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล.

มลฤดี สนธิ และนิศารัตน์ ดาราวิโรจน์. (2558). รูปแบบการจัดการฟาร์ม และการควบคุมอินทรีย์สารในบ่อกุ้งของเกษตรกร เพื่อป้องกันโรคตายด่วน ในกุ้งทะเล. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีงบประมาณ 2557 เสนอสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา.

Sonthi, M., Toubiana, M., Pallavicini, A., Venier, P. and Roch, P. (2011). Diversity of coding sequences and gene structures of the antifungal peptide Mytimycin (MytM) from the Mediterranean Mussel, Mytilus galloprovincialis. *Marine Biotechnology*; 13-857.

Sonthi, M., Cantet, F., Toubiana, M., Trapani, M.R., Parisi, M.,G., Cammarata, M. and Roch, P. (2012). Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM). *Fish and Shellfish Immunology*; 32-45.

Cantet, F., Toubiana, M., Parisi, M.G., **Sonthi, M.**, Cammarata, M. And Roch, P. (2012). Individual variability of mytimycin gene expression in mussel. *Fish & Shellfish Immunology*; 1-4.

Napaporn Leadprathom, Pornpimon Teangtarn, Kedsiri Ing-Kanorn, Jayakody A. Sumith and **Molruedee Sonthi**. (2012). Determining the Effect of Sediment Resuspension from the Activity of Phenoloxidase in Penaeid Shrimp Post Larvae. *American Journal of Environmental Sciences* 8; 304-310.

Molruedee Sonthi, Mylène TOUBIANA and Philippe ROCH. Antifungal peptide, Mytimycin (MytM) from Mediterranean mussle (*Mytilus galloprovincialis*). Burapha University International Conference 2013 July 4 - 6, 2013, Pattaya Chonburi Thailand. (poster presentation)

มลฤดี สนธิ,วราวุฒิ สืบเพ็ง และบัลลังก์ เนื่องแสง. (2014). *ผลของเบต้ากลูแคนต่อองค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรควิบริโอซิสในปลานิลแดง* (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*). นำเสนอปากเปล่า ในการประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6, 20-21 มีนาคม 2557, มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.

มะลิวัลย์ คุตะโค, ทนงศักดิ์ โตเจริญ, **มลฤดี สนธิ**, รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และ จันทร์จรัส วัฒนะโชติ**.** (2558)**.** ปริมาณผลผลิตและรูปแบบโปรตีนคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระบอกดำ (*Liza subviridis*) ที่สกัดด้วยเปปซินความเข้มข้นแตกต่างกัน. แก่นเกษตร 43 ฉบับพิเศษ 1; 562-567.