อย่างน้อย 2 ครั้ง (รัชนี และอนุทิน, 2532; Sakai et al., 1989; Mastsuyama et al., 1992; Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000) เช่นเดียวกันกับการวิจัยของ Surendra (2002) ที่ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตายจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าการให้วัคซีนเชื้อตายเฉพาะครั้งที่สองเท่านั้นที่มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูง

ความเข้มข้นของวัคซีนที่ใช้ก็มีผลโดยตรงต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่ง Eldar et al. (1997) ได้ทดลองให้วัคซีนเชื้อตายแก่ปลาเทราท์สายรุ้ง พบว่าวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น $3x10^{11}$ cfu/ml ทำให้ปลาต้านทานโรคได้ดีกว่าการให้วัคซีนในระดับที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ Klesius et al. (2000) รายงานว่า ความเข้มข้นของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus sp.* ที่ฉีดเข้าช่องท้องส่วนใหญ่มีค่าประมาณ $1x10^{9}$ cfu/ml เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มได้ดี เช่นเดียวกับในปลานิลแดงซึ่งได้รับการฉีดวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น $1x10^{9}$ cfu/ml สามารถกระตุ้นให้ปลานิลแดงตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงเท่ากับ $1x10^{8}$ cfu/ml (เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง และคณะฯ 2546) และ 1 x 10^{7} cfu/ml (Shelby et al., 2002) ก็สามารถให้ปลานิลตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นวัคซีนที่ระดับ $1x10^{8}$ cfu/ml แก่ปลานิล ซึ่งอยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา เมื่อเปรียบเทียบกับงานทดลองอื่น

ขนาดและอายุของสัตว์ก็มีผลต่อระดับการสร้างภูมิคุ้มกัน สัตว์ที่มีขนาดใหญ่และอายุมากมักตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่าสัตว์ที่มีขนาดเล็กและอายุน้อยกว่า Thorburn and Jansson (1988) ได้ทำการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลาเทราท์สายรุ้งขนาดต่างๆ กันให้ได้รับวัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* ที่ระดับความเข้มข้น 1:500 พบว่าปลาขนาดเล็กจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันน้อยกว่าปลาขนาดใหญ่ และ Quentel and Baulny (1995) ได้ทำการทดลองฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพียงครั้งเดียว เพื่อป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาเทอร์บอท (*S. maximus*) วัยรุ่น ที่อายุต่างกัน พบว่าอัตราการรอดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุระหว่าง 90-104 วัน หลังจากได้รับการฉีดวัคซีนเป็นเวลา 2 เดือน

และ สภาวะแวดล้อม เช่น คุณภาพน้ำ ฤดูกาล และช่วงแสง พบว่าส่งผลต่อประสิทธิผลของการใช้วัคซีน (เยาวนิตย์และจีรนันท์, 2544; Dale and Foreman, 1984; Ellis, 1988; Cryz, 1991; Stoskopf, 1992; Iwama and Nakanishi, 1996)

จากผลการทดลองนี้ที่ใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ผสมคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรในปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ขนาดประมาณ 100 กรัม มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยมากกว่า 2,048 หลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งสูงกว่าการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นฉีดเชื้อตายชนิดโดยไม่ผสมแอดจูแวนท์ และการทำวัคซีนโดยวิธีการแช่และการผสมอาหารกิน (ตารางที่ 12) แต่การใช้คอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีค่าใช้จ่ายต่อตัวปลาประมาณ 65 สตางค์ ทำให้การเลือกใช้เชื้อเป็นความเข้มข้น 10^{4} cfu/ml และการใช้เชื้อตายความเข้มข้น 10^{8} cfu/ml 2 ครั้ง น่าจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับเกษตรกร โดยหลักทั่วไปการให้เชื้อ

เป็นอาจเป็นการโน้มนำให้เกิดการระบาดของโรค โดยเฉพาะเมื่อปลาที่เลี้ยงมีความเครียดสูงหรืออยู่ในน้ำคุณภาพไม่ดี

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Grabowski and Cain (2004) ที่รายงานว่าปลานิลไนล์ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย *Flovobacterium columnare* ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์อัตราส่วน 1:1 มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย 11,200 หลังการทำวัคซีนครั้งแรก และเพิ่มขึ้นเป็น 30,600 หลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งแตกต่างอย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ที่มีระดับไตเตอร์เฉลี่ย 67 หลังการทำวัคซีน 6 สัปดาห์ Ali (1997) รายงานว่าระดับภูมิคุ้มกันของปลานิลไนล์ที่ทำวัคซีนเชื้อตาย *A. hydrophila* ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ชนิดคอมพลีทมีระดับที่ไม่แตกต่างจากฟรอยด์แอดจูแวนท์ชนิดอินคอมพลีท ระดับไตเตอร์ของวัคซีนผสมแอดจูแวนท์เริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 หลังทำวัคซีนครั้งที่ 2 แอดจูแวนท์ชนิดน้ำปนน้ำมันหรือชนิดน้ำมันปนน้ำพบว่าโดยทั่วไปสามารถเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนในการป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนในรูปน้ำที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ น้ำมันแอดจูแวนท์ชนิดที่เหมาะสมในการเตรียมวัคซีนมี 2 ประเภทคือ 1) มิเนอรัลออยล์ 2) เมตาโบไลเซเบิลออยล์ เช่น น้ำมันถั่ว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปลาสควาแลน และโทโคฟีรอลในวัคซีนควรมีสารรักษาสภาพ เช่น ซูโครส ฟอสเฟต กลูตาเมท และ ฮิวแมนอัลบูมิน (SPGA) เพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาสภาพวัคซีนให้นานมากขึ้น (WO Pat.No. 003734, 2008) Chen et al. (1996) พบว่าการใช้ extra cellular product (ECP) ของเชื้อ *Mycobacterium spp.* ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่เชื้อสร้างและขับออกนอกเซลล์ (Adam et al., 1996) มาผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์สามารถเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันในปลาเทารท์สายรุ้ง เช่นกัน Choi and Oh (2000) รายงานว่า ECP ของเชื้อ *M. marinum* กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลานิลไนล์ได้

จากผลการทดลองนี้ที่ใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ฉีดเข้าช่องท้อง 1 ครั้งร่วมกับการกินวัคซีนเคลือบเจลาติน อัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับเอธิลเซลลูโลส นาน 6 สัปดาห์พบว่าระดับการสร้างภูมิคุ้มกันต่ำมาก และต่ำกว่าการฉีดเข้าช่องท้อง 2 ครั้งและการใช้วัคซีนฉีดผสมแอดจูแวนท์ นอกจากนี้ชนิดสารเคลือบผสมอาหารไม่ทำให้ระดับการสร้างภูมิคุ้มกันมีค่าแตกต่างกันมาก (ตารางที่ 15-16)

2.3.2) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการได้รับวัคซีนชนิดแช่

การศึกษาการให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่ พบว่ามีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทำวัคซีนคือ อยู่ระหว่าง 3.89-4.67 (ตารางที่ 16) จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลากลุ่มที่ได้รับการแช่วัคซีนแบบโดยตรงมีค่าใกล้เคียงกับการแช่ในสารละลายเกลือก่อนการแช่ในวัคซีน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Sakai et al. (1987) ที่ทำการแช่ปลา rainbow trout ด้วยวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. และปลา coho salmon ซึ่งได้รับการแช่วัคซีนที่เตรียมได้จากเชื้อ *V. anguillarum* แต่ตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรั่ม แต่ในปลา yellowtail ซึ่งได้รับการแช่วัคซีนที่เตรียมจาก endotoxin ของเชื้อ *Streptococcus* sp. กลับมีรายงานว่าตรวจพบแอนติบอดีในซีรั่มปริมาณสูง (Kusuda and Takagi, 1983) และ Sakai et al. (1989) กล่าวว่าการเตรียมวัคซีนจาก whole cells

ของเชื้อแบคทีเรียจะได้ผลในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มน้อยกว่าการเตรียมวัคซีนจาก endotoxin ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้เป็นการเตรียมวัคซีนจาก whole cells ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะส่งให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ในปริมาณน้อยเช่นกัน และให้ผลคล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่นๆ อาทิ Akhlaghi et al. (1996) ที่รายงานว่าตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรั่มของปลา rainbow trout ซึ่งได้รับการแช่วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ถึงแม้ว่าจะใช้เทคนิค Elisa ซึ่งมีความไวสูงก็ตาม แต่ก่อนหน้านั้น Iida et al. (1981) ได้ทำการทดลองในปลา yellowtail ด้วยเชื้อชนิดเดียวกันกลับสมมารถตรวจพบแอนติบดดีในซีรั่มถึงแม้จะใช้วิธีการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนธรรมดา (agglutination) มีรายงานเพิ่มเติมว่าการแช่วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Enterococcus* sp. แก่ปลา turbot ตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรั่ม (Toranzo et al., 1995) อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างทางสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ชนิดปลาหรือระยะเวลาและจำนวนครั้งในการแช่วัคซีน เช่น การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล ซึ่งได้รับการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic infiltration ที่เตรียมจากชื้อ *E. tarda* พบว่าการแช่วัคซีนเพียงครั้งเดียวและการแช่วัคซีนสองครั้งมีผลต่อการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มแต่ให้ผลไม่แตกต่างกัน (Lio-po and Wakabayashi, 1986) ซึ่งการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาด้วยวิธีการแช่วัคซีนนั้นอาจจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มหรือไม่ก็ได้ (Ellis, 1988) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการแช่วัคซีนของปลาส่วนใหญ่เป็นการตอบสนองภูมิคุ้มกันของเซลล์ซึ่งเป็นการทำงานของ phagocytosis ซึ่งเมื่อเกิดขบวนการดังกล่าว ปลาจะมีภูมิคุ้มกันต่อโรคได้ในช่วงระยะเวลาสั้น (สิทธิพันธ์ และคณะ, 2537) เช่น สามารถตรวจพบว่าเซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอมมีการทำงานมากขึ้นในปลา rainbow trout และปลา coho salmon ที่ได้รับการแช่วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. หลังการได้รับวัคซีนเพียง 14 ถึง 25 วัน ถึงแม้ว่าจะตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรั่มก็ตาม (Sakai et al., 1986, 1987, 1989) และในบางครั้งตอบสนองโดยการขับเมือกออกมามากกว่าปกติ (Kusuka and Salati, 1982)

2.3.3) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการได้รับวัคซีนชนิดผสมอาหาร

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการให้วัคซีนชนิดเคลือบผสมอาหารเป็นเวลา 6 สัปดาห์ต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลานิล โดยได้รับและไม่ได้รับวัคซีนแบบฉีดและแช่ร่วมด้วย เมื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีไตเตอร์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.89-12.00 (ตารางที่ 15-16) ซึ่งประเมินว่าระดับการสร้างภูมิคุ้มกันค่อนข้างต่ำ และต่ำกว่าการฉีดเข้าช่องท้อง 2 ครั้งและการใช้วัคซีนฉีดผสมแอดจูแวนท์อย่างมาก นอกจากนี้ชนิดสารเคลือบผสมอาหารไม่ทำให้ระดับการสร้างภูมิคุ้มกันไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 15-16)

การให้วัคซีนโดยวิธีการผสมอาหารเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นักวิจัยสัตว์น้ำให้ความสำคัญ โดยมีการศึกษาวิจัยที่เน้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรค จากผลการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลาตั้งแต่ 4 ถึง 8 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยเพิ่มขึ้นและสูงกว่ากลุ่มควบคุม และแม้ปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยต่ำกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แต่ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยไม่ต่างกัน ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของนิลุบล กิจอันเจริญ (2534) และกรองแก้ว พลาย

มาศ (2541) ที่ให้วัคซีนผสมอาหารในปลาดุกอุย และปลาดุกลูกผสม พบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 0.70±0.56 และ 6.10±2.54 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับปลากลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 1.50±0.28 และ 1.60±0.42 ตามลำดับ ทั้งการให้วัคซีนครั้งเดียวหรือการให้วัคซีนมากกว่าหนึ่งครั้ง

จากผลการทดลองการให้วัคซีนผสมอาหารในระยะเวลาที่นานขึ้นมีแนวโน้มที่ทำให้ปลามีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพลายมาศ (2541) ที่ได้ทำการหาประสิทธิภาพของการต่อต้าน *A. hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินในปลาดุกลูกผสมโดยการแช่ในวัคซีน 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

2.3.4) การทดสอบความต้านทานโรคของปลานิล

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรค โดยการฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* เข้าทางช่องท้องและทำการวิเคราะห์อัตราการตายเฉลี่ยพบว่า ปลานิลที่ได้รับวัคซีนผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ฉีดเข้าช่องท้อง สามารถต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสได้ดีที่สุด โดยไม่มีการตาย (อัตรารอด 100%) ส่วนปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นขนาด 10^6 cfu/ml 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน มีค่าเฉลี่ย 497 มีอัตราตายเท่ากับ 4.60±0.99 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 16) ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับต่ำมาก ขณะที่ปลากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนมีอัตราการตายระหว่าง 23.72-27.78 เปอร์เซ็นต์ ปลานิลที่ได้รับวัคซีนชนิดแช่ 1 ครั้งละกินวัคซีนชนิดเคลือบผสมอาหาร มีอัตราการตายระหว่าง 32.48-33.49 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างจากปลากลุ่มควบคุม ส่วนปลานิลที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นไม่ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ความเข้มข้น 10^1 10^2 และ 10^4 cfu/ml ฉีดเข้าช่องท้อง 1 ครั้ง และกินวัคซีนชนิดเคลือบผสมอาหาร มีอัตราตายระหว่าง 34.13-37.35 เปอร์เซ็นต์ และปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งมีอัตราการตายเฉลี่ยระหว่าง 33.11-36.34เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17) จากผลการทดลองระดับการตายน้อยกว่า 5% ของปลาที่ได้รับวัคซีนฉีดเชื้อเป็น 2 ครั้งซึ่งมีระดับไตเตอร์เกิน 497 ระดับไตเตอร์นี้น่าจะเป็นระดับไตเตอร์เป้าหมายในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลต่อไป โดยเฉพาะการให้วัคซีนในรูปแบบการกินหรือการกินร่วมกับการฉีด นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้แอดจูแวนท์ชนิดต่างๆ เพิ่มเติมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล

ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Surendra (2002) ได้ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตายซึ่งเตรียมจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดตายสูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน Eldar et al. (1995) กล่าวว่าการฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมได้จาก whole cell ของเชื้อ *S. difficilis* เข้าช่องท้องแก่ปลานิลนั้น ให้ผลในการป้องกันโรคได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่เป็น homologous vaccine และ heterologous vaccine ของเชื้อ *Streptococcus* spp. แต่วัคซีนให้ผลในการป้องกันโรคได้ค่อนข้างต่ำในปลานิลแดง คือ 42.55

เปอร์เซ็นต์ (Prasad, 2002) ส่วนในปลา rainbow rout ให้ผลในการป้องกันโรคได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Sakai et al., 1987) ในขณะที่ Ellis (1988b) ให้เหตุผลสนับสนุนว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องให้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มได้เร็วกว่าการแช่วัคซีน เนื่องจากการฉีดเป็นวิธีการซึ่งทราบถึงปริมาณ และความเข้มข้นของวัคซีนที่ปลาได้รับเข้าสู่ร่างกายแน่นอนกว่าวีการแช่ แต่การฉีดไม่ใช่วิธีที่ทำให้ปลาเกิดโรคได้ตามธรรมชาติ การฉีดจะเป็นเพียงการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบทั่วไปและแบบเฉพาะที่ จึงทำให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดีสูงกว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีอื่น (Dun et al., 1990)

จากการทดลองเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารนาน 4 สัปดาห์ สามารถต้านทานโรคน้อยกว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเป็นเวลา 6 และ 8 สัปดาห์ แสดงว่าความต้านทานโรคในแง่อัตราตายมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาการได้รับวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับการผลการวิจัยของกรองแก้ว (2541) ซึ่งได้ทำการให้วัคซีนซ้ำโดยการผสมอาหารแก่ปลาดุกลูกผสมในช่วงระยะเวลาต่างกันคือ ได้รับอาหารผสมวัคซีนเดือนละ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ เป็นเวลาติดต่อกันนาน 3 เดือน แล้วนำมาทดสอบความต้านทานโรคกับเชื้อ *A. hydrophila* พบว่าปลาทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมวัคซีนมีความต้านทานโรค หรือมีอัตราการรอดสูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน เมื่อสังเกตผลที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลองมีความต้านทานโรคสูงสุดเท่ากับ 53.03 เปอร์เซ็นต์ และจากกรายงานของ 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 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนซึ่งมีอัตรารอดเพียง 20 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้จำนวนครั้งและอัตราส่วนในการให้วัคซีนผสมอาหารที่มากขึ้นจะช่วยเพิ่มอัตรารอดในปลาเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ นิลุบล กิจอันเจริญ (2534) ที่รายงานว่าปลาดุกอุยที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารสองครั้ง ให้ผลในการป้องกันโรคดีกว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารเพียงครั้งเดียวเมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย Plumb and Vinitnantharat (1994) รายงานว่าในปลาดุกอเมริกันซึ่งได้รับวัคซีนผสมอาหารที่เตรียมได้จากเชื้อ *E. ictaluri* มีอัตราการรอดเพิ่มสูงขึ้นตามอัตราส่วนของวัคซีนที่ผสมในอาหาร เนื่องจากการให้วัคซีนผสมอาหารนั้นจะต้องใช้แอนติเจนในปริมาณมากเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา เพราะแอนติเจนบางส่วนอาจถูกทำลายโดยขบวนการย่อยอาหาร (Bogwald et al., 1994)

จากผลการทดลองวัคซีนในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยวิธีการผสมอาหารอย่างน้อย 4 สัปดาห์มีค่าอัตราตายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่อัตราตายดังกล่าวยังน้อยกว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องอยู่มาก ดังนั้นการให้วัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* โดยการผสมอาหารในครั้งนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระยะต่อไป เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำวัคซีนในระดับที่สูงขึ้น ก่อนการนำไปใช้ในสภาพการเลี้ยงจริง

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเปรียบเทียบการสร้างภูมิคุ้มกันภายหลังปลาได้รับวัคซีนชนิดฉีด แช่ และกินผสมอาหารนาน 6 สัปดาห์ พบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของ ปลาที่ฉีดวัคซีนผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ 2 ครั้งมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเกิน 2,048 รองลงมาคือปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นขนาด 10^6 cfu/ml 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน มีค่าเฉลี่ย 497 เมื่อทดสอบความต้านทานโรค โดยการฉีดเชื้อเป็นของเชื้อ *S. agalactiae* เข้าช่องท้องของปลาที่ได้รับวัคซีนทั้ง 3 ชนิด พบว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีอัตราตายเป็น 0 รองลงมาคือเชื้อเป็นขนาด 10^6 cfu/ml 2 ครั้งมีอัตราตายต่ำกว่า 4.60% ซึ่งแตกต่างจากปลาที่ได้วัคซีนแบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ที่ทำภายใน 1 วัน (Within- run precision) โดยทำการทดลองวันที่ 21 กรกฎาคม 2551 (n=10)

ความเข้มข้น (cfu/ml)	เช้า	เที่ยง	เย็น	mean	SD	% CV
1×10^8	12.341	13.739	12.469	12.850	0.77	5.99
1×10^9	141.171	120.661	120.838	127.557	11.79	9.24
1×10^{10}	1410.785	1416.322	1417.322	1414.810	3.52	0.25

ตารางที่ 5 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ที่ทำภายใน 1 วัน (Within- run precision) โดยทำการทดลองวันที่ 22 กรกฎาคม 2551 (n=10)

ความเข้มข้น (cfu/ml)	เช้า	เที่ยง	เย็น	mean	SD	%CV
1×10^8	13.091	14.005	13.614	13.570	0.46	3.39
1×10^9	146.599	146.031	145.224	145.951	0.69	0.47
1×10^{10}	1364.675	1366	1367.254	1365.976	1.29	0.09

ตารางที่ 6 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ที่ทำภายใน 1 วัน (Within- run precision) โดยทำการทดลองวันที่ 23 กรกฎาคม 2551

ความเข้มข้น (cfu/ml)	เช้า	เที่ยง	เย็น	mean	SD	%CV
1×10^{8}	13.836	13.312	13.240	13.463	0.33	2.45
1×10^{9}	146.953	146.975	133.609	142.512	7.71	5.41
1×10^{10}	1414.903	1419.863	1392.01	1408.925	14.86	1.05

ตารางที่ 7 ความแม่นยำที่วิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ในวันเดียวกัน (Within-run precision) และระหว่างวัน (Between-run precision) ที่ความเข้มข้น $1x10^{8}$ cfu/ml

วันที่ /เวลาที่ทำการประเมิน	Peak area			% CV ของ within-run precision
	1*	2*	3*	
วันที่ 1	12.341	13.739	12.469	5.99
วันที่ 2	13.091	14.005	13.614	3.39
วันที่ 3	13.836	13.312	13.24	2.45
% CV ของ between-run precision	5.71	2.55	4.45	

1*, 2* และ 3* คือ ช่วงเวลาที่ทำการประเมินช่วงเช้า , เที่ยง และเย็น ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ความแม่นยำที่วิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ในวันเดียวกัน (Within-run precision) และระหว่างวัน (Between-run precision) ที่เชื้อความเข้มข้น $1x10^{9}$ cfu/ml

วันที่ /เวลาที่ทำการประเมิน	Peak area			% CV ของ within-run precision
	1*	2*	3*	
วันที่ 1	141.171	120.611	120.838	9.24
วันที่ 2	146.599	146.031	145.224	0.47
วันที่ 3	146.953	146.975	133.609	5.41
% CV ของ between-run precision	2.24	10.84	9.15	

ตารางที่ 9 ความแม่นยำที่วิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ในวันเดียวกัน (Within-run precision) และระหว่างวัน (Between-run precision) ที่เชื้อความเข้มข้น $1x10^{10}$ cfu/ml

วันที่ /เวลาที่ทำการประเมิน	Peak area			% CV ของ within-run precision
	1*	2*	3*	
วันที่ 1	1410.68	1416.32	1417.322	0.25
วันที่ 2	1364.68	1366	1367.254	0.09
วันที่ 3	1414.9	1419.86	1392.01	1.05
% CV ของ between-run precision	1.99	2.15	1.79	

ตารางที่ 10 ความแม่นยำที่วิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี HPLC ระหว่างวัน (Intermediate precision) ทำการทดลองวันที่ 21-23 กรกฎาคม 2551 (n=10)

ความเข้มข้น (cfu/ml)	Peak area			mean	SD	% CV
	21/7/08	22/7/2008	23/7/2008			
1×10^{8}	12.341	13.091	13.836	13.089	0.75	5.73
1×10^{9}	141.171	146.953	146.953	145.026	3.34	2.30
1×10^{10}	1410.785	1364.675	1414.903	1396.788	27.89	2.00

ตารางที่ 11 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เชื้อเชื้อสเตรปโตคอคคัสด้วยเทคนิค HPLC (%Recovery) ณ วันที่ 22 กรกฎาคม 2551 (n= 10)

ครั้งที่	% Recovery		
	ความเข้มข้น 1 x 10^8 cfu/ml	ความเข้มข้น 1 x 10^9 cfu/ml	ความเข้มข้น 1 x 10^{10} cfu/ml
1	69.83	104.6	100.21
2	63.05	104.04	99.98
3	54.9	104.24	100.19
4	61.26	104.23	99.69
5	62.18	104.03	100.01
6	60.65	104.37	99.78
7	59.92	104.74	99.85
8	60.58	104.23	99.82
9	65.03	104.45	100.04
10	59.42	103.96	100.13
mean	61.682	104.289	99.97
SD	3.89	0.25	0.18
%CV	6.31	0.24	0.18

ตารางที่ 12 ส่วนประกอบในตำรับที่ใช้ศึกษาปัจจัยก่อนตั้งตำรับ

ตำรับที่	ปริมาตรของสารในระบบอิมัลชัน (ml)		
	วัฏภาคน้ำ		วัฏภาคน้ำมัน
	เชื้อสเตรปโตคอคคัส	อัลจิเนตที่กระจายตัวในน้ำ	dichloromethane
1	0.66	29.34	30
2	0.66	29.34	45
3	0.66	29.34	50

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบในตำรับที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยของเอทิลเซลลูโลส และไดบิวทิลซีบาเคต

ตำรับที่	% Ethycellulose	% Dibutyl Sebacate
1	-	-
2	0.5	-
3	2	-
4	-	0.5
5	0.5	0.5
6	2	0.5
7	-	1
8	0.5	1
9	2	1

หมายเหตุ – คือ ไม่มีส่วนประกอบนั้นในตำรับ

ตารางที่ 14 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิล ภายหลังการได้รับวัคซีนเชื้อตายเคลือบอัลจิเนตผสมอาหารนาน 4 และ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นวัคซีน	แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย * (mean $\pm$ S.D.)		
(cfu/ml)	กินวัคซีน 4 สัปดาห์	กินวัคซีน 6 สัปดาห์	กลุ่มควบคุม
$5x10^8$	2.93 ± 1.01^b	4.27 ± 1.01^c	0^a
$1x10^9$	4.09 ± 0.60^c	4.71 ± 1.55^c	
$5x10^9$	4.18 ± 0.83^c	5.51 ± 1.9^d	

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

ตารางที่ 15 แผนการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนแบบฉีด แช่ และกินผสมอาหาร

กลุ่ม	รายละเอียด
1.	ไม่ทำวัคซีน (กลุ่มควบคุม)
2.	ฉีดเชื้อตาย 10^8 cfu/ml 2 เข็ม ห่าง 14 วัน
3.	ฉีดเชื้อตาย 10^8 cfu/ml ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ 2 เข็ม ห่าง 14 วัน
4.	ฉีดเชื้อตาย 10^8 cfu/ml เข็มแรก กินวัคซีนเคลือบเจลาติน 6 สัปดาห์
5.	ฉีดเชื้อตาย 10^8 cfu/ml เข็มแรก กินวัคซีนเคลือบอัลจิเนต 6 สัปดาห์
6.	ฉีดเชื้อตาย 10^8 cfu/ml เข็มแรก กินวัคซีนเคลือบอัลจิเนตและ เอธิลเซลลูโลส 6 สัปดาห์
7.	ฉีดเชื้อเป็น 10^4 cfu/ml 2 เข็ม ห่าง 14 วัน
8.	ฉีดเชื้อเป็น 10^6 cfu/ml 2 เข็ม ห่าง 14 วัน
9.	แช่เชื้อตาย 10^8 cfu/ml แล้วกินวัคซีนเคลือบเจลาติน 6 สัปดาห์
10.	แช่เชื้อตาย 10^8 cfu/ml แล้วกินวัคซีนเคลือบอัลจิเนต 6 สัปดาห์
11.	แช่เชื้อตาย 10^8 cfu/ml แล้วกินวัคซีนเคลือบทั้งอัลจิเนตและ เอธิลเซลลูโลส 6 สัปดาห์
12.	แช่เชื้อเป็น 10^1 cfu/ml แล้วกินวัคซีนเคลือบเจลาติน6 สัปดาห์
13.	แช่เชื้อเป็น 10^2 cfu/ml แล้วกินวัคซีนเคลือบเจลาติน6 สัปดาห์
14.	แช่เชื้อเป็น 10^4 cfu/ml แล้วกินวัคซีนเคลือบเจลาติน6 สัปดาห์
15.	กินวัคซีนเชื้อตาย 10^8 cfu/ml เคลือบเจลาติน 6 สัปดาห์
16.	กินวัคซีนเชื้อตาย 10^8 cfu/ml เคลือบอัลจิเนต 6 สัปดาห์
17.	กินวัคซีนเชื้อตาย 10^8 cfu/ml เคลือบอัลจิเนตและเอธิลเซลลูโลส 6 สัปดาห์

ตารางที่ 16 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิล ภายหลังการได้รับวัคซีนทั้งแบบฉีด แช่ และกินผสมอาหาร

กลุ่มทดลองที่	ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)
1 (กลุ่มควบคุม)	0
2	341.33 (256-512)
3	> 2,048.00
4	9.78 (8-16)
5	10.67 (8-16)
6	12.00 (8-16)
7	273.07 (256-512)
8	497.78 (256-512)
9	3.67 (2-4)
10	3.78 (2-4)
11	3.89 (2-4)
12	3.73 (2-4)
13	3.75 (2-4)
14	4.67 (2-8)
15	3.80 (2-4)
16	3.86 (2-4)
17	3.88 (2-4)

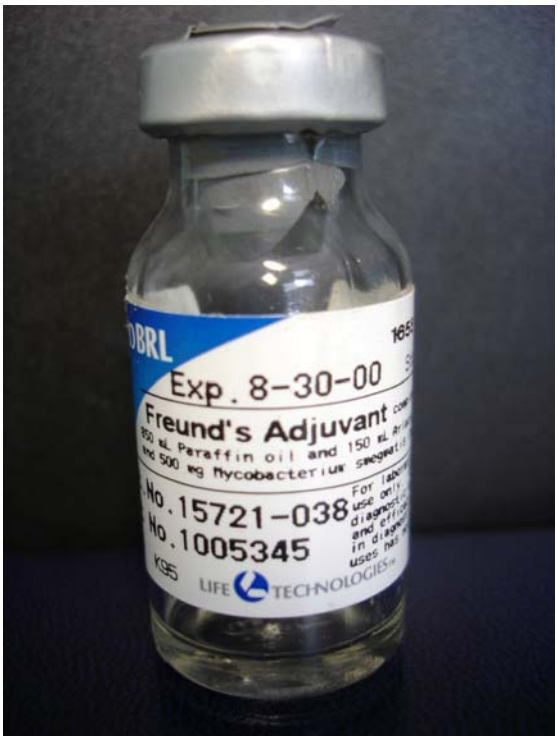
หมายเหตุ ^{ab} ตัวอักษรกำกับที่ต่าง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 17 แสดงค่าอัตราการตายเฉลี่ยของปลานิล ภายหลังการได้รับวัคซีน

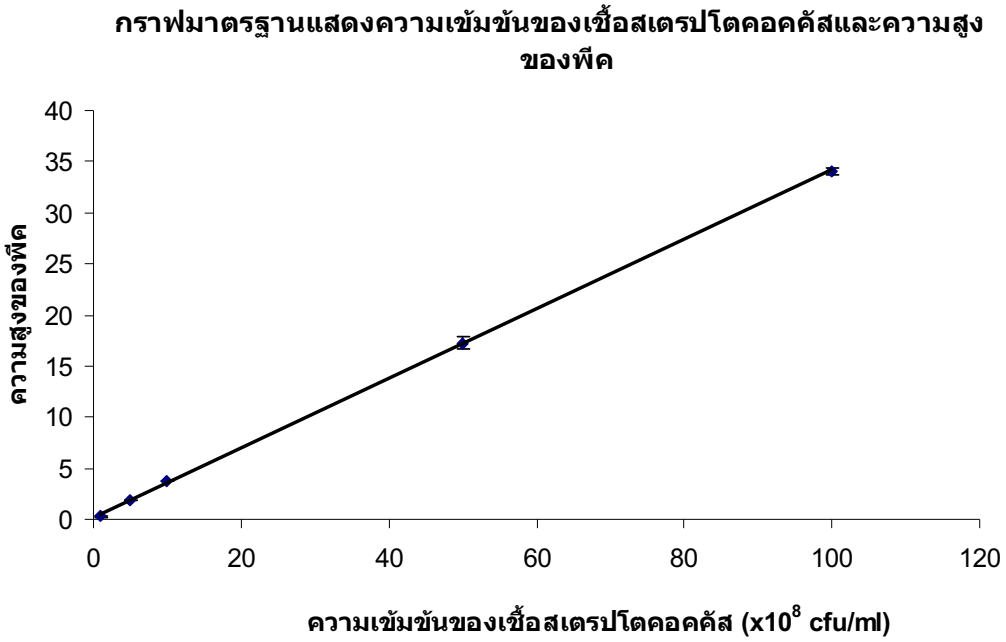
กลุ่มทดลองที่	อัตราการตายเฉลี่ยเฉลี่ย * (% ± S.D.)
1 (กลุ่มควบคุม)	47.22 ± 4.81^{a}
2	10.10 ± 3.64^{b}
3	0.00 ± 0.00^{c}
4	26.50 ± 5.92^{e}
5	27.78 ± 4.81^{e}
6	23.72 ± 1.11^{e}
7	10.78 ± 1.92^{b}
8	4.60 ± 0.99^{d}
9	33.49 ± 2.48^{f}
10	32.58 ± 6.56^{f}
11	32.48 ± 1.48^{f}
12	37.35 ± 3.75^{f}
13	35.04 ± 2.96^{f}
14	34.13 ± 1.37^{f}
15	36.34 ± 2.87^{f}
16	35.59 ± 5.56^{f}
17	33.11 ± 6.06^{f}

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

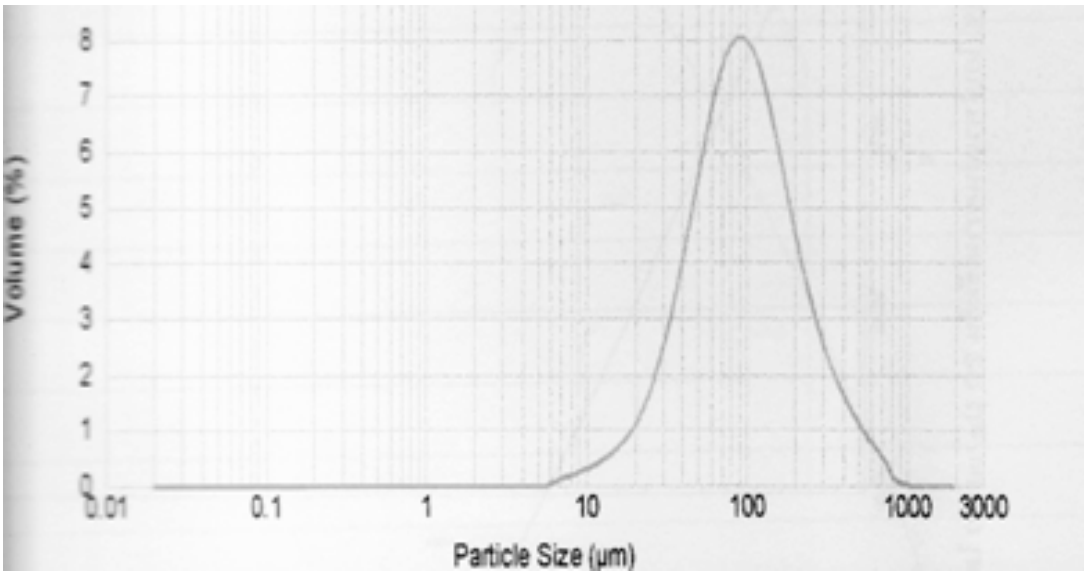
รูปที่ 8 วัคซีนชนิดกินที่เตรียมจากสารเคลือบ 3 ชนิดคือ เจลาติน อัลจิเนต และอัลจิเนตเคลือบเอธิลเซลลูโลส



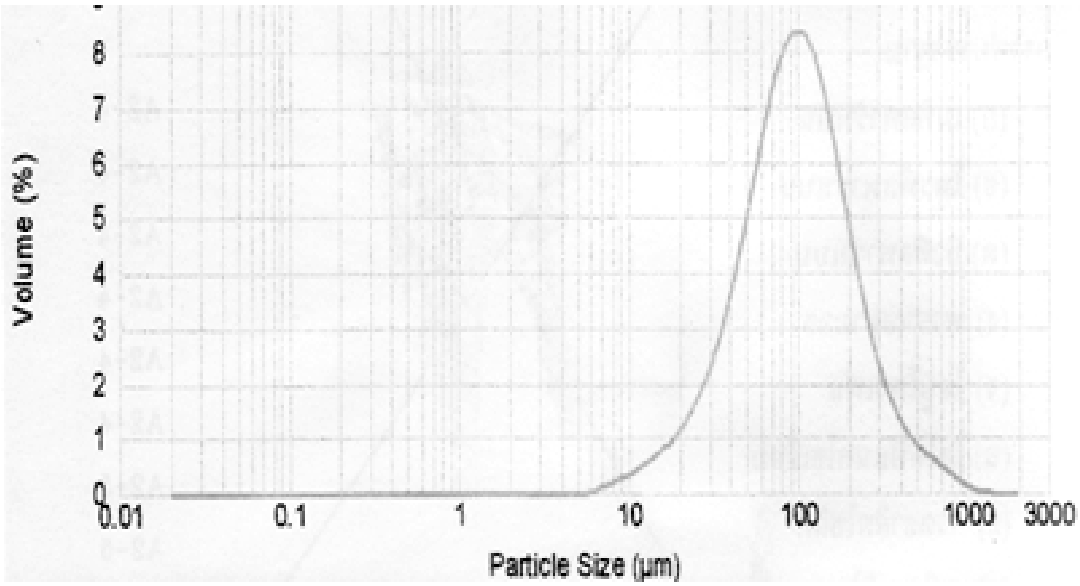
รูปที่ 9 ฟรอยด์คอมพลีท์แอดจูแวนท์



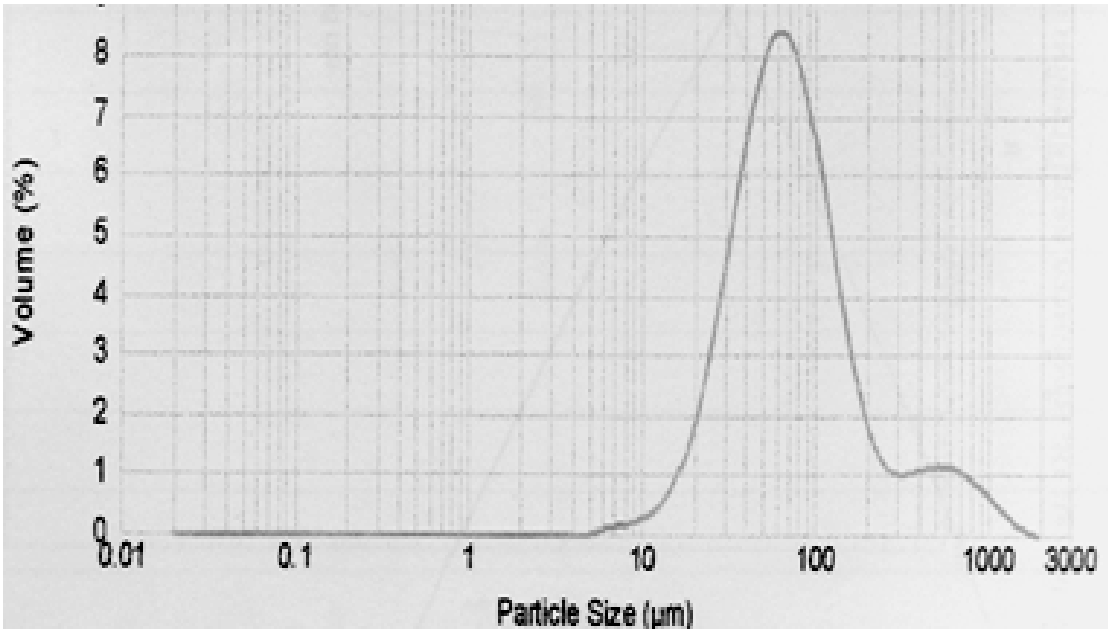
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของเชื้อสเตรปโตคอคคัสและความสูงของพืคที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1x 10^8 ถึง 1x10^{10} cfu/ml (n=5)
เมื่อ y = ความสูงของพืค และ x = ความเข้มข้นของเชื้อสเตรปโตคอคคัส



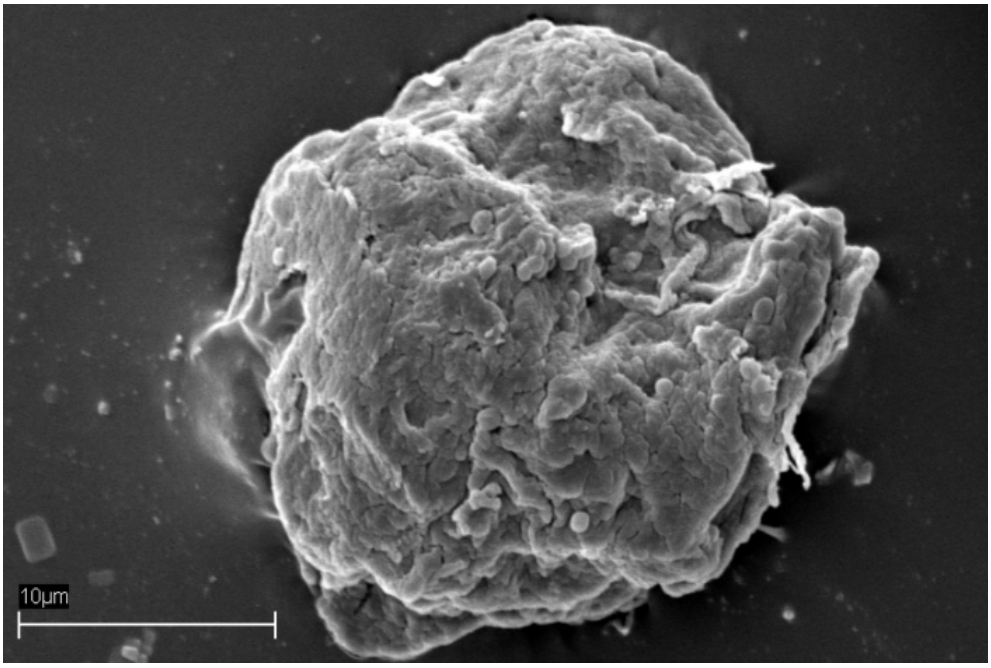
รูปที่ 11 ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคขนาดเล็ก เมื่ออัตราส่วนระหว่างวัตภาคภายในต่อวัตภาคภายนอก เท่ากับ 30:50 โดยปริมาตร เวลาในการก่ออิมัลชันเป็น 5 นาที



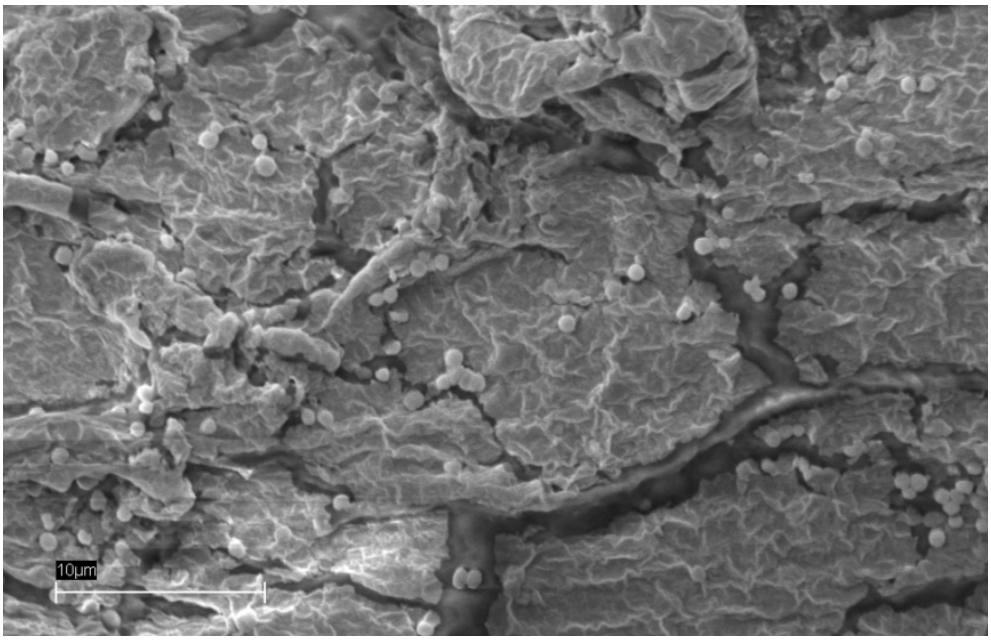
รูปที่ 12 ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคขนาดเล็ก เมื่ออัตราส่วนระหว่างวัตภาคภายในต่อวัตภาคภายนอก เท่ากับ 30:50 โดยปริมาตรเวลาในการก่ออิมัลชันเป็น 7 นาที



รูปที่ 13 ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคขนาดเล็ก เมื่ออัตราส่วนระหว่างวัตภาคภายในต่อวัตภาคภายนอก เท่ากับ 30:50 โดยปริมาตร เวลาในการก่ออิมัลชันเป็น 10 นาที



รูปที่ 14 อนุภาคไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้



รูปที่ 15 อนุภาคของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่อยู่บนผิวของอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิล

รูปที่ 16 รอยโรคของปลาที่ตายภายหลังการฉีดเชื้อเป็นสเตรปโตคอคคัสเข้าช่องท้องเพื่อทดสอบความต้านทานโรค: (A) ปื้นเลือดบริเวณปาก ใต้คาง และฝาปิดเหงือก และ (B) พบจุดเลือดออกตามลำตัวและครีบ

3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพแอดจูแวนต์ผสมในวัคซีนชนิดฉีด

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนต์ผสมในวัคซีนชนิดฉีด

ผลการตรวจคุณภาพน้ำในการทดลองพบว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติคือ ค่าออกซิเจนละลายในน้ำมีค่า 4.8-6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอชมีค่าประมาณ 7.0-7.2 แอมโมเนียและไนไตรท์มีค่าน้อยกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิมีค่า 25.6-28.3 องศาสเซลเซียส

จากการศึกษาเปรียบเทียบการให้วัคซีนที่ผสมและไม่ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง และทำการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำพบว่าปลาวัยรุ่นที่ได้รับวัคซีนไม่ผสมแอดจูแวนท์มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย 54.32 ปลาวัยรุ่นได้วัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีค่าไตเตอร์ 134.74 และ ปลาโตเต็มวัยที่ได้รับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดเฉลี่ย 2,021.15 ปลาทุกกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 18)

จากผลการทดลองนี้ที่ใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ผสมคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรในปลานิลวัยรุ่นสายพันธุ์จิตรลดา 3 ขนาดประมาณ 25 กรัม มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย 134.74 หลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งมีค่าสูงกว่าการฉีดวัคซีนเข้ากล้ามในปลาโตเต็มวัยขนาดประมาณ 100 กรัม ซึ่งมีระดับไตเตอร์ประมาณ 145 (นิลุบลและคณะ, 2545) ผลการทดลองนี้สอดคล้องงานวิจัยอื่นซึ่งแสดงให้เห็นว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องในปลานิลและปลาชนิดอื่นๆ เป็นวิธีการที่กระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มที่มีประสิทธิภาพ (เกรียงศักดิ์ และเกรียงศักดิ์, 2522; Eldar et al., 1995; Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000; Prasad, 2002) วิธีการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมักจะทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันดีกว่า การฉีดเข้ากล้ามและการผสมอาหาร การฉีดวัคซีนครั้งเดียวกระตุ้นภูมิได้ไม่สูงเท่าการฉีดอย่างน้อย 2 ครั้ง (Sakai et al., 1989; Matsuyama et al., 1992; Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000) เช่นเดียวกันกับการวิจัยของ Surendra (2002) ที่ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตายจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าการให้วัคซีนเชื้อตายเฉพาะครั้งที่สองเท่านั้นที่มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูง

จากผลการทดลองพบว่าปลานิลวัยรุ่นน้ำหนักประมาณ 25 กรัม ซึ่งเป็นขนาดที่ใช้เลี้ยงปลานิลในกระชัง มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ 134.74 ต่ำกว่าปลานิลโตเต็มวัย ที่มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม ที่มีระดับไตเตอร์ 2021.15 เมื่อใช้วัคซีนที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/mlเท่ากัน ระดับไตเตอร์ดังกล่าวที่ค่อนข้างต่ำในปลาวัยรุ่นคือ ต่ำกว่าระดับไตเตอร์ 497 ที่ผู้วิจัยพบว่าเป็นระดับที่ปลาสามารถต้านทานโรคได้ดี ปลามีอัตรารอดไม่น้อยกว่า 95% หลังการชาเลนจ์เชื้อด้วยการฉีดเชื้อเป็นเข้าช่องท้องขนาด 10^7 cfu/ml ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรต่อตัว ดังนั้นการทำวัคซีนในปลาวัย รุ่นควรเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อ เพื่อเพิ่มระดับความคุ้มกันและต้านทานโรค ซึ่ง Eldar และคณะ (1997) ได้ทดลองให้วัคซีนเชื้อตายแก่ปลาเทราท์สายรุ้ง พบว่าวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น $3x10^{11}$ cfu/ml ทำให้ปลาต้านทานโรคได้ดีกว่าการให้วัคซีนในระดับที่ต่ำกว่า Plumb และ Vinitnantharat (1994) รายงาน

ว่า ปลาดุกอเมริกันซึ่งได้รับวัคซีนที่เตรียมได้จากเชื้อ *E. ictaluri* มีอัตราการรอดเพิ่มสูงขึ้นตามอัตราส่วนของวัคซีนที่ใช้ นอกจากนี้ Klesius และคณะ (2000) รายงานว่า ความเข้มข้นของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus sp.* ที่ฉีดเข้าช่องท้องส่วนใหญ่มีค่าประมาณ $1x10^9$ cfu/ml เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มได้ดี เช่นเดียวกับในปลานิลแดงซึ่งได้รับการฉีดวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml สามารถกระตุ้นให้ปลานิลแดงตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงเท่ากับ $1x10^8$ cfu/ml (เสาวลักษณ์ และคณะ, 2546) และ 1×10^7 cfu/ml (Shelby et al., 2002) ก็สามารถให้ปลานิลตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นวัคซีนที่ระดับ $1x10^8$ cfu/ml แก่ปลานิลซึ่งอยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา เมื่อเปรียบเทียบกับงานทดลองอื่น

ในทำนองเดียวกันจำนวนครั้งในการให้วัคซีนที่มากขึ้นน่าจะช่วยเพิ่มระดับแอนติบอดีและความต้านทานโรคในปลาเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ นิลุบล กิจอันเจริญ (2534) ที่รายงานว่าการเพิ่มจำนวนครั้งที่ให้วัคซีนในปลาดุกอุย ทำให้ผลในการป้องกันโรคดีขึ้น เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย

ขนาดและอายุของสัตว์ก็มีผลต่อระดับการสร้างภูมิคุ้มกัน สัตว์ที่มีขนาดใหญ่และอายุมากมักตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่าสัตว์ที่มีขนาดเล็กและอายุน้อยกว่า Thorburn และ Jansson (1988) ได้ทำการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลาเทราท์สายรุ้งขนาดต่างๆ กันเมื่อได้รับวัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* ที่ระดับความเข้มข้น 1:500 พบว่าปลาขนาดเล็กจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันน้อยกว่าปลาขนาดใหญ่ และ Quentel และ Baulny (1995) ได้ทำการทดลองฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพียงครั้งเดียว เพื่อป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาเทอร์บอท (*S. maximus*) วัยรุ่นที่อายุต่างกัน พบว่าอัตราการรอดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุระหว่าง 90-104 วัน หลังจากได้รับการฉีดวัคซีนเป็นเวลา 2 เดือน

แอดจูแวนท์เป็นสารผสมในวัคซีนหรือแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท (Maureen Dale and Foreman, 1984) ดังนี้ 1) สารอนินทรีย์ เช่น อลูมิเนียมฟอสเฟต 2) อิมัลชั่น เช่น ฟรอยด์แอดจูแวนท์ แอดจูแวนท์ชนิดไม่สมบูรณ์ไม่นิยมใช้เพราะมักก่อให้เกิดฝีที่ตำแหน่งฉีด และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันก็มีประสิทธิภาพต่ำกว่าแอดจูแวนท์ชนิดสมบูรณ์ 3) สารประกอบจำพวกไขมัน (Lipophilic compound) เช่น ซาโปนิน และวิตามินเอ และ 4) แบคทีเรีย เช่น เชื้อบอเดทเทลล่าเพอทูซิส (*Bordetella pertussis*) และเชื้อไมโคแบคทีเรียม (*Mycobacterium spp.)* ชนิดเชื้อตายที่ผสมในฟรอยด์แอดจูแวนท์ชนิดสมบูรณ์ ผนังเซลล์ของเชื้อในโครงสร้างที่เรียก polymeric peptidoglycan ซึ่งจะมีน้ำตาล 1 โมเลกุลเกาะอยู่กับอะมิโนแอซิด 3 ตัว ปัจจุบันมีการใช้สารสังเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เลียนแบบโครงสร้างข้างต้นที่เรียก muramyl dipeptide (MDP) แต่สารนี้จะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเมื่ออยู่ในรูปละลายน้ำ

จากการทดลองพบว่าการให้วัคซีนที่ผสมแอดจูแวนท์ให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์มาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของจิตต์เกษมและคณะ (2536) ที่ให้ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ผสมกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในอัตราส่วน 1:1 แล้วฉีดเข้าช่องท้องปลา

ช่อนพบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์จะมีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ อัตราส่วนของวัคซีนต่อแอดจูแวนท์ไม่มีผลต่อค่าแอนติบอดีไตเตอร์ ในการศึกษาของ Ruangpan และคณะ (1986) พบว่าเมื่อให้วัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อตายของ *A. hydrophila* ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง ให้ผลไม่แตกต่างกันระหว่างการฉีดแบบผสมแอดจูแวนท์และไม่ผสมแอดจูแวนท์ ส่วนนิลุบล (2534) พบว่าการฉีดวัคซีนทั้งแบบผสมและไม่ผสมแอดจูแวนท์สามารถกระตุ้นให้ปลาดุกอุยมีความต้านทานโรคซึ่งเกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* ได้เหมือนกัน ส่วนผลการศึกษาของผู้วิจัยพบว่า ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์หลังการได้รับวัคซีน ปลานิลสามารถป้องกันการติดเชื้อได้เพียงเล็กน้อย ส่วนที่ระยะเวลา 2 ถึง 5 สัปดาห์ สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ถึงร้อยละ 100 นอกจากนี้ ยังมีการทดลองของ นิลุบล (2545) พบว่า หลังการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปลานิลครั้งแรก ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ค่อนข้างต่ำ หลังจากมีการกระตุ้นวัคซีน ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เริ่มมีค่าเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 5 หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก

Grabowski และ Cain (2004) ได้รายงานว่าปลานิลไนล์ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย *Flovobacterium columnare* ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ อัตราส่วน 1:1 มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย 11,200 หลังการทำวัคซีนครั้งแรก และเพิ่มขึ้นเป็น 30,600 หลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งแตกต่างอย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ที่มีระดับไตเตอร์เฉลี่ย 67 หลังการทำวัคซีน 6 สัปดาห์ Ali (1997) รายงานว่าระดับภูมิคุ้มกันของปลานิลไนล์ที่ทำวัคซีนเชื้อตาย *A. hydrophila* ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีระดับที่ไม่แตกต่างจากฟรอยด์แอดจูแวนท์ชนิดอินคอมพลีท ระดับไตเตอร์ของวัคซีนผสมแอดจูแวนท์เริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 หลังทำวัคซีนครั้งที่ 2 แอดจูแวนท์ชนิดน้ำปนน้ำมันหรือชนิดน้ำมันปนน้ำ มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนในรูปน้ำที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์

สรุปผลการทดลอง

การให้วัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีประสิทธิภาพดีกว่าการให้วัคซีนเพียงอย่างเดียว และหลังการทำวัคซีนพบว่าปลานิลวัยรุ่นตอบสนองต่อสร้างแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำกว่าปลานิลโตเต็มวัยอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพแอดจูแวนท์ 4 ชนิดผสมในวัคซีนชนิดฉีด

ผลการตรวจคุณภาพน้ำในการทดลองพบว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติคือ ค่าออกซิเจนละลายในน้ำมีค่า 4.5-6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอชมีค่าประมาณ 7.0-7.3 แอมโมเนียและไนไตรท์มีค่าน้อยกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิมีค่า 25.8-28.1 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างภูมิคุ้มโดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิดผสมในวัคซีนเชื้อตายความเข้มข้น $5x10^8$ cfu/ml ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และฉีดเข้าช่องท้อง 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน ในปลานิลวัยรุ่น พบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์วัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีค่าสูงสุดที่ 216 แตกต่างจากชนิดอื่น ($p<0.05$) รองลงมาคือน้ำมันถั่วเหลือง และ

อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์มีค่า 92.55 ± 4.22 และ 85.50 ± 4.72 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากวัคซีนผสมน้ำมันพาราฟินที่มีค่า 38.27 ± 1.31 ($p<0.05$) (ตารางที่ 19) เมื่อเปรียบเทียบผลการสร้างภูมิจากการใช้ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์พบว่า ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ให้ผลดีกว่า ผลที่แตกต่างคงเนื่องจากคุณสมบัติพื้นฐานของอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ที่ละลายในน้ำ มีฤทธิ์ระคายเคือง และกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะแบบสารน้ำ แต่ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์อยู่ในรูปน้ำมันที่ผสมเชื้อตายไมโคแบคทีเรียม กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีโดยเฉพาะระบบเซลล์ เช่น ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์มาโครฟาจ์ (Epitheloid macrophage) และการพัฒนาการของเซลล์พลาสมา (Stewart-Tull, 1996) ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับ Anderson (1997) รายงานว่าแอดจูแวนท์กลุ่มเกลือของอะลูมิเนียมจะให้ระดับภูมิคุ้มกันที่ไม่สูง การให้ปลามีภูมิถึงระดับที่ต้องการเพื่อต้าน ทานโรคต้องทำวัคซีนหลายครั้ง Oliver และคณะ (1985) กล่าวว่าฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจ์ที่เป็นเซลล์ในระบบคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา น้ำมันมิเนอรัลในฟรอยด์แอดจูแวนท์จะช่วยปลดปล่อยแอนติเจนจากวัคซีนอย่างช้าๆ การผสมเชื้อกับน้ำมันจะทำให้ระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงกว่าการใช้เชื้อหรือน้ำมันเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ Heckels และคณะ (1989) และ Kawai และคณะ (2004) รายงานว่าผนังเซลล์แบคทีเรียมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างภูมิแบบสารน้ำและแบบเซลล์ ข้อด้อยของการใช้อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์คืออาจทำให้เกิดตุ่มเนื้อ (granuloma) บริเวณตำแหน่งที่ฉีด แต่มักฝ่อในหลายสัปดาห์หลังจากฉีด (Stewart-Tull, 1996) ส่วนการใช้ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์อาจทำให้เป็นไข้ เป็นแผล เกิดตุ่มเนื้อ เกิดภาวะออโต้อิมมูน และข้ออักเสบ (Stewart-Tull, 1983; 1985) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ ฟรอยด์อินคอมพลีทแอดจูแวนท์ซึ่งไม่มีเชื้อไมโคแบคทีเรียมสามารถให้ผลในการสร้างภูมิในระดับที่ยอมรับได้

ระดับการใช้วุ้นอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ที่ 2% ในการทดลองนี้ที่ให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำกว่าและแตกต่างจากฟรอยด์แอดจูแวนท์อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) แต่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแอดจูแวนท์ ($p<0.01$) และเมื่ออิงกับข้อมูลส่วนตัวของนักวิชาการ รัชนี อัตถิ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่าวัคซีนที่ใช้ในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค กระบือ อาจมีระดับวุ้นอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ผสมในวัคซีนถึงระดับ 10% ซึ่งสูงกว่าระดับ 2% ที่ใช้ศึกษาในการทดลองนี้ถึง 5 เท่า ดังนั้นผลการกระตุ้นภูมิโดยใช้วุ้นอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ระดับต่างๆ ควรมีการศึกษาวิจัยในระยะต่อไป รวมถึงการศึกษาเปรียบเทียบกับแอดจูแวนท์ชนิดอื่น

ผลการสร้างภูมิจากการใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันพาราฟินผสมวัคซีนต่ำกว่าการใช้วัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ คงเนื่องจากน้ำมันทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติช่วยกักเก็บและค่อยๆ ปลดปล่อยเชื้อในวัคซีน ทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันช้า มีระดับที่ไม่สูง นอกจากนี้การผสมน้ำมันกับวัคซีนในสัดส่วน 1:1 อาจไม่เหมะสม ควรปรับให้น้ำมันที่ผสมในวัคซีนมีสัดส่วนลดลง ทำให้โอกาสที่เชื้อจะสัมผัสกับเซลล์ในระบบสร้างภูมิคุ้มกันทั้ง non-specific cytotoxic cell (NSCC), macrophage, memory T-cell, lymphocyte และอื่นๆ (Shoemaker et al., 2005; Rite and Evensent, 2006) มีมากขึ้น ส่งผลให้การสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น

ผลการศึกษานี้ให้ผลคล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่นๆ เช่น Grabowski และ Cain LaPata (2004) ที่รายงานว่าปลานิลไนล์ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย *Flovobacterium columnare* ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์อัตราส่วน 1:1 มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย 11,200 หลังการทำวัคซีนครั้งแรก และเพิ่มขึ้นเป็น 30,600 หลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งแตกต่างอย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ที่มีระดับไตเตอร์เฉลี่ย 67 หลังการทำวัคซีน 6 สัปดาห์ Ali (1997) รายงานว่าระดับภูมิคุ้มกันของปลานิลไนล์ที่ทำวัคซีนเชื้อตาย *Aeromonas hydrophila* ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีระดับที่ไม่แตกต่างจากฟรอยด์แอดจูแวนท์ชนิดอินคอมพลีท ระดับไตเตอร์ของวัคซีนผสมแอดจูแวนท์เริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 หลังทำวัคซีนครั้งที่ 2 และแอดจูแวนท์ชนิดน้ำปนน้ำมันหรือชนิดน้ำมันปนน้ำพบว่าโดยทั่วไปสามารถเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนในการป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนในรูปน้ำที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์

แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันที่เหมาะสมในการเตรียมวัคซีนมี 2 ประเภทคือ 1) น้ำมันมิเนอรัล และ 2) น้ำมันเมตาโบไลเซเบิล เช่น น้ำมันถั่ว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปลาสควาแลน และโทโคฟีรอล โดยทั่วไปในวัคซีนควรมีสารรักษาสภาพ เช่น ซูโครส ฟอสเฟต กลูตาเมท และ ฮิวแมนอัลบูมิน (SPGA) เพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาสภาพวัคซีนให้นานมากขึ้น (WO Pat.No. 003734, 2008) นอกจากนี้ Chen และคณะ (1992) พบว่าการใช้ extra-cellular product (ECP) ของเชื้อ *Mycobacterium spp.* ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่เชื้อสร้างและขับออกนอกเซลล์ (Adams et al., 1996) มาผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ สามารถเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันในปลาเทารท์สายรุ้ง เช่นกัน Choi และ Oh (2000) รายงานว่า ECP ของเชื้อ *Mycobacterium marinum* กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลานิลไนล์ได้ นอกจากนี้ Midlying และคณะ (1996) ทำการทดลองผลของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Aeromonas salmonicida* ร่วมกับการใช้แอดจูแวนท์ 4 ชนิดคือ มิเนอรัลออยล์ เกลืออะลูมิเนียม กลูแคนและลีวาไมโซล ในปลาแอตแลนติคแซลมอน (*Salmo solar* L.) พบว่าระดับแอนติบอดีและความสามารถในการต้านทานโรคของปลากลุ่มที่ได้รับเชื้อร่วมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันมิเนอรัลออยล์สูงกว่าการใช้แอดจูแวนท์ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดสัมพัทธ์ (Relative survival rate) ประมาณ 87% สำหรับในปลาคาร์พที่ได้รับฮอร์โมน Human Chorionic Gonadotropin ผสมกับฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์จะพบการรวมกลุ่มของ pyroninophilic cells ในไตส่วนหน้า ส่วน antibody-forming cells สามารถพบได้ในไตทั้งสองส่วน การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันนี้จะพบสูงมากใน 3 สัปดาห์ (สิทธิพันธ์, 2537; วิน, 2548) นอกจากนี้ Bomford (1984) และ Seok Lee และ Il Park (1992) รายงานว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายป้องกันโรคเอดเวอด์ซิลโลซิสมีระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงที่สุดหลังการทำวัคซีน 3 สัปดาห์ วัคซีนที่ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์และโพแทสเซียมซัลเฟตเหมาะสมที่จะนำมาใช้ป้องกันการติดเชื้อมากกว่าวัคซีนที่ผสมฟรอยด์อินคอมพลีทแอดจูแวนท์และวัคซีนที่ไม่มีแอดจูแวนท์ นอกจากนี้ Kwon และคณะ (2006) รายงานว่าการสลายยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับการสร้างโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Edwardsiella tarda* ในห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุล และนำมาฉีดเข้าช่องท้องปลานิลพบว่า ยีนดังกล่าวช่วยให้สัตว์น้ำสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการใช้เซลล์แบคทีเรียที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินหรือความร้อน ประสิทธิภาพของยีนคล้ายกับการใช้แอดจูแวนท์

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

1) วุ้นอนินทรีย์ (Inorganic gel) เช่น อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ อลูมิเนียมฟอสเฟต
2) อิมัลชั่นชนิดน้ำปนในน้ำมัน (Water-in-oil emulsion) เช่น ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์
3) อณูแอดจูแวนท์ (Particle) เช่น ซาโปนิน (QS-21) อะลิฟาติกเอมีน วิตามินเอ
4) จุลชีพ (Microbe) เช่น DNA CpG motifs, Muramyl dipeptide, *E.coli* toxin
5) สารสังเคราะห์ ได้แก่ nonionic block copolymers, muramyl peptide analogues

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

1. ช่วยยืดอายุของวัคซีนทั้งทางด้านคุณสมบัติทางชีวภาพ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในแอดจูแวนท์
2. เพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการเสนอแอนติเจน (antigen presenting cell, APC) ทั้งช่วงของการรับแอนติเจน เปลี่ยนแปลงแอนติเจน และนำเสนอแอนติเจนที่ผิวเซลล์แอดจูแวนท์บางชนิด
3. กระตุ้นการสร้างสารไซโตคายน์ (cytokine)

การเลือกใช้แอดจูแวนท์ขึ้นกับข้อมูลทางวิชาการ ทั้งการเตรียม ธรรมชาติและขนาดของแอนติเจน วิธีการให้วัคซีน และผลที่ไม่พึงประสงค์หรือข้อด้อยจากการใช้แอดจูแวนท์ ปัจจุบันมีเพียงแอดจูแวนท์กลุ่มเกลืออะลูมิเนียมที่ได้รับรองให้ใช้ในคนและสัตว์ (Vogel and Powell, 1994; Stewart-Tull, 1996) ในการศึกษาวิจัยนี้มีการใช้อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์และฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์เป็นแอดจูแวนท์มาตรฐานที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เป็นแอดจูแวนท์ที่มีลักษณะคล้ายวุ้นที่เป็นการจับตัวของโครงข่ายธาตุอะลูมิเนียม มีฤทธิ์ระคายเคืองเนื้อเยื่อ มักทำให้เกิดการอักเสบบริเวณที่ฉีด โปรตีนในวัคซีนที่ผสมกับอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์จะถูกตกตะกอนและปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ (Lindblad, 1994) ประสิทธิภาพในการกักเก็บโปรตีนแอนติเจนในวุ้นอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของวุ้น เช่น ขนาดอนุภาค พื้นผิวภายใน ปริมาณน้ำ ประจุของอนุภาควุ้น และชนิดของโปรตีนที่ผสมกับวุ้น (Stewart-Tull, 1996) Hem และ White (1984) พบว่าประจุของวุ้นจะเป็นประจุบวก ถ้าความเป็นกรดด่างของวัคซีนต่ำกว่า 9 ซึ่ง Stewart-Tull (1996) ได้ให้ข้อควรคำนึงในการใช้บัฟเฟอร์กับอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ว่า ควรเลี่ยงชนิดที่มีประจุลบมากหรือที่ใช้ประจุลบหลายชนิดร่วมกัน เพื่อให้การสร้างภูมิคุ้มกันไม่ถูกรบกวน นอกจากนี้ Seeber et al. (1991) ยังพบว่าความสามารถในการจับเก็บโปรตีนของวุ้นมีความแตกต่างกัน แม้ในโปรตีนที่คล้ายกัน และ Stewart-Tull (1996) กล่าวว่าวัตถุประสงค์หลักในการใช้วุ้นอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์คือ เพื่อเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ โดยเฉพาะอิมมูโน

กลอบบูลินจีและอิมมูโนกลอบบูลินอี แต่ยังขาดข้อมูลผลของวุ้นอะลูมิเนียมต่อการเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันแบบเซลล์

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพแอดจูแวนท์ 4 ชนิดที่ผสมในวัคซีนชนิดฉีดในปลา พบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลาที่ฉีดวัคซีนผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์มีค่าเฉลี่ยสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากวัคซีนที่ผสมน้ำมันถั่วเหลืองและอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ($p<0.05$) วัคซีนผสมน้ำมันพาราฟินมีระดับไตเตอร์ต่ำที่สุดและแตกต่างจากแอดจูแวนท์ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 18 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิลวัยรุ่นและโตเต็มวัย หลังการได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผสมและไม่ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์

กลุ่มทดลอง	แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย * (mean ± S.D.)
1. ปลาวัยรุ่นไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มควบคุม)	0.00 ± 0.00^{a}
2. ปลาวัยรุ่นได้วัคซีนไม่ผสมแอดจูแวนท์	54.32 ± 3.34^{b}
3. ปลาวัยรุ่นได้วัคซีนผสมแอดจูแวนท์	134.74 ± 9.37^{c}
4. ปลาโตเต็มวัยได้วัคซีนผสมแอดจูแวนท์	$2,021.15 \pm 117.46^{d}$

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

ตารางที่ 19 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของปลานิลวัยรุ่น หลังการได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผสมแอดจูแวนท์ 4 ชนิด

ชนิดแอดจูแวนท์	แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย * (mean ± S.D.)
1. ไม่มีแอดจูแวนท์ (กลุ่มควบคุม)	74.07 ± 2.40^{b}
2. ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์	216.14 ± 13.72^{d}
3. อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์	85.54 ± 4.72^{c}
4. น้ำมันถั่วเหลือง	92.59 ± 4.22^{c}
5. น้ำมันพาราฟิน	38.27 ± 1.31^{a}

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

4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมกับการฉีดวัคซีน

ในการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างภูมิคุ้มโดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิดคือ ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ อะลูมินัมไฮดรอกไซด์ ไคโตซาน และแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (รูปที่ 17-18) ร่วมกับการฉีดวัคซีนเชื้อตายความเข้มข้น $5x10^8$ cfu/ml เข้าช่องท้อง 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน ในปลานิลวัยรุ่น (รูปที่ 19) ผลการศึกษาพบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์วัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีค่าสูงที่สุดที่ 118.67 ± 8.22 แตกต่างจากอะลูมินั่มไฮดรอกไซด์และไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาคือแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีค่าประมาณ 112.67 ± 3.34 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากระดับไตเตอร์จากสารกระตุ้นภูมิชนิดฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ ($p>0.05$) (ตารางที่ 20)

เพปทิโดไกลแคนของผนังเซลล์ของไมโครแบคทีเรียมในฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ พบว่าเป็นตัวกลางช่วยกระตุ้นโทลไลค์รีเซปเตอร์ (Toll like- receptor) ที่จะส่งสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Brewer et al., 1993; Weiner et al., 1997; Aguilar and Rodriguez, 2007) สารมูรามิลไดเพพไทด์ (Muramyl dipeptide) สารตัวกลางจากการกระตุ้นของเชื้อพบว่าสามาถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำได้ (Audibert et al., 1985; Warren and Chelid, 1986; Audibert and Lise, 1993) แม้ในปัจจุบันสารนี้ไม่นิยมใช้ในมนุษย์ (Brewer et al., 1996) อย่างไรก็ตามในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยนำมาใช้เพื่อเป็นตัวอ้างอิงเปรียบเทียบกับแอดจูแวนท์หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันตัวอื่นๆ Seok Lee and Il Park (1992) รายงานว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายป้องกันโรคเอดเวอด์ซิลโลซิส (Edwardsiellosis) มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงที่สุดหลังการทำวัคซีน 3 สัปดาห์ วัคซีนที่ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์และโพแทสเซียมซัลเฟตเหมาะสมที่จะนำมาใช้ป้องกันการติดเชื้อมากกว่าวัคซีนที่ผสมฟรอยด์อินคอมพลีทแอดจูแวนท์และวัคซีนที่ไม่มีแอดจูแวนท์

อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ยอมรับให้ผสมวัคซีนที่ใช้ในมนุษย์ เช่น บาดทะยักและคอตีบ (Katare and Panda, 2006; Liang et al., 2008) เนื่องจากความปลอดภัยและผลต่อภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามพบว่ามีข้อจำกัดต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์และการสร้างอิมมูโนโกลบบูลินอี (Katare and Panda, 2006; Singh et al., 2006) บทบาทของอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมี 2 สมมุตฐาน 1) ทำให้แอนติเจนเกาะกลุ่มตกตะกอนในบริเวณที่ฉีด และ 2) กระตุ้นการทำงานของคอมพลีเม้นท์ หรือ อีโอซิโนฟิลล์ หรือมาโครฟาจ์ (Walls, 1977; Gupta et al., 1995) Wang et al. (2008) รายงานว่าอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์กระตุ้นการทำงานของบีลิมโฟไซท์ โดยอาศัยไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-4 ของอีโอซิโนฟิล ในการสร้างอิมมูโนโกลบบูลินเอ็ม (Ig M) ด้วยข้อมูลพื้นฐานของสารนี้ในข้างต้น ทำให้การกระตุ้นภูมิในมนุษย์และสัตว์ของสารนี้ไม่สูงนัก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของผู้วิจัยในปลานิลในครั้งนี้ที่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำที่สุด (ตารางที่)

โดยทั่วไปสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immuno-stimulant) คือสารที่ให้ผสมอาหารหรือโดยวิธีอื่นเพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานดีขึ้น โดยการกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจ์ นิวโทรฟิล เนเจอรัลคิลเลอร์เซลล์ และทีลิมฟ์โฟไซท์ รวมทั้งเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรียและราดีขึ้น (Suzuki, 1984; Anderson, 1992; Siwicki and Dunier, 1994) แหล่งที่มาของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ได้แก่ Peptidoglycan (PG) จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก, Lipopolysaccharide (LPS) จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ,Polysaccharide (PG) วิตามิน ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone) และสารสังเคราะห์ต่างๆ สารกระตุ้นเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม ช่วยกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีการเพิ่มการผลิตไลโซไซม์และแอนติบอดี รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์และเพิ่มการยับยั้งการเกิดโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรีย มีผลช่วยให้สัตว์เพิ่มความต้านทานโรคติดเชื้อต่างๆ การศึกษานี้ได้ทดลองใช้ไคโตซานและแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ไคโตซานเป็นสารอินทรีย์จากขบวนการดีอะเซทิลเลชั่นของไคตินที่ได้จากเปลือกสัตว์จำพวกกุ้ง ปู และแมลง นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์เชื้อราและสาหร่ายบางชนิด ไคโตซานถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำ ของเสีย และโลหะหนักจากอุตสาหกรรม (Kumar, 2000; Nair and Madhavan, 1984; Jha et al., 1988; McKay et al., 1989; Sanford, 1989) ใช้ผลิตเครื่องสำอางยา ฆ่าแมลง และฟิลม์ถ่ายรูป (Mark et al., 1985; Muzzarelli, 1997; Kumar, 2000) ในทางการแพทย์ถูกนำไปใช้ในการรักษาแผล เป็นผิวหนังเทียม ระบบกรองในการฟอกไต ศัลยกรรม ระบบนำส่งยา อาหารเสริมสำหรับมนุษย์ และสารจับไขมันและลดโคเลสเตอรอล (Mark et al., 1985; Knorr, 1991; Nicol, S. 1991, Zikakis et al., 1982; Uhrich, K.E., Cannizzaro et al., 1999; Kumar, 2000; Kupta and Kumar, 2000; Wadstein et al., 2000) ในทางประมงไคโตซานใช้เป็นสารเหนียวเติมในอาหาร สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคแบคทีเรีย ปรับบำบัดคุณภาพน้ำ และสารปลดปล่อยวัคซีน (Anderson, 1992; Sakai, 1999; Bullock et al., 2000; Elson, 1996; Kumar, 2000; Gopalakannam and Arul, 2006; Cha et al., 2008) โดยทั่วไปไคโตซานมีคุณสมบัติที่ดีหลายด้านทั้งในแง่ความปลอดภัยในการใช้ การรักษาสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายง่าย หาง่าย ราคาถูก มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 6.89% ซึ่งสูงกว่าเซลลูโลสซึ่งมีเพียง 1.25% (Kumar, 2000)

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไคโตซานที่ระดับ 0.75% โดยน้ำหนักอาหารมีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากเป็นระดับที่ให้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์และอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าไคโตซานระดับ 0.5% และ 1% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากไคโตซานในระดับที่สูงถึง 1% อาจไปรบกวนการดูดซึมสารอาหารหรือทำให้ปลาเครียด ตามการวิเคราะห์ผลการทดลองของ Shiau and Yu (1999) รายงานว่าไคตินและไคโตซานที่ระดับ 2% 5% และ 10% ในอาหารทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการถูกรบกวนการดูดซึมสารอาหาร แต่การใช้ไคตินและไคโตซานในระดับที่ต่ำเพียง 1% และลีวาไมโซลที่ระดับ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารจะช่วยเพิ่มการย่อยและการดูดซึมอาหาร การใช้ไคตินหากนานถึง 30 วันจะลดการจริญเติบโต และถ้าใช้นานถึง 60 หรือ 90 วัน จะเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว ซึ่งน่าจะเกิดจากความเครียดหลังได้รับไคติน ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นคล้ายกับการที่ปลาเครียดจากการป่วยด้วยโรคแบคทีเรียและไวรัส การอยู่อย่างหนาแน่น มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และการได้รับสารพิษ เช่น ทองแดง (Wedmeyer et al, 1983; Haney et al., 1992; Hossain and Sherif, 1995; Harikrishnan et al., 2003) แม้การศึกษานี้จะไม่พบรอยวิการเนื้อเยื่อเหงือกจากพิษของไดโตซาน แต่ Bullock et al. (2000) รายงานว่าไคโตซานมีพิษต่อ

เหงือกของปลาเทราท์ โดยสารที่ระดับ 0.019 และ 0.038 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถทำให้เซลล์เยื่อบุผิวซี่เหงือกยกตัวจากเซลล์ชั้นฐาน (Basement membrane) และมีการบวมน้ำ (edema) ซึ่งคล้ายกับการที่ปลาได้รับสารพิษในระดับที่ต่ำกว่าระดับที่ทำให้ตายหรือการที่ปลาได้รับสารพิษนระยะเวลานาน (Magor, 1988; Mallatt et al, 1995) มีการเพิ่มขนาดและปริมาณของเซลล์บุผิวเหงือก (hypertrophy and hyperplasia) การเพิ่มขนาดของเซลล์บุผิวเหงือกพบว่าสัมพันธ์กับการได้รับสารพิษอันตรายสูงและสารพิษอันตรายต่ำ (Mallatt, 1985) นอกจากนี้ Bullock et al (2000) พบว่าความเป็นพิษเฉียบพลัน พบในปลาที่ได้รับไคโตซานมี่ระดับ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 24 ชั่วโมง และที่ระดับ 0.075 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 72 ชั่วโมง พิษไคโตซานทั้งสองระดับดังกล่าวทำให้เกิดวิการการเชื่อมกันของซี่เหงือกและโป่งพองของปลายซี่เหงือกจากการคั่งของเม็ดเลือดในหลอดเลือด ซึ่งวิการดังกล่าวคล้ายกับการได้รับพิษโลหะหนักจำพวกแคดเมียม ปรอท และทองแดง (Ferguson, 1989) การเชื่อมของซี่เหงือก เชื่อว่าเกิดจากสารพิษหรือสารระคายเคืองเปลี่ยนแปลงสารไกลโคโปรตีนของเมือกที่เหงือก ทำให้ประจุลบของเยื่อบุผิวเกิดการเปลี่ยนแปลงและมีการเชื่อมของซี่เหงือกตามมา (Ferguson, 1989)

อย่างไรก็ตาม Kono (1987) พบว่าไคโตซานผสมในอาหารที่ระดับ 10% ไม่เป็นพิษต่อปลาทะเลที่เลี้ยงในญี่ปุ่น เช่น เรดซีบรีม (Red Sea Bream) หางเหลือง (Yellow tail) และปลาไหล (Japanese eel) Kopalakkanan and Arul (2006) ทดลองให้ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ได้รับไคโตซาน 1% ไคตินระดับ 1% และลีวาไมโซล 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 45 และ 90 วัน พบว่าปลากลุ่มได้รับไคโตซานมีการเจริญเติบโตสูงสุด ไลโซไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนในเลือดที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะมีค่าสูงสุดในวันที่ 30 และ60 หลังการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และในวันที่ 45 หลังการทดลองมีการปลาในฉีดเชื้อเป็น *Aeromonas hydrophila* $1.5x10^6$ cfu/ml เพื่อทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อพบว่า ปลาที่ได้รับไคโตซานมีอัตรารอดสูงสุดที่ 68.9% คงเนื่องมาจากระดับภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสูงกว่าปลากลุ่มที่ได้รับลีวาไมโซลที่มีอัตรารอด 57.8% และไคตินที่ 37.5% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ปลาที่ได้รับไคตินมีอัตรารอดลดลง คงเนื่องมาจากระดับภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะที่ลดต่ำลง ทำนองเดียวกัน Anderson and Siwicki (1994) และ Swiki et al (1994) พบว่าไคโตซานสามารถช่วยเพิ่มการต้านเชื้อแบคทีเรียและกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกลุ่มปลาแซลมอน Esteban et al. (2000) และ Cuesta et al. (2003) รายงานว่าไคโตซานช่วยเพิ่มการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวในปลากิลท์เฮดซีบรีม Cha et al. (2008) ทดลองเคลือบไคโตซานบนอาหารเม็ดเพียง 1% เลี้ยงปลาโอลีฟฟาวน์เดอร์ (*Paralichthys olivaceus*) ขนาดรุ่นน้ำหนัก 80 กรัม นาน 3 เดือนพบว่าระดับไลโซไซม์ที่เมือกบนผิวหนังปลา การใช้ออกซิเจนของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ (respiratory burst) ซึ่งสัมพันธ์กับการตอบสนองในการต่อต้านเชื้อของเซลล์ที่ทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอม เช่น มาโครฟาจ์และนิวโทรฟิลล์ (Dinauer, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงดัชนีค่าเลือดบางดัชนีอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เช่น แอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรส ฮีโมโกลบิน โคเลสเตอรอลที่มีความหนาแน่นสูงและต่ำ (High and Low Density Cholestrol) Sakai et al. (1992) ทดลองฉีดไคติ

นขนาด 100 มิลลิกรัมต่อปลาหนัก 1 กิโลกรัม พบว่าสามารถช่วยกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ์และเพิ่มการต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรค *Vibio anguillarum*

Sakai *et al*. (1992) รายงานว่าปลาเทราท์สายรุ้งที่ฉีดไคติน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวปลา 1 กิโลกรัม พบว่ามีการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ์และเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อ *V. anguillarum* และ Kawakami et al. (1998) ยังพบว่า ปลาหางเหลือง (yellowtail; *Seriola quinquera-diata*) ที่ฉีดด้วยไคตินสามารถเพิ่มความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. piscicida* หลังจากที่ได้รับเชื้อในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 45 วัน นอกจากนี้ Anderson et al. (1995) รายงานว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่ได้รับการฉีดหรือจุ่มไคโตซาน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันโรคโดยสังเกตได้จากความสามารถในการฆ่าของเซลล์ (potential killing activity) และปริมาณของอิมมูโนโกลบลุลินรวม (total Ig concentration)

แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (Mannan Oligosaccharide) เป็นสารอินทรีย์ธรรมชาติ ที่มักจะได้สารจำพวกผนังเซลล์ยีสต์ เช่น แซคคาโรไมเซส เซอร์วิซิเอ (*Saccharomyces cerviciae*) แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) (Masuoka and Haxen, 1999;) เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะหรือเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ใช้ดูดซึมสารพิษจากเชื้อรา และเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจ์และอินเตอร์เฟียรอน (Vadstein, 1997; Raa, 2000; Bergh et al., 2001; Pryor et al., 2003) สารกลุ่มนี้ใช้ผสมในอาหารได้ดี กลไกของสารนี้คือ แมนแนนซึ่งเป็นส่วนของน้ำตาลเลคตินในโครงสร้างที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรค ทำให้การจับของเชื้อที่ผนังลำไส้ลดลง วิลไลของลำไส้แข็งแรงขึ้น ถูกทำลายหรือรบกวนโดยเชื้อลดลง ทำให้การดูดซึมสารอาหารดีขึ้น (Vadstein, 1997; Raa, 2000; Pryor et al., 2003)

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 0.8% โดยน้ำหนักอาหารมีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากเป็นระดับที่ทำให้ปลามีระดับแอนติบอดีไตเตอร์และอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าไคโตซานระดับ 0.2% และ 0.4% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 24) ด้วยกลไกของสารดังข้อมูลในข้างต้นน่าจะเป็นเหตุผลให้ปลาที่ได้รับโอลิโกแซคคาไรด์มีสมรรถนะการผลิตและการสร้างภูมิคุ้มกันดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบสารกระตุ้นภูมิที่ให้โดยการผสมอาหารให้กินหรือการใช้แอดจูแวนท์ร่วมกับวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิส ผลการศึกษาทั้งในแง่การเจริญเติบโต ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ ปริมาณการใช้ ต้นทุน และความปลอดภัยในการใช้สารดังกล่าวพบว่า แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์น่าจะเป็นสารที่ถูกเลือกใช้ร่วมกับการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

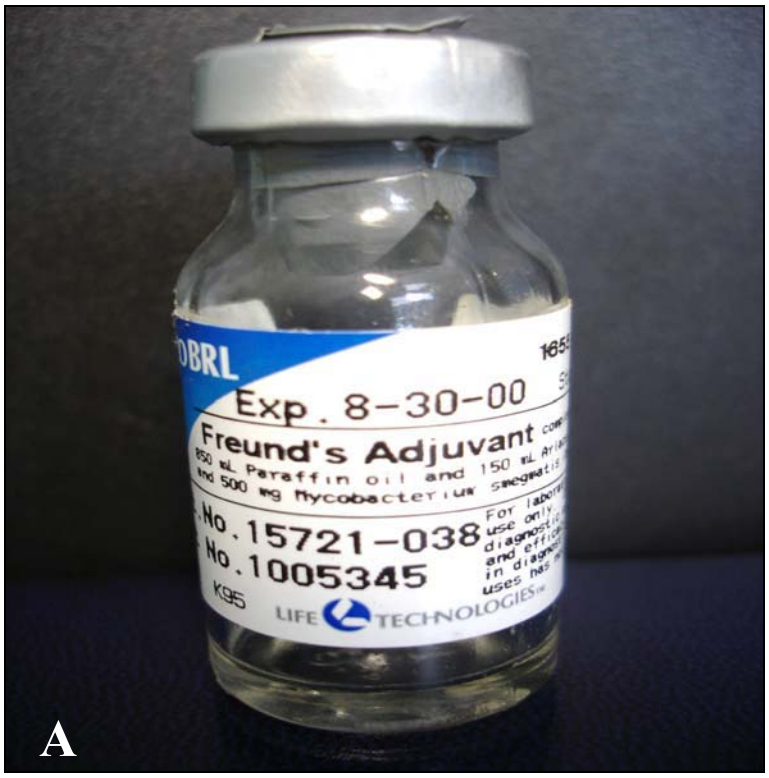
สำหรับในปลาชนิดอื่นพบว่าสารเบต้ากลูแคนและแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ผสมในอาหารที่ระดับ 5% สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตในและอัตรารอดในลูกปลาโอลีฟฟลาวน์เดอร์ แต่ถ้าผสมถึงระดับ 15% จะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตและอัตรารอดลดลง (Piaget et al., 2007) ทำนองเดียวกันจากการศึกษาของSamrongpan et al. (2009) พบว่าผลของการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 ระดับคือ 0, 2, 4 และ 6 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ระดับละ 3 ซ้ำ ในอาหารลูกกุ้งที่ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 alpha-methyl testosterone ต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) หลังจากทดลองอนุบาลลูกปลาเป็นเวลา 21 วัน พบว่ามีน้ำหนัก

0.78±0.16, 0.79±-0.19, 0.85±0.20 และ 0.90±0.19 กรัม และมีความยาว 2.86±0.24, 2.88±0.20, 2.96±0.25 และ 3.03±0.22 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยที่ระดับ 4 และ 6 กรัม ส่งผลให้มีน้ำหนักกและความยาวสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับการเสริม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนั้นยังพบว่าการเสริมแมน-แนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 และ 6 กรัม มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยค่าเฉลี่ย 0.037±0.007, 0.037±0.009, 0.040±0.010 และ 0.042±0.009 กรัมต่อวัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเสริมอาหารทุกระดับไม่มีผลต่ออัตราแลกเนื้อ (FCR) และอัตรารอดของลูกปลานิล นอกจากนี้ยังพบว่า การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ทุกระดับมีผลช่วยให้ลูกปลานิลมีความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้ดีกว่าลูกปลาจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีอัตราการตายเฉลี่ย 43.33±20.82, 3.33±5.77, 0.00±0.00 และ 0.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้แสดงถึงประโยชน์ของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคของลูกปลานิล เช่นเดียวกันHanley et al. (1995) รายงานว่าปลานิลแดง (red tilapia) ที่ได้รับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 0.6% มีผลผลิตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ Torrecillas et al. (2007) รายงานผลการใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ผสมในอาหารปลากะพงยุโรป (European sea bass, *Dicentrarchus labrax*) นาน 67 วัน พบว่าที่ระดับ 0.2% และ 0.4% ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตและมีสภาพเนื้อเยื่อตับใต้กล้องจุลทรรศน์ดีกว่าการกลุ่มควบคุมที่ไม่ใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ ความสามารถในการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลากลุ่มที่ได้รับโอลิโกแซคคาไรด์ที่ 0.4% สูงกว่าการทดลองกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และในการทดสอบการเกาะผนังลำไส้ของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* หลังการทดลอง 21 วัน พบว่า ปลาที่ได้รับโอลิโกแซคคาไรด์ไม่พบการเกาะของเชื้อ แต่กลุ่มที่ไม่ได้รับสารยังพบการเกาะของเชื้อถึง 33% ของผนังลำไส้ สำหรับปลาซีบรีมขาว (white sea bream, *Diplodus sargus*) พบว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ทำให้การจัดเรียงตัวของไมโครวิลไลและความสูงของวิลไลของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมแข็งแรงขึ้น ซึ่งน่าจะช่วยให้การดูดซึมสารอาหารดีขึ้น (Dimitroglou and Davies, 2004) สำหรับในปลาเทราท์สายรุ้ง (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) เลี้ยงในกระชัง ที่ได้รับหรือไม่ได้รับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ผสมในอาหาร 0.2% โดยน้ำหนัก พบว่าปลาที่ได้รับโอลิโกแซคคาไรด์มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 13.7% มีอัตราแลกเนื้อและอัตราตายลดลง และมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น (Staykov et al., 2007) Staykov (2005) และ Zhou and Li (2004) รายงานการมีภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านการติดเชื้อในปลาไน (*Cyprinus carpio Var. Jian*) เพิ่มสูงขึ้นขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังได้รับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังมีรายงานปลาที่ได้รับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีสมรรถนะการผลิตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีอัตราแลกอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Ratio) ลดลงทั้งในปลาดุกยุโรป (European catfish) และ ปลาไน (common carp) (Bogut et al., 2006; Culjak et al., 2006) สำหรับในไก่เนื้อทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น อัตราแลกเนื้อลดต่ำลง และตายลดลง Piaget et al. (2007)

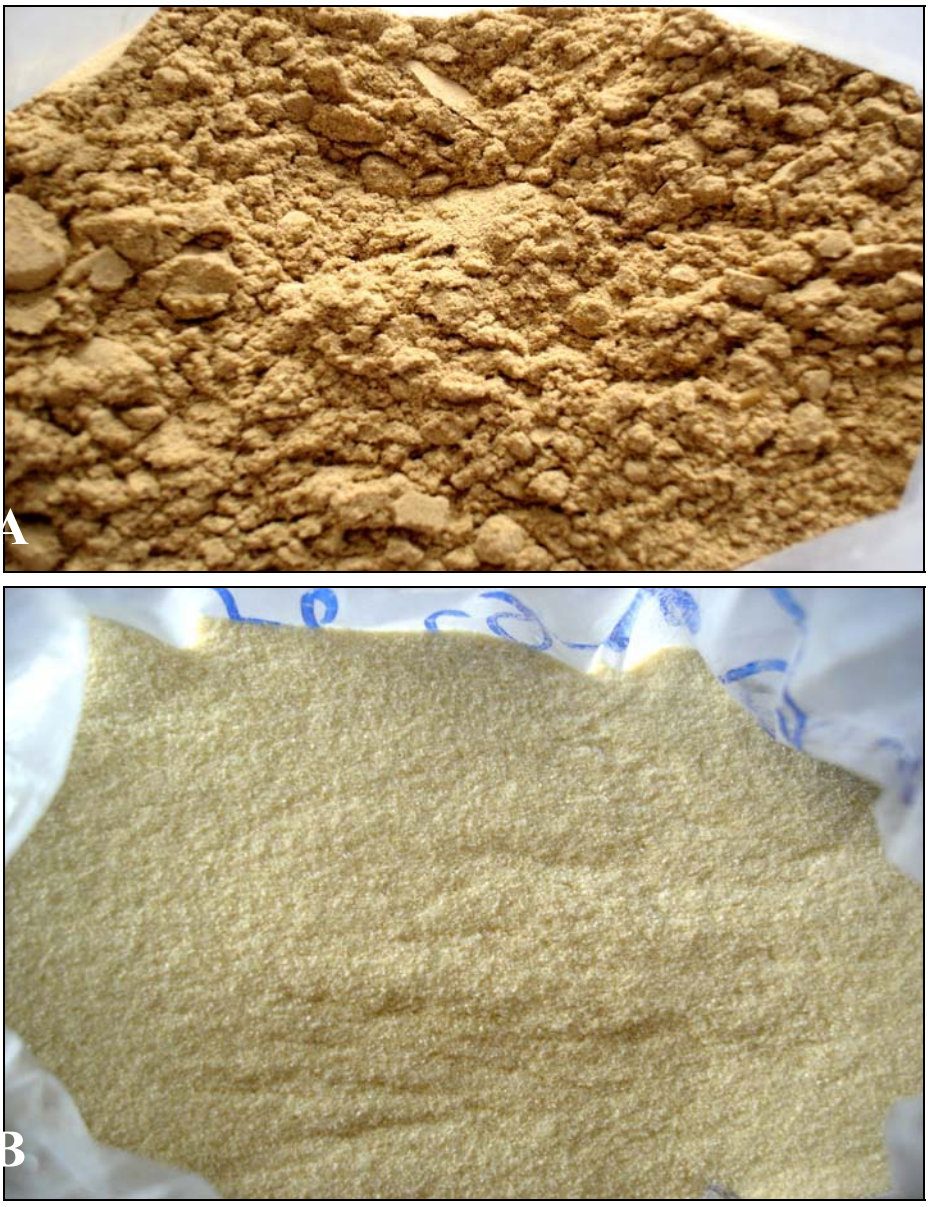
ตารางที่ 20 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิลภายหลังการได้รับสารกระตุ้นภูมิร่วมกับวัคซีน

กลุ่มทดลอง	ระดับไตเตอร์เฉลี่ย
1. กลุ่มควบคุม	0±0
2. ปลาที่ได้รับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ 1:1	118.67±8.22 ^{e}
3. ปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ 10%	67.34±6.34 ^{b}
4. ปลาที่ได้รับวัคซีนและกินไคโตซาน 0.5%	51.54±1.76 ^{a}
5. ปลาที่ได้รับวัคซีนและกินไคโตซาน 0.75%	60.59 $\pm$ 2.34 ^{b}
6. ปลาที่ได้รับวัคซีนและกินไคโตซาน 1%	62.27 $\pm$ 2.31 ^{b}
7. ปลาที่ได้รับวัคซีนและกินโอลิโกแซคคาไรด์ 0.2%	83.3±2.34 ^{c}
8. ปลาที่ได้รับวัคซีนและกินโอลิโกแซคคาไรด์ 0.4%	98.67±2.56 ^{d}
9. ปลาที่ได้รับวัคซีนและกินโอลิโกแซคคาไรด์ 0.8%	112.67±3.34 ^{e}

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



รูปที่ 17 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ (A) และอะลูมินัมไฮดรอกไซด์ (B) ที่ผสมในวัคซีนชนิดฉีด



รูปที่ 18 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (A) และ ไคโตซาน (B) ที่คลุกผสมกับอาการปลานิล

รูปที่ 19 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิด คือ ฟรอยด์คอมพลีท-แอดจูแวนท์ อะลูมินัมไฮดรอกไซด์ ไคโตซาน และแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในปลานิล

5. การศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนชนิดฉีด

ผลการตรวจคุณภาพน้ำในการทดลองพบว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติคือ ค่าออกซิเจนละลายในน้ำมีค่า 4.8-6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอชมีค่าประมาณ 7.0-7.3 แอมโมเนียและไนไตรท์มีค่าน้อยกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิมีค่า 25.6-28.4 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนในปลานิลรุ่นน้ำหนักประมาณ 50 กรัมต่อตัวพบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์สำหรับวัคซีนเชื้อตายที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 20) เมื่อเริ่มการทดลองมีค่า 124.16 และลดลงเป็น 120, 114.96 และ 110.66 ในเดือนที่ 1, 2 และ 3 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ (ตารางที่ 21-24) และเมื่อเทียบระดับแอนติบอดีในวันที่เริ่มการทดลองเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ระดับไตเตอร์สำหรับวัคซีนที่ไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งลดลงเหลือ 89.13% ในเดือนที่ 3 สำหรับวัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 21-22) มีค่าไตเตอร์เมื่อเริ่มการทดลองเป็น 122 และลดลงเป็น 119.65, 120.47 และ 116.70 ในเดือนที่ 1, 2 และ 3 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ (ตารางที่ 21-24, รูปที่ 23) หรือลดลงเหลือ 94% เมื่อเทียบกับตอนเริ่มทดลอง แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การเก็บวัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อนำเซลล์แบคทีเรีย *S. agalactiae* เชื้อตายของวัคซีนแบบไม่ผ่านและผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไปย้อมสีแกรม (gram stain) และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงสว่าง (Olympus รุ่น CH2, Japan) กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่า รูปร่างลักษณะภายนอกของเชื้อบางส่วนมีลักษณะที่ผิดปกติคือ เซลล์บวม ขอบไม่เรียบ ไม่ติดสีย้อมแกรมบวกซึ่งมีสีน้ำเงินม่วง (รูปที่ 24) โดยเฉพาะในเดือนที่ 3 ของการเก็บรักษา แต่ไม่พบเชื้อชนิดอื่นหรือการเกาะเป็นก้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในวัคซีน

ตามนิยามความคงตัวของผลิตภัณฑ์ยาของ National Coordinating Committee on Large Volume Parenteral คือมีปริมาณการคงเหลือของตัวยาในยาหรือผลิตภัณฑ์สำคัญมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 90 ของปริมาณเริ่มต้น (Lieberman et al., 1990) จากผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนที่พิจารณา ณ ระดับแอนติบอดีลดลงไม่เกิน 90% (t_{90}%) ของเมื่อเริ่มทดลอง ตามสมการ regression ของวัคซีนที่เก็บทั้ง 2 แบบ แบบที่ 1 วัคซีนที่ไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งมีสมการ $Y= -3.616X + 100$ ค่า $R^2= 0.9423$ และ แบบที่ 2 วัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งมีสมการ $Y= -1.9543X + 100$ ค่า $R^2= 0.9629$ และ (รูปที่ 25) พบว่าอายุวัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่า 5.11 เดือน สูงกว่าวัคซีนเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่า 2.76 เดือน การที่ระดับแอนติบอดีลดลงอาจเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาเสื่อมสลายของเซลล์ (autolysis) เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะกายภาพที่เปลี่ยนไปของเซลล์แบคทีเรียเมื่อย้อมด้วยสีแกรม (รูปที่ 24-25) อย่างไรก็ตามปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น คุณภาพน้ำ สภาพอากาศ ฤดูกาล ส่งผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ (เยาวนิตย์และจีรนันท์, 2544; Ellis, 1988; Cryz, 1991; Stoskopf, 1992; Iwama and Nakanishi, 1996; Hurvitz et al., 1997)

สรุปผลการทดลอง

วัคซีนที่เก็บรักษา 2 แบบคือ แบบไม่ผ่านและผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง ก่อนเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน ให้ผลการสร้างแอนติบอดีไตเตอร์ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แต่ทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) จากการคำนวณหาอายุการเก็บรักษาวัคซีนพบว่า วัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 5.11 เดือน และวัคซีนที่ไม่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งมีอายุการเก็บรักษานานประมาณ 2.76 เดือน

ตารางที่ 21 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อเริ่มศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีน (เดือน 0)

กลุ่มทดลอง	ระดับไตเตอร์เฉลี่ย (%ไตเตอร์*)
กลุ่มควบคุม	0 ± 0^{a} (0%)
ปลาวัยรุ่นได้รับวัคซีนเก็บ 4°C	124.16 ± 10.61^{b} (100%)
ปลานิลวัยรุ่นได้รับวัคซีนทำแห้งเยือกแข็ง	122.00 ± 12.90^{b} (100%)

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

ตารางที่ 22 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อได้รับวัคซีนที่เก็บรักษา 1 เดือน

กลุ่มทดลอง	ระดับไตเตอร์เฉลี่ย (%ไตเตอร์*)
กลุ่มควบคุม	0 ± 0^{a} (0%)
ปลาวัยรุ่นได้รับวัคซีนเก็บ 4°C	120.00 ± 14.11^{b} (97.57%)
ปลาวัยรุ่นได้รับวัคซีนทำแห้งเยือกแข็งและเก็บ 4°C	119.65 ± 14.37^{b} (98.08%)

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

ตารางที่ 23 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อได้รับวัคซีนที่เก็บรักษา 2 เดือน

กลุ่มทดลอง	ระดับไตเตอร์เฉลี่ย (%ไตเตอร์*)
กลุ่มควบคุม	0 ± 0^{a} (0%)
ปลาวัยรุ่นได้รับวัคซีนเก็บ 4°C	114.96 ± 16.02^{b} (92.59%)
ปลาวัยรุ่นได้รับวัคซีนทำแห้งเยือกแข็งและเก็บ 4°C	120.47 ± 13.99^{b} (97.03%)

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

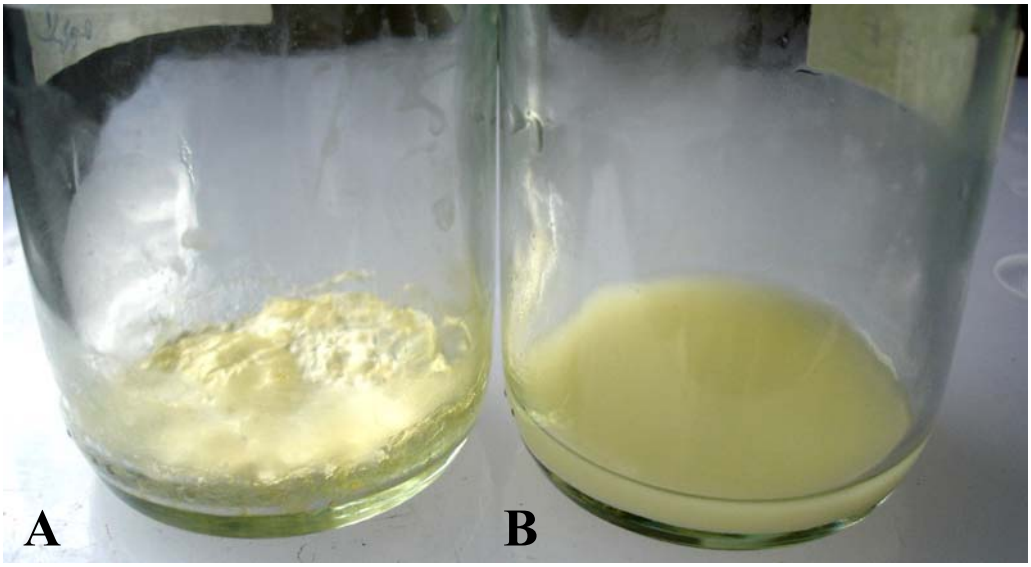
* ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นการทดลอง

ตารางที่ 24 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล เมื่อได้รับวัคซีนที่เก็บรักษา 3 เดือน

กลุ่มทดลอง	ระดับไตเตอร์เฉลี่ย (%ไตเตอร์*)
กลุ่มควบคุม	0 ± 0^{a} (0%)
ปลาวัยรุ่นได้รับวัคซีนเก็บ 4°C	110.67 ± 16.29^{b} (89.13%)
ปลาวัยรุ่นได้รับวัคซีนทำแห้งเยือกแข็งและเก็บ 4°C	116.71 ± 15.76^{b} (94.00%)

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

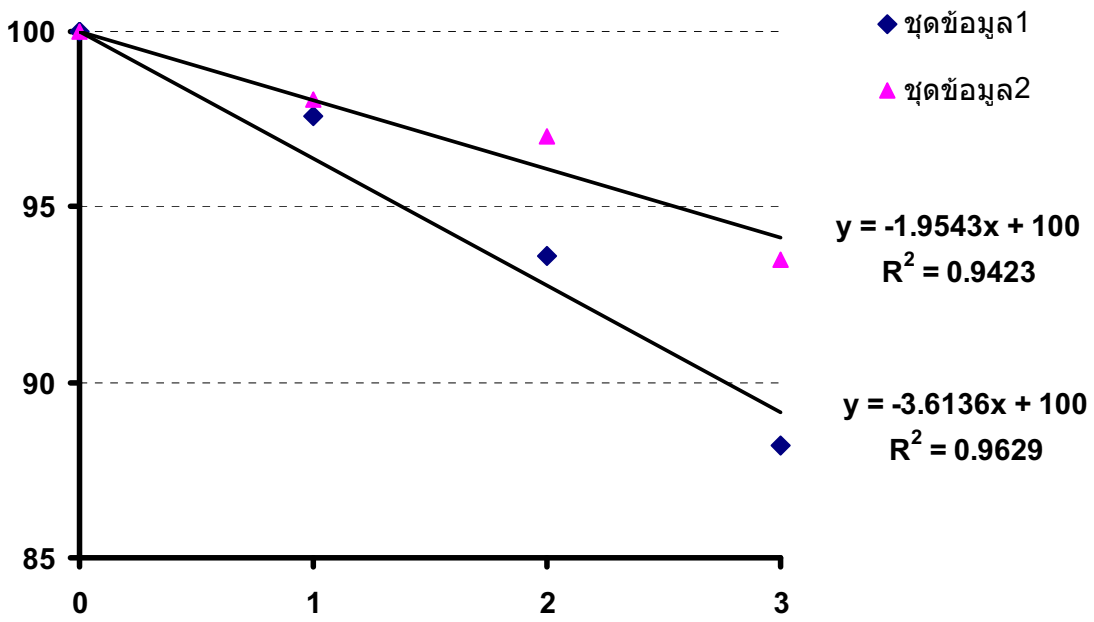
* ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นการทดลอง



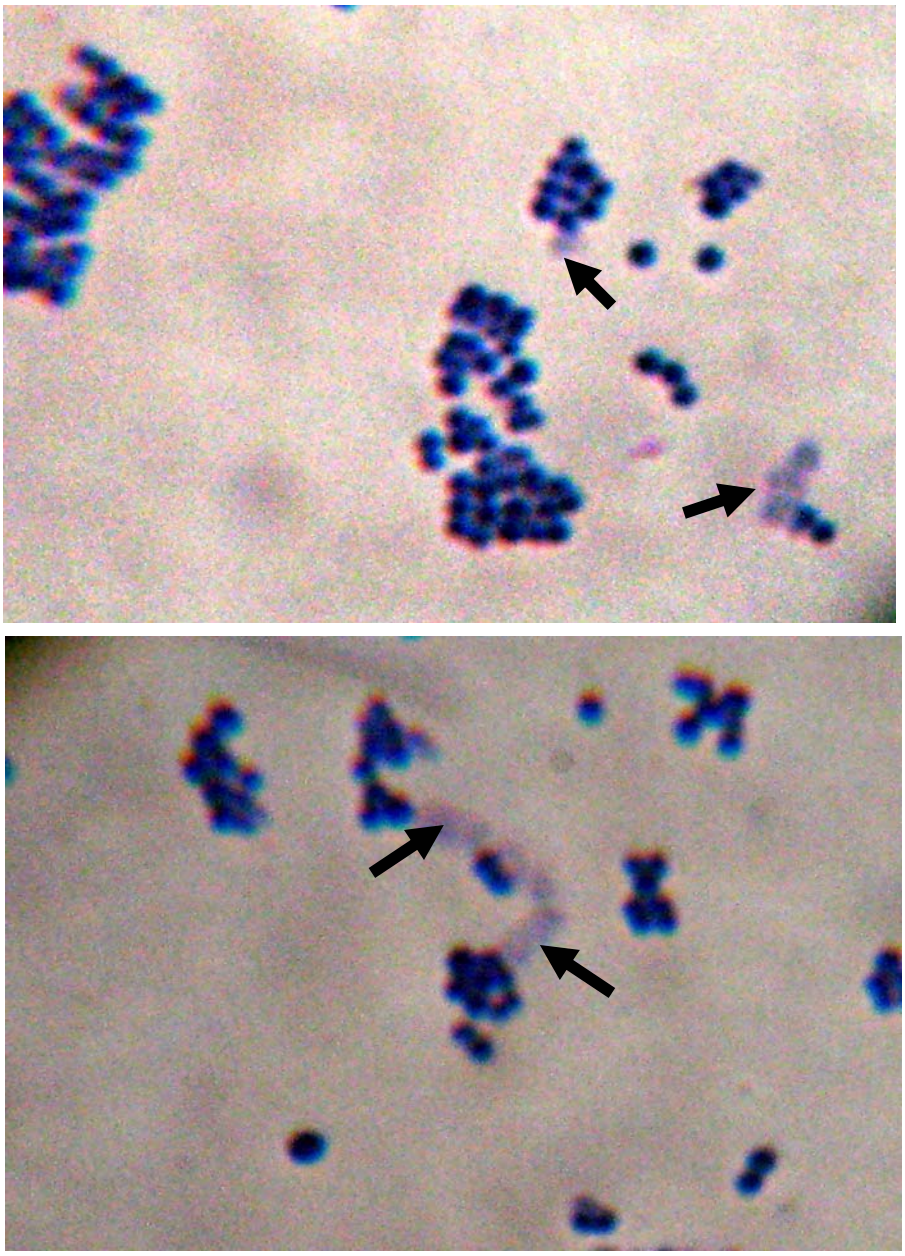
รูปที่ 20 วัคซีนที่ผ่าน (A) และไม่ผ่าน(B) การทำแช่แข็งแบบแห้ง

รูปที่ 21 วัคซีนที่ผ่านการทำแช่แข็งแบบแห้ง

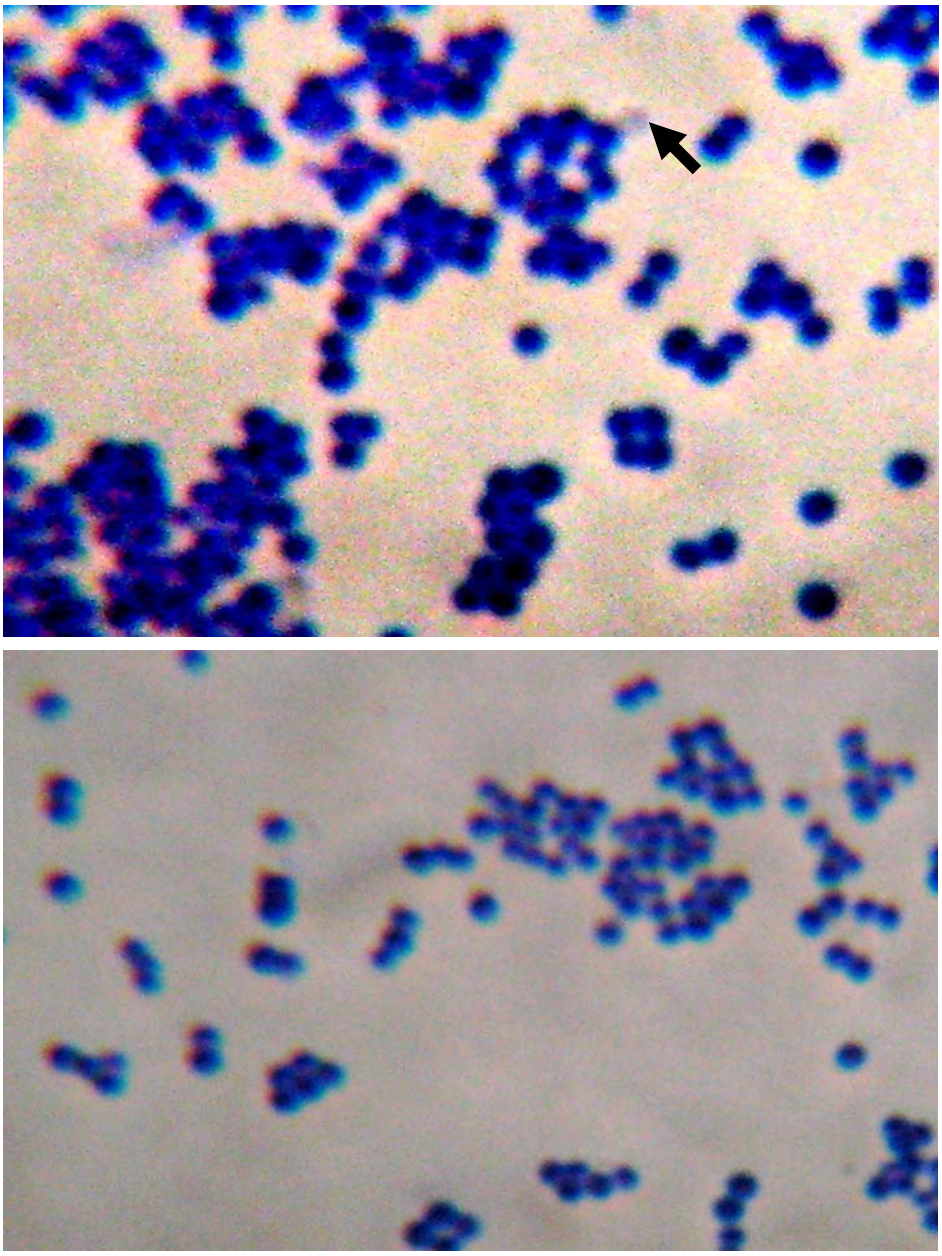
รูปที่ 22 เครื่องแช่แข็งแบบแห้ง



รูปที่ 23 กราฟแสดงความคงตัว (stability) ของวัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ที่เก็บไว้ 3 เดือน



รูปที่ 24 แสดงลักษณะภายนอกที่ผิดปกติของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในวัคซีนที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน (ลูกศร)



รูปที่ 25 แสดงลักษณะภายนอกที่ผิดปกติของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในวัคซีนที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน (ลูกศร)

6. ผลการประเมินค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีน

จากการประเมินค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีนต่อปลา 2,500 ตัว (โด๊ส) พบว่ามีค่าใช้จ่ายดังนี้

1) ค่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth และ Agar รวม 15 บาท
2) ค่าสารเคมีในการเตรียมเชื้อตาย เช่น ฟอร์มาลิน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ รวม 6 บาท
3) ค่าวัสดุปั่นแยกเชื้อ เช่น หลอดโพลีเมอร์ ชนิดออโตเครวฟได้รวม 8 บาท
4) ค่าเสื่อมอุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง อ่างอุ่นสารละลาย เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์รวม 10 บาท
5) ค่าน้ำกลั่นและน้ำเกลือปลอดเชื้อรวม 7 บาท
6) ค่าไฟฟ้า 10 บาท
7) ค่าเข็มและไซรินจ์ชนิดทูโบคูลินรวม 150 บาท
8) ค่าสำลีและแอลกอฮอล์รวม 65 บาท
9) ค่าแรงในการฉีดวัคซีนปลา 2,500 ตัว (เวลา 5 วัน) ค่าแรงวันละ 200 บาท รวม 1,000 บาท

วัคซีนที่ผลิตได้สำหรับ 2,500 ตัวปลา (โด๊ส) มีค่าใช้จ่ายในการผลิตวัคซีน (รายการ 1-6) เป็นเงิน 56 บาท เฉลี่ย 2.24 สตางค์ต่อตัวปลา (โด๊ส) เมื่อรวมค่าอุปกรณ์ ยาฆ่าเชื้อ และค่าแรงงานในการทำวัคซีนในรายการ 7-9 ในข้างต้น ทำให้ค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีนต่อปลา 2,500ตัว รวมเป็นเงิน 1,271 บาท หรือเฉลี่ย 50.84 สตางค์ต่อตัวปลา

ถ้าเปรียบเทียบมูลค่าปลานิลราคาตลาดกิโลกรัมละ 60 บาท น้ำหนักปลาตัวละ 700 กรัม หรือราคาปลาตัวละ 42 บาทกับค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีนพบว่าแตกต่างกันถึง 82.61 เท่า ซึ่งผู้วิจัยประเมินว่ามีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจและในการนี้ยังไม่มีการคำนวณรวมถึงค่าอาหาร วิตามิน พันธุ์ปลา แรงงาน ไฟฟ้า ปั๊มลม วัสดุอุปกรณ์ และอื่นๆ ที่ใช้ระหว่างการเลี้ยงก่อนเกิดโรคหรือเมื่อมีความเสียหายเกิดขึ้นหากไม่มีการป้องกันโรคหรือใช้วัคซีน

สรุปผลการทดลอง

1.การทำวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลโดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องให้ผลดีที่สุด ดีกว่าการแช่และการกินอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

2. ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อตายขนาด 10^8 cfu/ml ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีค่าเฉลี่ยสูงกว่า การฉีดวัคซีนเชื้อเป็นขนาด 10^6 cfu/ml และการฉีดเชื้อตายขนาด 10^6 cfu/ml อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

3. ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลาที่กินวัคซีนที่เคลือบด้วยอัลจิเนต อัลจิเนตร่วมกับเอธิลเซลลูโลส เจลาติน และเจลาตินร่วมกับเอธิลเซลลูโลส มีค่าที่ต่ำ นอกจากนี้การฉีดวัคซีนเชื้อตายขนาด 10^8 cfu/ml เข้าช่องท้องในเข็มแรก ร่วมกับการให้วัคซีนในข้างต้นให้ผลในการสร้างแอนติบอดีไตเตอร์ในระดับที่ต่ำ

4. ระดับแอนติบอดีไตเตอร์วัคซีนเชื้อตายขนาด 10^8 cfu/ml ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ มีค่าสูงกว่าการใช้วัคซีนผสมน้ำมันถั่วเหลือง อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ และน้ำมันพาราฟินอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

5. วัคซีนที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษา 5.11 เดือน ซึ่งแตกต่างจากวิธีการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่มีอายุการเก็บรักษา 2.76 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

6. ในการศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 4 ชนิดคือ ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์และอะลูมินัมไฮดรอกไซด์ฉีดร่วมกับวัคซีน ไคตินไคโตซานและแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ผสมอาหารให้กินร่วมกับการฉีดวัคซีนเชื้อตายเข้าช่องท้อง ในปลานิลวัยรุ่น ผลการศึกษาพบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์วัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีค่าสูงที่สุดและสูงกว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ แต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่สารทั้งสองแตกต่างจากอะลูมินัมไฮดรอกไซด์และไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เอกสารอ้างอิง

กรองแก้ว พลายมาศ. 2541. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยการแช่และผสมในอาหารปลาดุกลูกผสม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ 76 น.

เกรียงศักดิ์ สายธนู และเกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2522. แอนติบอดีในปลาดุกด้านหลังจากฉีดวัคซีนแอโรโมนาสไฮโดรฟิลล่า. วารสารชมรมโรคปลา 2(3): 123-129.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, สมภพ รุ่งสุภา, วีณา เคยพุดซา และเปี่ยมศักดิ์ เมะเศวต. 2534. การเพิ่มผลผลิตปลากระพงขาว โดยวิธีป้องกันโรคด้วยวัคซีนต้านแบคทีเรีย. ประมวลงานประชุมวิชาการเรื่องทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำครั้งที่ 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 17-18 มกราคม. หน้า 454-463

ชนกันต์ จิตมนัส. 2545. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา. วารสารสงขลานครินทร์ วทท 24(4)**:** 739-747

นนทวิทย์ อารีชน. 2537. การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรค Aeromonad Septicemia ในการเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย. รายงานวิจัยปี 2537-2538. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 86 น.

นิลุบล กิจอันเจริญ. 2534. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคในปลาดุกอุย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ 75 น.

ธีระภรณ์ มอไธสง. 2547. ศักยภาพของการใช้วัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มอัตราการรอดของปลานิลต่อโรค Streptococcosis. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 48 หน้า.

เยาวนิตย์ ดนยดล และ จีรนันท์ อุไรประสิทธิ์. 2544. ผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันในปลากะรังและปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 1/2544. กลุ่มโรคและพยาธิสัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ถ. เก้าแสน ซอย 1 อ. เมือง จ. สงขลา 90000.

สถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2547. 2549. เอกสารฉบับที่ 4/2549. ศูนย์สารสนเทศ. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 9-27.

สิทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัตน์ ธารากุล และศันสนีย์ เสนะวงษ์. 2537. อิมมูโนวิทยา. มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 390น.

เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง, ณัฐวุฒิ เหล่าพงศ์ไพศาล และสมเกียรติ เดชะคุณ. 2546. การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรค Streptococcosis ในปลานิล. รายงานการศึกษาประจำวิชาปัญหาพิเศษ (118494). ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18 หน้า.

Adams, A., Thompson, K.D., McEwan, H., Chen, S.-C., Richards, R. H. 1996. Development of monoclonal antibodies to Mycobacterium spp. isolated from chevron snakeheads and siamese fightingfish.Ý J. Aqua. Anim. Health 8, 208-215.

Aguilar, J.C. and Rodriguez, E.G. 2007. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine 25: 3752-3762.

Akhlaghi, M., Munday, B.L. and Whittigton, R.J. 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis. J. Fish Dis. 19: 251-158.

Al-Harbi, AH. First isolation of *Streptococcus* sp. From hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. Aquaculture. 1997; 128:195-201.

Ali, H.M. 1997. The effect of adjuvants on immunization of the Nile tilapia. J. King Saud U. 9: 37-45.

Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. Annu. Rev.Fish Dis. 2: 258-261.

Anderson, D.P. and Siwicki, A.K. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immuostimulated with glucan and chitosan by injection and immersion, Progr. Fish Cult. 56: 258-261.

Anderson, D.P., Siwicki, A.K., and Rumsey, GL. 1995. Injection or immersion delivery of selected immunostimulants to trout demonstrate enhancement of nonspecific defense mechanisms and protective immunity. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. **(**eds.**)**, Disease in Asian Aquaculture Vol 11. Fish health section, Asian fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 413-426.

Areechon, N., Kitancaroen, N. and Tonguthi, K. 1992. Immune response of walking catfish, *Clarias macrocephalus* to vaccination against *Aeromonas hydrophila* by injection, immersion and oral administration. pp. 143-151. In: Langdon, J.S., Rodriguez, G.L. and Sukimin , S. (eds.). BIOTROP Special Publish No. 48

Audibert, F., Leclerc,C. and Chedid, L. 1985. Muramyl peptides as immunopharmocalogical response modifiers. In: Torrence, P.F. (ed). Biological response modifiers. New approaches to disease prevention. Orlando, Academic press, CAN. p.307.

Audibert, F.M. and Lise, L.D. 1993. Adjvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Immunol. Today. 14: 281-284.

Baba, T., Watase, Y., and Yoshinaga, Y. 1993. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in crap. Nippon Suisan Gakkaishi 59: 301-307.

Baron, E.J., Peterson, L.R. and Finegold, S.M. 1994. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Diagnostic Microbiology. James F. Shanahan (ed.), Mosby-Year Book, Inc., Missouri, USA. Pp. 168-190.

Bogwald, J., K. Stensvag, T.B. Stuge and T.O. Jorgensen. 1994. Tissue localization and immune response in Atlantic salmon, *Salmo solar.* L. after oral administration of *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* antigen. Fish and Shellfish Immunology 4:353-368.

Bomford, R. 1984. Immunological Adjuvants. In: Maureen Dale, M. and Foreman, J.C. (eds.) Textbook of Immunopharmacology. Blackwell Scientific Publications, Boston, USA. p. 340-346

Brewer, H.M., Conacher, M. Satoskar, A., Bluethman, H. and Alexander, J. 1996. In interleukin-4-deficit mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. Eur. J. Immunol. 26: 2062-2066.

Bricknell, I. and Dalmo, R.A, 2005. The use of immunostimulantsin fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunol. 19: 457-472.

Bullock, G., Blazer, V., Tsukuda, S. and Summerfelt, S. 2000. Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). Aquaculture 185: 273-280.

Cannizzaro, S.M., Langer, R.S., Shakessheff, K.M. 1999. Polymeric systems for controlled drug release. Chem.Rev. 99: 3181.

Cha, S.H., Lee, J.S., Son, C.B., Lee, K.H. and Jeon, Y.J. 2008. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. 278: 110-0118.

Chen, D and Ainsworth, A.J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. J. of fish diseases 15: 295-304.

Clark, J.S. 2003. Prevention of Streptococcus in tilapia by vaccination: The Philippine Experience. 10/1/03 http://www.Avl.co.uk/other-sp.html.

Clem, L.W., Sizemore, R.C., Ellsaesser, C.F., and Miller, N.W. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. Developmental and Comparative Immunology 9: 803-809.

Cook, DW, and Lofton, SR. Pathogenicity studies with Streptococus sp. Isolated from fishes in an Alabama-Florida fish kill. Transactions of the American Fisheries Society. 1975; 104: 286-288.

Dale, M. and Foreman, J.C. 1984. Textbook of Immunopharmacology. Blackwell Scientific Publications, Boston, USA.

Dunn, J.A., Polk, J., Scarett, J., Olivier, G., Lall, S. and Goosen, F.A. 1990. Vaccine in aquaculture: the search for an efficient delivery system. Aquaculture. 91: 23-32.

Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996b. Effects of feeding *Spirulina* on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. J. of Aquatic Animal Health 8: 308-313.

Eldar, A., Shalpiro, O., Bejerano, Y. and Bercovier, H. 1995. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficilis* meningoencephalitis. Vaccine 13: 867-870.

Eldar, A., Orovitcz, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology 56:175-183.

Elson, C.M. 1996. Agricultural and medical applications of N,O-carboxymethylchitosan, a derivative of chrimp processing waste. Bull. Aquacult. Assoc. Can. 96: 39-44.

Ellis, A.E. 1982. Difference between the immune mechanism of fish and higher vertebrate. Pp. 1-30. *In* R.J. Roberts (ed.). Microbial Disease of Fish. Academic Press. London.

Ellis, A.E. 1988. Vaccination. Against Enteric Red Mouth (ERM). Pp. 85-91. *In* Ellis, A.E. (ed.). Fish Vaccination. Academic Press. New York.

Ellis, A.E. 1995. Recent development in oral vaccine delivery systems. Fish Pathology 30: 293-300.

Evans, J. J., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Fitzpatrick, B.T. 2004. *Streptococcus agalactiae* Vaccination and Infection Stress in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus.* J. Applied Aquacult. 16: 105 – 115.

Ferguson, H.W. 1989. Systemic Pathology of Fish. Iowa State University Press, Ames, USA 263 pp.

Fundueanu, G. Nastruzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J. and Rinaudo, M. 1999. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produce with different methods. Biomaterials. 20: 1427—1435.

Fitzsimmons, K. 2003. Tilapia Imports to US 2002, National Marine Fisheries Service, Fisheries Statistics and Economics Division, Department of Agriculture, USA. 2 p.

Galeotti, M. 1998. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. J. Appl. Ichth. 14: 189-199.

Gopalakannan, A. and Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture 179: 179-187.

Gudding, R., Lillehaug, A. and Evensen, O. 1999. Recent developments in fish vaccinology. Veterinary Immunology and Immunopathology. 72: 203-212.

Grabowski, L.D. and Cain. LaPata K.D. 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus*(L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. J. Fish Dis. 27: 573-581.

Gupta, R.K., Rost, B.E., Relyveld, E. and Siber, G.R. 1995. Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. In: Powell, M.F., Newman, M.J. (eds). Vaccine design: the subunit and adjuvant approach. Plenm Press, New York. p. 229-248.

Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary Vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo solar*). Aquaculture 95: 201-214.

Haney, D.C. Hursh, D.A., Mix, M.S. and Winton, J.R. 1992. Physiological and hematological changes in chum salmon artificially infected with erythrocyte necrosis virus. J. Aqua. Anim. Healt. 4:48-57.

Harikrishnan, R. Rani, N.M. and Balasundaramm, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio* following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture 221: 41-50.

Heckels, J.E., Fletcher, J.N. and Virji, M. 1989. The potential protective effect of immunization with outer membrane protein I from Neisseria gonorhoeae. J Gen Microbiol 135: 2269-2276.

Herwing, R.P., Gary, J.P. and Weston, D.P. 1997. Antibiotic resistant bacteria in surfacial sediments near Salmon net cage farms in Puget Sound, Washington, USA. Aquaculture 14**:** 263–283.

Hossain, M.A. and Sheriff, M. 1995. Changes in the hematological parameters of gold fish *Carassius aurata* Linnaeus exposed to sublethal copper. J. Asiat. Soc. Banglad. Sci. 21:263-270.

Hurvitz, H, Bercovier, H and Van, RJ. 1997. Effact of ammonia on the survival and the immune reponse of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Wallbaum) vaccinated against Streptococcus iniae. Fish and Shellfish Immunology 7: 45-53.

Iwama, G. and Nakanishi, T. 1996. The Fish Immune System. Academic Press of San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo and Toronto. 380 p.

Jha, N., Leela, I. and Prabhakar Rao. 1988. Removal of cadmium using chitasan. J. Environ. Eng. 114: 962.

Jeney, G. and Anderson, D.P. 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 116: 315-329.

Joosten,P.H.M., Tiemersma, E., Ehreels, A., Caumartin-Dheux, C. and Rombout, J.H.W.M. 1997. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. Fish Shellfish Immunol. 7: 471-485.

Kajita, Y., Sakai, M., and Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathology 25: 93-98.

Katare, Y.K. and Panda, A.K. 2006. Immunogenicity and lower dose requirement of polymer entrapped tetanus toxoid co-administered with alum. Vaccine 24: 3599-3608.

Kawakami, H., Hiratsuka, M., and Dosako, S. 1998. The nonspecific immunostimulantion and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. Fish Pathology 33: 287-292.

Kitao, T, Aoki, T and Sakou, R. 1981. Epizootic cause by β- haemolytic *Streptococcus* spicies in fresh water fish. Fish pathol. 15: 301-307.

Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcal iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) Aquaculture 188: 237-246.

Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management, Food Technol. Jan. p. 114.

Kono, M. Matsui, T. and Shimizu, C. 1987. Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. Nippon. Suisan Gakkaishi. 53: 125-129.

Kusuda, R. and Takagi, S. 1983. Antibody production against Streptococcus sp. In nationally infected yellowtail, Seriola quiwueradita. Reports. USA Marine Biological Institute. Kochi University. 5: 21-28.

Kupta, K.C. and Kumar, M.N.V. Ravi. 2000. Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan. Biomaterials. 21: 115

Kusuda, R. and Salati, F. 1982. Enterococcus seriolicida and Streptococcus iniae. Source: http://www.cabi-publishing. Org/bookshop/Reading Room/0851991947/1974ch8.pdf

Kwon, S.R., Nam, Y.K., Kim, S.K. and Kim, K.H. 2006. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. Fish & Shellfish Immunol. 20: 621-626.

Li, Y. and Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. J. of Nutrition 115: 123-131.

Liang, Y., Ma, S., Yang, Z., Liu, L., Wang, L., Wang, J. Jiang, L., Shi, C., Dong, C. and Li, Q. 2008. Immunogenicity and safety of a novel formalin-inactivated and alum-adjuvanted candidate subunit vaccine for mumps. Vaccine 26: 4276-4283.

Lida, T., Wakabayashi, H. and Egusa, W. 1981. Vaccination for control of Streptococcal disease in culture yellowtail. Fish Pathology 16: 201-206.

Lio-po, G. and Wakabayashi, H. 1986. Immuno-response in tilapia vaccinated with Edwardsiella tarda by hyper-osmotic infiltration method. Vet. Immunol. Immunopath. 12: 351-357.

Magor, B.G. 1988. Gill histopathology of juvenile *Oncorhychus kisutch* exposed to suspended wood debris. Can. J. Zool. 66: 2164-2169.

Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 630-648.

Mallatt, J., Bailey, J.F. Lampa,S.J., Evans, M.A. and Brumbaugh, S. 1995. A gill system for quantifying the ultrastructural effects of environmental stressors: methylmercurry, keptone and heat shock. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 1165-1182.

Matsuyama, H., R.E.P. Mangindaan and Tomoki Yano. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture 101:197-203.

Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G. 1985. In: Menges, G. (ed). Encyclopedia of polymer Science and Engineering, Vol. 1. Wiley, New York, USA. P.20

McKay, G., Blair, H.S. and Gardner, J.R. 1989. Adsorption of dyes on chitin. I. Equilibrium studies. J. Appl. Polym. Sci. 27: 3043.

Miyazaki, T., Gutierrez, M., Hata, H. and Kim, M. 1992. Effective of anti-*Edwardsiella tarda*-Ig Y egg yolk immunoglobulin on prevention of *E. tarda* infection in Japanese eel. Symposium on Disease in Asian Aquaculture, Asian Fisheries Society. 26-29 Novmber 1990. pp. 399-406.

Muzzarelli, R.A.A. 1997. Human enzymatic activities related to the therapeutical administration of chitin derivatives, Cell Mol. Biol. Life Sci. 53: 131.

Nair, K.G.R. and Madhavan, P. 1984. Chitosan for removal of mercury from water. Fishery Tech. 21: 109.

Nicol, S. 1991. Life after death for empty shells, New Scientist Feb. p. 46.

O' Hogan, D. 1998. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. Adv. Drug Deliv. Rev. 34: 285-304

Oliver, G., Evelyn, T.P.T, and Lallier, R. 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. Developmental and Comparative Immunology 9: 419-432.

Poncelet, D., Babak, V., Dulieu, c. and Picot, A. 1999. A Physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. Colloids Surf. A Physicochem Eng Aspects. 155: 171-176.

Pilarczyk, A. 1995. Changes in specific carp immune reaction caused by addition of fish oil to pellets. Aquaculture 129:425-429.

Plumb, J.A. and S. Vinitnantharat. 1994. Optimum concentration of *Edwardsiella ictaluri* vaccine in feed for oral vaccination of channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health 6: 118-121.

Prasad Surendra. 2002. Efficacy of Formalin-Killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcs* sp. Vaccine in Red Tilapia. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science (Aquaculture). Graduate School, Kasetsart University.

Quentel, C and Baulny, M.O. 1995. vaccination on juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L, against vibriosis. Aquaculture 132: 125-131.

Rahim, Z., Sanyal, S.C., Aziz, K.M.S., Huz, M.I. and Chowdhury, A.A., 1998. Isolation of enterotoxigenic, haemolytic and antibiotic resistant *Aermonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 48**:** 865–867.

Robertsoen, B. 1999. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. Fish Shellfiish Immunol. 11:23-37.

Ruangapan, L., T. Kitao and T. Yoshida. 1986. Pretective efficiency of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia. Veterinary Immunology and Immunopathology 12:345-350.

Sajeevan TP, Rosamma Philip, Bright Singh TS. 2009. Dose/frequency : A critical factor in The Administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture. 287:248-252.

Sakai, M., R. Kubota and S. Atsuta. 1987. Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* agent β-haemolytic streptococcal disease. Nippon Suisan Gakkaishi 53(8) 1373-1376.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1989. Protective immune response in rainbow trout vaccinated with haemolytic streptococcal bacterin. Fish Pathol.. 24: 169-173.

Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S., and Kobayashi, M. 1992. The immuno-stimulating effects of chitin in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). In: Shariff, M., Subasighe, R.P. Arthur, J.R. (Eds.), Diseases Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillippines, pp. 413-417.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172: 63-92.

Sanford, P.A. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applicatios. In: Bronner, F. and Kleinzeller, A. (eds). Current Topics in Membranes and Transport. Academic Press, New York. pp. 135-176.

Seok Lee, J. and Il Park, S. 1992. The effects of adjuvant and vaccine against Edwardsiellosis in tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Fish Pathol. 5: 19-27.

Shelby, R.A., P.H. Klesius, C.A. Shoemaker and J.J. Evans. 2002. Passive immunization of tilapia, *Orechromis niloticus* L. with anti *Streptococcus iniae* whole sera. Journal of Fish Disease 25: 1-6

Shiau, S.Y. and Yu, Y.P. 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. auratus*. Aquaculture 179: 439-446.

Singh, M. and Hogan, D. 1998. The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for delivery systems for oral administration. Adv.Drug Deliv.Rev. 34: 285-304.

Singh, M., Ugozzoli, M., Kazzaz, J., Chesko, J., Soenaqan, E., Mannucci, D., Titta, F., Contorni, M., Colpini, G., Duidice, G.D. and Hagan, D.T. 2006. A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a rance of established and new generation vaccine antigens. Vaccine 24: 1680-1686.

Skjermo, J., Storseth, T.R., Hansen, K., Handa, A. and Oie, G. 2006. Evaluation of beta-glucans and high-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (Gadus morhua L.). Aquaculture 261: 1088-1101.

Surendra, P. 2002. Efficacy of formalin-killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus sp.* vaccine in red tilapia. A Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (Aquaculture). Kasetsart University.

Shoemaker, C.A., Vandenberg, G.W., Desormeaux, A., Klesius, P.H. and Evans, J.J. 2006. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 255: 151-156.

Siwicki, A.K. and Dunier, M. 1994. In vitro restoration of antibody secreting cells and lymphocyte proliferation activity by nitrogranlogen after in vivo immunosuppression due to lindane in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Ecotoxicol. Environment. Safety. 27: 316-323.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunolpahtol. 41: 219-222.

Stoskopf, M.K. 1992. Fish Medicine. W.B. Saunders, Maxico.

Suzuki, K., Okawa, Y. Hashinoto, K. Suzuki, S. Suzuki, M. 1984. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. Microbiol. Immunol. 28:903-912.

Thompson, I., G. Choubert, D.F. Houlihan and C.J. Secombes. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquaculture 133:91-102.

Thorburn, M.A. and E.L.K.Jasson. 1987. Effect of immersion in live *Vibrio anguillarum* and simultaneous oxytetracycline trement on protection of vaccinated and non-vaccinated rainbow trout, *Salmo gairdneri* against Vibriosis. Disease of Aquatic Organization 2:167-171.

Thompson, I., G. Choubert, D.F. Houlihan and C.J. Secombes. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquaculture 133:91-102.

Tipsemongkol C, Purivirojkul W, Chuchird N, Limsuwan C. Effects of DVAQUA® on the Growth, Survival and Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei).* Kasetsart University fisheries research bulletin. 2009;33(1):15-27.

Toronzo, A.E., Devesa,H.L., Romalde, J., Lamas, A. Riaza, J., Leioro, J. and Barje, J.L. 1995. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus sp*. Injection in turbot. Aquaculture 134: 17-27.

Vargas, A.F. and Yepiz, P.G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture. 191:13-21.

Vollstad, D., Bogwald, J., Gaserod, O. andDalmo, R.A . 2006. Influence of high-M alginate on the growth and survival of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) fry. Fish Shellfish Immunol. 20: 548-561.

Wadstein, J., Thom, E. Heldman, E., Gudmunsson, S. and Lilja, B. 2000. Biopolymer L112, a chitosan with fat binding properties and potential as a weight reducing agent: a review of in vitro and in vivo experiments, In: R.A.A. Muzzarilli (ed). Chitosan Per Os: from Dietary Supplement To Drug Carrier. Grotammare, Italy.

Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schuep, W., and Meier, W. 1998. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. of Fish Diseases 21: 127-137.

Walls, R.S. 1977. Eosinophil response to alum adjuvants: involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 156: 431-435.

Warren, H.S. and Chedid, L.A. 1986. Future prospects for vaccine adjuvant. CRC Crit. Rev. Immunol. 4: 369-388.

Wedmeyer, G.A. Gould, R.W. and Yasutake, W.T. 1983. Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment mehod. J. Fish Biol. 23:711-716.

Weiner, G.J., Hsin-Ming, L., Wooldrige, J.E., Dahle, C.E. and Krieg, A.M. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucletides containing the CpG mofif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 10833-10837.

Wise, D.J., Tomasso, J.R., Schwedler, T.E., Blazer, V.S., and Gatlin, D.M. III. 1993. Effect of vitamin E on the immune responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. J. of Aquatic Animal Health 5: 183-188.

World Intellectual Property Orgaization. 2008. Combination vaccine against streptococcus. Patent WO/2008/003734. http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2008003734

Zikakis, J.P., Saylor, W.W., Austin, P.R. 1982. Chitin and chitosan, The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori. P. 233.