

ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

Efficiency of Vaccination with *Streptococcus agalactiae* bacterin on Streptococcosis Prevention in Nile Tilapia

นิลุบล กิจอันเจริญ (Nilubol Kitancharoen)^{1*}

ชุตินา หาญจวนิช (Chutima Hanjavanij)²

นงนุช สุวรรณเพ็ง (Nongnuch Suwannapeng)³

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นไปได้ของการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล โดยทำการศึกษาทั้งในห้องปฏิบัติการและในเลี้ยงจริง สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ การให้วัคซีนจะใช้วิธีการฉีด โดยเปรียบเทียบการฉีดเข้าช่องท้องและการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปลานิลที่ใช้ในการศึกษามีขนาด 230.0 ± 5.7 กรัม วัคซีนที่ใช้เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ KKU 44002 ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน โดยมีความเข้มข้น 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ให้โดยการฉีดในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม จากผลการศึกษาพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์และอัตราการรอดสัมพัทธ์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์และอัตราการรอดสัมพัทธ์สูงกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับการศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริง ทดลองกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังของเกษตรกร ในแม่น้ำชี อ. ท่าประทาย จ. มหาสารคาม ซึ่งมีน้ำหนัก 368.8 ± 7.8 กรัม ปลาจำนวน 2 กระชัง จากทั้งหมด 7 กระชัง ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ผ่านการฆ่าด้วยฟอร์มาลิน เข้าทางช่องท้อง ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ในอัตรา 0.3 มิลลิลิตรต่อตัว ผลที่ได้แสดงว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการเฉลี่ยสะสมสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างเห็นได้ชัดตลอดการเลี้ยง

Abstract

This research focused on examination of the possibility of vaccination against streptococcosis in Nile tilapia both in laboratory and net cage conditions. For the laboratory test, injection was used as the route for vaccination. Comparison between intraperitoneal and intramuscular injection was performed using tilapia of 230.0 ± 5.7 g BW. Vaccine was prepared from *Streptococcus agalactiae* strain KKU 44002 killed with 2% formalin. Concentration of the bacterin was 1×10^8 CFU/ml and injection dosage was 0.1 ml/100 g fish BW. The results revealed that vaccinated fish showed significantly higher antibody titer and relative percent survival, compared with the unvaccinated control group ($P < 0.05$). Among vaccinated fish, increase of antibody titer and relative percent survival of the fish vaccinated by intraperitoneal injection was significantly higher than that of

¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³นักวิจัย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จังหวัดมหาสารคาม

*corresponding author

the fish vaccinated by intramuscular injection ($P < 0.05$). The field experiment was carried out at a real cage culture system in Chee River, Tapratat District, Mahasarakham. Average BW of the tested fish was 368.8 ± 7.8 g. Two from 7 cages were vaccinated with 1×10^8 CFU/ml of formalin-killed bacterin at the dosage of 0.3 ml/fish by intraperitoneal injection. From the result, vaccinated fish obviously showed clearly higher accumulative percent survival than unvaccinated fish through the culture period.

คำสำคัญ: การฉีด เชื้อตายของ *S. agalactiae* ปลานิล โรคสเตรปโตคอคโคซิส

Keywords: injection, killed-*S. agalactiae* bacterin, Nile tilapia, streptococcosis

บทนำ

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn.) เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงและบริโภคกันมากที่สุดในประเทศไทย จากข้อมูลล่าสุดของฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง (2545) พบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 เป็นต้นมา ผลผลิตปลานิลเป็นอันดับหนึ่งมาโดยตลอดเมื่อเปรียบเทียบกับปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ ในปัจจุบันปลานิลสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงกันมากที่สุด คือ สายพันธุ์จิตรลดา 3 (ยุพินท์และพันธุ์ศักดิ์, 2543) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีเขื่อนและอ่างเก็บน้ำจำนวนมากนิยมเลี้ยงปลานิลในกระชังเพราะให้ผลผลิตสูง และให้ประโยชน์สูงสุดในเชิงเศรษฐศาสตร์สำหรับการใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำทั่วไป (ศิริ, 2542) จากรายงานของนิลบล และคณะ (2545) พบว่าตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมาการเลี้ยงปลานิลในกระชังทุกพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ประสบกับปัญหาการระบาดของโรค ยังความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างไม่สามารถประเมินมูลค่าความเสียหายส่งผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงหลายรายประสบกับภาวะขาดทุนจนต้องเลิกกิจการไปในที่สุด ลักษณะอาการของโรคที่พบ คือ ปลานิลจะมีสีตัวเข้ม เชื่องซึม ลอยตัวที่ผิวน้ำ ไม่กินอาหาร ตาขุ่นโปน มีหนองแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อ ตับและม้ามซีดเนื่องจากการตายของเซลล์ในอวัยวะดังกล่าว สามารถแยกเชื้อได้จากสมองเช่นกัน

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับโรคที่พบในปลานิลนั้น มีรายงานน้อยมากในประเทศไทย โดยมีเพียงรายงานจากกรมประมงโดยกมลพร (2539) ที่ได้ทำการรวบรวมเกี่ยวกับโรคที่เกิดขึ้นในปลานิลว่ามาจากหลาย

สาเหตุโดยมีทั้งที่เกิดจากปรสิต แบคทีเรีย และเชื้อรา แบคทีเรียที่มักทำให้เกิดโรคในปลาน้ำจืดได้แก่สกุล *Aeromonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ชนิดที่รู้จักกันดีคือ *Aeromonas hydrophila* และเชื้อสกุล *Streptococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ชนิดที่มีรายงานในสัตว์น้ำได้แก่ *Streptococcus iniae* และ *S. agalactiae* (นิลบล, 2544; นิลบล และคณะ, 2545) เป็นต้น เชื้อสกุล *Streptococcus* นั้นเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรค Streptococcosis ที่มีการระบาดมากในปลานิล (*O. niloticus*) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. iniae* (Eldar et al., 1994; Yuasa et al., 1999) เชื้อ *Streptococcus* นี้มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ โดยแบ่งเป็นแบบ α -, β - และ γ - haemolysis ซึ่งส่วนใหญ่พบว่ากลุ่มที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบ β - และ γ - haemolysis เป็นสาเหตุการตายของปลานิล ส่วน α - haemolysis นั้นมีรายงานว่า เป็นสาเหตุการตายของปลาอุกผสมระหว่าง *O. niloticus* และ *O. aureus* ที่เลี้ยงในประเทศซาอุดีอาระเบีย และอิสราเอล (Al-Harbi, 1994; Eldar et al., 1997) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรค Streptococcosis ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ streptococcus กลุ่ม β - haemolysis ของการเลี้ยงปลานิลในกระชังในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นิลบล และคณะ, 2545) อาการของโรคที่ปรากฏในปลาจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา แต่ในปลาบางชนิดอาจทำให้เกิดการติดเชื้อแบบกึ่งเฉียบพลัน และไม่ปรากฏอาการภายนอก (Cook and Lofton, 1975; Kitao et al., 1981; Miyazaki et al., 1984; Al-Harbi, 1994; Eldar et al., 1995; 1997; Yuasa et al., 1999)

จากปัญหาความรุนแรงของโรคและการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะบางตัวในการรักษาโรคในสัตว์น้ำทำให้คณะผู้วิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับการหาวิธีในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสโดยการให้วัคซีนเพื่อเสริมสร้างความต้านทานต่อโรคนั้นในปลานิล

วิธีการศึกษา

1. สัตว์ทดลอง

1.1 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ ใช้ปลานิลซึ่งเลี้ยงมาจากปลาเล็กที่มีอายุเท่ากัน โดยเลี้ยงในบ่อขนาด 4x2 เมตร ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง มีระบบให้อากาศ และเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ในอัตรา 50 เปอร์เซ็นต์ จนเป็นปลารุ่น จึงนำมาใช้ในการศึกษาปลาที่ใช้มีน้ำหนักเฉลี่ย 230.0 ± 5.7 กรัม ความยาว 20.3 ± 1.8 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 2x2 เมตร ระดับน้ำ 50 เซนติเมตร ใช้ระบบน้ำไหลผ่านตลอด เป็นเวลา 2 สัปดาห์เพื่อให้ปลาปรับตัวเข้ากับสภาพการทดลอง ให้อาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็นในอัตราส่วน 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลา และทำการทดสอบก่อนการทดลองเพื่อยืนยันว่าปลาที่นำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ โดยสุ่มตรวจแอนติบอดีไตเตอร์จากปลาจำนวน 60 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง ปลาที่ใช้จะต้องมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ไม่เกิน 4.0

1.2 การศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริง ปลานิลที่ใช้เป็นปลาที่เกษตรกรเลี้ยงอยู่ในกระชังในแม่น้ำชี อำเภอบำเหน็จณรงค์ จังหวัดมหาสารคาม โดยเลี้ยงในกระชังขนาด 3x5x3 เมตร มีอายุประมาณ 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 368.8 ± 7.8 กรัมต่อตัว ซึ่งปลาเหล่านี้จะเลี้ยงผ่านช่วงที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสสูง เพื่อให้ถึงขนาดตลาด ช่วงที่ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อยู่ระหว่างเดือนพฤษภาคม - มิถุนายน พ.ศ. 2546 ปลาทดลองมีจำนวน 7 กระชัง โดยกระชังที่ได้รับวัคซีนมี 2 กระชัง โดยมีจำนวน 720 และ 630 ตัวต่อกระชัง ส่วนอีก 5 กระชังไม่ได้รับวัคซีน มีจำนวน 800, 900, 900, 700 และ 850 ตัวต่อกระชัง

ปลาทุกกระชังได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง ในอัตรา 2-5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว

2. การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนที่ใช้ในการศึกษาเป็นวัคซีนเชื้อตาย (killed vaccine) เตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ KKU 44002 ซึ่งแยกจากตัวอย่างปลานิลที่ป่วยในเดือนกันยายนปี พ.ศ. 2544 ของจังหวัดมุกดาหาร นำมาเลี้ยงบน BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Difco) เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเลี้ยงใน BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Difco) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาล้างด้วย normal saline ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม normal saline ลงไป เขย่าให้เซลล์แบคทีเรียกระจาย ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร แล้วเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นล้างฟอร์มาลินออกด้วย normal saline 3 ครั้ง และทดสอบว่าเชื้อตายหรือไม่บน BHIA (นิลบล, 2534)

สำหรับการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้วัดแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี direct agglutination มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีน แตกต่างกันตรงที่การปรับความเข้มข้นของแบคทีเรีย ซึ่งมีค่าความเข้มข้นประมาณ 1×10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร (นิลบล, 2534)

3. การหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์

การตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ใช้วิธีการ direct agglutination โดยการเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution ใน normal saline ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุมจนถึงหลุมสุดท้าย ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:2,048

เขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งมี normal saline และแอนติเจน (นิลบล, 2534)

4. การทดสอบความต้านทานโรค

โดยพิจารณาจากอัตราการตาย และอัตราการรอดสัมพัทธ์ตามวิธีการของ Ellis (1988) หลังการฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* จากสายพันธุ์ KKU 44002 ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถฆ่าปลาทดลองประมาณ 50 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน โดยฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.2 มิลลิลิตร สังเกตอาการของปลาทดลองเป็นเวลา 7 วัน และนำปลาที่ตายหรือปลาที่มีอาการติดเชื้อไปวินิจฉัยหาสาเหตุของการตาย เพื่อยืนยันว่าสาเหตุเกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* นับจำนวนปลาที่ตายหรือแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าแปรปรวน (Analysis of variances : ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลอง ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยโปรแกรม MSTAT (MSTAT, 1985)

5. การศึกษาการให้วัคซีนโดยการฉีด

5.1 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

ปลานิลทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง โดยแต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ ซึ่งแต่ละซ้ำประกอบด้วยปลาจำนวน 20 ตัว ดังนี้ กลุ่มการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection, IM) และกลุ่มการทดลองที่ 2 คือ กลุ่มที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection, IP) ปลาทดลองจะได้รับวัคซีนที่เตรียมตามวิธีในหัวข้อ 3 โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือช่องท้องในอัตราส่วน 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีนจะได้รับการฉีด normal saline เข้าช่องท้องในอัตราส่วน 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา

100 กรัม หลังจากนั้นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มเจาะเลือดปลาจำนวน 20 ตัว โดยเจาะจาก caudal vein เพื่อตรวจวัดแอนติบอดีไโตเตอร์ และให้วัคซีนครั้งที่สองหลังจากการให้วัคซีนครั้งแรก 3 สัปดาห์ และทำการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาแอนติบอดีไโตเตอร์หลังจากการได้รับวัคซีนครั้งที่สองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ทำการทดสอบความต้านทานโรคดังวิธีการในข้อ 4

5.2 การศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริง

ปลาที่เลี้ยงจำนวน 2 กระชัง จากทั้งหมด 7 กระชัง ได้รับวัคซีนที่เตรียมโดยวิธีการและความเข้มข้นดังข้อ 3 ปลาทดลองได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในอัตรา 0.3 มิลลิลิตรต่อตัว ส่วนอีก 5 กระชัง ไม่ได้รับวัคซีน จากนั้นเลี้ยงปลาทั้งหมดตามระบบการเลี้ยงของเกษตรกร เก็บข้อมูลปลาที่ตายตลอดการเลี้ยง

ผลการศึกษา

1. ผลของการให้วัคซีนต่อการเพิ่มน้ำหนักและความยาวของปลานิล

จากการชั่งวัดขนาด พบว่าน้ำหนักปลานิลก่อนและหลังการให้วัคซีน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $189.84 + 20.45$ และ $200.04 +$ กรัม ความยาวเฉลี่ยเท่ากับ $19.23 + 1.44$ และ $21.04 + 1.74$ เซนติเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างน้ำหนักและความยาวของปลานิลก่อนและหลังการทดลอง

2. การให้วัคซีนต่อต้านเชื้อ *S. agalactiae* แก่ปลานิลในห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาเปรียบเทียบการให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในปลานิล ด้วยวิธีการที่ต่างกันดังนี้ การฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง และกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์เข้าช่องท้อง เมื่อตรวจวัดค่าแอนติบอดีไโตเตอร์หลังการได้รับการฉีดวัคซีนครั้งแรก 2 สัปดาห์พบว่าทั้ง 3 กลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องมีค่าแอนติบอดีไโตเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ $7.02 + 0.85$ สูงกว่า

วิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อซึ่งมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ $5.16 + 0.44$ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ $0.25 + 0.00$ (ตารางที่ 1) หลังการได้รับการฉีดวัคซีนครั้งที่สองโดยวิธีการเช่นเดียวกับการฉีดครั้งแรก พบว่า การฉีดเข้าช่องท้องมีผลทำให้ปลานิลสร้างแอนติบอดีสูงถึง $422.15 + 1.68$ สูงกว่าการฉีดเข้ากล้ามเนื้อซึ่งมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์ $151.16 + 0.77$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ปริมาณแอนติบอดีที่วัดได้จากปลาทดลองที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อนี้มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เพียง $0.38 + 0.01$ (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยระหว่างการได้รับการฉีดวัคซีนครั้งแรกและครั้งที่สอง พบว่าการฉีดเข้าช่องท้องและการฉีดเข้ากล้ามเนื้อสองครั้งมีผลต่อการสร้างแอนติบอดีในซีรัมของปลานิลมากกว่าการฉีดครั้งเดียว

เมื่อทดสอบความต้านทานโรคโดยฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* เข้าทางช่องท้องปลาทดลอง และนำอัตราการตายมาวิเคราะห์ค่า Relative Percent Survival (RPS) พบว่าปลากลุ่มควบคุมมีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ $11.67 + 2.52$ เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีอัตราการตายเฉลี่ยและค่า RPS เท่ากับ $3.67 + 1.53$ เปอร์เซ็นต์ และ $68.55 + 7.46$ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมีอัตราการตายเฉลี่ยและค่า RPS เท่ากับ $1.00 + 1.00$ เปอร์เซ็นต์ และ $91.43 + 5.51$ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การให้วัคซีนโดยการฉีดทั้งสามกลุ่มมีค่าอัตราการตายเฉลี่ยและค่า RPS แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องมีค่าอัตราการตายต่ำกว่าและมีค่า RPS สูงกว่าวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2)

3. การศึกษาการให้วัคซีนต่อต้านเชื้อ *S. agalactiae* แก่ปลานิลในสภาพการเลี้ยงจริง

สำหรับการศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริง ทดลองกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังของเกษตรกรในแม่น้ำชี ที่อำเภอท่าประทาย จังหวัดมหาสารคาม โดย

การให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องพบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างชัดเจน โดยปลากระชังที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอด 97.64 และ 98.09 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดเฉลี่ย $73.03 + 6.78$ เปอร์เซ็นต์

สรุปและวิจารณ์ผล

1. ผลของการให้วัคซีนต่อต้านเชื้อ *S. agalactiae* ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล

ผลจากการทดลองให้วัคซีนแก่ปลานิลโดยการฉีดไม่มีผลกระทบในเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับปลานิลปกติ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับในงานวิจัยอื่นที่รายงานว่าปลานิลแปลงเพศที่มีอายุ 4 เดือน จะมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 200 ถึง 280 กรัม (เวียง, 2542; ยุทธชัย และอัจฉริยวรรณ, 2543) และน้ำหนักเฉลี่ยดังกล่าวสอดคล้องกับข้อมูลที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ สำหรับผลต่อปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง เกษตรกรให้ข้อมูลจากการสังเกตว่าปลาที่ให้วัคซีนมีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีน อย่างไรก็ตามควรจะได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความถูกต้องของข้อมูลที่ได้จากเกษตรกรในเชิงปริมาณต่อไป

2. การให้วัคซีนต่อต้านเชื้อ *S. agalactiae* แก่ปลานิลโดยวิธีการฉีด

จากการทดลองให้วัคซีนแก่ปลานิลจิตรลดา 3 โดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าช่องท้อง และกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับการฉีด normal saline ในครั้งแรกพบว่า การสร้างแอนติบอดีในซีรัมมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างชัดเจน โดยการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและกลุ่มควบคุมมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยต่ำที่สุด ซึ่งผลที่ได้เหมือนกันในการให้วัคซีนครั้งที่สอง การศึกษานี้ให้ผลคล้ายคลึงกับในหลายรายงาน ซึ่งสรุปว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องเป็นวิธีการที่กระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรัมสูงสุด (เกรียงศักดิ์และเกรียงศักดิ์, 2523;

นิลบล, 2534; Eldar et al., 1995; 1997; Klesius et al., 2000) และสอดคล้องกับ Eldar et al. (1995) และ Surenda (2002) ที่ได้ทำการทดลองในปลานิลเช่นกัน แต่ค่าการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีในซีรัมของปลาอาจแตกต่างกันบ้างขึ้นอยู่กับปัจจัยบางประการ เช่น ชนิดของปลา ชนิดของเชื้อ และสภาพแวดล้อม เป็นต้น (Ellis, 1988; Sakai et al., 1987; Klesius et al., 2000)

เมื่อพิจารณาในแง่ความต้านทานโรค พบว่าการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องและการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อแก่ปลานิล สามารถต้านทานต่อโรค Streptococcosis โดยมีค่า RPS สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในรายงานของ Eldar et al. (1995) กล่าวว่าการฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมได้จาก whole cell ของเชื้อ *S. difficile* เข้าช่องท้องแก่ปลานิลนั้น ให้ผลในการป้องกันโรคได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่เป็น homologous vaccine และ heterologous vaccine ของเชื้อ *Streptococcus* spp. (Klesius et al., 2000) แต่วัคซีนให้ผลในการป้องกันโรคได้ค่อนข้างต่ำในปลานิลแดง คือ 42.55 เปอร์เซ็นต์ (Surenda, 2002) ส่วนในปลา rainbow trout ให้ผลในการป้องกันโรคได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Sakai et al., 1987) ในขณะที่ Ellis (1988) ให้เหตุผลสนับสนุนว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องให้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีในซีรัมได้เร็วกว่าการแช่วัคซีน เนื่องจากการฉีดเป็นวิธีการซึ่งทราบถึงปริมาณ และความเข้มข้นของวัคซีนที่ปลาได้รับเข้าสู่ร่างกายแน่นอนกว่าวิธีการแช่ แต่การฉีดไม่ใช่วิธีที่ทำให้ปลาเกิดโรคได้ตามธรรมชาติ การฉีดจะเป็นเพียงการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบทั่วไปและแบบเฉพาะที่ จึงทำให้ร่างกายสัตว์ทดลองมีการสร้างแอนติบอดีได้สูงกว่าวิธีการให้วัคซีนด้วยวิธีอื่น (Dunn et al., 1990) สำหรับในกลุ่มควบคุมที่พบแอนติบอดีได้แต่ไม่ถึงระดับที่ต่ำน่าจะเกิดจากการจับกันของแอนติบอดีกับบางส่วนของแอนติเจนบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียไม่จำเพาะ

การให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดนั้น ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน คือความเข้มข้นของวัคซีนที่ปลาได้รับเข้าสู่ร่างกาย โดย Klesius et al. (2000) กล่าวว่าความเข้มข้นของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ฉีดเข้าช่องท้องส่วนใหญ่มีค่าประมาณ 1×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรัมได้ดี เช่นเดียวกับในปลานิลแดงซึ่งได้รับการฉีดวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 1×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้ปลานิลแดงตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงเท่ากับ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (เสาวลักษณ์ และคณะ, 2546) และ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Shelby et al., 2002) ก็สามารถให้ปลานิลตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีการฉีดวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แก่ปลานิลจิตรลดา 3 ในอัตราส่วน 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม ซึ่งอยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา เมื่อเปรียบเทียบกับงานทดลองอื่นๆ สำหรับอัตราการตายเฉลี่ยที่ต่ำประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์นั้น ในขณะที่การระบาดของโรคในระบบการเลี้ยงมีค่าสูงมากน่าจะเนื่องมาจากอุณหภูมิของน้ำขณะทำการศึกษาซึ่งอยู่ระหว่าง 20–23 องศาเซลเซียส ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อในตัวปลา

การศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงการฉีดวัคซีนที่ผสมแอดจูแวนท์ เนื่องจากในรายงานของนิลบล (2534) กล่าวว่าวัคซีนทั้งแบบผสมและไม่ผสมแอดจูแวนท์ สามารถกระตุ้นให้ปลาถูกภูมิคุ้มกันต้านทานโรคซึ่งเกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* ได้เหมือนกัน และ Ruangpan et al. (1986) รายงานว่าปลานิลเมื่อให้วัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อตายของ *A. hydrophila* ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง ให้ผลไม่แตกต่างกันระหว่างการฉีดแบบผสมแอดจูแวนท์และไม่ผสมแอดจูแวนท์ นอกจากนี้การใช้แอดจูแวนท์อาจทำให้ปลาเกิดการบาดเจ็บ หรือเกิดการตอบสนองอย่างรุนแรงของเนื้อเยื่อบริเวณที่ได้รับ

การฉีด (Ellis, 1988) มีผลทำให้ปริมาณแอนติบอดีที่สร้างขึ้นอาจจะไม่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรค

จากการทดลองในสภาพการเลี้ยงจริงนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ทดสอบเพื่อดูแนวโน้มความเป็นไปได้ในการนำผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการไปใช้ ส่วนใหญ่การใช้วัคซีนในสภาพการเลี้ยงจริงมักให้ผลไม่แน่นอนเนื่องจากผลกระทบจากสภาพแวดล้อมและตัวเกษตรกรผู้ใช้ แต่จากผลการทดลองที่แสดงว่าการให้วัคซีนโดยการฉีดให้ผลดี ดังนั้น การให้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสแก่ปลาไนล์โดยวิธีการฉีดน่าจะมีความเป็นไปได้ในระบบการเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามวิธีการฉีดค่อนข้างจะยุ่งยากและสิ้นเปลืองสำหรับปลาโตที่มีขนาดมากกว่า 200 กรัม ดังนั้นหากเกษตรกรเลือกใช้วิธีนี้ควรทำในปลาที่มีขนาดเล็กคือประมาณ 100 กรัม ซึ่งง่ายต่อการจัดการและประหยัดวัคซีน หรืออาจเลือกใช้วิธีการให้วัคซีนแบบอื่น

เอกสารอ้างอิง

- กมลพร ทองอุไทย. 2539. โรคที่พบในปลาไนล์. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 49 น.
- เกรียงศักดิ์ สายธนู และเกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2523. การป้องกันโรคแผลในปลาตุ๊กตาโดยวิธีการฉีดวัคซีน ผลจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ. วารสารชมรมโรคปลา 3(3): 153-160.
- ศิริ ก่ออนันตกุล. 2542. การเพาะเลี้ยงปลาไนล์แปลงเพศ. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 47 หน้า.
- ศิริ ก่ออนันตกุล และศุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์. 2545. การตรวจเชื้อ *Mycobacterium* ในเนื้อเยื่อปลาโดยวิธี Immunohistochemistry. วารสารประมง 55(3): 133-138.
- นิลุบล กิจอันเจริญ. 2534. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคในปลาตุ๊กตา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 75 หน้า.
- นิลุบล ยูอาสะ. 2544. โรคปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. เอกสารประกอบการสอนวิชา 118 341 โรคปลาและปรสิตสัตว์น้ำ. ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 100 หน้า.
- นิลุบล ยูอาสะ, ชุติมา หาญจวนิช และนงนุช สุวรรณเพ็ง. 2545. การพัฒนาวิธีการในการป้องกันรักษาโรคที่เกิดกับปลาไนล์ที่เลี้ยงในกระชังในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารประกอบการงานวิจัยทุนอุดหนุนประจำปี 2545. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 27 หน้า.
- ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และพันธ์ศักดิ์ ไชยบุตร. 2543. การเลี้ยงปลาไนล์. เอกสารคำแนะนำ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 10 หน้า.
- ยุทธิชัย ยวงทอง และอัจฉริยวรรณ สุวรรณวัฒน์. 2543. การเปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระหว่างปลาไนล์แปลงเพศกับปลาไนล์ปกติ. รายงานการศึกษาประจำวิชาปัญหาพิเศษ (118494). ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 20 หน้า.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 30 หน้า.
- ฝ่ายสถิติและสารสนเทศ. 2545. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย. เอกสารฉบับที่ 10/2545. กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 87 หน้า.
- เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง, ณัฐภูมิ เหล่าพงศ์ไพศาล และ สมเกียรติ เดชะคุณ. 2546. การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรค Streptococcosis ในปลาไนล์. รายงานการศึกษาประจำวิชาปัญหาพิเศษ (118494). ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18 หน้า.

- Al-Harbi, A.H. 1994. First isolation of *Streptococcus* sp. From hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture** 128:195-201.
- Cook, D.W. and Lofton, S.R. 1975. Pathogenicity studies with *Streptococcus* sp. isolated from fishes in an Alabama-Florida fish kill. **Trans. Amer. Fish. Soc.** 104:286-288.
- Dunn, J., Polk, A., Scarlett, J., Olivier, G., Lall, S. and Goosen, F.A. 1990. Vaccine in aquaculture: the search for an efficient delivery system. **Aquaculture** 9:23-32.
- Eldar, A., Bejerano, Y. and Bercovier, H. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Current Microbiol.** 28:139-143.
- Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. and Bercovier, H. 1995. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. **Vaccine** 13:867-870.
- Eldar, A., Horovitz, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 56:175-183.
- Ellis, A.E. 1988. **Fish Vaccination**. New York: Academic Press.
- Kitao, T., Aoki, T. and Sakou, R. 1981. Epizootic caused by β -haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. **Fish Pathol.** 15:301-307.
- Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture** 188:237-246.
- Miyazaki, T., Kubota, S., Kaige, N. and Miyashita, T. 1984. A histopathological study of streptococcal disease in tilapia. **Fish Pathol.** 19:167-172.
- MSTAT Development Team. 1985. **User's guide to MSTAT**. Michigan State University and Agriculture of Norway.
- Ruangpan, L., Kitao, T. and Yoshida, T. 1986. Protective efficiency of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 12: 345-350.
- Sakai, M., Kubota, R. and Atsuta, S. 1987. Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* agent β -haemolytic streptococcal disease. **Nippon Suisan Gakkaishi** 53(8):1373-1376.
- Shelby, R.A., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* L. with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **J. Fish Dis.** 25: 1-6.
- 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). Graduate School, Kasetsart University.
- Yuasa, K., Kitanchaen, N., Kataoka, Y. and Al-Murbaity, F.A. 1999. *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. **J. Aquat. Anim. Health** 11:87-93.

ตารางที่ 1 ค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยของปลานิล ภายหลังได้รับการฉีดวัคซีนครั้งแรกและครั้งที่สอง (n=20)

วิธีการให้วัคซีน	แอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ย * (means $\pm$ S.D.)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ	5.16 $\pm$ 0.44 ^a	151.16 $\pm$ 0.77 ^d
การฉีดเข้าช่องท้อง	7.02 $\pm$ 0.85 ^b	422.15 $\pm$ 1.68 ^c
การฉีด normal saline (กลุ่มควบคุม)	0.25 $\pm$ 0.00 ^c	0.38 $\pm$ 0.01 ^c

หมายเหตุ * การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเป็นการทดสอบทางสถิติโดยใช้ log transformation และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวดิ่งและแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P > 0.05)

ตารางที่ 2 ค่าอัตราการตายเฉลี่ย และค่า Relative Percent Survival (RPS) ของปลานิล ภายหลังได้รับการฉีดวัคซีน 2 ครั้ง (n=20)

วิธีการให้วัคซีน	อัตราการตายเฉลี่ย(%)	ค่า RPS (%)
การฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 %	11.67 $\pm$ 2.52 ^a	-
การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ	3.67 $\pm$ 1.53 ^c	68.55 $\pm$ 7.46 ^a
การฉีดเข้าช่องท้อง	1.00 $\pm$ 1.00 ^b	91.43 $\pm$ 5.51 ^b