

รหัสโครงการ : RDG5120003

ชื่อโครงการ : การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลในพื้นที่

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ชื่อนักวิจัย : พันจิตต์ เต็งเจริญกุล วัชรีย์ คุณกิตติ และรติยา คุณเขตพิทักษ์วงศ์

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

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

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

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

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

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

Project Code : RDG51200013

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

Investigators : Bundit Tengjaroenkul, Watcharee Khunkitti and Thanee Tedsiri

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

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

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

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

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

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

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

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