ผลการทดลอง

การเก็บและแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดลองสามารถทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งที่เกิดโรคในบริเวณภาคใต้ได้จากแหล่งต่างๆ ดังผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยลักษณะทั่วไปของกุ้งที่ทำการแยกเชื้อจะมีลักษณะสีตัวเข้ม ตัวหลวม กรอบแกรบ ระยางค์ส่วนต่างๆ เช่นแพนหาง หนวด ขาว่ายน้ำ กร่อนและมีบาดแผลสีดำบนผิวหุ้มลำตัวและเหงือก เมื่อทำการเปิดส่วนของแผ่นปิดหัวออกพบลักษณะของตับกุ้งใส ฝ่อและลีบแข็ง นอกจากนั้นในกุ้งบางตัวยังพบว่ามีน้ำขังบริเวณรอยต่อของหัวและลำตัวมากกว่าปกติ ลักษณะของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบมีลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบ ทั้งสีเหลืองและสีเขียว โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีเขียว คิดเป็น 90 เปอร์เซนต์ และโคโลนีสีเหลือง 10 เปอร์เซนต์ ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีทั้งที่เรืองแสงในที่มืด คิดเป็น 80 เปอร์เซนต์ และไม่เรืองแสง 20 เปอร์เซนต์ เชื้อทั้งหมดสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร BA ผสมเกลือ 1.5 เปอร์เซนต์ ได้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่เลี้ยงกุ้งในเขตจังหวัดภาคใต้

Isolates	Source of samples	Organ	Characteristic of colony	Luminescent	Growth on TCBS	Hemolysis
V018	Nakornsrithamarat	Hepatopancreas	S.R	N	G	H
V022	Patthalung	Hepatopancreas	S.R	N	G	H
V031	Songkhla	Hepatopancreas	S.R	L	G/Y	H
V038	Patthani	Hepatopancreas	S.R	L	G	H
V039	Satun	Hepatopancreas	S.R	L	G	H
V045	Patthani	Hepatopancreas	S.R	L	G	H
V046	Nakornsrithamarat	Hepatopancreas	S.R	L	G	H
V048	Satun	Hepatopancreas	S.R	L	G	H
V049	Songkhla	Hepatopancreas	S.R	L	G	H
V050	Patthalung	Hepatopancreas	S.R	L	G	H

Remark : S = Smooth R= Round L= Luminescent on TSA
N= Non luminescent G= Green colony
Y= Yellow colony H= Hemolysis on BA

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในตารางที่ 1 พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทุกตัวมีลักษณะทางชีวเคมีที่สามารถจัดได้เป็นแบคทีเรีย *V. harveyi* ทั้งหมดโดยคุณสมบัติทางชีวะเคมีและลักษณะทั่วไปที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มีทั้งลักษณะโคโลนีสีเหลืองและสีเขียวและมีลักษณะเรืองแสงและไม่เรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ดังรายละเอียดลักษณะทางชีวเคมีได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

Characteristics	**V002**	**V018**	**V022**	**V031**	**V039**	**V045**	**V046**	**V048**	**V049**	**V050**
Growth on TCBS	G	G	G/Y	G	G	G	G	G	G	G
Luminasecent	N	N	L	L	L	L	L	L	L	L
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motality	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduction of NO_3^- to NO_2^-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Enzyme production										
- Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trytophane desaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensitive to 0/129 (150 ug)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of										
- Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Arabinose	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
- Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 2 (ต่อ)

L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at										
0^0C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4^0C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20^0C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37^0C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40^0C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50^0C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in NaCl at										
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	-	-	-	+w	-	-	-	-	-	-
12%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identification	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh

Note : G = green. Y = yellow. L = luminescent. N = non-luminescent. + = positive.
- = negative. +/- = not clear. w = weak. Vh = *Vibrio harveyi*

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

จากผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยคือ ออกโซลินิก แอซิด (Oxolinic acid. OA) นอร์ฟล็อกซาซิน (Norfroxacin. NOR) ออกซี่เตตร้าซัยคลิน (Oxytetracyclin. OT) ไตรเมธโธพริม-ซัลฟาเมทอกซาโซน (Sulfamethoxazole trimetroprime. SXT) และ ซาราฟล็อกซาซิน (Sarafloxacin. SRF)นอกจากนั้นได้ทำการทดสอบยาคลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol. C) เพื่อศึกษาแนวโน้มการต้านต่อชนิดยาปฏิชีวนะของเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะต่างกัน (ตารางที่ 3) โดยเชื้อมีความไวต่อยาออกโซลินิก แอซิด คิดเป็น 40 เปอร์เซนต์ ไวต่อยานอร์ฟลื่อกซาซิน คิดเป็น 60 เปอร์เซนต์ ไวต่อยาออกซี่เตตร้าซัยคลิน คิดเป็น 40 เปอร์เซนต์ มีความไวต่อยาไตรเมธโธพริม-ซัลฟาเมทอกซาโซน คิดเป็น 50 เปอร์เซนต์ ไวต่อยาซาราฟลื่อกซาซิน คิดเป็น 30 เปอร์เซนต์ และมีความไวต่อยาคลอแรมฟินิคอล คิดเป็น 80 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ในช่วง

เดือนตุลาคม 2542-สิงหาคม 2543 แล้วทำการทดสอบความไวของยาชนิดต่างๆ ต่อเชื้อพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความไวต่อยาต่างกัน โดยเฉลี่ยใน ตารางที่ 5

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ ต่างๆ ต่อยาปฏิชีวนะ

Antibacterial	Sensitivity test									
	V002	V018	V022	V031	V039	V045	V046	V048	V049	V050
OA	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
NOR	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R
OT	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R
SXT	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S
SRF	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
C	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S

S= Susceptable: R= Resistant
OA = Oxolinic acid: NOR = Norfloxacin: OT = Oxytetracyclin:
SXT = Sulfamethoxazole trimetroprim: SRF = Sarafroxacin: C = Chloramphenicol

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10 สายพันธุ์ ต่อยาปฏิชีวนะ

Antibacterial	Number of Isolates			
	Tested (strain)	Sensitive (strain)	Sensitive (%)	Resistant (%)
Oxolinic acid	10	4	40	60
Norfloxacin	10	6	60	40
Oxytetracyclin	10	4	40	60
Sulfamethoxazole trimetroprim	10	5	50	50
Sarafloxacin	10	3	30	70
Chloramphenicol	10	8	80	20

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ต่อยาปฏิชีวนะ

Antibacterial	Number of Isolates			
	Tested (Isolate)	Sensitive (Isolates)	Sensitive (%)	Resistant (%)
Norfloxacin	110	72	64.45	35.55
Chloramphenicol	52	17	32.69	67.31
Oxolinic acid	110	30	27.27	72.73
Sulfamethoxazol -trimetrophrim	110	34	30.91	69.09
Oxytetracyclin	93	29	31.18	68.82
Sarafloxacin	51	11	21.57	78.43

Note: เก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งป่วย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2542-สิงหาคม 2543

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยการหาค่า LD_{50} ที่เวลา 10 วัน หลังทำการฉีดเชื้อที่ทราบความเข้มข้นจากการวัดค่าการส่องผ่านของแสงที่ OD 640 เข้าในกุ้งปกติขนาด 12-15 กรัม และทำการบันทึกผลอัตราการตายเป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วคำนวณหาค่า LD_{50} พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีค่า LD_{50} ที่แตกต่างกัน โดยมีค่า OD ตั้งแต่ 0.007-0.139 มีปริมาณความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียตั้งแต่ $1.60x10^{6}$ – $7.27x10^{7}$ CFU/มล ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซนต์ ในเวลา 10 วัน ตั้งแต่ $1.60x10^{5}$ – $7.27x10^{6}$ CFU/ 0.1 มล (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อกุ้งกุลาดำ

Isolates	OD 640	CFU/ml	LD_{50} at 10 days (CFU/animal*)
V002	0.059	$2.73x10^{7}$	$2.73x10^{6}$
V018	0.053	$4.08x10^{7}$	$4.08x10^{6}$
V022	0.136	$7.27x10^{7}$	$7.27x10^{6}$
V031	0.095	$5.00x10^{7}$	$5.00x10^{6}$
V039	0.063	$4.65x10^{7}$	$4.65x10^{6}$
V045	0.059	$1.11x10^{7}$	$1.11x10^{6}$
V046	0.081	$1.60x10^{6}$	$1.60x10^{5}$
V048	0.007	$3.79x10^{6}$	$3.79x10^{5}$
V049	0.069	$3.17x10^{7}$	$3.17x10^{6}$
V050	0.096	$4.97x10^{7}$	$4.97x10^{6}$

OD = Optical density
LD = lethal dose
* = 0.1 ml/shrimp

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลังการติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาภายในบางประการของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะมีปริมาณเม็ดเลือดต่ำกว่ากุ้งปกติแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง หลังทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย กล่าวคือที่เวลา 24 ชั่วโมงชุดควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย $3.36\pm1.30x10^{7}$ เซลล์/มล และลดลงเหลือ $2.15\pm1.03x10^{7}$ เซลล์/มล ในชุดทดลองฉีดเชื้อ และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ชุดควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย $3.52\pm1.27x10^{7}$ เซลล์/มล และลดลงเหลือ $2.33\pm1.42x10^{7}$ เซลล์/มล ในชุดทดลองโดยพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งชุดทดลองหลังจากฉีดเชื้อ 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 7)

ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อมีค่าสูงกว่ากุ้งปกติ โดยชุดควบคุมมีค่า 7.62±0.17 ชุดทดลองมีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือด 7.89±0.14 หลังจากฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์พบมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) และเมื่อทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งกุลาดำที่ฉีดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดก็พบว่ายังมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยพบว่าในชุดควบคุมยังคงมีความเป็นกรด-ด่างในน้ำเลือดต่ำกว่าชุดทดลอง กล่าวคือในชุดควบคุมมีค่า 7.23±0.30 และในชุดทดลองมีค่า 7.68 ±0.22 ปริมาณน้ำตาลในน้ำเลือดพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียมีค่าไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุม ($p>0.05$) ทั้งชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อนาน 24 และ 48 ชั่วโมง โดยในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ ปริมาณน้ำตาลในน้ำเลือดมีค่า 24.55±9.0 มก เปอร์เซนต์ ขณะที่ชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ย 23.14±9.05 มก เปอร์เซนต์ ส่วนเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง มีค่า 25.58±4.79 มก เปอร์เซนต์ และ 26.13±9.43 มก เปอร์เซนต์ ในชุดทดลองและชุดควบคุมตามลำดับ ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรัม พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อ 24 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนในซีรัมลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม กล่าวคือชุดควบคุมมีค่า 29.20±5.28 ก เปอร์เซนต์ และชุดลองมีปริมาณโปรตีนในซีรัม 22.63±7.58 ก เปอร์เซนต์ เมื่อทำการวิเคราะห์พบมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 48 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนในซีรัมของกุ้งติดเชื้อมีค่าสูงขึ้นใกล้เคียงกับกุ้งปกติคือมีค่า 28.32±6.84 ก เปอร์เซนต์ และ 28.52±9.38 ก เปอร์เซนต์ ในชุดทดลองและชุดควบคุมตามลำดับ นอกจากนี้การทดลองหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ของเม็ดเลือดกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่ากุ้งที่ถูกฉีดเชื้อนาน 24 ชั่วโมง มีค่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ของเม็ดเลือด 469.66±412.68 หน่วย นาที มก โปรตีน สูงกว่าชุดควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ ที่มีค่า 298.25±174.26 หน่วย นาที มก โปรตีน อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบมีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เมื่อทำการวิเคราะห์หาความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือด ในทั้ง 2 ชุดการทดลองหลังจากฉีดเชื้อนาน 48 ชั่วโมง พบมีค่าใกล้เคียงกันคือชุดควบคุมมีค่า 195.35±58.45 หน่วย นาที มก โปรตีน และชุดทดลองมีค่าเฉลี่ย 188.76±67.27 หน่วย นาที มก โปรตีน ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน ($p>0.05$) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบเลือดของกุ้งกุลาดำหลังทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียนาน 24 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Parameters	24 hr post injection*		48 hr post injection*	
	Control	Treatment	Control	Treatment
THC (x 10^7 cell/mm^3)	3.36±1.30[a]	2.15±1.03[b]	3.52±1.27[a]	2.33±1.42[b]
Blood pH	7.68±0.22[a]	7.89±0.14[b]	7.62±0.17[a]	7.89±0.14[b]
Blood glucose (mg %)	23.14±9.05[a]	24.55±9.0[a]	25.58±4.79[a]	26.13±9.43[a]
Serum protein (g %)	29.20±5.28[a]	22.63±7.58[b]	28.52±9.38[a]	28.32±6.84[a]
PO activity (unit/ min/ mg protein)	298.25±174.26[a]	469.66±412.68[a]	195.35±58.45[a]	188.76±67.27[a]

Means±SD in the same row with sharing the common superscript are not statistically different ($p>0.05$)
* n=20

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำปกติในชุดควบคุม (ภาพที่ 1) กับชุดติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่าหลังการฉีดเชื้อแบคทีเรียนาน 24-48 ชั่วโมง ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อมากนัก พบมีการลอกหลุดของ tubular epithelium บ้าง และเนื้อเยื่อตับบางส่วนยังปกติ (ภาพที่ 2) ส่วนในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อพบการเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอมของเซลล์จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocyte) เมื่อกุ้งติดเชื้อนานขึ้น (7 วัน) พบว่าการติดเชื้อแบคทีเรียมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดคือภายในท่อตับ ต่อมน้ำเหลือง บริเวณซี่เหงือก แอ่งเลือด อวัยวะสร้างเม็ดเลือด บริเวณโคนขา เกิดการบวมพองของ lumen ภายในท่อตับและต่อมน้ำเหลืองพบเซลล์บางส่วนถูกทำลายหลุดเป็นเศษเซลล์ มีเม็ดเลือดแทรกตัว (hemocytic infiltration) เข้าสู่ช่องว่างระหว่างตับท่อตับ และห้อมล้อมส่วนที่ติดเชื้อจนมีลักษณะเป็น granulomatous ซึ่งเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 3) หลังจากกุ้งติดเชื้อนานในลักษณะเรื้อรัง (14 วัน) พบว่าเซลล์ภายในท่อตับทั้งหมดถูกทำลายเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า hepatopancreatic tubular necrosis มีการสลายของท่อตับอย่างรุนแรง (tubular degeneration) และมีการขยายตัวของช่องว่างระหว่างท่อตับมากขึ้น (ภาพที่ 4) ในระยะดังกล่าวพบว่ากุ้งทยอยตายอย่างต่อเนื่อง