ชื่อโครงการ ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสชนิดเชื้อตาย ต่ออัตรารอดของกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) ที่อายุต่างๆ กัน

ชื่อผู้วิจัย จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล อรัญญา พลพรพิสิฐ และวีณา เคยพุดซา

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ

พฤษภาคม 2538

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสในกุ้งกุลาดำที่อายุต่างกัน ที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ฆ่าด้วยความร้อน แล้วนำไปใช้ทดลองในกุ้งช่วง post larva ที่ 20 และกุ้งจากบ่อดินอายุ 60 วัน ด้วยวิธีการจุ่มแช่ (Bath) เป็นระยะเวลานาน 30 นาที แล้วศึกษาเปรียบเทียบดูอัตรารอดของกุ้งที่เลี้ยงนาน 32 วัน ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนระดับความเข้มข้น 10^9, 10^{11} และ 10^{13} CFU/ml. กับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าอัตรารอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

หลังจากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีสด้วยการแช่เชื้อพิษทับ (Challenge) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{18} CFU/ml. เป็นเวลานาน 9 วันในกุ้งกลุ่มทดลองเบื้องต้น แล้วทำการศึกษาเปรียบเทียบดูอัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่อายุต่างกัน ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนระดับความเข้มข้น 10^9, 10^{11} และ 10^{13} CFU/ml. กับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าอัตรารอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

ส่วนผลของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งบ่อดิน ระหว่างกลุ่มของกุ้งที่ได้รับวัคซีนกับกลุ่มควบคุม โดยดูจากน้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัวภายในระยะเวลาที่เลี้ยงนาน 32 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) โดยที่กลุ่มไม่ได้แช่วัคซีนจะมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากกว่า

595.388
ป412

คำสำคัญ : วัคซีนป้องกันโรควิบริโอ อัตรารอด กุ้งกุลาดำ

- 4 S.A. 2545
I20129500

Project Title : The Efficacy of Vibriosis Bacterin to survival rate of Penaeus monodon of different stage

Name of Investigators :

Jirasak Tangtrongpiros, Somkiat Piyatiratitivorakul, Aranya Polpornpisit and Weena Koeypudsa

Year : 1995

Abstract

The efficacy of V. parahaemolyticus heat killed bacterin was tried to against vibriosis in P. monodon at post larva 20 and 2 months old after rearing in grow-out pond. The animal was bathed for 30 minutes in bacterin at dosage 10^9, 10^{11} and 10^{13} CFU/ml. The challenge was done with V. parahaemolyticus at concentration of 10^{18} CFU/ml. The growth rate of post larva 20 and survival rate of both groups of animal were not significance different. In contrast, the growth rate of control 2 months old group was significantly higher than vaccinated group.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

595.388
ส412

ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสชนิดเชื้อตาย ต่ออัตรารอดของกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) ที่อายุต่าง ๆ กัน

บทนำ

ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ผ่านมา คือ ภาวะการเกิดโรคระบาดในกุ้งกุลาดำ ได้มีการศึกษาเรื่องโรคติดต่อต่าง ๆ มักพบว่ามีสาเหตุมาจากจุลชีพขนาดเล็ก ๆ ทั้งสิ้น เช่น พยาธิภายนอก ไวรัส เชื้อรา และแบคทีเรีย (Anne et al, 1989) แต่ปัญหาของโรคกุ้งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียนั้นพบได้บ่อยและเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อ *Vibrio spp.* สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในสัตว์น้ำเค็มและน้ำกร่อย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Vibrio spp.* เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่เป็นปกติในน้ำทะเล (สิลาและคณะ, 1985) และมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคในสัตว์ทะเล

เชื้อ *Vibrio spp.* ในกุ้งที่พบได้บ่อย คือ *Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* (อรัญญา และคณะ, 1990)

มีรายงานการระบาดของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง *Vibrio spp.* ในกุ้ง *Penaeus japonicus* ที่ประเทศญี่ปุ่น (Takahashi et al, 1985) การระบาดของ *Penaeus monodon* ระยะวัยอ่อน ที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio splendidus* ที่ประเทศฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo et al, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าการตายของกุ้งกุลาดำที่ประเทศมาเลเซีย ส่วนมากเกิดจากหลายสาเหตุร่วมกัน ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย (Anderson et al, 1987)

ดังจะเห็นได้ว่าการติดเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดความรุนแรง เสียหาย และแพร่ระบาดในพื้นที่การเลี้ยงกุ้งทั่ว ๆ ไป ในการแก้ปัญหาดังกล่าวนิยมใช้ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ อ๊อกซีเตตร้าซัยคลิน ซัลฟา อนุพันธ์ของซัลฟา และยาในกลุ่มควิโนโลน โดยแบคทีเรียนั้นสามารถพัฒนาพลาสมิด ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ ทำให้บางครั้งการใช้ยาไม่ได้ผลดี นอกจากนี้การใช้ยาที่ไม่ถูกต้องยังก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำ

การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดเชื้อตาย จะเป็นแนวทางในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำเพื่อต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรีย ลดอัตราการตายของกุ้ง ซึ่งในกุ้งก็มีระบบป้องกันตัวเองทางระบบภูมิคุ้มกันคล้าย ๆ กับสัตว์ชนิดอื่น ๆ เช่นกัน (Soderhall and Cerenius, 1992) อีกทั้งเป็นการลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ

ซึ่งมีแนวโน้มความเป็นไปได้ค่อนข้างสูง วัคซีนที่ใช้ทดลองจะเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย ที่ทำจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ให้โดยวิธีการจุ่มแช่ (bath) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในแง่การปฏิบัติทดลอง เพื่อพัฒนาไปสู่เชิงการค้ามากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันการติดเชื้อวิบริโอชนิดเชื้อตาย ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่าง ๆ กัน โดยดูจากอัตราการรอดตายของกุ้ง

2. ศึกษาอัตราการอดของกุ้งกุลาดำที่ได้รับและไม่ได้รับวัคซีน เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อวิบริโอ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

1.1 ลูกกุ้งกุลาดำช่วง Postlarva ที่ 8 (P_8) ที่แข็งแรงจากโรงเพาะฟักนำมาเลี้ยงปรับสภาพให้คุ้นกับสิ่งแวดล้อมใหม่ในห้องปฏิบัติการจนถึงช่วงอายุ P_{20} เลี้ยงด้วยไรน้ำเค็มโดยให้กินวันละ 2 ครั้ง

1.2 กุ้งกุลาดำ อายุประมาณ 60 วันจากบ่อดิน นำมาเลี้ยงปรับสภาพให้คุ้นกับสิ่งแวดล้อมใหม่ในห้องปฏิบัติการ เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปชนิดเม็ด เบอร์ 1 โดยให้กินวันละ 2 ครั้ง

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

2.1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งป่วยที่มีการติดเชื้อวิบริโอ แล้วทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Purification) และพิสูจน์เชื้อ (Identification) ด้วยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้แผ่นการทดสอบเชื้อสำเร็จรูปชนิด API 20E และทดสอบคุณสมบัติการออกซิไดส์ รวมทั้งคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

2.2 เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ผสมกับเกลือ NaCl 1% และนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง

2.3 หาความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Standard Plate Count

3. การทดลองหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 50 % (Lethal concentration: LC_{50}) ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยทำการแช่ลูกกุ้ง P_{20} จำนวน 4 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 45 ตัว และกุ้งปอดินอายุ 60 วัน จำนวน 5 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 15 ตัว สังเกตอาการและบันทึกการตาย

4. การเตรียมวัคซีนเชื้อตาย (killed vaccine)

4.1 นำเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จำนวน 1 loop จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาเพิ่มจำนวนใน Tryptic Soy Broth (TSB) ผสม 1 % NaCl ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง

4.2 ใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูด TSB (จากข้อ 4.1) ขึ้นมา 0.5 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA (1% NaCl) ที่เตรียมไว้ แล้วทำการกระจายเชื้อให้ทั่วทั้งแผ่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 ใช้ loop ขูดเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA (1% NaCl) ที่เตรียมไว้ทั่วทั้งแผ่น นำไปใส่ในน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) แล้วนำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวด้วยเครื่อง Mixer

4.4 นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้แบคทีเรียตกตะกอน

4.5 ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงนำตะกอนเชื้อที่ได้ไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.6 ทิ้งไว้ให้เย็น จะได้วัคซีนชนิดเชื้อตาย *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^{23} CFU/ml. นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. วิธีการให้วัคซีนโดยการแช่ (bath)

5.1 กุ้งกุลาดำอายุประมาณ 60 วัน จากปอดิน

แบ่งเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มทำ 2 ซ้ำ เลี้ยงในตู้กระจกที่มีความจุ 50 ลิตร อัตราความหนาแน่น 20 ตัวต่อน้ำ 30 ลิตร ความเค็มของน้ำ 20 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส ให้ออกซิเจนในน้ำตลอดเวลา

5.2 กุ้ง Post larva ที่ 20 (P_{20})

แบ่งเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มทำ 2 ซ้ำ เลี้ยงในตู้กระจกที่มีความจุ 50 ลิตร อัตราความหนาแน่นลูกกุ้ง 70 ตัวต่อน้ำ 10 ลิตร ความเค็มของน้ำ 20 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส ให้ออกซิเจนในน้ำตลอดเวลา

กลุ่มที่ 1 แช่กุ้งกุลาดำในวัคซีนเชื้อตายที่ความเข้มข้น 10^{9} CFU/ml. นาน 30 นาที

กลุ่มที่ 2 แช่กุ้งกุลาดำในวัคซีนเชื้อตายที่ความเข้มข้น 10^{11} CFU/ml. นาน 30 นาที

กลุ่มที่ 3 แช่กุ้งกุลาดำในวัคซีนเชื้อตายที่ความเข้มข้น 10^{13} CFU/ml. นาน 30 นาที

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุม แช่กุ้งกุลาดำในน้ำที่มีความเค็ม 20 ppt. นาน 30 นาที

6. ทำการเลี้ยงกุ้งต่อไปเป็นระยะเวลานาน 32 วัน หลังจากแช่วัคซีน โดยถ้ามีกุ้งที่ตาย จะนำ hepatopancreas มาเพาะเชื้อเพื่อทำการพิสูจน์เชื้อ

7. ควบคุมคุณภาพน้ำโดยวัดค่าความเค็ม พีเอช ออกซิเจนในน้ำ และ อุณหภูมิทุก 3 วัน ตลอดการทดลอง

8. อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง Post larva เลี้ยงด้วยไรน้ำเค็ม และอาหารลูกกุ้ง Post larva ชนิดแผ่น (Flake) ส่วนกุ้งปอดินให้อาหารชนิดเม็ด

9. การแช่เชื้อพิษกับ (challenge) ใช้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^{18} CFU/ml. ในกุ้งที่ได้รับวัคซีนแล้วทั้ง 4 กลุ่ม สังเกตดูอาการความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น และบันทึกจำนวนกุ้งที่เหลือเมื่อครบ 9 วัน

หอสมุดกลาง แผนกวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

1. จากการแยกพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio parahaemolyticus* โดยใช้แผ่นทดสอบเชื้อสำเร็จรูปชนิด API 20 E ให้ผลดังตาราง

ตารางที่ 1 แสดงผลการพิสูจน์เชื้อซึ่งแยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ตายหลังแช่เชื้อพิษทับ

การทดสอบ	ผล	การทดสอบ	ผล
Gram's strain	-	TCBS Growth	G
Oxidase	+	Motile	+
Orthonitrophenyl galactose	-	Gelatinase	-
Arginine dihydrolase	-	Glucose	+
Lysine decarboxylase	+	Mannital	+
Ornithine decarboxylase	+	Inositol	-
Citrate utilization	+	Sorbital	-
H_2S Production	-	Rhamnose	-
Urease	-	Sucrose	-
Tryptophane Desaminase	-	Melibiose	-
Indole production	+	Amygdalin	-
Acetoin production	-	Arabinose	+

หมายเหตุ - negative

\+ positive

G สีเขียว

2. ผลการหา Lethal concentration 50 (LC_{50}) ที่ระยะเวลา 96ชั่วโมง เมื่อนำกุ้ง Post larva ที่ 20(P_{20}) และกุ้งปอดินอายุ 60 วัน มาแช่ในน้ำที่มีระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ต่าง ๆ

ตารางที่ 2 แสดงผลการหาค่า LC_{50} ในกุ้งปอดินและกุ้ง Post larva ที่ 20

ก. กุ้งปอดิน อายุ 60 วัน

ความเข้มข้นเชื้อ CFU/ml	จำนวนกุ้งทดลอง (ตัว)	จำนวนกุ้งที่ตาย (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
10^{18}	15	6	40
10^{16}	15	6	40
10^{14}	15	6	40
10^{12}	15	3	20
control	15	2	13

ข. กุ้ง Post larva ที่ 20

ความเข้มข้นเชื้อ CFU/ml	จำนวนกุ้งทดลอง (ตัว)	จำนวนกุ้งที่ตาย (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
10^{18}	45	43	95
10^{16}	45	40	89
10^{14}	45	42	93
10^{12}	45	25	55
control	45	42	93

I 20122500

3. ผลการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตาย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุม ในกุ้งปอดินอายุประมาณ 60 วัน และกุ้งกุลาดำช่อง Post larva ที่ 20 (P_{20}) ในช่วงระยะเวลาที่เลี้ยงนาน 32 วัน

ตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายต่ออัตรารอดของกุ้งกุลาดำ

กลุ่มทดลอง	กุ้งปอดิน								กุ้ง Post larva 20							
	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	B_2	B_3	B_5	C_1	C_2	C_3	C_5	D_1	D_3	D_3	D_5
1. จำนวนกุ้งทดลอง (ตัว)	20	20	20	20	20	20	20	20	70	70	70	70	70	70	70	70
2. จำนวนกุ้งที่รอด (ตัว) หลังจากเลี้ยงนาน 32วัน	19	14	16	14	15	16	3	13	18	15	17	14	8	0	0	24
3. อัตราการรอด (%)	95	70	80	70	75	80	15	65	26	21	24	20	11	0	0	34
4. จำนวนกุ้งทดลอง (ตัว)หลังแช่เชื้อวิบริโอ*	13	13	13	13	13	13	13	13	20	20	20	20	-	-	-	-
5. จำนวนกุ้งที่รอด (ตัว)ภายหลังแช่เชื้อวิบริโอนาน 9 วัน	13	11	12	11	13	10	13	12	19	19	18	20	-	-	-	-
6. อัตรารอด (%)	100	85	92	85	100	77	100	92	95	95	90	100	-	-	-	-

หมายเหตุ

A_1, B_1 = คือ กุ้งปอดินที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายโดยการแช่ (bath) ระดับความเข้มข้น 10^9 CFU/ml. นาน 30 นาที

A_2, B_2 = คือ กุ้งปอดินที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายโดยการแช่ (bath) ระดับความเข้มข้น 10^{11} CFU/ml. นาน 30 นาที

A_3, B_3 = คือ กุ้งปอดินที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายโดยการแช่ (bath) ระดับความเข้มข้น 10^{13} CFU/ml. นาน 30 นาที

A_4, B_4 = กลุ่มควบคุม กุ้งปอดินแช่ในน้ำทะเล ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน นาน 30 นาที

C_1, D_1 = คือ กุ้ง P_{20} ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายโดยการแช่ (bath) ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 CFU/ml. นาน 30 นาที

C_2, D_2 = คือ กุ้ง P_{20} ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายโดยการแช่ (bath) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{11} CFU/ml. นาน 30 นาที

C_3, D_3 = คือ กุ้ง P_{20} ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายโดยการแช่ (bath) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{13} CFU/ml. นาน 30 นาที

C_4, D_4 = กลุ่มควบคุมกุ้ง P_{20} ที่แช่ในน้ำทะเล ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน นาน 30 นาที

* เชื้อที่ใช้แช่กุ้ง ระดับความเข้มข้น 10^{18} CFU/ml นานเป็นระยะเวลา ๑ วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งปอดิน ระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน ในช่วงเวลานาน 32 วัน

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของกุ้งปอดินกลุ่มที่ได้รับวัคซีนกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน

กลุ่มทดลอง	กุ้งปอดิน ~ 60 วัน							
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	35	45	40	30	50	40	35	45
จำนวนกุ้งปอดินเริ่มต้น (ตัว)	20	20	20	20	20	20	20	20
น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (กรัม/ตัว)	1.75	2.25	2.0	1.5	2.5	2.0	1.75	2.25
น้ำหนักสุดท้ายเลี้ยงนาน 32 วัน (กรัม)	37.5	32.5	30	30	30	30	6	42.5
จำนวนกุ้งปอดินที่เหลือรอด (ตัว)	19	14	15	12	12	14	3	14
น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (กรัม/ตัว)	1.97	2.32	2.0	2.50	2.50	2.14	2.0	3.04
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัว (กรัม)	0.2	0.07	0	1.0	0	0.14	0.25	0.79

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

จากตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตาย *Vibrio parahaemolyticus* อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยการแช่ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเลี้ยงเป็นเวลา 32 วัน พบว่าในกุ้งปอดินอายุ 60 วัน ที่ได้รับวัคซีนในระดับความเข้มข้น $10^9, 10^{11}, 10^{13}$ CFU/ml และกลุ่มควบคุม มีอัตราการรอดชีวิต 95 %, 70 %, 80 % และ 70 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ส่วนในกุ้ง Postlarva นั้น กุ้งที่ได้รับวัคซีนในระดับความเข้มข้น 10^9, 10^{11} , 10^{13} CFU/ml. และกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิต 26 % , 21 % , 24 % และ 20 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากนั้นทำการแช่เชื้อซ้ำด้วยเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่รุนแรงในระดับความเข้มข้น 10^{18} CFU/ml ในทุกกลุ่มการทดลองเป็นเวลา 7 วัน พบว่าในกุ้งปอดินอายุที่ได้รับวัคซีนในระดับความเข้มข้น $10^9, 10^{11}, 10^{13}$ CFU/ml และกลุ่มควบคุม มีอัตราการรอดชีวิต 100 %, 85 %, 92 % และ 85 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ส่วนในกุ้ง postlarvar นั้น กุ้งที่ได้รับวัคซีนในระดับความเข้มข้น 10^9, $10^{11}, 10^{13}$ CFU/ml และกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิต 95 %, 95 %, 90 % และ 100 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งปอดิน โดยดูจากน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในแต่ละกลุ่มที่เพิ่มขึ้นภายหลังได้รับวัคซีน พบว่ากุ้งปอดินกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัวมากกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคควบรโอซสในกุ้งกุลาดำที่เตรียมจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อผลิตเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย แล้วนำไปใช้โดยการแช่เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วนำไปเลี้ยงนาน 32 วัน ผลปรากฏว่า

-อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ได้รับการแช่วัคซีนและกลุ่มควบคุมให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และไม่แตกต่างกันในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนในระดับต่าง ๆ กันด้วย

–อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำภายหลังการแช่เชื้อไวรัส ในกลุ่มที่ได้รับการแช่วัคซีนและกลุ่มควบคุมให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และไม่แตกต่างกันในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนในระดับต่าง ๆ กันด้วย ทั้งนี้จากการสังเกตเป็นเวลา ๑ วัน

–อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งปอดที่ไม่ได้รับการแช่วัคซีน จะมีการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัวมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการแช่วัคซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์

เป็นที่น่าสังเกตว่าในการหาค่า Lethal Concentration 50 (LC_{50}) ในกุ้ง Postlarva ที่ 20 (P_{20}) และกุ้งปอดินนั้น ไม่สามารถหาค่าได้อย่างชัดเจน โดยเห็นว่ากุ้งปอดินมีอัตราการตายสูงสุดเพียง 40 เปอร์เซนต์ ทั้งที่อาจใส่เชื้อแบคทีเรียและกุ้งปอดินมีสุขภาพแข็งแรง อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ดี และปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio parahaemolyticus* ที่สามารถเตรียมได้สูงสุด คือ 10^{18} CFU/ml. ซึ่งอาจไม่มากพอที่จะทำให้กุ้งเกิดการติดเชื้อ เพราะตามธรรมชาติเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio* spp. มีการติดเชื้อเป็นแบบทุติยภูมิ ซึ่งต้องอาศัยความเครียดจากสภาพแวดล้อม การเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูง การจัดการที่ไม่ดี ในขณะที่กุ้งปอดินที่ใช้ในการทดลองนั้นถูกเลี้ยงในความหนาแน่นต่ำ ได้รับอาหารและออกซิเจนเพียงพอ

ส่วนในกุ้ง Post larva ที่ 20 (P_{20}) มีอัตราการตายมีความแปรปรวนและมีอัตราการตายที่สูงมาก สาเหตุหลักน่าจะมาจากการที่กุ้งจัดอยู่ในสัตว์ตระกูล Artropod ซึ่งมีพฤติกรรมในการเข้าหาแสงในระยะวัยอ่อน (พันธิพา และคณะ, 1987) กุ้งจึงกระโดดขึ้นสู่ผิวน้ำมาติดอยู่ตามขอบตู้ และแห้งตายในที่สุด นอกจากนี้ช่วงเวลาดังกล่าวในกุ้งยังถือเป็นช่วงที่วิกฤตที่มีอัตราการสูญเสียสูงมากอยู่แล้วในการเลี้ยงปกติ

จากการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถสรุปได้ว่า วัคซีนไม่ทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ เพราะว่าบริษัท Aqua Health (เอเชีย) จำกัด ได้ทำการผลิตวัคซีนชนิด VIBROGEN-S ป้องกันการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ตัววัคซีนผลิตขึ้นจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ถูกทำให้อ่อนกำลังด้วยสารเคมีชนิดที่ไม่ส่งผลต่อกระทบต่อกุ้งและสภาพแวดล้อมในบ่อ

การให้วัคซีนในกุ้งกุลาดำทำได้โดยวิธีการต่าง ๆ ตามความเหมาะสม คือ

1) สำหรับกุ้ง Postlarva (P_{15}-P_{25}) ควรให้โดยวิธีการแช่ โดยผสมกับน้ำในความเข้มข้น 1: 300 และแช่นาน 6 ชั่วโมง

2) กุ้งปอดินควรให้โดยการผสมอาหารติดต่อกันนาน 10 วัน

3) สำหรับพ่อแม่พันธุ์ ควรใช้วิธีการฉีดเข้ากล้าม ขนาด 0.1 มิลลิลิตร/ตัว

การใช้วัคซีนทั้ง 3 วิธี พบว่าให้ผลในการป้องกันการเกิดโรควิบริโอซิสจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อที่รุนแรง โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน (ชาวกุ้ง, 2536) จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ จึงน่าคิดว่าน่าจะมีการศึกษาเพื่อพัฒนารูปแบบการใช้วัคซีนให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในสภาพการเลี้ยงจริง

เอกสารอ้างอิง

ข่าวกุ้ง 1993 (2536) การใช้วัคซีนในการจัดการฟาร์มกุ้ง 5 (56) : 2-4

พันธิพา จันทวัฒน์ ชัยยุทธ ธัญพิทยากุล และอุชุกร พฤกษ์พงษ์รัตน์ 1987 (2530) การผลิตปลาหมอเทศเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบอาหารกุ้ง *การประชุมวิชาการทรัพยากรสัตว์น้ำทางน้ำ* ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 126-153

ลิลา เรืองแป้น ยาใจ เจริญวิทยกุล และเยาวนิตย์ ดนยดล 1985 (2528) โรคและพยาธิในกุ้งทะเลของไทย ใน จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และทศพร วงศ์รัตน์(บรรณาธิการ) 2530 *ทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำ* โครงงานเผยแพร่ผลงานวิจัย โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 81

อรัญญา พลเพรชสิงห์ ปนการิกา ศิศรศักดิ์ ณ อยุธยา วัฒา เตชบุเรศา วิชิระ บุญยกาโล และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ 1990 (2533) สถานการณ์โรคกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงในปอดิน เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการ ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 3

Ahne, W., Winton, J.R. and Kimura, T. 1989. Prevention of infectious disease in Aquaculture. J.Vet.Med. 36 : 561-567.

Anderson, I.G., Shariff, M., Nash, G. and Nash, M., 1987. Mortalities of Juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* Baculovirus, Cytoplasmic Reo-like virus and Rickettsial and Bacterial infectious, from Malaysian Brackish water ponds. Asian fisheries science 1: 47-64.

Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Cruz-lacierda, E.R. and Leobert, D.P., 1990 Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* Larvae in the Philippines. Aquaculture 91 : 1-13.

Soderhall, K. and Cerenius, L. 1992 Crustacean Immunity Annual Rev. of Fish Disease. p. 3-23.

Takahashi, Y., Shimoyama, Y. and Monoyama, K. 1985 Pathogenicity and Charateristics of *Vibrio* spp. isolated from cultured Kuruma prawn *(Penaeus japonicus)* Bate. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries 51 (5) : 721-730.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2537

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย