



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลาไนล
ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

คณะผู้วิจัย

รศ.บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล
รศ.วัชรวิ คุณกิตติ
รศ.คมกริช พิมพ์ภักดี
อ. รติยา คุณเขตพิทักษ์วงศ์

สังกัด

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

“งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง”



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลาไนล
ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

คณะผู้วิจัย

รศ.บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล
รศ.วัชรီ คุณกิตติ
รศ.คมกริช พิมพ์ภักดี
อ. รติยา คุณเขตพิทักษ์วงศ์

สังกัด

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

“งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง”

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในโครงการวิจัย และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์นันทวัน บุญยประภัศร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และรองศาสตราจารย์นวลจันทร์ พารักษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำตลอดการวิจัย

ชื่อโครงการ การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลในพื้นที่ภาค
ตะวันออกเฉียงเหนือ

Development of Streptococcal vaccine in tilapia, *Oreochromis sp.*, in the
Northeast region of Thailand

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นาย บัณฑิตย เต็งเจริญกุล

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Bundit Tengjaroenkul

หน่วยงาน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภาควิชา อายุรศาสตร์

ที่อยู่ 123 ถนนมิตรภาพ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

โทรศัพท์/โทรสาร (043) 364491 E-mail: btengjar@kku.ac.th

ระยะเวลาดำเนินงาน24....เดือน

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญที่เลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออก แต่จากปัญหาการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิส และปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคในปลา ที่สามารถส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภคและอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิล ด้วยเหตุดังกล่าวจึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคและลดปัญหาจากการใช้ยาปฏิชีวนะ แม้วัคซีนในรูปการกินและการจุ่มจะมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในสภาพการเลี้ยงจริง แต่ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันโรคยังไม่สูงและได้ผลเหมือนวิธีการฉีด แต่ปัจจุบันมีรายงานถึงเทคโนโลยีการผลิตวัคซีนในรูปการกินโดยการเคลือบสารโพลีเมอร์ที่สามารถลดการทำลายของกรดในกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตามยังขาดการศึกษาวิจัยเชิงเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนที่ใช้ในแบบการกินที่เคลือบสารกับวัคซีนที่เตรียมโดยวิธีการฉีด จากเชื้อก่อโรคในประเทศไทย ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการให้วัคซีนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล จากผลการศึกษาทดลองพบว่า ปลานิลได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน มี

ค่าแอนติบอดีไทเทรตเฉลี่ยหลังการได้รับวัคซีนในครั้งแรกและครั้งที่สองมีค่าสูงกว่าการผสมอาหาร เมื่อให้เป็นเวลานาน 4, 6 และ 8 สัปดาห์ เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรค โดยการฉีดเชื้อเป็นของ *Streptococcus agalactiae* เข้าทางช่องท้องและทำการวิเคราะห์อัตราตายพบว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องมีอัตราตายต่ำที่สุด ปลาที่ฉีดวัคซีนผสมฟรอยด์แอตจูแวนท์ที่มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าการฉีดวัคซีนที่ไม่ผสมฟรอยด์แอตจูแวนท์ และปลาที่ได้รับวัคซีนแบบแช่และผสมอาหารกินอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างภูมิคุ้มกันในปลานิลวัยรุ่นโดยใช้แอตจูแวนท์ 4 ชนิด คือ ฟรอยด์คอมพลีทแอตจูแวนท์ อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันพาราฟิน ผสมในวัคซีนเชื้อตายความเข้มข้น 5×10^8 cfu/ml ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และฉีดเข้าช่องท้อง ผลการศึกษาพบว่าระดับแอนติบอดีไทเทรตวัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอตจูแวนท์ที่มีค่าสูงที่สุด แตกต่างจากน้ำมันถั่วเหลือง อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์และน้ำมันพาราฟิน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนเชื้อตายชนิดฉีดความเข้มข้น 5×10^8 cfu/ml พบว่าวัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษา 5.11 เดือนนานกว่าการเก็บที่ไม่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่มีอายุการเก็บรักษา 2.76 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในการศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิดคือ ฟรอยด์คอมพลีทแอตจูแวนท์และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ฉีดร่วมกับวัคซีน แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์และไคโตซานผสมอาหารให้กินร่วมกับการฉีดวัคซีนเชื้อตายความเข้มข้น 5×10^8 cfu/ml เข้าช่องท้องในปลานิลวัยรุ่น ผลการศึกษาพบว่าระดับแอนติบอดีไทเทรตวัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอตจูแวนท์ที่มีค่าสูงกว่าและไม่แตกต่างจากแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์และไคโตซาน ($p < 0.05$)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RDG5120003

ชื่อโครงการ : การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลในพื้นที่
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ชื่อนักวิจัย : บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล วชิร คุณกิตติ และรติยา คุณเขตพิทักษ์วงศ์

E-mail Address : btengjar@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (15 พฤษภาคม 2550 ถึง 15 พฤษภาคม 2552)

โครงการนี้มีการพัฒนาประสิทธิภาพการให้วัคซีนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากผลการศึกษาทดลองพบว่า ปลานิลได้รับวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจากเชื้อก่อโรครุนแรงในปลาในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน ระดับแอนติบอดีโตเตอร์เฉลี่ยหลังการได้รับวัคซีนมีค่าเท่ากับ 244.62 ซึ่งสูงกว่าการผสมอาหารนาน 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ที่มีค่าแอนติบอดีโตเตอร์เฉลี่ย 3.64, 4.27 และ 4.71 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรค โดยการฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* เข้าทางช่องท้องและทำการวิเคราะห์อัตราตายพบว่า ปลานิลกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องมีอัตราตายต่ำที่สุด จากการพัฒนาวัคซีนเชื้อตายชนิดกินที่ไม่ใช้สารเคลือบที่ความเข้มข้น 5×10^9 cfu/ml และเปรียบเทียบการสร้างภูมิคุ้มกันกับปลาได้รับวัคซีนชนิดฉีดและพบว่า ค่าแอนติบอดีโตเตอร์ของปลาที่ฉีดวัคซีนผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเกิน 2,048 รองลงมาคือปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นขนาด 10^6 cfu/ml มีค่าเฉลี่ย 497 เมื่อทดสอบความต้านทานโรคโดยการฉีดเชื้อเป็นของเชื้อ *S. agalactiae* เข้าช่องท้องของปลาที่ได้รับวัคซีนทั้ง 3 ชนิดพบว่า ปลานิลกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีอัตราตายเป็น 0 รองลงมาคือเชื้อเป็นขนาด 10^6 cfu/ml 2 ครั้งมีอัตราตายสะสมต่ำกว่า 4.60% ซึ่งแตกต่างจากปลาที่ได้รับวัคซีนแบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันในปลานิลขนาดวัยรุ่นและโตเต็มวัยที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายขนาด 10^8 cfu/ml ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ฉีดเข้าช่องท้องในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน ผลการศึกษาพบว่า ระดับแอนติบอดีโตเตอร์ของปลาโตเต็มวัยมีค่าสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากปลาวัยรุ่น ($p < 0.05$) จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันในปลานิลวัยรุ่นโดยใช้แอดจูแวนท์ 4 ชนิดคือ ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันพาราฟินผสมในวัคซีนเชื้อตายความเข้มข้น 5×10^8 cfu/ml ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และฉีดเข้าช่องท้อง ผลการศึกษาพบว่าระดับแอนติบอดีโตเตอร์วัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีค่าสูงที่สุดที่ 496 แตกต่างจากชนิดอื่น

อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) น้ำมันถั่วเหลืองและอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์มีค่า ไตเตอร์ 178 และ 165 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากวัคซีนผสมน้ำมันพาราฟินที่มีค่า 104 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนเชื้อตายความเข้มข้น 5×10^8 cfu/ml ที่เก็บ 2 แบบคือ 1. วัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 2. วัคซีนที่ไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนที่ทำแห้งเยือกแข็งมีอายุการเก็บรักษา 5.11 เดือนนานกว่าการเก็บที่ไม่ทำแห้งเยือกแข็งที่มีอายุการเก็บรักษา 2.76 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในการศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิดคือ พรอยด์คอมพลีท แอดจูแวนท์และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ฉีดร่วมกับวัคซีน โคตินโคโตซานและแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ผสมอาหารให้กินร่วมกับการฉีดวัคซีนเชื้อตายเข้าช่องท้อง ในปลานิลวัยรุ่น ผลการศึกษาพบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์วัคซีนผสมพรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีค่าสูงที่สุดและสูงกว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ แต่ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่สารทั้งสองแตกต่างจากอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์และโคโตซานอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

คำสำคัญ : วัคซีน แบคทีเรีย สเตรปโตคอคโคซิส สเตรปโตคอคคัส สารกระตุ้นภูมิ ปลานิล

Abstract

Project Code : RDG51200013

Project Title : Development of Streptococcal vaccine in tilapia, *Oreochromis sp.*, in the
Northeast region of Thailand

Investigators : Bundit Tengjaroenkul, Watcharee Khunkitti and Thanee Tedsiri

Project Period : 2 Years (15 November 2007- 15 December 2009)

The main purpose of the project was to develop vaccine for preventing streptococcosis in tilapia fish in the Northeast region of Thailand

. From the experiment, killed vaccine prepared from most virulent strain of *S. agalactiae* in Northeast region of Thailand. The vaccine was injected intra-peritonally and fed orally to juvenile tilapia. Antibody titer of the injected fish was 244.62, whereas of the fed fish for 4, 6 and 8 weeks were 3.69, 4.36 and 5.42, respectively. After did challenge test, the injected fish had the highest survival rate as compared among fish groups.

As compared for immune production of oral vaccine without coating agent at concentration of 5×10^9 cell/ml to injected and immersion vaccines, the result demonstrated that the titers of fish injected with vaccine mixed with Freud's complete adjuvant (FCA) at ratio 1:1 had the highest antibody level, followed by that of injected with the live bacterial vaccine at concentration of 10^6 cfu/ml. And also after the challenge test, the fish injected with FCA vaccine significantly showed the greatest survival than of other fish groups ($p < 0.05$).

Furthermore, Adult tilapia injected with FCA vaccine significantly presented the greater antibody titer than of the juvenile fish ($p < 0.05$). For the study on immune response of the streptococcal vaccine (5×10^8 cell/ml) mixed with 4 different adjuvants: FCA, aluminum hydroxide, soybean oil and liquid paraffine oil at ratio 1:1 in juvenile tilapia was conducted. The result demonstrated that the FCA vaccine had the highest antibody titer, and statistically different from all other treatments ($p < 0.05$). Stability test of 2 different preparations and storages at temperature 4 degree celcius of streptococcal vaccine (freeze dryer and refrigerated vaccines) was evaluated. From pharmacological calculation, antibody titer level of the freeze dryer vaccine at

temperature 4 degree celcius could be kepted for 5.11 months, and, the refrigerated vaccine should be stored at 4 degree celcius for 2.76 months ($p<0.05$).

In addition, four kinds of immunostimulants: FCA, aluminum hydroxide, mannan oligosaccharide and chitosan were involved with the injection vaccine. At the end of experiment, FCA injected fish presented the greatest antibody titer, but not statistically different than of the oligosaccharide fed fish ($p>0.05$). However, the FCA vaccine demonstrated statistically different from the aluminum hydroxide injected fish as well as the chitosan fed fish ($p<0.05$).

The results of all experiments in the project suggested that FCA adjuvant adding in injected streptococcal vaccine is likely the most efficient way for the disease prevention in tilapia fish. Moreover, mannan oligosaccharide coated on feed following intra-peritoneal injection of the vaccine can also improve immunity against streptococcus infection to satisfactory level.

Keywords : Vaccine, Immunostimulant, Bacteria, Streptococcosis, Streptococcus, Vaccine

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีวิจัย	
1. การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิส	7
2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารเคลือบวัคซีนชนิดกินในปลาไนล	
2.1 การพัฒนาอนุภาคสารเคลือบวัคซีนชนิดกิน	9
2.2 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกิน	11
2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกินแบบเคลือบ	12
3. ศึกษาประสิทธิภาพแอดจูแวนต์ในวัคซีนชนิดฉีด	
3.1 การศึกษาประสิทธิภาพฟรอยด์แอดจูแวนต์ผสมในวัคซีนชนิดฉีด	14
3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพแอดจูแวนท์ 4 ชนิดผสมในวัคซีนชนิดฉีด	16
4. การศึกษาประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมกับการฉีดวัคซีน	18
5. การศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนชนิดฉีด	20
6. การประเมินค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีน	22
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
1. การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิส	22
2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารเคลือบวัคซีนชนิดกินในปลาไนล	
2.1 การพัฒนาอนุภาคสารเคลือบวัคซีนชนิดกิน	34
2.2 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกิน	37
2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกินแบบเคลือบ	38
3. ศึกษาประสิทธิภาพแอดจูแวนต์ในวัคซีนชนิดฉีด	
3.1 การศึกษาประสิทธิภาพฟรอยด์แอดจูแวนต์ผสมในวัคซีนชนิดฉีด	59
3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพแอดจูแวนท์ 4 ชนิดผสมในวัคซีนชนิดฉีด	61
4. การศึกษาประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมกับการฉีดวัคซีน	66
5. การศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนชนิดฉีด	75
6. การประเมินค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีน	83
สรุปผลการทดลอง	84
เอกสารอ้างอิง	85

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิล หลังได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง	26
ตารางที่ 2 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล หลังการได้รับวัคซีนผสมอาหาร	26
ตารางที่ 3 ค่าอัตราการตายเฉลี่ยของปลานิล หลังการให้วัคซีนแบบฉีดและผสมอาหาร	26
ตารางที่ 4 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ภายใน 1 วัน	44
ตารางที่ 5 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ภายใน 1 วัน	44
ตารางที่ 6 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ภายใน 1 วัน	45
ตารางที่ 7 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ในวันเดียวกัน และระหว่างวัน	45
ตารางที่ 8 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ในวันเดียวกัน และระหว่างวัน	45
ตารางที่ 9 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ในวันเดียวกัน และระหว่างวัน	46
ตารางที่ 10 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ระหว่างวัน	46
ตารางที่ 11 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เชื้อเชื้อสเตรปโตคอคคัสด้วยเทคนิค HPLC	47
ตารางที่ 12 ส่วนประกอบในตำรับที่ใช้ศึกษาปัจจัยก่อนตั้งตำรับ	47
ตารางที่ 13 ส่วนประกอบในตำรับที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยของเอทิลเซลลูโลส และไดบิวทิลซีบาเคต	48
ตารางที่ 14 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิล ภายหลังจากได้รับวัคซีนเชื้อตายเชื้อออลจีเนตผสมอาหารนาน 4 และ 6 สัปดาห์	48
ตารางที่ 15 แผนการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนแบบฉีด แซ่ และกิน	49
ตารางที่ 16 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิล ภายหลังจากได้รับวัคซีนทั้งแบบฉีด แซ่ และกินผสมอาหาร	50
ตารางที่ 17 แสดงค่าอัตราการตายเฉลี่ยของปลานิล ภายหลังจากได้รับวัคซีน	51
ตารางที่ 18 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิลวัยรุ่นและโตเต็มวัย หลังการได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผสมและไม่ผสมฟรอยด์คอมพลิทแอดจูแวนท์	65
ตารางที่ 19 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิลวัยรุ่น หลังการได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผสมแอดจูแวนท์ 4 ชนิด	71
ตารางที่ 20 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิลภายหลังจากได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับวัคซีน	71
ตารางที่ 21 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อเริ่มศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีน	76
ตารางที่ 22 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อได้รับวัคซีนที่เก็บรักษา 1 เดือน	76
ตารางที่ 23 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อได้รับวัคซีนที่เก็บรักษา 2 เดือน	77
ตารางที่ 24 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อได้รับวัคซีนที่เก็บรักษา 3 เดือน	77

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงอาการป่วยของปลานิลจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส	27
รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างรอยโรคของปลานิลป่วยจากเชื้อสเตรปโตคอคคโคซิส	28
รูปที่ 3 แสดงโคโลนีเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกได้จากปลาป่วย	29
รูปที่ 4 แสดงการเจาะและเก็บเลือดจากปลานิล หลังได้รับวัคซีน	30
รูปที่ 5 แสดงการตรวจหาระดับแอนติบอดีไคเตอร์จากซีรัมปลานิล	31
รูปที่ 6 แสดงผลการตรวจแอนติบอดีไคเตอร์ที่มีการตกตะกอน และที่จับกลุ่ม	32
รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจแอนติบอดีไคเตอร์ที่มีการตกตะกอน และที่จับกลุ่ม	33
รูปที่ 8 วัคซีนชนิดกินที่เตรียมจากสารเคลือบ 3 ชนิดคือ เจลาติน อัลจิเนต และอัลจิเนตเคลือบเอซิลเซลลูโลส	52
รูปที่ 9 ฟรอยด์คอมพลีท์แอดจูแวนท์	53
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของเชื้อสเตรปโตคอคคัส	54
รูปที่ 11 ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคขนาดเล็ก เวลาแก้อิมัลชัน 5 นาที	55
รูปที่ 12 ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคขนาดเล็ก เวลาแก้อิมัลชัน 7 นาที	55
รูปที่ 13 ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคขนาดเล็ก เวลาแก้อิมัลชัน 10 นาที	56
รูปที่ 14 อนุภาคไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้	57
รูปที่ 15 อนุภาคของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่อยู่บนผิวของอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิล	57
รูปที่ 16 รอยโรคของปลา ภายหลังการฉีดเชื้อเป็นสเตรปโตคอคคโคซิสเข้าช่องท้อง	58
รูปที่ 17 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์และอะลูมินัมไฮดรอกไซด์	72
รูปที่ 18 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ และ โคโตซาน	73
รูปที่ 19 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิดในปลานิล	74
รูปที่ 20 วัคซีนที่ผ่าน (A) และไม่ผ่าน(B) การทำแช่แข็งแบบแห้ง	78
รูปที่ 21 วัคซีนที่ผ่านการทำแช่แข็งแบบแห้ง	78
รูปที่ 22 เครื่องแช่แข็งแบบแห้ง	79
รูปที่ 23 กราฟแสดงความคงตัวของวัคซีนเชื้อตาย <i>S. agalactiae</i> ที่เก็บไว้ 3 เดือน	80
รูปที่ 24 แสดงลักษณะภายนอกที่ผิดปกติของแบคทีเรีย <i>S. agalactiae</i> ในวัคซีนที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน	81
รูปที่ 25 แสดงลักษณะภายนอกที่ผิดปกติของแบคทีเรีย <i>S. agalactiae</i> ในวัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน	82

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญที่เลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออก ในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลได้ถึง 203,100 เมตริกตัน มูลค่าประมาณ 6,298.5 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วน 30.6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณผลผลิตรวมของปลาน้ำจืดของไทย (สถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2547, 2549) และในปี พ.ศ. 2545 ประเทศไทยส่งออกปลานิลไปสหรัฐอเมริกาปริมาณกว่า 1,050 เมตริกตัน ด้วยมูลค่า 165 ล้านบาท (Fitzsimmons, 2003) ในอนาคตยังได้มีการคาดการณ์ถึงการเพิ่มอย่างต่อเนื่องของปริมาณการผลิตและการบริโภคของปลานิลทั้งภายในประเทศและของโลก

ปัจจุบันการเลี้ยงปลานิลได้มีการพัฒนาไปในเชิงพาณิชย์ มีการปรับการเลี้ยงไปเป็นแบบพัฒนา โดยเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง แม้มีการจัดการที่ดีแต่เกษตรกรมักประสบปัญหาความสูญเสียจากการป่วยตายเนื่องจากโรค โดยเฉพาะโรคสเตรปโตคอคโคซิส เมื่อเกษตรกรยังไม่ทราบผลการตรวจวินิจฉัยถึงสาเหตุของโรคก็มักใช้ยาปฏิชีวนะ แต่เมื่อไม่ได้ผลก็ต้องจับปลาขายทำให้เกิดปัญหาขาดกำไรในปลา ปัญหาการติดเชื้อ (Barticados and Padihare, 1992; Herwing et al., 1997; Rahim et al., 1998) รวมถึงปัญหาการส่งออกไปยังต่างประเทศ และจากปัญหาในข้างต้นที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีความพยายามที่จะนำวัคซีนมาใช้ป้องกันโรค การศึกษาการให้วัคซีนกับปลาในเขตอบอุ่นนั้น Lida et al. (1981) ได้ทดลองให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. iniae* ซึ่งฆ่าด้วยฟอร์มาลินแก่ปลา yellow tail (*S. quinquerediata*) เพื่อควบคุมโรคสเตรปโตคอคโคซิส พบว่าวิธีการให้วัคซีนแบบฉีดให้ผลในการต้านทานโรคดีกว่าการผสมอาหาร Klesius et al. (2000) ศึกษาการเตรียมวัคซีนเชื้อตายโดยใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการติดเชื้อ *S. iniae* ในปลานิล (*O. niloticus*) พบว่าปลามีความต้านทานต่อโรคสเตรปโตคอคโคซิส 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ทั้งในปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องและการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ Surendra (2002) ได้ศึกษาการให้วัคซีนเชื้อตายซึ่งเตรียมจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าการให้วัคซีนเชื้อตายเฉพาะครั้งที่สองเท่านั้นที่มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์สูง และปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดตายสูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน Eldar et al. (1995) ได้ทดลองการให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสซึ่งฆ่าด้วยฟอร์มาลินในปลา rainbow trout ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าสามารถป้องกันโรคได้ดี ซึ่งปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายจากการติดเชื้อเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการให้วัคซีนผสมอาหารนั้นได้มีการพัฒนาวัคซีนที่สามารถป้องกันการถูกย่อยสลายจากน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารของปลา เช่น การทำวัคซีนแบบ encapsulation และ chitosan microcapsule (Dunn et al., 1990; Ellis, 1995; Gudding, et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการเติมสารบางอย่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน อาทิ Miyasaki et al. (1992) ได้นำ IgY (egg yolk immunoglobulin) มาเตรียมวัคซีน anti-IgY *Edwardsiella tarda* เพื่อป้องกันการเกิดโรคในปลาไหลญี่ปุ่น การให้วัคซีนโดยการผสมอาหารมีรายงานในปลาชนิดอื่นๆ อีก ซึ่งประสบผลสำเร็จพอสมควร เช่น ในประเทศฟิลิปปินส์ เมื่อให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *S. iniae* ในลูกปลานิลด้วยวิธีการแช่และผสมอาหารพบว่า ลูกปลามีอัตราการตายเพียง 10-15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 1 เดือนแรกของการเลี้ยง (Clark et al., 2003)

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immuno-stimulant) หลายชนิดในสัตว์น้ำ เช่น

1) แบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรีย (bacterial derivative) Clem et al. (1985) ทำการศึกษาโดยใช้ LPS (lipopolysaccharide) ของผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ B-lymphocyte และ กระตุ้นการสร้างโปรตีนคล้าย อินเตอร์ลิวคิน 1 (interleukin 1) จากเซลล์โมโนไซต์ (monocyte) ของปลากดหลวง (*Ictalurus punctatus*) และ Phillip et al. (2006) พบว่าสารที่สกัดจากเชื้อ 2 ชนิดคือ *S. iniae* และ *S. agalactiae* สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ (chemotactic activity) ของเซลล์มาโครฟาจ

2) ไคตินและไคโตซาน (chitin and chitosan) Sakai et al. (1992) รายงานว่าปลาเรนโบว์เทราท์ที่ฉีดไคติน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวปลา 1 กิโลกรัม พบว่ามีการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจและเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อ *V. anguillarum* และ Kawakami et al. (1998) ยังพบว่า ปลาหางเหลือง (yellowtail; *Seriola quinqueradiata*) ที่ฉีดด้วยไคตินสามารถเพิ่มความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. piscicida* หลังจากที่ได้รับเชื้อในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 45 วัน นอกจากนี้ Anderson et al. (1995) รายงานว่า ปลาเทราท์สายรุ้งที่ได้รับการฉีดหรือจุ่มไคโตซาน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันโรค โดยสังเกตได้จากความสามารถในการฆ่าของเซลล์ (potential killing activity) และปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินรวม (total Ig concentration)

3) กลูแคน (glucan) การใช้กลูแคนที่ได้มาจากผนังเซลล์ยีสต์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้มาก (ชนกันต์, 2545) Chen and Ainsworth (1992) รายงานว่าปลากดหลวง (*Ictalurus punctatus*) ที่ฉีดด้วยกลูแคนจากยีสต์มีปริมาณของแอนติบอดีไทเทรตสูงขึ้นและยังสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella ictaruli* ต่อมา Jenny and Anderson (1993) ทดลองใช้กลูแคนผสมอาหารให้แก่ปลาแอตแลนติกแซลมอน พบว่าในขนาดกลูแคน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าปลาดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานโรคจากการติดเชื้อ *V. anguillarum* และเชื้อ *V. salmonicida* อย่างไรก็ตามผลการทดลองใช้กลูแคนยังให้ผลที่แตกต่างกัน กล่าวคือ Thomson et al. (1995) ได้ใช้กลูแคนฉีดให้ปลาเทราท์สายรุ้ง พบว่าปลาดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. anguillarum* Richard et al., (2005) ได้ทดลองใช้เบต้ากลูแคนผสมในอาหารเลี้ยงปลานิล (*O. niloticus*) ที่ 5 ความเข้มข้นได้แก่ 0, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. iniae* กระตุ้นภูมิคุ้มกัน จากผลการทดลองก็สรุปได้ว่า ระดับของเบต้ากลูแคนไม่มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี นอกจากนี้ Lara-Folres et al. (2003) พบว่าปลานิลกินยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผสมอาหารอัตราส่วน 0.1% โดยน้ำหนักนาน 9 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตและอัตราแลกเนื้อดีกว่าการใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* และ *Streptococcus faecium* ผสมอาหารในปริมาณที่เท่ากัน ซึ่งน่าจะส่งผลทางอ้อมต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในปลาด้วย ยีสต์กลูแคนและไฮเอม-อัลจินต (mannuronic acid) พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในปลา (Bricknell and Dalmo, 2005; Skjermo et al., 2006) สารข้างต้นเข้าสู่

ร่างกายทางผนังลำไส้ ก่อนกระจายเข้าสู่ตับม้ามและไต (Vollstad et al., 2006) ในปลาคาร์พที่ได้รับโซเดียมอัลจิเนต

4) วิตามิน (vitamin) มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในเรื่องการใช้วิตามินซีผสมอาหาร เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและป้องกันโรคในสัตว์น้ำ Li and Lovell (1985) รายงานว่า ปลาสดหลวงที่ได้รับอาหารที่ผสมเป็นเวลา 13 สัปดาห์ มีอัตราการตายจากโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella tarda* น้อยลง ขณะที่ Hardie et al. (1991) กล่าวว่า การให้อาหารปลาที่มีระดับวิตามินซีสูงสามารถเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยพบว่าการทำงานของคอมพลีเมนต์ของปลามีประสิทธิภาพสูงขึ้น วิตามินอีเป็นสารอีกตัวหนึ่งที่มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา โดย Hardie et al. (1990) ได้รายงานไว้ว่าปลาแอตแลนติกแซลมอนที่ได้รับอาหารที่มีวิตามินอีไม่เพียงพอ มีอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อ *A. salmonicida* มากกว่าอาหารสำเร็จรูปปกติ Wise et al., (1993) กล่าวว่าปลาสดหลวงที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณของวิตามินอีสูง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกิน (phagocytosis) ของเม็ดเลือดขาว ต่อมา Wahli et al. (1998) ทดลองให้อาหารที่ผสมวิตามินซีและวิตามินอีให้แก่ปลาเทราท์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในอัตราส่วนวิตามินซี 2,000 พีพีเอ็ม ต่อวิตามินอีที่ระดับ 800 พีพีเอ็ม มีผลให้เม็ดเลือดขาวของปลาเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากที่มีการกระตุ้นด้วยคอนคานาวัลลิน (concanavalin) และปลามีอัตราการตายลดลงหลังจากมีการทดลองให้ปลาติดเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค VSH (viral hemorrhagic septicemia) Duncan และ Klesius (1996) ได้ทดลองใช้สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina* sp.) ขนาด 2.7 % ผสมอาหารให้ปลาสดหลวงนาน 7 วัน พบว่าปลามีการตอบสนองในส่วนของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่สูงขึ้น แต่ปริมาณแอนติบอดีไม่แตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย *E. ictaruli* Thompson et al. (1995) ศึกษาการใช้วิตามินเอร่วมกับแอสตาแซนทีน (astaxanthin) ในอาหาร เพื่อเสริมภูมิคุ้มกันแก่ปลาเทราท์สายรุ้ง ในอัตราส่วน 18 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าให้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Pilarczyk (1995) การให้วัคซีนร่วมกับน้ำมันปลา (fish oil adjuvant) ผสมในอาหารเม็ด 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลาคาร์พ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์สูงขึ้น และ Matsuyama et al. (1992) พบว่าการเสริมเบต้ากลูแคน (β -glucan) ในปลา yellowtail ทำให้ปลามีการสร้างแอนติบอดีสูงขึ้นและอัตราการรอดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังการฉีดเชื้อเป็นของ *Streptococcus* sp. เข้าช่องท้อง

5) สารสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic chemical) Olivier et al. (1985) พบว่าปลาโคโฮแซลมอนที่ฉีดด้วยลีวาไมโซล (levamisole) 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผสมกับฟรอยด์แอดจูแวนท์ (Freund's complete adjuvant) จะเพิ่มความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. salmonicida* Kajita et al. (1990) รายงานว่าปลาเทราท์สายรุ้งที่ฉีดด้วยลีวาไมโซลจะเพิ่มความสามารถในการติดเชื้อ *V. anguillarum* ได้ โดยสารดังกล่าวจะไปเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ Baba et al. (1993) รายงานว่า ปลาคาร์พที่จุ่มในลีวาไมโซล 10 ไมโครกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ได้ และเพิ่มความสามารถในการกิน

(phagocytosis) ผลของการใช้ลิควิดไมโซลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานั้นถือว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ แต่ยังคงขาดการตรวจสอบถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Sakai, 1999)

6) ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone) Kajita et al. (1992) ได้ศึกษาผลของฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต ทำการทดลองโดยการฉีดฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตให้ปลาเทราท์สายรุ้ง พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาได้โดยเฉพาะการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว และ Non-specific cytotoxic cell (NCC cell) ที่เป็นเซลล์สำคัญชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sakai (1997) ที่ได้ทดลองฉีดฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตให้กับปลาเทราท์สายรุ้งเช่นกัน พบว่าปลามีความสามารถในการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. anguillarum* ที่สูงขึ้น

แอดจูแวนท์เป็นสารผสมในวัคซีนหรือแอนติเจนเพื่อเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ และในบางกรณีมีการเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (Stewart-Tull, 1996) สามารถแบ่งได้เป็น 5 ประเภท (Maureen Dale และ Foreman, 1984; Vogel และ Powell, 1994) ดังนี้

- 1) วัณนินทรีย์ (Inorganic gel) เช่น อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ อลูมิเนียมฟอสเฟต
- 2) อิมัลชันชนิดน้ำปนในน้ำมัน (Water-in-oil emulsion) เช่น ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ (Freud's Complete Adjuvant หรือ FCA) ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้มีเนอรัลลอยด์ขาวหรือมีเนอรัลลอยด์สกัดผสมในวัคซีน ฟรอยด์อินคอมพลีทแอดจูแวนท์ (Freud's Incomplete Adjuvant หรือ FIA) ไม่นิยมใช้เพราะมักก่อให้เกิดฝีสลาย (sterile abscess) ที่ตำแหน่งฉีด และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันก็มีประสิทธิภาพต่ำกว่าฟรอยด์แอดจูแวนท์ชนิดสมบูรณ์
- 3) อนุแอดจูแวนท์ (Particle) เช่น ซาโปนิน (QS-21) อะลิฟาติกเอมีน วิตามินเอ immuno-stimulatory complexes, liposomes, biodegradable microspheres
- 4) จุลชีพ (Microbe) ซึ่งแบ่งได้ 4 ชนิด
 - 4.1 ดีเอ็นเอ เช่น CpG motifs
 - 4.2 Muramyl dipeptide (MDP) สารสังเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เลียนแบบ polymeric peptidoglycan ซึ่งในโครงสร้างจะมีน้ำตาล 1 โมเลกุลเกาะอยู่กับอะมิโนแอซิด 3 ตัวจากผนังเซลล์ของเชื้อบอเตทเทลล่าเพอทูซิส (*Bordetella pertussis*) เชื้อโคโรเนียแบคทีเรียมพารวัม (*Corynebacterium parvum*) ที่ใช้ทำวัคซีนในโรคมะเร็ง และเชื้อไมโคแบคทีเรียม (*Mycobacterium spp.*) ที่ผสมในฟรอยด์แอดจูแวนท์ชนิดสมบูรณ์ สารนี้จะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเมื่ออยู่ในรูปที่ละลายน้ำ

4.3 เอ็กโซทอกซิน (Exotoxin) เช่น *E.coli* heat-labile toxin, cholera toxin, pertussis toxin

4.4 เอ็นโดทอกซิน (Endotoxin) เช่น monophosphoryl lipid A

5) สารสังเคราะห์ ได้แก่ nonionic block copolymers, muramyl peptide analogues, polyphosphazene, synthetic polynucleotides

การทำงานของแอดจูแวนท์ (Vogel และ Powell, 1994) แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1. ช่วยยืดอายุของวัคซีนทั้งทางด้านคุณสมบัติทางชีวภาพ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในแอดจูแวนท์ชนิดอื่น เช่น ฟรอยด์อินคอมพลีทแอดจูแวนท์ (FIA) และ อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ แอดจูแวนท์จะทำให้แอนติเจนถูกปลดปล่อยอย่างช้าๆ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีระยะเวลานานขึ้น

2. เพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการเสนอแอนติเจน (antigen presenting cell, APC) ทั้งช่วงของการรับแอนติเจน เปลี่ยนแปลงแอนติเจน และนำเสนอแอนติเจนที่ผิวเซลล์แอดจูแวนท์บางชนิด เช่น MF59 ช่วยทำให้การนำเสนอแอนติเจนโดย APC ดีขึ้น เช่น เซลล์เดนดริติก (dendritic cell) และ macrophage (มาโครฟาจ) ส่วนซาโปนิน ISCOMS และ ไลโปโซมช่วยกระตุ้นลิ้มโฟไซท์ ชนิด CD8 + CTL ด้วยการนำแอนติเจนเข้าสู่ส่วนไซโตซอลของเซลล์ เพื่อการนำเสนอผ่าน MHC class I ซึ่งเป็นขบวนการที่เกิดในวัคซีนชนิดเชื้อมีชีวิตอ่อนฤทธิ์ แต่วัคซีนอื่นๆ ที่ไม่มีแอดจูแวนท์ชนิดดังกล่าว นี้ช่วยแอนติเจน เมื่อเข้าไปในเซลล์จะไม่ผ่านเอนโดโซมทำให้มีการนำเสนอแอนติเจนที่โมเลกุล MHC class II แทน

3. กระตุ้นการสร้างสารไซโตไคน์ (cytokine) ซึ่งแอดจูแวนท์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการกระตุ้นไซโตไคน์ สำหรับ Th1 (type 1) และ Th2 (type 2) ต่างกันแอดจูแวนท์ที่เพิ่มไซโตไคน์พวก IFN- γ และ delayed-type hypersensitivity (DTH) จะกระตุ้นการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันแบบ Th1 ทำให้มีแอนติบอดีชนิด IgG1 ที่เป็น complement-mediated lysis และ antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) มีการใช้ไซโตไคน์หลายชนิดเป็นแอดจูแวนท์ เช่น IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF มีการใช้ IL-12 เป็นแอดจูแวนท์กับวัคซีนเอดส์ชนิด alum-adsorbed HIV-1 gp120 พบว่ามีการกระตุ้นไซโตไคน์ Th1 IgG2 และ IgG3 ในหนูเกิดขึ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูที่ได้รับวัคซีนที่ไม่มี IL-12 นั้นจะมีไซโตไคน์ Th2 ร่วมกับ IgG1 ในแอดจูแวนท์ชนิดจากจุลชีพ เช่น cholera toxin, pertussis toxin จะกระตุ้น Th2 ทำให้มีแอนติบอดีชนิด IgA และ IgE เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นแอดจูแวนท์ชนิดที่กระตุ้น Th2 จะช่วยทำให้เกิดภูมิคุ้มกันที่ป้องกันการติดเชื้อทางเยื่อได้

โดยทั่วไปปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีน คือ

1) วิธีการให้วัคซีน การฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องมักจะทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันดีกว่า การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การแช่และการผสมอาหาร การฉีดวัคซีนครั้งเดียวกระตุ้นภูมิได้ไม่สูงเท่าการฉีดอย่างน้อย 2 ครั้ง (รัชนี และอนุกิน, 2532; Sakai et al., 1989; Matsuyama et al., 1992; Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000) เช่นเดียวกันกับการวิจัยของ Surendra (2002) ที่ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตายจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าการให้วัคซีนเชื้อตายเฉพาะครั้งที่สองเท่านั้นที่มีค่าแอนติบอดีไทเทรตสูง

2) ความเข้มข้นของวัคซีน Eldar et al. (1997) ได้ทดลองให้วัคซีนเชื้อตายแก่ปลาเทราท์สายรุ้ง พบว่าวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 3×10^{11} cfu/ml ทำให้ปลาด้านทานโรคได้ดีกว่าการให้วัคซีนในระดับที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ Klesius et al. (2000) รายงานว่า ความเข้มข้นของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ฉีดเข้าช่องท้องส่วนใหญ่มักมีค่าประมาณ 1×10^9 cfu/ml เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรัมได้ดี เช่นเดียวกับในปลานิลแดงซึ่งได้รับการฉีดวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 1×10^9 cfu/ml สามารถกระตุ้นให้ปลานิลแดงตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงเท่ากับ 1×10^8 cfu/ml (เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง และคณะ, 2546) และ 1×10^7 cfu/ml (Shelby et al., 2002) ก็สามารถให้ปลานิลตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นวัคซีนที่ระดับ 1×10^8 cfu/ml แก่ปลานิล ซึ่งอยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา เมื่อเปรียบเทียบกับงานทดลองอื่น

3) สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immuno-stimulant) ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายชนิดในสัตว์น้ำดังนี้

3.1) แบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรีย (bacterial derivative) เช่น เปปติโดไกลแคน ไลโปโพลีแซคคาไรด์

3.2) โคตินและโคโตซาน

3.3) เบต้า-กลูแคน (β -glucan)

3.4) วิตามิน (vitamin) เช่น วิตามินเอ ซี อี

3.5) สารสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic chemical) เช่น ลีวาโมโซล

3.6) ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone)

4) ขนาดและอายุของสัตว์ สัตว์ที่มีขนาดใหญ่และอายุมากมักตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่า สัตว์ที่มีขนาดเล็กและอายุน้อยกว่า Thorburn and Jansson (1988) ได้ทำการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลาเทราท์สายรุ้งขนาดต่างๆ กันให้ได้รับวัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* ที่ระดับความเข้มข้น 1:500 พบว่าปลาขนาดเล็กจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันน้อยกว่าปลานขนาดใหญ่ และ Quentel and Baulny (1995) ได้ทำการทดลองฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพียงครั้ง

เดียว เพื่อป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาเทอรันบอ (S. maximus) วัยรุ่น ที่อายุต่างกัน พบว่าอัตราการรอดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุระหว่าง 90-104 วัน หลังจากรับการฉีดวัคซีนเป็นเวลา 2 เดือน

และ 5) สภาวะแวดล้อม เช่น คุณภาพน้ำ ฤดูกาล ช่วงแสง ย่อมส่งผลต่อประสิทธิภาพของการใช้วัคซีน (เยาวนิตยและจิรนนท์, 2544; Dale and Foreman, 1984; Ellis, 1988; Cryz, 1991; Stoskopf, 1992; Iwama and Nakanishi, 1996)

จากข้อมูลข้างต้นการศึกษาการใช้วัคซีนในสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะเป็นรายงานวิจัยจากต่างประเทศ รายงานการวิจัยในประเทศไทยนับว่ามีน้อย อาทิ ในปี พ.ศ. 2534 จิรศักดิ์และคณะ ได้ทำการทดลองแช่วัคซีนที่ได้จากเชื้อ *V. anguillarum* ให้แก่ลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) และในปีเดียวกัน นิลุบล (2534) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการใช้วัคซีนที่ตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*, Gunther) นนทวิทย์ (2537) และ Areechon et al. (1992) ได้ศึกษาการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรค Aeromonad Septicemia ในปลาดุกบักอุยโดยวิธีการแช่ กรองแก้ว (2541) ได้ทำการหาประสิทธิภาพของการต่อต้าน *A. hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินในปลาดุกกลมผสมโดยการแช่ในวัคซีน ก่อนให้วัคซีนซ้ำโดยการผสมอาหาร พบว่าการให้วัคซีนผสมอาหารนาน 4 สัปดาห์ต่อเดือน นาน 3 เดือน ให้ผลในการป้องกันโรคได้ดีที่สุด รองลงมา คือ การให้วัคซีนเป็นเวลา 3, 2 และ 1 สัปดาห์ต่อเดือน ตามลำดับ และที่ผ่านมาทางคณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดระดับแอนติบอดีไทเตอร์โดยใช้วิธี direct agglutination ในปลานิลลูกผสมหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ความเข้มข้นเชื้อ 1×10^8 cfu/ml ที่ขนาด 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัมพบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนชนิดผสมอาหารกินนาน 8 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่า 4 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปลาที่ได้รับวัคซีนชนิดกินนาน 8 สัปดาห์มีระดับภูมิคุ้มกันเท่ากับ 4.26 ± 0.24 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่มีระดับภูมิคุ้มกันเท่ากับ 151.16 ± 0.77 สำหรับปลา กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เท่ากับ 0.38 ± 0.01 ส่วนผลการทดสอบความต้านทานโรคหลังการฉีดเชื้อเป็น *S. agalactiae* เข้าช่องท้องพบว่า ปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีอัตราการรอด $80.22 \pm 10.18\%$ กลุ่มที่ได้รับวัคซีนชนิดกินนาน 6 และ 8 สัปดาห์ มีอัตราการรอด $53.00 \pm 18.68\%$ และ $82.00 \pm 8.19\%$ ตามลำดับ และปลากลุ่มควบคุมมีอัตราการรอด $51.11 \pm 0.58\%$

ที่ผ่านมามีงานพัฒนาและและการประยุกต์ใช้วัคซีนป้องกันโรคโรคสเตรปโตคอคโคซิสในประเทศไทยในสภาพการเลี้ยงจริงมีน้อย ทำให้การนำผลงานวิจัยไปใช้มีขอบเขตจำกัด ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนเพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล หากผลการศึกษาทำให้ทราบวิธีการเตรียมและใช้วัคซีนที่เหมาะสมเพื่อป้องกันโรค นอกจากจะช่วยลดความเสียหายจากการระบาดของเชื้อ ลดปัญหาการดื้อยาและการตกค้างของยาปฏิชีวนะแล้ว เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาสามารถส่งปลาไปต่างประเทศได้มากขึ้น

วิธีวิจัย

1. การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิส

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

วัสดุและวิธีวิจัย

1.1 ปลานิลจิตรลดา

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 100 กรัมต่อตัว นำปลามาเลี้ยงในกระชังขนาด 2x2 เมตร ในบ่อซีเมนต์ขนาด 4x8 เมตร ระดับน้ำลึก 1 เมตร อัตราเลี้ยง 15 ตัวต่อกระชังเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมก่อนการทดลอง ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลา มีการให้อากาศจากปั๊มลมตลอดการทดลอง และมีการทดสอบก่อนการทดลองเพื่อยืนยันว่าปลาที่จะนำมาใช้ทดลองไม่เคยได้รับเชื้อโดยสุ่มตรวจปลา 20 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

1.2 การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนทดลองเป็นวัคซีนเชื้อตายจากเชื้อ *S. agalactiae* จากปลาป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (รูปที่ 1-3) นำเชื้อมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในฟลาสก์บรรจุ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Criterion) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเชื้อที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer แล้วเติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาปั่นล้างฟอร์มาลินออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อปรับความเข้มข้นของปริมาณแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^8 cfu/ml และทดสอบว่าเชื้อตายหมดหรือไม่โดยการนำไปเลี้ยงบน BHIA เพื่อใช้เป็นวัคซีนให้กับปลาทดลองในลำดับต่อไป (ข้อมูลเบื้องต้นของนักวิจัย; Eldar et al., 1995; Shoemaker et al., 2006) สำหรับการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้วัดแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี direct agglutination มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีน แต่ต่างกันที่ต้องปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^7 cfu/ml

1.3 การให้วัคซีน

ปลาทดลองได้รับวัคซีนที่มีเชื้อขนาด 1×10^8 cfu/ml โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและผสมอาหารปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม การฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องจะฉีด 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน และตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์ในสัปดาห์ที่ 3 หลังฉีด สำหรับปลากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีนได้รับการฉีดน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้องในอัตราส่วน 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยปลา 15 ตัว

1.4 การเก็บเลือดและตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์

ทำการเจาะเก็บเลือดปลา 15 ตัว ในทุกกลุ่ม (รูปที่ 4) โดยเก็บเลือดหลังการฉีดวัคซีนครั้งแรกและครั้งที่สองเป็นเวลา 7 และ 21 วัน ตามลำดับ และปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์ใช้วิธีการ direct agglutination โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจน (Eldar, 1995; Shoemaker, 2006)

1.5 การทดสอบความต้านทานโรค

การทดสอบความต้านทานโรคโดยพิจารณาจากอัตราการตาย โดยการฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* เข้าช่องท้องปลาในขนาด 1×10^7 cfu/ml ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร สังเกตอาการของปลาทดลองเป็นเวลา 7 วัน และนำปลาที่ตายหรือปลาที่มีอาการติดเชื้อไปวินิจฉัยหาสาเหตุของการตายเพื่อยืนยันว่าสาเหตุเกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* นับจำนวนปลาที่ตายหรือแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดลอง ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารเคลือบวัคซีนชนิดกินในปลานิล

2.1 การพัฒนาอนุภาคสารเคลือบวัคซีนชนิดกิน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของเอทิลเซลลูโลสและสารเพิ่มความยืดหยุ่นในการกักเก็บเชื้อสเตรปโตคอคคัสของอนุภาคขนาดเล็ก

วัสดุและวิธีวิจัย

2.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เชื้อสเตรปโตคอคคัสโดย HPLC

ในการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่ถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคขนาดเล็ก ต้องศึกษาหาเทคนิคที่เหมาะสมที่จะสามารถวัดและหาปริมาณเชื้อดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบกับซีรัมอัลบูมินของโค (bovine serum albumin) ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งวิธีที่มีการวิเคราะห์เชื้อสเตรปโตคอคคัส สามารถวิเคราะห์ได้ โดยใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ซึ่งในการทดลองได้เตรียมสารละลายมาตรฐานในการวิเคราะห์เชื้อสเตรปโตคอคคัส 5 ความเข้มข้นได้แก่ 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 และ 1×10^{10} cfu/ml โดยการเจือจางเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่กระจายอยู่ในสารละลายน้ำเกลือ และได้ประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค HPLC จากการทดสอบพารามิเตอร์ Accuracy Limit Of Detection (LOD) ,Linearity ,Selectivity or Specificity , Range , Limit Of Quantification (LOQ)

2.1.2 การศึกษาก่อนตั้งตำรับ (Preliminary study)

การศึกษานี้เป็นการทดลองเตรียมอนุภาคขนาดเล็กโดยวิธี Emulsification evaporation method มีวัตถุดิบภายในคือ อัลจิเนตความเข้มข้น 2 % w/w และเชื้อสเตรปโตคอคคัสเข้มข้น 1×10^{10} cfu/ml และมีวัตถุดิบภายนอกเป็น Dichloromethane ในแต่ละตำรับ ใช้เครื่อง Homogenizer ความแรงเบอร์ 5 ทำให้เกิด water in oil emulsion และกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยเครื่อง rotary evaporator

2.1.2.1 การศึกษาปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบภายในและวัตถุดิบภายนอก ในการเตรียมไมโครอิมัลชัน

อัตราส่วนของวัตถุดิบภายในและนอกที่แตกต่างกันในแต่ละตำรับ

2.1.2.2 การศึกษาปัจจัยของเวลาที่ใช้ในการใช้ในการก่ออิมัลชัน

เตรียมตำรับที่มีการกระจายตัวของอนุภาคที่น้อยที่สุด จากการศึกษปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบภายในและวัตถุดิบภายนอก ในการเตรียมไมโครอิมัลชัน (Phase Volume Ratio) โดยใช้เวลาในการลดอนุภาคต่างกัน คือ 5, 7 และ 10 นาที บันทึกขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาค

2.1.2.3 การศึกษาปัจจัยของเอทิลเซลลูโลสและไคบิวทิลซีบาเคตต่อร้อยละการกักเก็บเชื้อสเตรปโตคอคคัส (% Entrapment) ค่าศักย์ไฟฟ้า (Zeta potential) และขนาดอนุภาค (Size) ปริมาณของเอทิลเซลลูโลสและไคบิวทิลซีบาเคตเมื่อเทียบกับวัตถุดิบภายใน

2.2. การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกิน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลจากการกินวัคซีนเชื้อตายเคลือบอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

วัสดุและวิธีวิจัย

2.2.1 ปลานิลจิตรลดา

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 100 กรัมต่อตัว จำนวน 45 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 9 ตัว โดยทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 3 ตัว ในตู้กระจกความจุ 100 ลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมก่อนการทดลอง ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลา มีการให้อาจากจากปั๊มลมตลอดการทดลอง และมีการทดสอบก่อนการทดลองเพื่อยืนยันว่าปลาที่จะนำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ โดยสุ่มตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในปลาทดลอง 20 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

2.2.2 การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนทดลองเป็นวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* จากปลาป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำเชื้อมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในฟลasks บรจ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Criterion) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเชื้อที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^{10} cfu/ml สำหรับเชื้อตายให้เติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาปั่นล้างฟอร์มาลินออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง และทดสอบว่าเชื้อตายหมดหรือไม่โดยการนำไปเลี้ยงบน BHIA ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนชนิดกินที่เคลือบด้วยสาร 3 ชนิดคือ เจลาติน อัลจิเนต และอัลจิเนตเคลือบด้วยเอทิลเซลลูโลสต่อไป (ข้อมูลเบื้องต้นของนักวิจัย; Eldar et al., 1995; Shoemaker et al., 2006) วัคซีนชนิดเคลือบทั้ง 3 ชนิดโดยวิธี Emulsification evaporation ซึ่งมีวัตถุดิบภายในคือ สารเคลือบ 3 ชนิดในข้างต้นที่ความเข้มข้น 2% w/w และเชื้อสเตรปโตคอคคัสเข้มข้น 1×10^{10} cfu/ml และมีวัตถุดิบภายนอกเป็น

Dichloromethane ในแต่ละตำรับ ใช้เครื่อง Homogenizer ความแรงเบอร์ 5 และทำการเจือจางเชื้อสเตรปโตคอคคัสในสารละลายน้ำเกลือให้เป็น 3 ความเข้มข้นได้แก่ 5×10^8 , 1×10^9 และ 5×10^9 cfu/ml

สำหรับการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้วัดแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี direct agglutination มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีน แต่ต่างกันที่ต้องปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^7 cfu/ml

2.2.3 การให้วัคซีน

แบ่งปลาทดลองเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 9 ตัว โดยทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 3 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นปลากลุ่มควบคุมซึ่งได้รับอาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่ผสมวัคซีน กลุ่มที่ 2 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายเข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ และกลุ่มที่ 3-5 เป็นปลาที่กินอาหารผสมวัคซีนชนิดเคลือบด้วยอัลจินตที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 3 ระดับคือ 5×10^8 , 1×10^9 และ 5×10^9 cfu/ml ตามลำดับ (รูปที่ 8) ในสัดส่วนอาหาร 0.1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม ปลาฉีดวัคซีนวันละ 2 ครั้ง เข้าและเย็นปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก ตัว แล้วเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันปลาทุกกลุ่มหลังฉีดวัคซีนที่ 4 และ 6 สัปดาห์

2.2.4 การเก็บเลือดและตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์

ทำการเจาะเก็บเลือดปลาในทุกกลุ่ม โดยเก็บเลือดหลังการให้วัคซีน 4 และ 6 สัปดาห์ และปั่นแยกซีรัมด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ใช้วิธีการ direct agglutination โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจน (Eldar, 1995; Shoemaker, 2006) วิเคราะห์หาค่าแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดลอง ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกินแบบเคลือบ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคคโคซิสโดยการฉีด การแช่ และการกิน โดยการเปรียบเทียบระดับการสร้างภูมิคุ้มกัน

วัสดุและวิธีวิจัย

2.3.1 ปลานิลจิตรลดา

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 100 กรัมต่อตัว นำปลามาเลี้ยงในกระชังขนาด 2x2 เมตร ในบ่อซีเมนต์ขนาด 4x8 เมตร ระดับน้ำลึก 1 เมตร อัตราเลี้ยง 15 ตัวต่อกระชังเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมก่อนการทดลอง ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลา มีการให้อากาศจากปั๊มลมตลอดการทดลอง และมีการทดสอบก่อนการทดลองเพื่อยืนยันว่าปลาที่จะนำมาใช้ทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ โดยสุ่มตรวจปลา 20 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

2.3.2 การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนทดลองเป็นวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* จากปลาป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำเชื้อมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในฟลาสก์บรรจุ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Criterion) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเชื้อที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^{10} cfu/ml สำหรับเชื้อตายให้เติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาปั่นล้างฟอร์มาลินออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง และทดสอบว่าเชื้อตายหมดหรือไม่โดยการนำไปเลี้ยงบน BHIA ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนชนิดกินที่เคลือบด้วยสาร 3 ชนิดคือ เจลาติน อัลจิเนต และอัลจิเนตเคลือบด้วยเอทิลเซลลูโลสต่อไป (ข้อมูลเบื้องต้นของนักวิจัย; Eldar et al., 1995; Shoemaker et al., 2006) วัคซีนชนิดเคลือบทั้ง 3 ชนิดโดยวิธี Emulsification evaporation ซึ่งมีวัตถุดิบภายในคือ สารเคลือบ 3 ชนิดในข้างต้นที่ความเข้มข้น 2% w/w และเชื้อสเตรปโตคอคคัสเข้มข้น 1×10^{10} cfu/ml และมีวัตถุดิบภายนอกเป็น Dichloromethane ในแต่ละตำรับ ใช้เครื่อง Homogenizer ความแรงเบอร์ 5 และทำการเจือจางเชื้อสเตรปโตคอคคัสในสารละลายน้ำเกลือให้เป็น 3 ความเข้มข้นได้แก่ 5×10^8 , 1×10^9 และ 5×10^9 cfu/ml

2.3.3 การให้วัคซีน

ปลาทดลองแบ่งเป็น 17 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้รับวัคซีน กลุ่มที่ 2 ได้รับวัคซีนเชื้อตายขนาด 1×10^8 cfu/ml โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง กลุ่มที่ 3 ได้รับวัคซีนเชื้อตายขนาด 1×10^8 cfu/ml ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ (Difco, USA) (รูปที่ 9) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง กลุ่มที่ 4-6 ได้รับวัคซีนเชื้อตายขนาด 1×10^8 cfu/ml 1 ครั้ง โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง และกินวัคซีนเคลือบเจลาติน อัลจิเนต และเคลือบทั้งอัลจิเนตและเอทิลเซลลูโลส นาน

6 สัปดาห์ ตามลำดับ กลุ่มที่ 7-8 ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นขนาด 1×10^4 และ 1×10^6 cfu/ml 1 ครั้ง ตามลำดับ กลุ่มที่ 9-11 ได้รับวัคซีนเชื้อตายขนาด 1×10^8 cfu/ml 1 ครั้ง โดยวิธีการแช่ นาน 30 นาที และกินวัคซีนเล็บบเจลลาติน อัลจิเนต และเคลือบทั้งอัลจิเนตและเอธิลเซลลูโลส ตามลำดับ นาน 6 สัปดาห์ กลุ่มที่ 12-14 ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นขนาด 1×10^1 , 1×10^2 และ 1×10^4 cfu/ml โดยวิธีการแช่ โดยตรง นาน 30 นาที และกินวัคซีนเคล็บบเจลลาติน 6 สัปดาห์ กลุ่มที่ 15-17 กินวัคซีนเชื้อตายขนาด 1×10^8 cfu/ml ที่เคลือบด้วยเจลลาติน อัลจิเนต และที่เคลือบด้วยอัลจิเนตและเอธิลเซลลูโลส ตามลำดับ นาน 6 สัปดาห์ ทุกกลุ่มทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3.4 การเก็บเลือดและตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์

ทำการเจาะเก็บเลือดปลา 15 ตัว ในทุกกลุ่ม โดยเก็บเลือดหลังการฉีดวัคซีนครั้งที่สองเป็นเวลา 21 วัน ตามลำดับ และปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์ใช้วิธีการ direct agglutination โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบซึ่งมีเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจน (Eldar, 1995; Shoemaker, 2006)

2.3.5 การทดสอบความต้านทานโรค

การทดสอบความต้านทานโรคโดยพิจารณาจากอัตราการตายสะสม โดยการฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* เข้าช่องท้องปลาในขนาด 1×10^8 cfu/ml ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร สังเกตอาการของปลา ทดลองเป็นเวลา 7 วัน และนำปลาที่ตายหรือปลาที่มีอาการติดเชื้อไปวินิจฉัยหาสาเหตุของการตาย เพื่อยืนยันว่าสาเหตุเกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* นับจำนวนปลาที่ตายหรือแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดลอง ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3. ศึกษาประสิทธิภาพแอดจูแวนต์ในวัคซีนชนิดฉีด

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพฟรอยด์แอดจูแวนต์ผสมในวัคซีนชนิดฉีด

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพฟรอยด์แอดจูแวนต์ผสมในวัคซีนชนิดฉีดเพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

วัสดุและวิธีวิจัย

3.1.1 ปลานิลจิตรลดา

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 วัฏรุ่นและโตเต็มวัยที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 25 และ 100 กรัม ต่อตัว ตามลำดับ จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิส และแบ่งปลานิล ออกเป็นจำนวน 3 กลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในกระชังขนาด 2x2 เมตร ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว มีการให้อากาศจากปั๊มลมตลอดการทดลอง และมีการทดสอบก่อนการทดลอง เพื่อยืนยันว่าปลาที่จะนำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ โดยสุ่มตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในปลาทดลอง 20 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2 การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนทดลองเป็นวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* จากปลาป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำเชื้อมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในฟลasksบรรจุ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Criterion) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้น นำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเชื้อที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer แล้วเติม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^8 cfu/ml สำหรับเชื้อตาย ให้เติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาปั่นล้าง ฟอร์มาลินออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M 3 ครั้ง และทดสอบว่าเชื้อตายหมดหรือไม่โดยการ นำไปเลี้ยงบน BHIA ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนชนิดฉีด

ฟรอยด์แอดจูแวนท์ (Difco, USA) ผสมวัคซีนชนิดฉีดความเข้มข้นเชื้อ 1×10^8 cfu/ml ใน อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โดยใช้เครื่อง Homogenizer และเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศา เซลเซียส ก่อนทำการฉีดเข้าช่องท้องปลา

3.1.3 การให้วัคซีน

แบ่งปลาทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นปลากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีน แต่ได้รับ น้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้อง กลุ่มที่ 2 เป็นปลานิลวัฏรุ่นที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายเข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ 3 เป็นปลานิลวัฏรุ่นที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจู แวนท์เข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ และ กลุ่มที่ 4 เป็นปลานิลโตเต็มวัยที่ได้รับวัคซีนเชื้อ ตายผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์เข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์

3.1.4 การเก็บเลือดและตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์

ทำการเจาะเก็บเลือดปลาในทุกกลุ่ม โดยเก็บเลือดหลังการให้วัคซีน 3 สัปดาห์ และปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Direct hemagglutination test โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจน (Eldar, 1995; Shoemaker, 2006) วิเคราะห์หาค่าแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างแต่ละกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันจากค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิลทั้ง 4 กลุ่ม ด้วย Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SAS 6.1 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99

3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพแอดจูแวนท์ 4 ชนิดผสมในวัคซีนชนิดฉีด

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพแอดจูแวนท์ 4 ชนิดคือ ฟรอยด์แอดจูแวนท์ อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันพาราฟินผสมในวัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

วัสดุและวิธีวิจัย

3.2.1 ปลานิลจิตรลดา

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 วัฏรุ่นที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 30 กรัมต่อตัว ตามลำดับ จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิส และแบ่งปลานิลออกเป็นจำนวน 6 กลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในกระชังขนาด 1x1 เมตร ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 3 ครั้ง ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว มีการให้อากาศจากปั๊มลมตลอดการทดลอง มีการตรวจคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ และมีการทดสอบก่อนการทดลองเพื่อยืนยันว่าปลาที่จะนำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ โดยสุ่มตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในปลาทดลอง 20 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาทดลองทั้งหมด

3.2.2 การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนทดลองเป็นวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* จากปลาป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำเชื้อมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48

ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในฟลasks บรจุ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Criterion) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้น นำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเชื้อที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^8 cfu/ml สำหรับเชื้อตายให้เติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาปั่นล้างฟอร์มาลินออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง และทดสอบว่าเชื้อตายหมดหรือไม่โดยการนำไปเลี้ยงบน BHIA ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนชนิดฉีด

แอดจูแวนท์ 4 ชนิดคือ ฟรอยด์แอดจูแวนท์ (Difco, USA) อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ น้ำมันถั่วเหลือง (บริษัท วิทยาสกร จำกัด กรุงเทพมหานคร) และน้ำมันพาราฟิน (บริษัท วิทยาสกร จำกัด กรุงเทพมหานคร) ผสมกับวัคซีนชนิดฉีดความเข้มข้นเชื้อ 1×10^8 cfu/ml ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และเติมทวิน 80 (Sigma, USA) ปริมาณ 5% โดยปริมาตร ก่อนปั่นผสมรวมกันโดยโดยใช้เครื่อง Homogenizer และเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการฉีดเข้าช่องท้องปลา

อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทดลองเตรียมขึ้นโดยใช้ $KAl_2(SO_4)_3$ 80 กรัม และ NaOH (บริษัท วิทยาสกร จำกัด กรุงเทพมหานคร) 20 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร อุ่นในอ่างอุ่นสารละลายอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเจลให้ได้ประมาณ 2% ด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3 การให้วัคซีน

แบ่งปลาวัยรุ่นทดลองเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นปลาในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีน แต่ได้รับน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้อง กลุ่มที่ 2 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ กลุ่มที่ 3 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ กลุ่มที่ 4 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายผสมอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ กลุ่มที่ 5 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายผสมน้ำมันถั่วเหลือง กลุ่มที่ 6 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายผสมน้ำมันพาราฟิน ปลาทุกกลุ่มได้รับวัคซีนเข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์

3.2.4 การเก็บเลือดและตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์

เจาะเก็บเลือดปลาในทุกกลุ่ม หลังการให้วัคซีน 3 สัปดาห์ และปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Direct agglutination test โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้ หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048

จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจน (Eldar, 1995; Shoemaker, 2006) วิเคราะห์หาค่าแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดลอง ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันจากค่าแอนติบอดีไทเตอร์ของปลานิลทั้ง 3 กลุ่ม ด้วย Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SAS 6.1 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4. การศึกษาประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมกับการฉีดวัคซีนสเตรปโตคอคโคซิส

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิดคือ ฟรอยด์แอดจูแวนต์และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ผสมในวัคซีนชนิดฉีด และโคโตซานและแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ผสมในอาหารหลังการฉีดวัคซีนโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

วัสดุและวิธีวิจัย

4.1 ปลานิลจิตรลดา

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 วัยรุ่นที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 30 กรัม ตามลำดับ จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิส และแบ่งปลานิลออกเป็นจำนวน 9 กลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในกระชังขนาด 2x2 เมตร ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว มีการให้อากาศจากปั๊มลมตลอดการทดลอง และมีการทดสอบก่อนการทดลองเพื่อยืนยันว่าปลาที่จะนำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ โดยสุ่มตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในปลาทดลอง 20 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาทดลองทั้งหมด

4.2 การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนทดลองเป็นวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* จากปลาป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำเชื้อมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในฟลาสก์บรรจุ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Criterion) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเชื้อที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมฟอสเฟต

บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer แล้วเติม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 5×10^8 cfu/ml สำหรับเชื้อตาย ให้เติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาปั่นล้าง ฟอร์มาลินออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M 3 ครั้ง และทดสอบว่าเชื้อตายหมดหรือไม่โดยการนำไปเลี้ยงบน BHIA ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนชนิดฉีด

สารกระตุ้นภูมิชนิดฉีด 2 ชนิดคือ พรอยด์แอดจูแวนต์ (Difco, USA) และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Sigma, USA) ผสมกับวัคซีนชนิดฉีดความเข้มข้นเชื้อ 5×10^8 cfu/ml ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โดยใช้เครื่อง Homoginizer และเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการฉีดเข้าช่องท้องปลา

สารกระตุ้นภูมิชนิดกิน 2 ชนิดคือ ไคโตซาน (Difco, USA) และแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (Alltech, USA) ผสมอาหารให้กินนาน 1 เดือนหลังการฉีดวัคซีน ไคโตซานที่ทดลองมี 3 ระดับคือ 0.5%, 0.75% และ 1% โดยน้ำหนัก และโอลิโกแซคคาไรด์มี 3 ระดับคือ คือ 0.2%, 0.4% และ 0.8% โดยน้ำหนัก

4.3 การให้วัคซีน

แบ่งปลาทดลองเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นปลาที่ควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีน แต่ได้รับน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้อง กลุ่มที่ 2 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายผสมพรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ กลุ่มที่ 3 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายผสมอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ กลุ่มที่ 4-6 เป็นปลาที่ได้รับการฉีดวัคซีนเชื้อตายและกินอาหารผสมไคโตซานที่ระดับ 0.5% 0.75% และ 1.0% ตามลำดับ กลุ่มที่ 7-9 เป็นปลาที่ได้รับการฉีดวัคซีนเชื้อตายและกินอาหารผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 0.2% 0.4% และ 0.8% ตามลำดับ ปลาทุกกลุ่มได้รับวัคซีนเข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์

4.4 การเก็บเลือดและตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์

ทำการเจาะเก็บเลือดปลาในทุกกลุ่ม โดยเก็บเลือดหลังการให้วัคซีน 3 สัปดาห์ และปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Direct hemagglutination test โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจน (รูปที่) (Eldar, 1995; Shoemaker, 2006) วิเคราะห์หาค่าแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดลอง ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันจากค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิลทั้ง 9 กลุ่ม ด้วย Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SAS 6.1 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99

5. การศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนชนิดฉีด

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนเชื้อตาย 2 แบบคือ แบบที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 18) และแบบที่เตรียมแบบแช่แข็งเยือกแข็ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 18-19) นาน 3 เดือน ด้วยเครื่อง Freeze dryer รุ่น LY5FM-ULE (Snijders Scientific, The Netherlands) (รูปที่ 20)

วิธีการวิจัย

5.1 ปลานิลจิตรลดา

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 วัฏรุ่นที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 50 กรัมต่อตัว ตามลำดับ จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิส และแบ่งปลานิลออกเป็นจำนวน 6 กลุ่ม ละ 15 ตัว นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในกระชังขนาด 1x1 เมตร ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 3 ครั้ง ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว มีการให้อากาศจากปั๊มลมตลอดการทดลอง มีการตรวจคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ และมีการทดสอบก่อนการทดลองเพื่อยืนยันว่าปลาที่จะนำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ โดยสุ่มตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในปลาทดลอง 20 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาทดลองทั้งหมด

5.2 การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนทดลองเป็นวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* จากปลาป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำเชื้อมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในฟลasks บรจุ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Criterion) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเชื้อที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^8 cfu/ml สำหรับเชื้อตายให้เติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาปั่นล้างฟอร์มาลิน

ออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง และทดสอบว่าเชื้อตายหมดหรือไม่โดยการนำไปเลี้ยงบน BHIA ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนชนิดฉีด ในการศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีน 2 แบบ แบบที่ 1 วัคซีนไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และแบบที่ 2 นำวัคซีนผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง โดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบแห้งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง มีการเติมไดเมทิลซัลโฟลไซด์ (Fluka, Germany) 7% โดยปริมาตร เพื่อเป็นสารช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียถูกทำลายจากผลึกน้ำแข็งในระหว่างการทำแห้ง ณ อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีการเติมยาต้านจุลชีพเพนิซิลลินสเตรปโตไมซิน ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อวัคซีน 1 ลิตร (เอ็มแอนด์เอช เมนูแฟกเจอริงจำกัด จังหวัดสมุทรปราการ) และ 1.5% benzyl alcohol (Fluka, Germany) ซึ่งเป็นสารรักษาสภาพวัคซีน (preservative) ก่อนทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในปลาหลังการเก็บรักษาทั้ง 2 แบบ ในทุกๆ เดือน นาน 3 เดือน

5.3 การให้วัคซีน

แบ่งปลาวัยรุ่นทดลองเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นปลากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีน แต่ได้รับน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน กลุ่มที่ 3 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน กลุ่มที่ 4 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเก็บ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน กลุ่มที่ 5 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเก็บ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน กลุ่มที่ 6 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเก็บ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน กลุ่มที่ 7 เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเก็บ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน ปลาทุกกลุ่มได้รับวัคซีนเข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์

5.4 การเก็บเลือดและตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์

ทำการเจาะเก็บเลือดปลาในทุกกลุ่ม โดยเก็บเลือดหลังการให้วัคซีน 3 สัปดาห์ และปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Direct hemagglutination test โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจน (Eldar, 1995; Shoemaker, 2006) วิเคราะห์หาค่าแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง ด้วย Duncan's New Multiple Range Test

5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันจากค่าแอนติบอดีไทเตอร์ของปลาในทั้ง 3 กลุ่ม ด้วย Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SAS 6.1 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

6. การประเมินค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประเมินค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีนโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลา

วัสดุและวิธีวิจัย

ทำการประเมินค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีนโดยการนำค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการผลิตวัคซีน วัสดุ อุปกรณ์ รวมทั้งค่าแรงงานที่ใช้ในการทำวัคซีนมาคำนวณเป็นค่าใช้จ่ายต่อการทำวัคซีนในปลา 1 ตัวหรือต่อโด้สวัคซีน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิส

1.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง

จากการตรวจวัดค่าแอนติบอดีไทเตอร์หลังการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องครั้งแรก พบว่ามีค่าค่อนข้างต่ำโดยมีค่าเฉลี่ย 5.16 ± 1.83 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีน ($p < 0.05$) และเมื่อทำการฉีดวัคซีนครั้งที่สอง หลังการให้วัคซีนครั้งแรก 14 วัน พบว่าค่าแอนติบอดีไทเตอร์มีค่า 244.62 ± 36.64 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการฉีดวัคซีนครั้งแรกและกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีน ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1, รูปที่ 5-7) ผลการทดลองนี้ให้ผลคล้ายคลึงงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งสรุปว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องในปลานิลและปลาชนิดอื่นๆเป็นวิธีการที่กระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรัมที่มีประสิทธิภาพ (เกรียงศักดิ์ สายธนู และเกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2522; นิลุบล, 2534; Eldar et al., 1995; Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000; Prasad, 2002)

โดยทั่วไปปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีน คือ

1) วิธีการให้วัคซีน การฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องมักจะทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันดีกว่า การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การแช่และการผสมอาหาร การฉีดวัคซีนครั้งเดียวกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่สูงเท่าการฉีดอย่างน้อย 2 ครั้ง (รัชนี้ และอนุทิน, 2532; Sakai et al., 1989; Mastsuyama et al., 1992; Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000)

2) ความเข้มข้นของวัคซีน วัคซีนที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น มักทำให้ปลาต้านทานโรคได้ดีกว่าการให้วัคซีนระดับที่ต่ำกว่า (Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000; Shelby et al., 2002)

3) สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immuno-stimulant) ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายชนิดในสัตว์น้ำดังนี้

- 3.1) แบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรีย เช่น เปปติโดไกลแคน
- 3.2). โคตินและโคโตซาน
- 3.3) เบต้า-กลูแคน (β -glucan)
- 3.4) วิตามิน (vitamin) เช่น วิตามินเอ ซี อี
- 3.5) สารสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic chemical) เช่น ลีวาโมโซล
- 3.6) ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone)

4) ขนาดและอายุของสัตว์ สัตว์ที่มีขนาดใหญ่และอายุมากมักตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่าสัตว์ที่มีขนาดเล็กและอายุน้อยกว่า (Thorburn and Jansson, 1988; Quentel and Baulny, 1995)

และ 5) สภาวะแวดล้อม เช่น คุณภาพน้ำ ฤดูกาล ช่วงแสง ย่อมส่งผลต่อประสิทธิภาพของการใช้วัคซีน (เยาวันิตย์และจิรนนท์, 2544; Dale and Foreman, 1984; Ellis, 1988; Cryz, 1991; Stoskopf, 1992; Iwama and Nakanishi, 1996)

1.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการได้รับวัคซีนชนิดผสมอาหาร

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการให้วัคซีนผสมอาหารต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลานิลที่ได้รับวัคซีนเป็นเวลา 4, 6 และ 8 สัปดาห์ เมื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีไทเตอร์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.64 ± 0.77 , 4.27 ± 1.01 และ 4.71 ± 1.55 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยสูงสุด ปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุม แม้ระดับไทเตอร์ที่ 6 และ 8 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าสูงกว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2)

การให้วัคซีนโดยวิธีการผสมอาหารเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นักวิจัยสัตว์น้ำให้ความสำคัญ โดยมีการศึกษาวิจัยที่เน้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรค จากผลการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลาตั้งแต่ 4 ถึง 8 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเพิ่มขึ้นและสูงกว่ากลุ่มควบคุม และแม้ปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยต่ำกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แต่ค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของนิลบล กิจอันเจริญ (2534) และกรองแก้ว พลายมาศ (2541) ที่ให้วัคซีนผสมอาหารในปลาดุกอุย และปลาดุกกลุ่มผสม พบว่าค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 0.70 ± 0.56 และ 6.10 ± 2.54 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับปลากลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 1.50 ± 0.28 และ 6.60 ± 0.42 ตามลำดับ ทั้งการให้วัคซีนครั้งเดียวหรือการให้วัคซีนมากกว่าหนึ่งครั้ง

จากผลการทดลองการให้วัคซีนผสมอาหารในระยะเวลาที่นานขึ้นมีแนวโน้มที่ทำให้ปลา มีระดับแอนติบอดีไทเทรตสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพลายมาศ (2541) ที่ได้ทำการหาประสิทธิภาพของการต่อต้าน *A. hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินในปลาดุกกลุ่มผสมโดยการแช่ในวัคซีน ก่อนให้วัคซีนซ้ำโดยการผสมอาหาร พบว่าการให้วัคซีนผสมอาหารนาน 4 สัปดาห์ต่อเดือน นาน 3 เดือน ให้ผลในการป้องกันโรคได้ดีที่สุด รองลงมา คือ การให้วัคซีนเป็นเวลา 3, 2 และ 1 สัปดาห์ต่อเดือน ตามลำดับ และการศึกษาของ Clark et al. (2003) ที่รายงานว่าเมื่อให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *S. iniae* ในลูกปลานิลด้วยวิธีการผสมอาหารพบว่า ลูกปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ทั้งนี้คงเพราะปลาที่ได้รับวัคซีนมีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อสูงกว่า

1.3 การทดสอบความต้านทานโรคของปลานิล

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรค โดยการฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* เข้าทางช่องท้องและทำการวิเคราะห์อัตราการตายเฉลี่ยพบว่า ปลานิลที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องสามารถต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการตายเท่ากับ 4.44 ± 3.85 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปลากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนมีอัตราการตาย 40 ± 6.67 เปอร์เซ็นต์ ปลานิลที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีอัตราการตายเท่ากับ 35.56 ± 3.85 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากปลากลุ่มควบคุม และปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 6 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งมีอัตราการตายเฉลี่ย 20 ± 6.67 และ 15.56 ± 3.85 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Surendra (2002) ได้ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตาย ซึ่งเตรียมจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่า ปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดตายสูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน Eldar et al. (1995) กล่าวว่า การฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมได้จาก whole cell ของเชื้อ *S. diffcilis* เข้าช่องท้องแก่ปลานิลนั้น ให้ผลในการป้องกันโรคได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่เป็น homologous vaccine และ heterologous vaccine ของเชื้อ *Streptococcus* spp. แต่วัคซีนให้ผลในการป้องกันโรคได้ค่อนข้างต่ำในปลานิลแดง คือ 42.55 เปอร์เซ็นต์ (Prasad, 2002) ส่วนในปลาเทราท์สายรุ้งให้ผลในการป้องกันโรคได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Sakai et al., 1987) ในขณะที่ Ellis (1988b) ให้เหตุผลสนับสนุนว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องให้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีในซีรัมได้เร็วกว่าการแช่วัคซีน เนื่องจากการฉีดเป็นวิธีการซึ่งทราบถึงปริมาณ และความเข้มข้นของวัคซีนที่ปลาได้รับเข้าสู่ร่างกายแน่นอนกว่าวิธีการแช่ แต่การฉีดไม่ใช่วิธีที่ทำให้ปลาเกิดโรคได้ตามธรรมชาติ การฉีดจะเป็นเพียงการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบทั่วไป และแบบเฉพาะที่ จึงทำให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดีสูงกว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีอื่น (Dun et al., 1990)

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารนาน 4 สัปดาห์ สามารถต้านทานโรคน้อยกว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 6 และ 8 สัปดาห์ แสดงว่าความต้านทานโรคในแง่อัตราการรอดมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาการได้รับวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับการผลการวิจัยของกรองแก้ว (2541) ซึ่งได้ทำการให้วัคซีนซ้ำโดยการผสมอาหารแก่ปลาดุกกลุ่มผสมในช่วงระยะเวลาต่างกันคือ ได้รับอาหารผสมวัคซีนเดือนละ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ เป็นเวลาติดต่อกันนาน 3 เดือน แล้วนำมาทดสอบความต้านทานโรคกับเชื้อ *A. hydrophila* พบว่าปลาทุก

กลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมวัคซีนมีความต้านทานโรค หรือมีอัตราการรอดสูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน เมื่อสังเกตผลที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลองมีความต้านทานโรคสูงสุดเท่ากับ 53.03 เปอร์เซ็นต์ และจากรายงานของ Ellis (1982) กล่าวถึงประสิทธิภาพของวัคซีนสามารถประเมินได้จากความสามารถในการต้านทานโรคในแง่ของเปอร์เซ็นต์อัตราตาย และ Clark et al. (2003) รายงานว่าลูกปลานิล ซึ่งได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ในอัตราส่วน 0.2 กรัมวัคซีนต่อตัว เป็นเวลาติดต่อกัน 5 วัน ในวันถัดมาได้รับอาหารไม่ผสมวัคซีนอีก 5 วัน แล้วให้วัคซีนผสมอาหารซ้ำติดต่อกันอีก 5 วัน เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรคกับเชื้อเป็น พบว่าลูกปลามีอัตราการรอดสูงถึง 85-90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนซึ่งมีอัตราการรอดเพียง 20 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้จำนวนครั้งและอัตราส่วนในการให้วัคซีนผสมอาหารที่มากขึ้นจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดในปลาเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ นิลุบล กิจอันเจริญ (2534) ที่รายงานว่าปลาดุกอายุที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารสองครั้ง ให้ผลในการป้องกันโรคดีกว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเพียงครั้งเดียวเมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย Plumb and Vinitnantharat (1994) รายงานว่าในปลาดุกอเมริกันซึ่งได้รับวัคซีนผสมอาหารที่เตรียมได้จากเชื้อ *E. ictaluri* มีอัตราการรอดเพิ่มสูงขึ้นตามอัตราส่วนของวัคซีนที่ผสมในอาหาร เนื่องจากการให้วัคซีนผสมอาหารนั้นจะต้องใช้แอนติเจนในปริมาณมากเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา เพราะแอนติเจนบางส่วนอาจถูกทำลายโดยขบวนการย่อยอาหาร (Bogwald et al., 1994) จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องทำให้ปลาสร้างการสร้างภูมิคุ้มกันดีกว่าการผสมอาหารอย่างมีนัยสำคัญ แต่การให้วัคซีนโดยการผสมอาหารในครั้งนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระยะต่อไป เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำวัคซีนในระดับที่สูงขึ้น ก่อนการนำไปใช้ในสภาพการเลี้ยงจริง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องทำให้ปลาสร้างการสร้างภูมิคุ้มกันดีกว่าการผสมอาหารอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 1 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิล หลังได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง

วิธีการให้วัคซีน	แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย ($\pm$ S.D.)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
กลุ่มควบคุม	0	0
การฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง	5.16 ± 1.83^a	244.62 ± 36.64^b

หมายเหตุ ^{ab} ตัวอักษรกำกับที่ต่าง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล หลังการได้รับวัคซีนผสมอาหาร

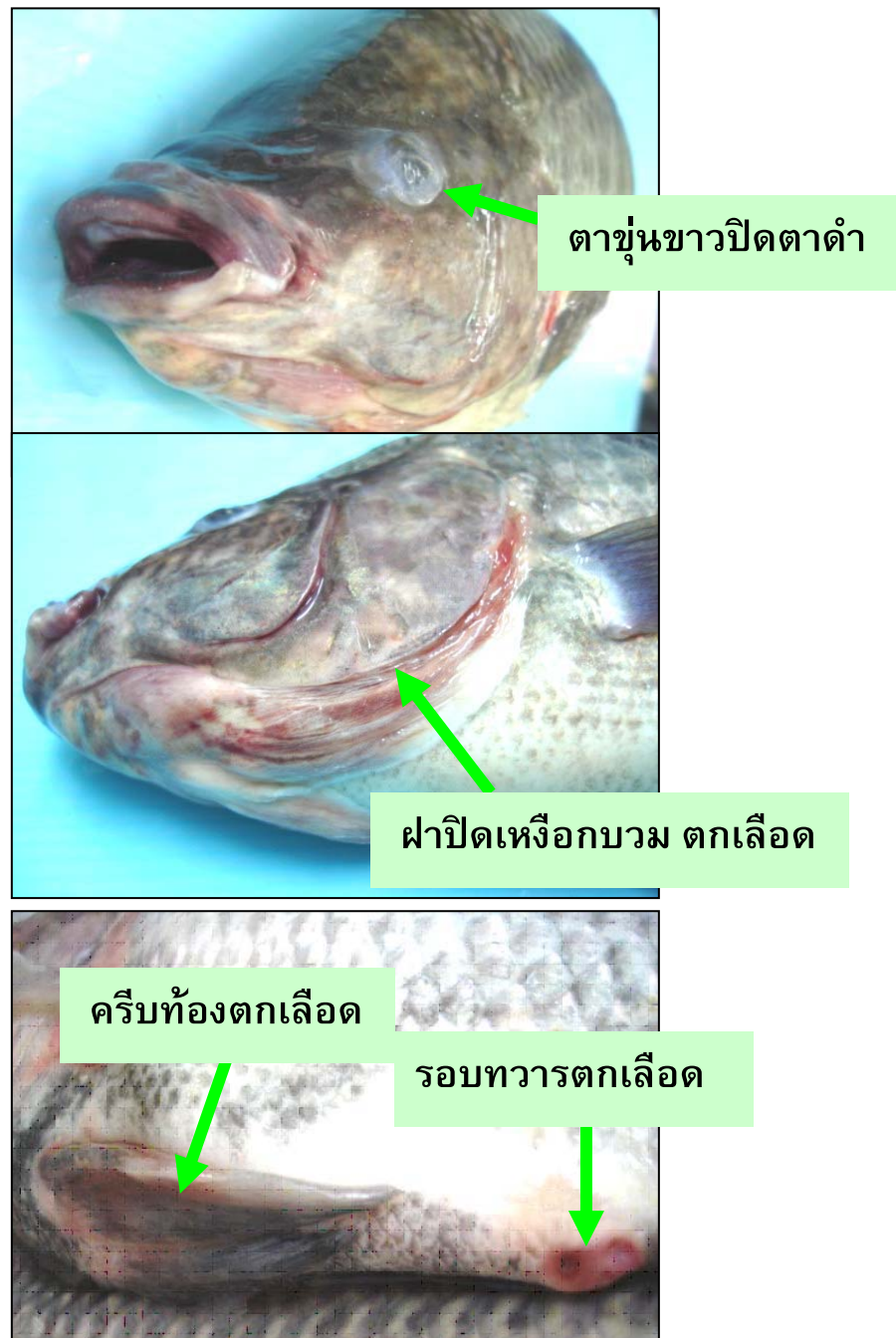
ระยะเวลาที่ได้รับวัคซีน	แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย ($\pm$ S.D.)
	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน
4 สัปดาห์	3.64 ± 0.77^a
6 สัปดาห์	4.27 ± 1.01^b
8 สัปดาห์	4.71 ± 1.55^c

หมายเหตุ ^{ab} ตัวอักษรกำกับที่ต่าง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

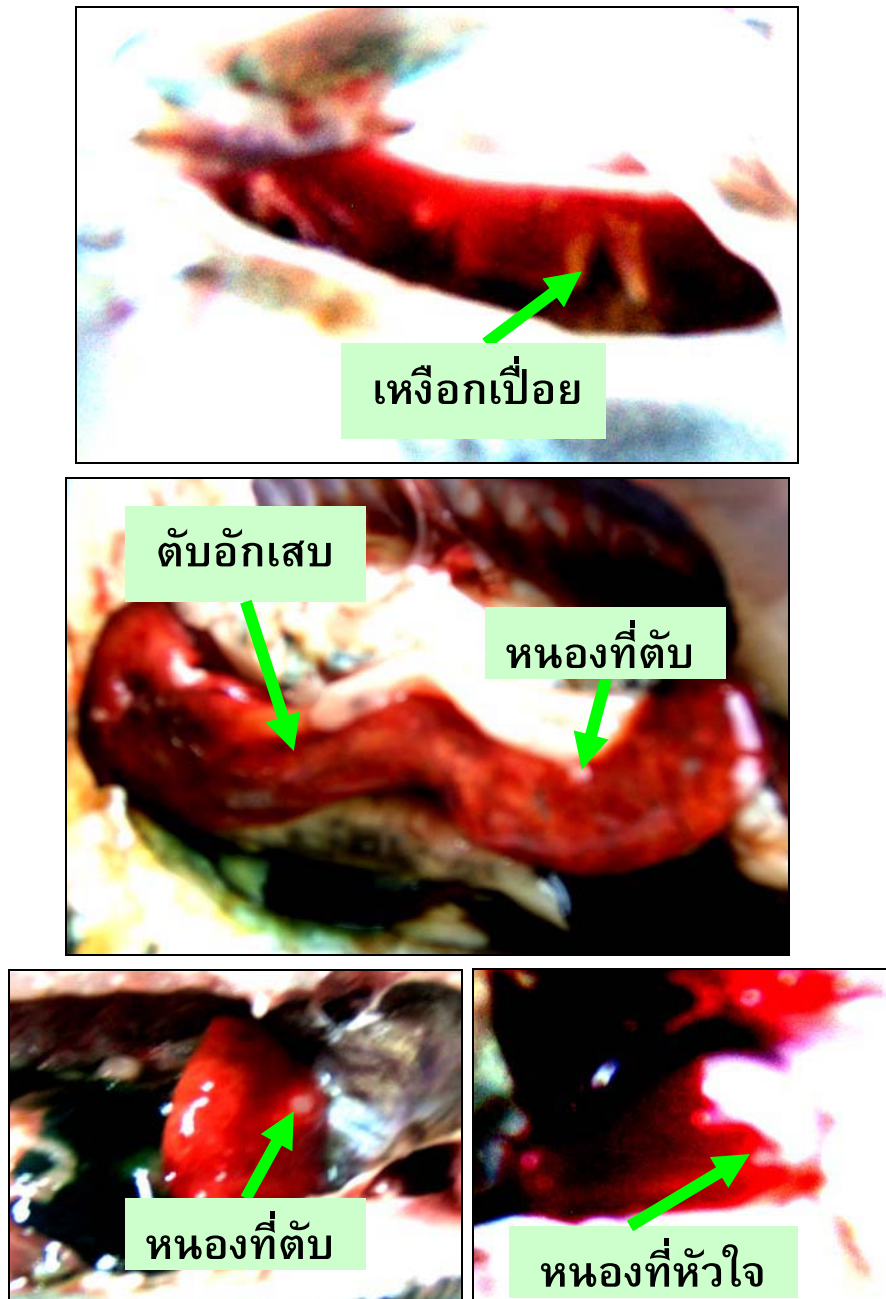
ตารางที่ 3 ค่าอัตราการตายเฉลี่ยของปลานิล หลังจากการให้วัคซีนแบบฉีดและผสมอาหาร

วิธีการให้วัคซีน	อัตราการตายเฉลี่ย (%)
ฉีดเข้าช่องท้อง	4.44 ± 3.85^a
ผสมอาหารนาน 4 สัปดาห์	35.56 ± 3.85^b
ผสมอาหารนาน 6 สัปดาห์	20 ± 6.67^c
ผสมอาหารนาน 8 สัปดาห์	15.56 ± 3.85^c
กลุ่มควบคุม	40 ± 6.67^b

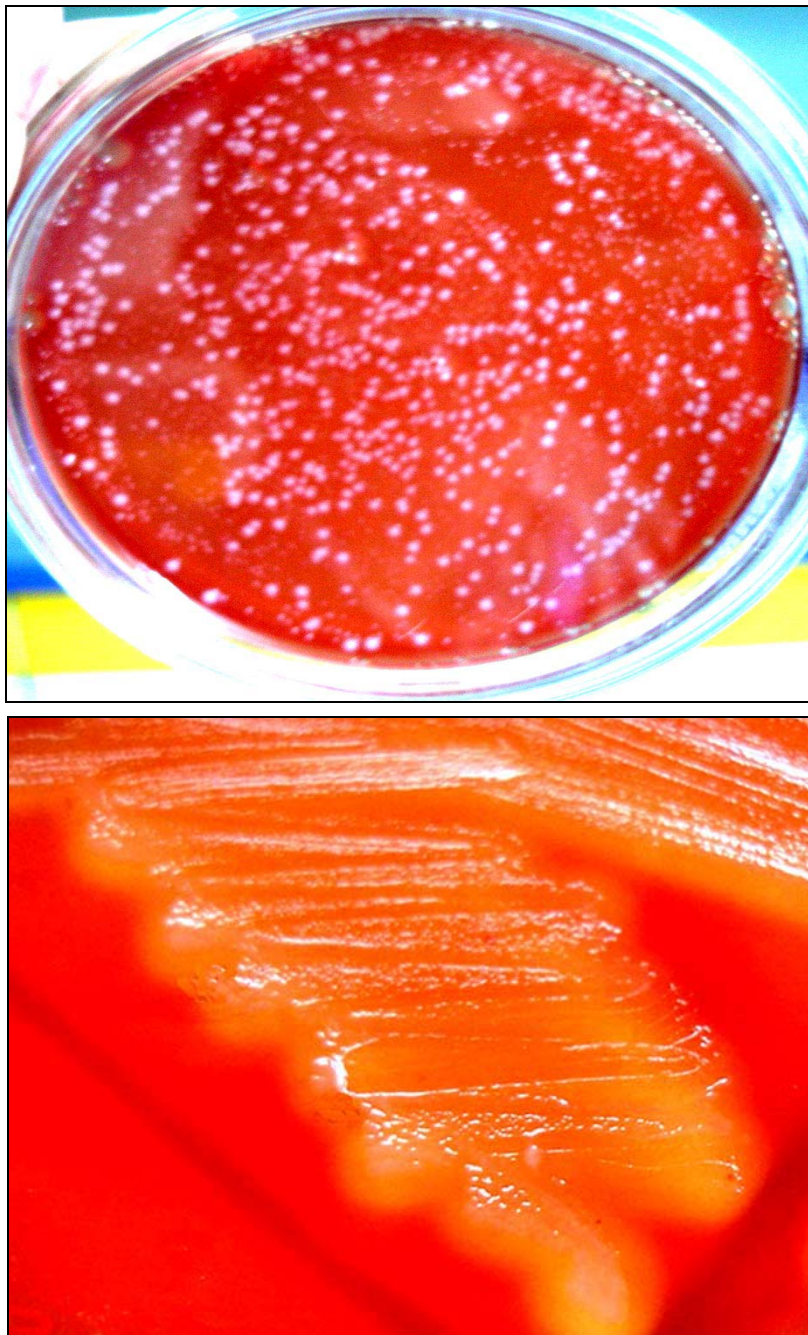
หมายเหตุ ^{ab} ตัวอักษรกำกับที่ต่าง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



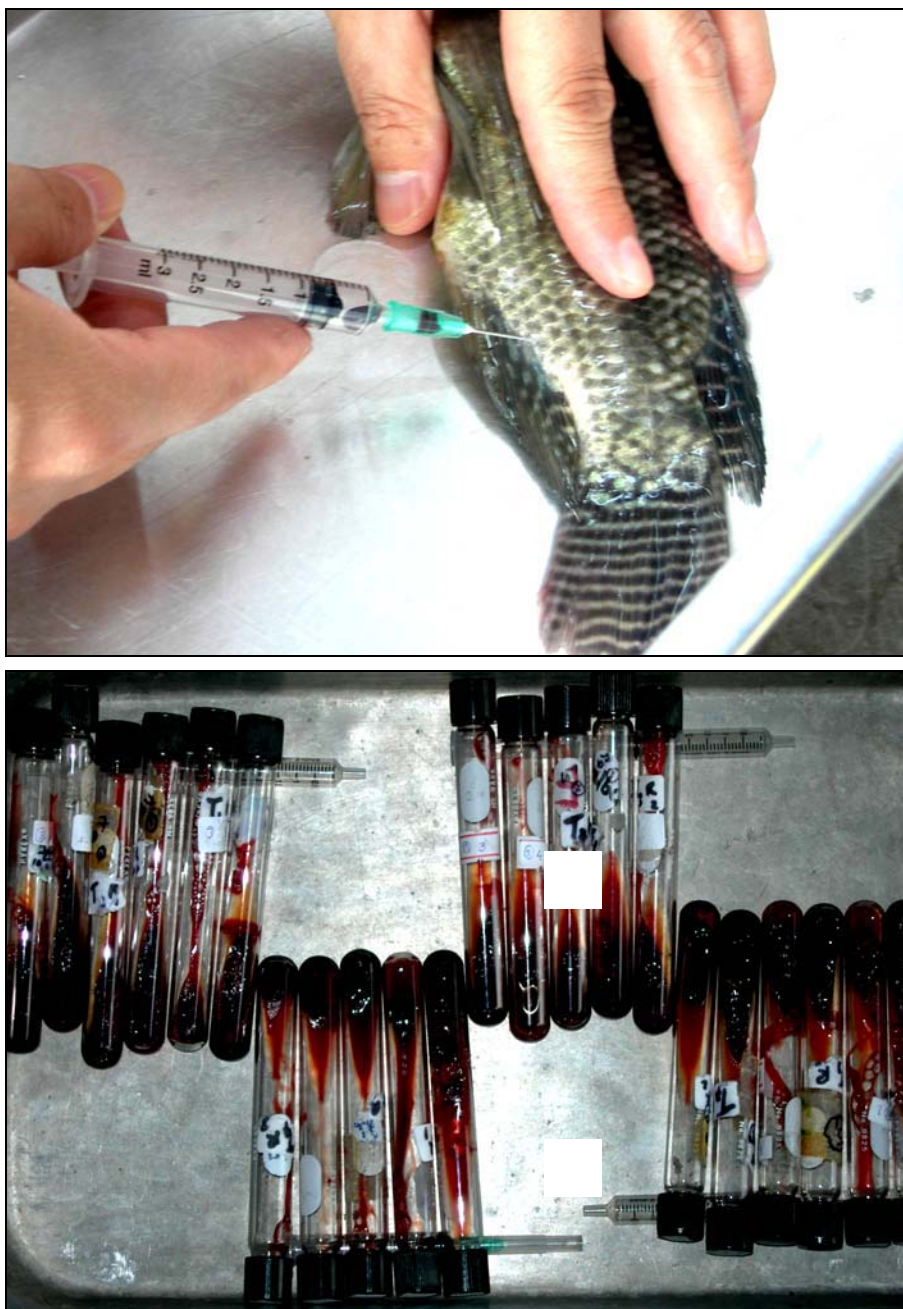
รูปที่ 1 แสดงอาการป่วยของปลานิลจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส



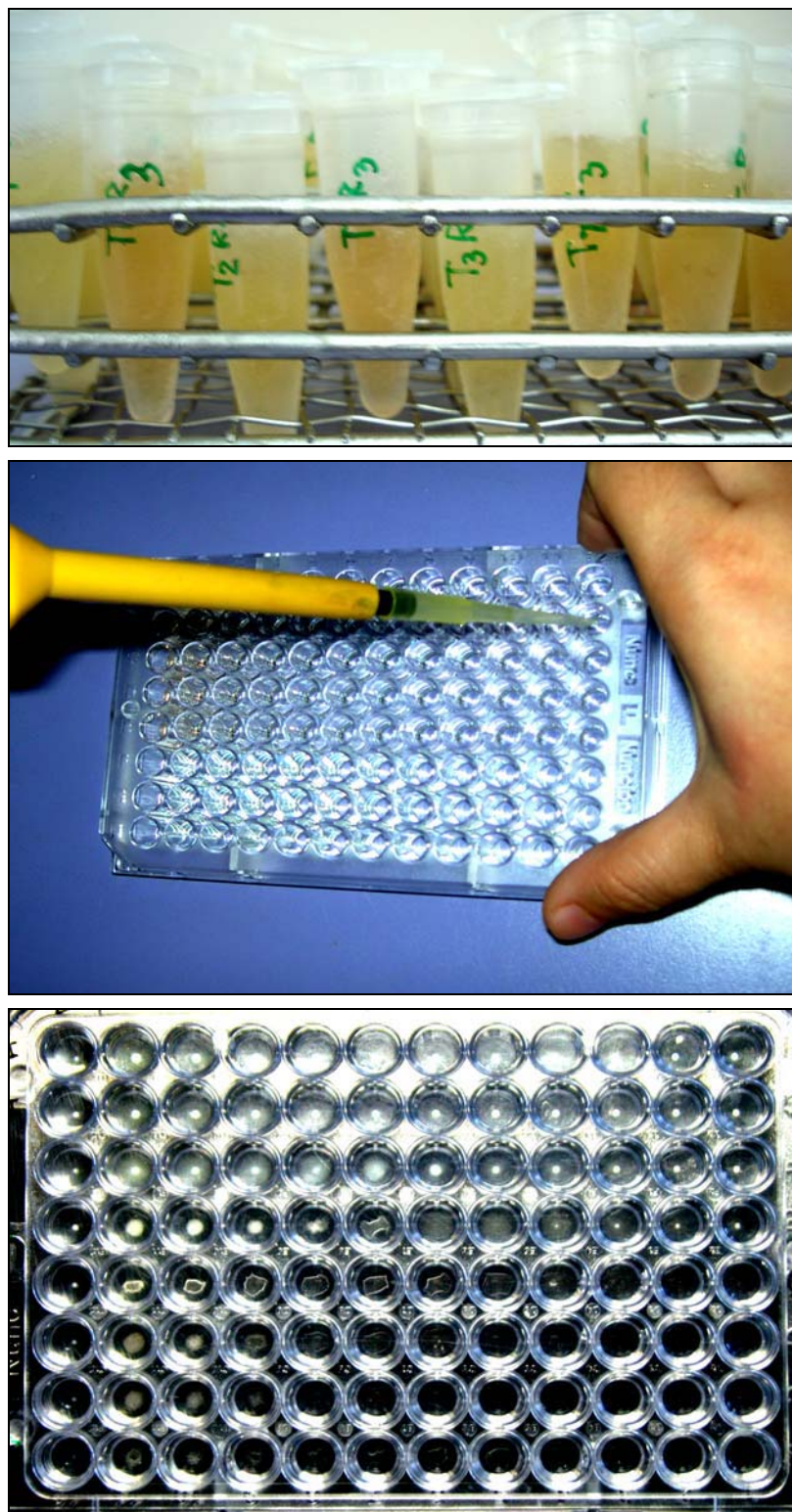
รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างรอยโรคของปลานิลป่วยจากเชื้อสเตรปโตคอคโคซิส



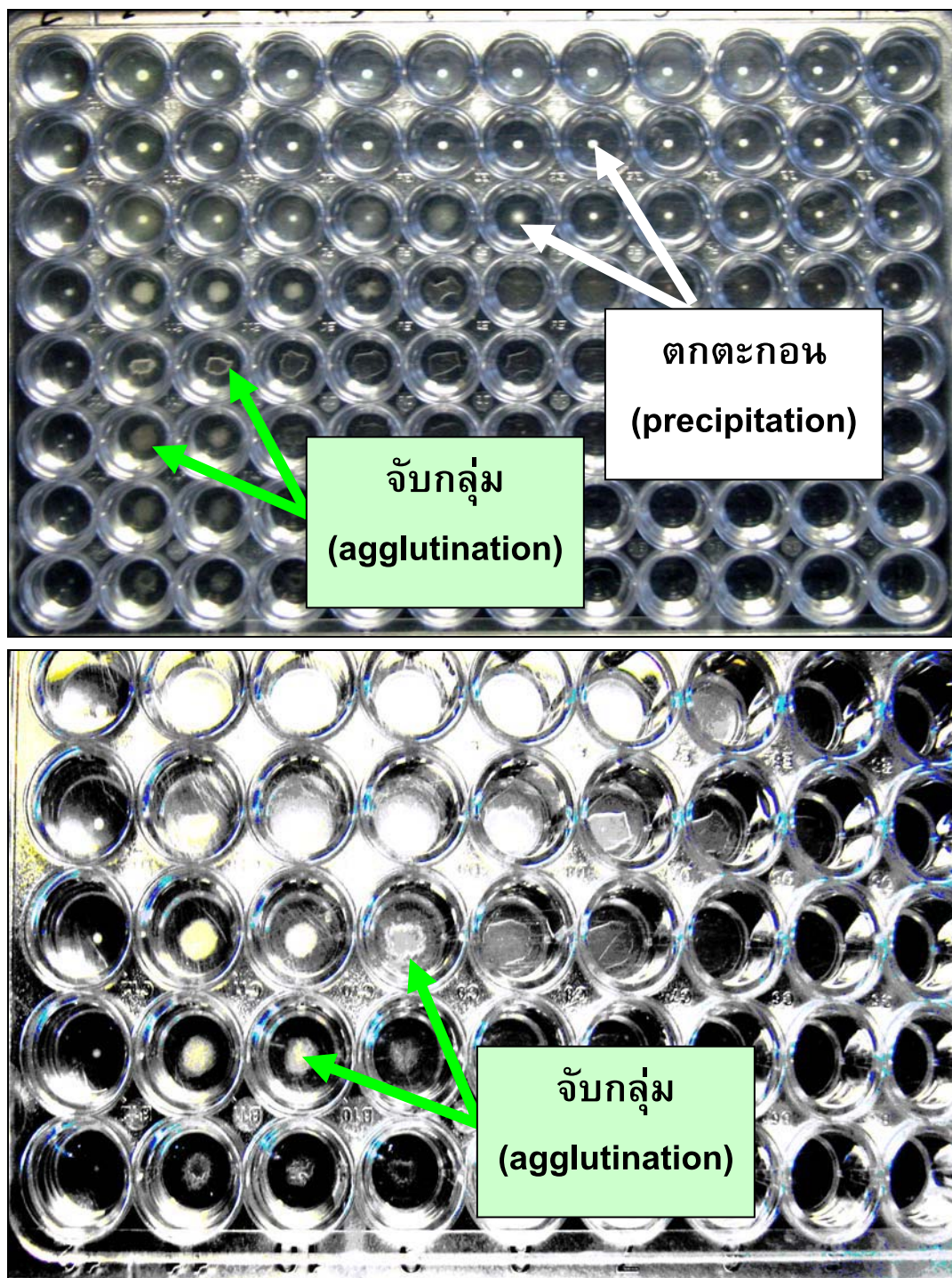
รูปที่ 3 แสดงโคโลนีเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกได้จากปลาป่วย



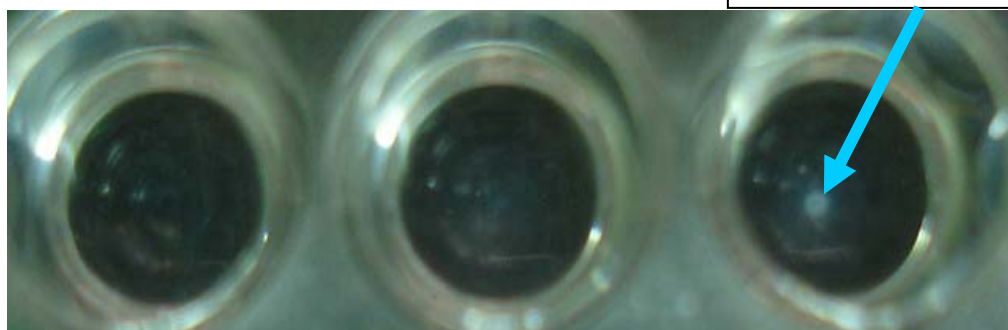
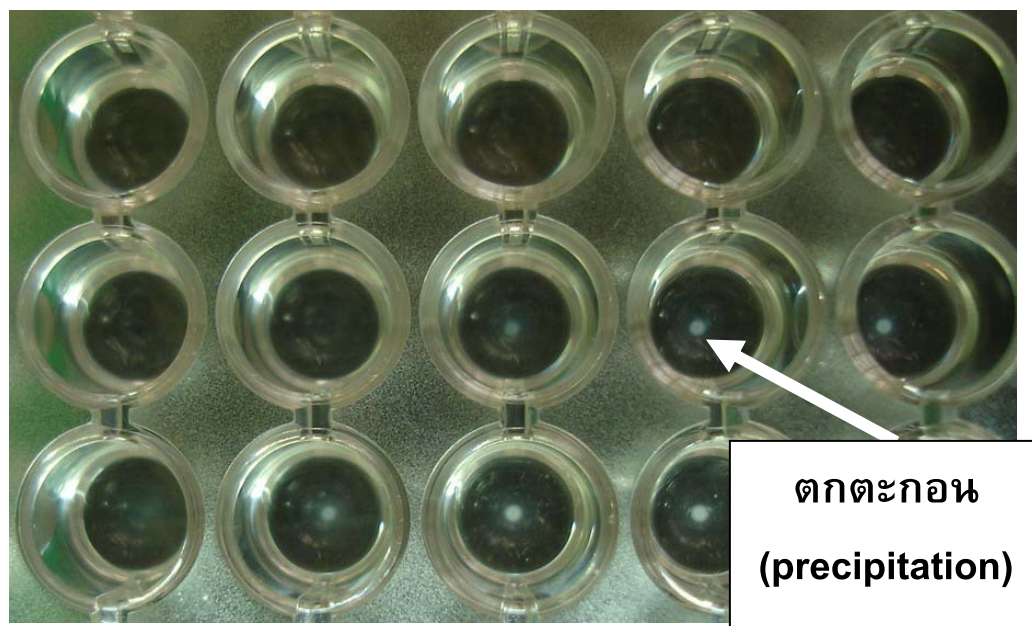
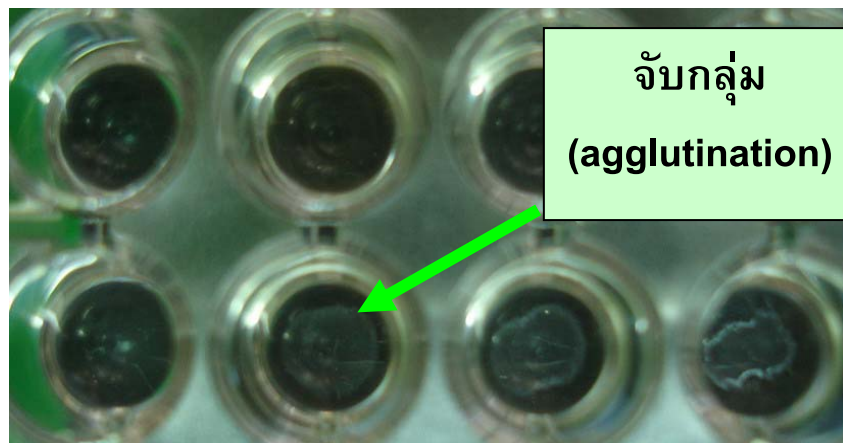
รูปที่ 4 แสดงการเจาะและเก็บเลือดจากปลาไนล์ หลังได้รับวัคซีน



รูปที่ 5 แสดงการตรวจหาระดับแอนติบอดีไ้เตเตอร์จากซีรัมปลานิล



รูปที่ 6 แสดงผลการตรวจแอนติบอดีไตเตอร์ที่มีการตกตะกอน (precipitation) ซึ่งให้ผลเป็นลบ และที่จับกลุ่ม (agglutination) ซึ่งให้ผลเป็นบวกในการสร้างภูมิคุ้มกัน



รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจแอนติบอดีไตเตอร์ที่มีการตกตะกอน (precipitation) ซึ่งให้ผลเป็นลบและที่จับกลุ่ม (agglutination) ซึ่งให้ผลเป็นบวกในการสร้างภูมิคุ้มกัน

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารเคลือบวัคซีนชนิดกินในปลาไหล

2.1 การพัฒนาอนุภาคสารเคลือบวัคซีนชนิดกิน

2.1.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส

โดยวิธี HPLC

กราฟมาตรฐานของเชื้อสเตรปโตคอคคัสแสดงในรูปที่ 10 ผลการทดลอง (peak area) แปรผันตรงกับความเข้มข้นของเชื้อ พบว่าได้สมการเชิงเส้นถดถอย (linear regression equation) เป็น $y = 1.45 \times 10^{-7} - 7.445$ และ correlation coefficient (R^2) เป็น 1

การหาความแม่นยำสามารถหาได้ 3 ระดับ คือ reproducibility, intermediate precision และ repeatability ซึ่งในการวิเคราะห์ครั้งนี้หาความแม่นยำ 2 ระดับ คือ intermediate precision และ repeatability โดย intermediate precision เป็นการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในแต่ละวันที่วิเคราะห์กันคนละวัน ส่วน repeatability เป็นการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในช่วงระยะเวลาหนึ่งในวันเดียวกัน พบว่า repeatability (Within-run precision) ตารางที่ 4-6

ในวันแรก ได้ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 0.25-5.99 (ช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 - 1×10^{10} cfu/ml)

ในวันที่สอง ได้ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 0.09-3.39 (ช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 - 1×10^{10} cfu/ml)

ในวันที่สาม ได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 1.05-5.41 (ช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 - 1×10^{10} cfu/ml) ดังแสดงในตารางที่ 7-9

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติข้างต้น พบว่ามีเพียงบางความเข้มข้นเท่านั้นที่ความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ มี % CV น้อยกว่า 1 โดยที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^9 - 1×10^{10} cfu/ml มี %CV อยู่ในเกณฑ์ดังกล่าว ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 1×10^8 cfu/ml มีการเบี่ยงของข้อมูลเมื่อคิดเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนจะมีค่าสูงกว่าที่ความเข้มข้นสูง ส่วน intermediate precision (Between-run precision) มี % CV เท่ากับ 2.00-5.73 (ช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 - 1×10^{10} cfu/ml) ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยผลการวิเคราะห์ดังกล่าวมีเพียงความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^{10} cfu/ml ที่มี %CV อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ นั่นคือ %CV เท่ากับ 2 %

ในการวิเคราะห์ที่ใช้ข้อมูล พบว่าค่า % recovery เท่ากับ $66.69 \pm 0.18\%$ ถึง $104.29 \pm 3.89\%$ และมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 0.18-6.39 % ในช่วงความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml - 1×10^{10} cfu/ml ดังแสดงในตารางที่ 11

การหา Limit Of Detection จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นั้นวัดจากค่าความเข้มข้นของสารที่ให้ signal-to- noise ratio เท่ากับ 2-3 ผลการทดลองได้ noise เท่ากับ 6.87-9.50 min : 0.0363 mV, Drift เท่ากับ 6.99-7.21 min : 3.8034 mV/ h จากสมการที่ 4 จะได้ $3 \times 0.0363 =$

0.1089 signal สูงเท่ากับ 0.1089 เมื่อนำไปแทนค่าในกราฟมาตรฐาน Limit Of Detection เท่ากับ 3.198×10^5 cfu/ml และ LOQ เป็น 1.0680×10^7 cfu/ml

2.1.2 การศึกษาก่อนตั้งตำรับ

2.1.2.1 การศึกษาปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบภายในและวัตถุดิบภายนอกในการเตรียมไมโครอิมัลชัน

การศึกษาก่อนตั้งตำรับดังกล่าวโดยเตรียม 3 ตำรับ ซึ่งตำรับที่ 1, 2 และ 3 (ตารางที่ 12) ประกอบด้วยวัตถุดิบภายในคือน้ำต่อต่อวัตถุดิบภายนอกคือ dichloromethane เป็น 30:40, 30:45 และ 30: 50 ตามลำดับ พบว่าตำรับที่ 1 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ $107.65 \mu\text{m}$ ส่วนตำรับที่ 2 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย $65.85 \mu\text{m}$ span เท่ากับ 2.335 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรของเหลวในวัตถุดิบภายนอก จะทำให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคขนาดเล็กลดลงได้ และเมื่อเตรียมอนุภาคขนาดเล็กในตำรับที่ 3 พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่แตกต่างจากตำรับที่ 2 แต่การกระจายขนาดอนุภาคมีความเบี่ยงเบนลดลง คือมีค่า span เท่ากับ 1.835 ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodrigues et al. (2006) ที่รายงานว่า การเพิ่มสัดส่วนวัตถุดิบภายในซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อตายของ *Aeromonas hydrophila* จาก 10% เป็น 50% ก่อนนำไปผสมวัตถุดิบภายนอกที่เป็นน้ำมันข้าวโพดหรือเกิดอิมัลชัน ทำให้ขนาดอนุภาควัคซีนโดยเฉลี่ยเพิ่มจาก 56 ไมโครเมตรเป็น 109 ไมโครเมตร และความคงตัวก็เพิ่มขึ้นประมาณ 40%

2.1.2.2 การศึกษาปัจจัยของเวลาที่ใช้ในการก่ออิมัลชัน

การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการลดขนาดอนุภาคโดยเตรียม 3 ตำรับ พบว่าตำรับที่ใช้เวลาในการปั่น 10 นาที ซึ่งมีการกระจายตัวของอนุภาคที่แคบที่สุด ส่งผลให้ตำรับมีความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคที่สูง ส่วนตำรับที่ 1 และตำรับที่ 2 แสดงในรูปที่ 11-13 Singh and Hogan (1998) และ Rodrigues et al. (2006) รายงานว่าการปั่นวัคซีนที่ใช้แอลจินेटเป็นสารตัวกลางในการปลดปล่อยเชื้อ ความเร็วที่เหมาะสมในการปั่นคือที่ 2,000 รอบ นาน 10 นาที

2.1.2.3 การศึกษาของเอทิลเซลลูโลสและไดบิวทิลซีบาเคตการกักเก็บเชื้อ

4.1.2.3.1 ผลของเอทิลเซลลูโลสและไดบิวทิลซีบาเคตต่อการกักเก็บเชื้อสเตรปโตคอคคัส

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเอทิลเซลลูโลส ไดบิวทิลซีบาเคตที่มีส่วนประกอบในตำรับต่างๆ (ตารางที่ 13) และการกักเก็บเชื้อสเตรปโตคอคคัส พบว่าลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง คือ $Y = -0.040A - 6.94B + 76.49$ แสดงให้เห็นว่าเมื่อลดความเข้มข้นของไดบิวทิลซีบาเคต (Dibutyl sebacate) เป็น 6.94% w/v และลดความเข้มข้นของเอทิลเซลลูโลส 0.04% w/v ส่งผลให้ร้อยละการกักเก็บเชื้อสเตรปโตคอคคัสเพิ่มขึ้น 1 % และพบว่าปัจจัยของความเข้มข้นไดบิวทิลซีบาเคต (Dibutyl sebacate) มีผลต่อร้อยละการกักเก็บเชื้อสเตรปโตคอคคัสในอนุภาคขนาดเล็กสูงกว่าปัจจัยความเข้มข้นของเอทิลเซลลูโลส

(Ethylcellulose) ในตำรับ จากผลการศึกษาที่ให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Alavi AK และ Squillante E (2002) ที่พบว่าเมื่อลดความเข้มข้นของไดบิวทิลซีบาเคตในตำรับ ส่งผลให้ร้อยละการกักเก็บเชื้อสเตรปโตคอคคัสในอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิล (โปรตีนแอนติเจน) เพิ่มขึ้น

2.1.2.3.2 ผลของเอทิลเซลลูโลสและไดบิวทิลซีบาเคตต่อขนาดอนุภาค

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเอทิลเซลลูโลส ไดบิวทิลซีบาเคต และขนาดอนุภาคที่ต่ำกว่า 50% ของอนุภาคทั้งหมด พบว่าลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นแบบ Quadratic คือ $Y = -65.63A^2 + 38.85B^2 + 2.98AB - 47.85A - 35.31B + 438.71$ โดยสมการดังกล่าวหมายความว่า ปัจจัยทั้งสองต่างส่งผลต่อขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิลที่ต่ำกว่า 50% ของอนุภาคทั้งหมด

2.1.2.3.3 ผลของเอทิลเซลลูโลสและไดบิวทิลซีบาเคตต่อขนาดอนุภาค

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเอทิลเซลลูโลส ไดบิวทิลซีบาเคต และขนาดอนุภาคที่ต่ำกว่า 90% ของอนุภาคทั้งหมด พบว่าลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นแบบ Quadratic คือ $Y = -239.29A^2 + 104.81B^2 + 24.36AB - 47.85A - 35.31B + 438.71$ โดยสมการดังกล่าวหมายความว่า ปัจจัยทั้งสองต่างส่งผลต่อขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิลที่ต่ำกว่า 90 % ของอนุภาคทั้งหมด

2.1.2.3.4 ผลของเอทิลเซลลูโลสและไดบิวทิลซีบาเคตต่อค่า zeta potential

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเอทิลเซลลูโลส ไดบิวทิลซีบาเคต และค่า zeta potential พบว่ามีลักษณะความสัมพันธ์แบบสมการ 2 ตัวแปร คือ $Y = -0.028A - 0.32B + 0.61AB - 18.99$ จากสมการดังกล่าวหมายความว่าทั้งสองปัจจัยมีผลต่อค่า zeta potential โดยเมื่อลดความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดในตำรับลง จะส่งผลให้ค่า zeta potential เพิ่มขึ้น

2.1.2.3.5 ลักษณะพื้นที่ผิวของอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากตำรับต่าง ๆ

พื้นที่ผิวของอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิลของวัคซีนชนิดกินในปลาที่เตรียมได้แสดงโดยการนำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยคาร์บอนในภาวะสุญญากาศ ยึดบนแท่นสตัป เคลือบด้วยโกลด์ แพลลาเดียมหนาประมาณ 20 นาโนเมตร และนำไปบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดสแกนนิ่ง S-2400 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) ขนาดอนุภาคระดับไมโครเมตร และการปลดปล่อยเชื้อสเตรปโตคอคคัส แสดงในรูปที่ 14-15

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์ความเหมาะสมของปัจจัย พบว่าเมื่อต้องการร้อยละการกักเก็บที่สูงที่สุด คือ 81.43 ควรมีความเข้มข้นของเอทิลเซลลูโลสและความเข้มข้นของไดบิวทิลซีบาเคต เท่ากับ 4%w/v และ 0.28 %w/v ตามลำดับ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาอัตราเร็วในการปลดปล่อยเชื้อสเตรปโตคอคคัส (dissolution test) ในงานวิจัยขั้นต่อไป เพื่อนำผลการศึกษาดังกล่าวมาพัฒนาตำรับวัคซีนในรูปการกินแก่ปลานั้น

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกิน

จากผลการให้วัคซีนเชื้อตายเคลือบอัลจิเนตผสมอาหารต่อระดับภูมิคุ้มกันในปลานิล พบว่าระดับแอนติบอดีไทเตอร์ ที่ 4 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 2.93 ± 1.01 , 4.09 ± 0.60 และ 4.18 ± 0.83 ตามลำดับ และระดับไทเตอร์ ที่ 6 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 4.27 ± 1.01 , 4.71 ± 1.55 และ 5.51 ± 1.9 ตามลำดับ ปลาที่ได้รับวัคซีนความเข้มข้นของเชื้อ 5×10^9 cfu/ml นาน 6 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยสูงที่สุด และแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในความเข้มข้น 1×10^9 และปลาที่ได้รับอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้น 5×10^8 และ 1×10^9 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบระดับไทเตอร์ของปลาที่กินวัคซีนกับปลาที่ฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องพบว่า ไทเตอร์ของปลาที่ฉีดวัคซีนมีระดับสูงกว่าประมาณ 40 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากหลายปัจจัยที่ทำให้วัคซีนชนิดกินมีประสิทธิภาพลดลง เช่น 1) จากสภาวะกรดซึ่งสร้างจากเซลล์ออกซินโตเปปติค (oxyntopeptic cell) ในกระเพาะปลานิลที่มี pH ต่ำประมาณ 4.5 และจะลดต่ำลงถึง 2.0 หลังกินอาหาร ซึ่ง Rodrigues et al. (2006) พบว่า high M-alginate จากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Durvillaea antarctica*) ที่ใช้เตรียมวัคซีนเชื้อตายของ *Aeromonas hydrophila* ชนิดน้ำมันน้ำมัน (water-in-oil emulsion) จะลดความคงตัวลงและปลดปล่อยเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 6% 2) สภาวะต่าง pH 9.0 ในลำไส้ส่วนปลาย ที่มีส่วนทำให้สารเคลือบพองตัว มีความคงตัวลดลงและสลายตัวง่ายขึ้น ซึ่ง Rodrigues et al. (2006) พบว่า high M-alginate ที่ใช้เตรียมวัคซีนเชื้อตายของ *A. hydrophila* ชนิดน้ำมันน้ำมันจะลดความคงตัวลงและปลดปล่อยเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 23% 3) คุณสมบัติของอนุภาค เช่น ความคงตัว ขนาด ชนิดวัตถุ มีผลโดยตรง (O' Hogan, 1998; Singh et al., 1998; Fundueanu et al., 1999; Poncellet et al., 1999) จากการที่อาหารหรือรวมถึงวัคซีนที่ปลานิลกินจะอยู่ในระบบทางเดินอาหารของปลานานได้ถึง 12 ชั่วโมง (Rodrigues et al., 2006) การปลดปล่อยวัคซีนจากการสลายตัวของสารตัวกลางในอนุภาค ถ้าเกิดขึ้นมากในลำไส้ส่วนต้นน่าจะส่งผลให้การเก็บกินเชื้อและการสร้างภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นได้ระดับต่ำ (Joosten et al., 1997)

การให้วัคซีนโดยวิธีการกินมีการศึกษาวิจัยที่เน้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรค จากผลการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลาตั้งแต่ 4 และ 6 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเพิ่มขึ้นและสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของ

นิลบล กิจอันเจริญ (2534) และกรองแก้ว พลายมาศ (2541) ที่ให้วัคซีนผสมอาหารในปลาตู้ก๊วย และปลาดุกลูกผสม พบว่าค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 0.70 ± 0.56 และ 6.10 ± 2.54 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับปลากลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 1.50 ± 0.28 และ 6.60 ± 0.42 ตามลำดับ ทั้งการให้วัคซีนครั้งเดียวหรือการให้วัคซีนมากกว่าหนึ่งครั้ง จากผลการทดลองการให้วัคซีนผสมอาหารในระยะเวลาที่นานขึ้นมีแนวโน้มที่ทำให้ปลา มีระดับแอนติบอดีไทเตอร์ในซีรัมสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพลายมาศ (2541) ที่ได้ทำการหาประสิทธิภาพของการต่อต้าน *A. hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินในปลาดุกลูกผสมโดยการแช่ในวัคซีน ก่อนให้วัคซีนซ้ำโดยการผสมอาหาร พบว่าการให้วัคซีนผสมอาหารนาน 4 สัปดาห์ต่อเดือน นาน 3 เดือน ให้ผลในการป้องกันโรคได้ดีที่สุด และการศึกษาของ Clark et al. (2003) ที่รายงานว่าเมื่อให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *S. iniae* ในลูกปลานิลด้วยวิธีการผสมอาหารพบว่า ลูกปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ทั้งนี้คงเพราะปลาที่ได้รับวัคซีนมีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่า

สรุปผลการวิจัย

จากการพิจารณาระดับแอนติบอดีของปลานิลที่ได้รับวัคซีนชนิดเคิลือบอัลจิเนต 2% ผสมอาหารนาน 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาควัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าประมาณ 5×10^9 cfu/ml อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาสารเคลือบหลายประเภทและความหนืดต่างชนิด ในงานวิจัยขั้นต่อไป เพื่อนำผลการศึกษาดังกล่าวมาพัฒนาตำรับวัคซีนในรูปแบบการกินแก่ปลานิล

2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนชนิดกินแบบเคลือบ

2.3.1) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง

จากผลการทดลองที่ใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ผสมคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรในปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ขนาดประมาณ 100 กรัมต่อตัว พบว่าหลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 มีระดับแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยสูงสุดคือมากกว่า 2,048 ซึ่งสูงกว่าการฉีดวัคซีนเชื้อเป็น ฉีดเชื้อตายชนิดโดยไม่ผสมแอดจูแวนท์ และการทำวัคซีนโดยวิธีการแช่และการผสมอาหารกิน ปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อความเข้มข้น 10^6 cfu/ml 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ย 497 ส่วนค่าแอนติบอดีไทเตอร์หลังการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องครั้งที่สอง หลังการให้วัคซีนครั้งแรก 14 วัน พบว่ามีค่าประมาณ 341 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ฉีดวัคซีน (ตารางที่ 15-16) ผลการทดลองนี้ให้ผลคล้ายคลึงงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งสรุปว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องในปลานิลและปลาชนิดอื่นๆ เป็นวิธีการที่กระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรัมที่มีประสิทธิภาพ (เกรียงศักดิ์ สายธนู และเกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2522; นิลบล, 2534; Eldar et al., 1995; Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000; Prasad, 2002) วิธีการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมักจะทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันดีกว่าการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การแช่และการผสมอาหาร การฉีดวัคซีนครั้งเดียวกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่สูงเท่าการฉีด