การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

Production of Vaccine from *Vibrio harveyi* and Its Application in Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricius)

สาวิตรี ศิลาเกษ

Sawitri Silakes

050 เลขหมู่ QR189.5.B33 ส45 2541 เลขทะ... 1 มิ.ย. 2541

Order Key 15659

BIB Key 142901

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2541

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)
ผู้เขียน	นางสาวสาวิตรี ศิลาเกษ
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง นำมาทดสอบเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี และทำการผลิตวัคซีนจากเชื้อที่ได้โดยเลี้ยงในอาหารเหลว (Tryptic Soy Broth) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นรวบรวมเชื้อแล้วนำมาทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ตรวจสอบความปลอดเชื้อของวัคซีนและนำไปทำการแช่แข็งแห้งเพื่อทำเป็นวัคซีนผง นำวัคซีนที่ผลิตได้มาให้แก่กุ้งกุลาดำ 3 วิธีคือ วิธีกิน วิธีแช่และวิธีฉีด จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งในวันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน โดยทำการตรวจสอบพารามิเตอร์ 4 อย่างคือ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* การให้วัคซีนด้วยวิธีกินทำโดยผสมวัคซีนลงในอาหาร 4 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร การให้วัคซีนด้วยวิธีแช่ทำโดยเตรียมสารละลายวัคซีนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และนำวัคซีนมาเจือจางกับน้ำทะเลในอัตราส่วน 1:250 จากนั้นแช่กุ้งกุลาดำเป็นเวลา 5 ชั่วโมงและหลังจากแช่วัคซีนครั้งแรก 14 วันจึงทำการแช่วัคซีนในระดับความเข้มข้นเดิมอีกครั้ง ส่วนวิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดทำโดยฉีดสารละลายวัคซีนเข้มข้น 2 ระดับคือ 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยจะฉีดเข้าไปที่บริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องที่ 6 ในปริมาณตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

การให้วัคซีนด้วยวิธีการให้กินและวิธีการแช่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งที่ได้รับวัคซีนให้เพิ่มมากขึ้นได้เช่น ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำ

เลือด และความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* แต่ พบว่า RPS (relative percent survival) ของการให้วัคซีนด้วยวิธีการให้กินและวิธีการแช่มีค่าต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการให้กินและวิธีการแช่วัคซีนมีประสิทธิภาพต่ำในการป้องกันการติดเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการกินไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างการผสมวัคซีนลงในอาหารที่ระดับ 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดพบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น ปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด และความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยพบว่าค่า RPS ของการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์มีค่ามากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างการให้วัคซีนเข้มข้น 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด ส่วนวิธีการให้กินและวิธีแช่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในระดับที่ใกล้เคียงกัน

Thesis Title	Production of Vaccine from *Vibrio harveyi* and Its Application in Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricius)
Author	Miss Sawitri Silakes
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	1997

Abstract

The luminescent bacterium *Vibrio harveyi* was isolated from infected black tiger prawns and identified biochemically. The bacterium was incubated at room temperature for 24 hours in Tryptic Soy Broth. The cells were then killed by ultrasonic homoginization. The sterility of the vaccine was confirmed by culturing on Tryptic Soy Agar. The vaccine was then lyophilized and preserved dry.

The vaccine was administered to the black tiger prawns using three methods; oral, immersion and injection. Blood was collected from black tiger prawns at 10, 20 and 30 days post vaccination. It was analyzed for phenoloxidase activity, superoxide anion production, bacterial clearance from haemolymph and disease resistance against *V. harveyi*. Oral administration was with the dry vaccine mixed with feed at 0, 0.1, 0.5 and 1 % of the total weight of the feed. The immersion solution was prepared by diluting 2.5% vaccine solution to 1:250 (vaccine : seawater). Prawns were immersed in the dilute solution for five hours. The treatment was repeated 14 days after the first immersion. For injection, prawns were injected intramuscularly with 0.1 ml of 0.1 or 0.25% of the vaccine solution in sixth abdominal segment.

These methods produced positive results in clearing bacteria from the haemolymph, and in disease resistance against *V. harveyi*. The overall survival

(RPS) was less than 60%, leading to the conclusion that vaccine administered by either oral or immersion methods has a low protection factor for black tiger prawn. In the oral trial, there was no significant differences among the 0.1, 0.5 and 1% vaccine added to the feed.

However, vaccine administered by injection show markedly high protection against disease. It enhanced the activities in the immune response such as production of superoxide anion, clearance of bacteria from the haemolymph and in disease resistance. There was overall 60% RPS in the 0.1 and 0.25% vaccine solution trials, with no significant differences between the two.

It was therefore concluded that the injection method was superior to the oral or immersion methods.