

บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงมากที่สุดในปัจจุบัน เป็นที่นิยมบริโภคของภายในประเทศและกรมประมงยังมีนโยบายส่งเสริมให้มีการเลี้ยงเพื่อการส่งออก รูปแบบการเลี้ยงมีหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการเลี้ยงในบ่อดิน หรือการเลี้ยงในกระชัง การเลี้ยงเป็นรูปแบบเชิงพาณิชย์ โดยเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงเพื่อเพิ่มกำลังผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดเป็นผลให้สภาพในบ่อหรือแหล่งน้ำที่เลี้ยงเสื่อมโทรม สภาพการเลี้ยงแบบนี้ทำให้ปลาเกิดความเครียดเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรค

ในปัจจุบันผลผลิตปลานิลร้อยละ 70 เป็นการบริโภคภายในประเทศ โดยแยกเป็นการบริโภคสดถึงร้อยละ 81 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีนโยบายส่งเสริมการเลี้ยงปลานิลเพื่อการส่งออกเนื่องจากตลาดต่างประเทศให้การยอมรับปลานิลสายพันธุ์จิตรลดาซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบัน รัฐบาลตั้งเป้าหมายว่าในปี พ.ศ. 2553 จะมีผลผลิตประมาณ 300,000 ตัน และมีเป้าหมายการส่งออกอยู่ที่ 50,000 ตัน เพื่อนำมาแทนที่การเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ที่ประสบปัญหาทั้งภาครัฐและเอกชนให้ความสนใจและร่วมกันกำหนดยุทธศาสตร์เพื่อส่งเสริมการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งออก

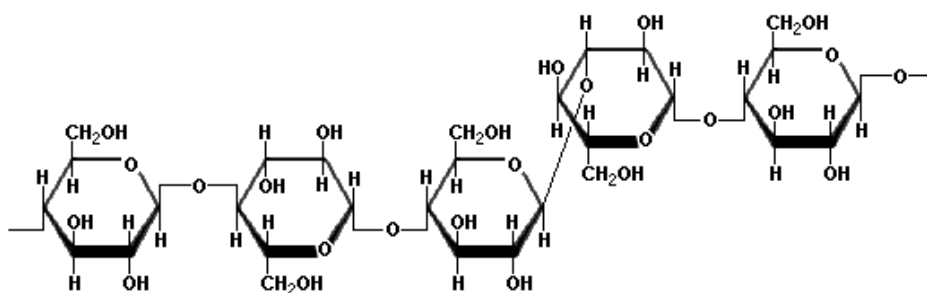
ในภาคตะวันออกเนื่องเหนือการเลี้ยงปลานิลเป็นหนึ่งในอาชีพหลักทางการเกษตรของประชาชน แต่ปริมาณผลผลิตที่ได้ยังน้อยกว่าทางภาคกลางอยู่มาก ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นความแตกต่างทางสภาพภูมิประเทศ การขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเลี้ยง และการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยง โดยภาพรวมแล้วการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยยังประสบปัญหาหลายประการ ทั้งปัญหาคุณภาพของลูกพันธุ์ที่ไม่คงที่ทำให้การเจริญเติบโตช้า ปัญหาเกษตรกรขาดความรู้ที่ถูกต้องตามหลักวิชาการในการเลี้ยง ปัญหาการเกิดโรคระบาดระหว่างการเลี้ยง และปัญหาราคาอาหารสำเร็จรูปที่ส่งผลให้ต้นทุนการเลี้ยงของเกษตรกรสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตปลานิลโดยรวมของประเทศในปี พ.ศ. 2547 กับปริมาณผลผลิตในปี พ.ศ. 2546 พบว่าลดลงถึง 706 ตัน (FAO-FIDI, 2006) ปัญหาหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ การระบาดของโรคที่เกิดระหว่างการเลี้ยง ได้แก่ โรคที่เกิดจากปรสิต เชื้อรา และจากเชื้อแบคทีเรีย (กรมประมง, 2545; เพ็ญพรรณ, 2543) โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของปลานิลและก่อให้เกิดความเสียหายต่อฟาร์มเลี้ยงปลานิลอย่างมาก โดยทั่วไปการแก้ปัญหาระบาดของโรคในปลานิลส่วนใหญ่มักใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย แต่การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลผลิตสัตว์น้ำซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมอีกด้วย (นิลบล, 2545)

ดังนั้น เพื่อเป็นการตอบสนองต่อนโยบายของรัฐบาลที่ส่งเสริมการส่งออกปาลันิล ผลผลิตที่จะส่งออกต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันโรคน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดีกว่าการใช้สารเคมีหรือยาในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งเบต้า-กลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันตัวหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ได้เป็นอย่างดี

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เบต้า-กลูแคน (Beta-glucan)

เบต้า-กลูแคนเป็นสารธรรมชาติที่ได้จากสิ่งมีชีวิตจำพวก เห็ด ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ยีสต์ หรือสมุนไพรบางชนิด เบต้า-กลูแคนเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค จากโมเลกุลของน้ำตาลต่อกันเป็นสาย (polysaccharide) กลูแคนเป็นชื่อเรียกการเรียงตัวของน้ำตาลกลูโคส โดยมีโครงสร้างการเรียงตัว คือ เลข 1,3 เป็นการเรียงตัวของโซ่หลัก ส่วนเลข 1,6 คือ การเรียงตัวของโซ่ข้าง เบต้า-กลูแคนมีชื่อเรียกและโครงสร้างของแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา คือ ชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สกัดได้มา (Robertsen, et al., 1990) โครงสร้างคล้ายเซลลูโลส (cellulose) คือ โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) แบบเบต้า 1-4 และทุก 3 โมเลกุลจะมีพันธะระหว่างออกซิเจนที่ตำแหน่ง C1 กับ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C3 ของอีกกลุ่มหนึ่งดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเบต้า-กลูแคน

ที่มา <http://www.google.co.th/imgres?q=glucan&um>

ในช่วงแรกที่มีการค้นพบเบต้า-กลูแคนนั้นถูกนำมาใช้เป็นยากระตุ้นภูมิคุ้มกัน และได้เริ่มศึกษากันอย่างจริงจังมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะจากทางมหาวิทยาลัยในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการทดลองและวิจัยสารเบต้า-กลูแคนที่มีผลต่อร่างกายและได้พัฒนาเทคโนโลยีการสกัดให้ดีขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีค่อนข้างสูงจนสามารถสกัดเบต้า-กลูแคน ที่บริสุทธิ์

ประโยชน์และการนำไปใช้

เบต้า-กลูแคนมีประโยชน์หลายประการ ซึ่งส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการป้องกันโรค โดยกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์ภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิตจะไม่ทำงานจนกว่าจะตรวจพบสิ่งแปลกปลอม เบต้า-กลูแคนจะไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันเหล่านี้ให้ทำงานอยู่ตลอดเวลา Hunter et al. (2001) กล่าวว่า สัตว์ที่ได้รับเบต้า-กลูแคนจะมีความต้านทานต่อเชื้อโรคหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส หรือโปรโตซัว เบต้า-กลูแคนสามารถต่อต้านโรคมะเร็งและลดอนุมูลอิสระ มีการนำเอาเบต้า-กลูแคนมาใช้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งผิวหนังในต่างประเทศ และพบว่าจำนวนเซลล์มะเร็งลดลงเมื่อได้รับเบต้า-กลูแคน เบต้า-กลูแคนจะกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการทำงานเพื่อต่อต้านการติดเชื้อ และการทำลายเซลล์มะเร็ง เพิ่มการสร้างและกระตุ้นการเจริญของเม็ดเลือดขาวหลายชนิด (Meira et al., 1996 Akramiene et al., 2007) นอกจากนี้ Wood et al. (1994) และ Othman et al. (2011) ยังรายงานว่า เบต้า-กลูแคนที่สกัดจากข้าวโอ๊ตสามารถลดระดับของ Low density lipoprotein (LDL) cholesterol ซึ่งทำให้เสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจได้

โรค Streptococcosis

โรค Streptococcosis เป็นโรคที่เป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญอีกโรคหนึ่ง เนื่องจากทำให้ปลาตายได้มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในระบบปิด (Perera et al., 1997) โรค Streptococcosis เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ในสกุล *Streptococcus* รูปร่างกลม (coccus) หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ถึง 3 ไมโครเมตร ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างแคปซูล ไม่มีเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ต้องการออกซิเจนปริมาณน้อย (microaerophilic organism) และสามารถเจริญในที่ไม่มีออกซิเจน (นิลบล, 2545; Eldar et al., 1997; Yuasa et al., 1999) มักอยู่เป็นคู่หรือสายโซ่ (chain) ซึ่งสายโซ่จะสั้นหรือยาวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าเชื้อสกุล *Streptococcus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะมีสายโซ่สั้นกว่า ส่วนมากสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา (นันทริกา, 2539; เรืองทอง, 2543; Hoshina et al., 1958) แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* ส่วนใหญ่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบเบต้า (β - haemolytic) มีบางที่เป็นแกรมมา (γ - haemolytic), แบบอัลฟา (α - haemolytic) หรือ non- haemolytic (นิลบล,

2544; นิลบล และคณะ, 2549) เชื้อที่มักก่อให้เกิดโรคในปลาส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Lancefield's group B และ D เช่น *S. iniae*, *S. faecium* และ *S. faecalis* เป็นต้น (Nakatsugawa, 1983; Inglis et al., 1993; Eldar et al., 1997; Yuasa et al., 1999)

อาการของโรค Streptococcosis ที่ปรากฏในปลาแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา และอุณหภูมิ บางชนิดอาจทำให้เกิดการติดเชื้อแบบกึ่งเฉียบพลัน และไม่ปรากฏอาการภายนอก (Miyazaki et al., 1984; Al- Harbi, 1994; Yuasa et al., 1999) แต่ลักษณะร่วมที่พบในปลาทุกชนิดคือ ปลาว่ายน้ำช้าลงมักลอยตัวนิ่งๆ สีตัวเข้ม ตาโปน ตกเลือดรอบตา ลูกตาขุ่นขาว ตกเลือดบนแผ่นปิดเหงือก ฐานครีบทวารหนัก และผิวหนัง ปลาที่ใกล้ตายจะว่ายน้ำไม่มีทิศทางที่บริเวณผิวน้ำ (นิลบล, 2544; Nakatsugawa, 1983; Inglis et al., 1993) ปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* จะแสดงลักษณะภายในคือ ในระยะแรกจะมีการตกเลือดหรืออาการเลือดคั่งในบริเวณเรตินาของตา เส้นเลือดแดงบริเวณเหงือก ลำไส้ และมี macrophages แทรกในบริเวณเหงือกเป็นจำนวนมาก กลุ่มเซลล์และเนื้อเยื่อเหงือกตาย มีการหลุดลอกของเยื่อชั้นกลาง (mucosa) อวัยวะที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดได้แก่ บริเวณม้ามซึ่งจะมีลักษณะม้ามโต มีสีแดงใส และบริเวณตับซึ่งจะพบกลุ่มเซลล์และเนื้อเยื่อตายเป็นหย่อมๆ รองลงมาคือ หัวใจ และไตโดยเชื้อหุ้มหัวใจและเยื่อช่องท้องเกิดการอักเสบ ภายในมีของเหลวข้นซึ่งเป็นเศษเซลล์ที่ตายแล้วหลุดลอกออก รอบๆ ช่องทวารหนักมีการอักเสบและบวมแดง (นิลบล, 2544; Kusuda et al., 1978; Miyazaki, 1982; Inglis et al., 1993; El-Sayed, 2006) ปลาที่ป่วยในช่วงที่อุณหภูมิของน้ำสูงส่วนใหญ่จะมีการตาโปน ตกเลือดรอบตา ลูกตาขุ่นขาว และมีอาการตกเลือดที่ผนังด้านในของแผ่นปิดเหงือก (Sano and Fukuda, 1987)

โรค Streptococcosis มีรายงานการระบาดจากทั่วโลก พบได้ทั่วไปทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเลมียารายงานการระบาดทั้งประเทศอิสราเอล ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา การระบาดพบมากในช่วงฤดูร้อน (นิลบล, 2544; Eldar et al., 1994) เชื้อในสกุล *Streptococcus* ก่อให้เกิดโรคในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด Eldar et al. (1994) รายงานว่าพบในปลานิลและปลา trout ที่ประเทศอิสราเอลมีอาการป่วยซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. shiloi* และ *S. difficile* โดยจะแสดงลักษณะอาการที่ระบบประสาทส่วนกลางร่วมกับอาการที่พบโดยทั่วไป สำหรับปลา trout จะมีการติดเชื้อตามกระแสเลือด นอกจากนี้ส่วนของสมอง เยื่อสมองและไขสันหลังของปลามักมีอาการอักเสบร่วมด้วย ปลาที่มียารายงานในปลา yellow tail ปลาซีกเดียวในญี่ปุ่น (Kusuda et al., 1978; Iida et al., 19986) และปลาสลิดหิน (*Siganus canaliculus*) ที่เลี้ยงในประเทศไต้หวันและประเทศในกลุ่มอาหรับ (Yuasa et al., 1999) และยังมีรายงานการระบาดของโรคนี้อย่างต่อเนื่องในประเทศต่างๆ ทั่วโลก อาทิเช่นประเทศนอร์เวย์ อังกฤษ ตอนเหนือของประเทศสเปน อิสราเอล ซาอุดีอาระเบีย บาห์เรน ฟังทะเลเมดิเตอร์เรเนียนของประเทศฝรั่งเศส ฟิลิปปินส์ รวมทั้งประเทศไทย (ประเสริฐ, 2545; Kusuda et al., 1978; Pappalardo and Boemare, 1982; Al-Harbi, 1994; Eldar et al., 1994; Domenech et al., 1996; Yuasa et al., 1999) ในประเทศไทย นเรศ และคณะ(2548) ได้พบปลานิลที่

เลี้ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีอาการป่วยคล้ายกับอาการของโรค Streptococcosis จึงทำการศึกษหาสาเหตุของโรคโดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยพบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคคือเชื้อ *S. agalactiae* จากรายงานของ นิอุบลและคณะ (2549) ที่พบการระบาดของโรค Streptococcosis ในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าเกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่งเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบเบต้า สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากที่สุดคือ KKU 44002 โดยทำให้เกิดการตายสะสม 75 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลา 14 วัน

วัคซีน

วัคซีน (vaccine) หมายถึง สารที่เมื่อเข้าสู่ร่างกาย จะมีผลกระตุ้นและชักนำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรคที่จำเพาะต่อสารนั้น โดยวัคซีนอาจเตรียมได้จากเชื้อจุลชีพหรือส่วนประกอบของเชื้อที่ได้รับการดัดแปลง หรือเป็นสารสังเคราะห์ ที่เมื่อนำเข้าสู่ร่างกายสัตว์ทดลองด้วยวิธีฉีด หรือการกินไม่ทำให้สัตว์ทดลองนั้นเกิดโรค แต่จะกระตุ้นให้สัตว์ทดลองมีภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันอาการจากโรคนั้นๆ (รัชนิ และอนุทิน, 2532) สำหรับการให้วัคซีนในสัตว์น้ำเริ่มมีการทดลองใช้นานกว่า 50 ปี และการได้รับการพัฒนาให้ดีขึ้นเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน (สิทธิ, 2527)

วัคซีนที่ใช้ในสัตว์น้ำโดยทั่วไปสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (ชนกันต์, 2544) ดังนี้

1. วัคซีนเชื้อตาย (Killed หรือ inactivated vaccine) เป็นวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อที่มีความรุนแรง และถูกทำให้ตายด้วยวิธีทางฟิสิกส์โดยการใช้ความร้อนหรือกระบวนการทางเคมี เช่น การใช้ฟอร์มัลลิน อะซีไธน ethylene imine (EI) แต่ยังสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ (โสมทต, 2538) วัคซีนเชื้อตายสามารถแบ่งย่อยได้หลายชนิด ได้แก่ วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (broth bacterin) และ adjuvant vaccine (รัชนิและอนุทิน, 2532) การผลิตวัคซีนจากเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะผสมสารที่มีผลในการฆ่าเชื้อ (inactivating agents) ก่อนผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปโดยไม่มีส่วนผสมของสารอื่น สำหรับ adjuvant vaccine นั้นเป็นวัคซีนที่ผสมสารแอดจูแวนท์ (adjuvant) บางอย่างนอกจากสารที่มีผลในการฆ่าเชื้อลงไปด้วย เช่น aluminum hydroxide gel, yeasts, β - glucan, oil- base adjuvant หรือสารสังเคราะห์ตัวอื่นลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนให้มีความต้านทานโรคสูงขึ้น (รัชนิและอนุทิน, 2532; Matsuyama et al., 1992; Pascho et al., 1997) เนื่องจากแอดจูแวนท์มีผลทำให้การกระจายตัวของวัคซีนเป็นไปอย่างช้าๆ ทำให้สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเป็นเวลานาน และลดโอกาสในการเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงหลังการฉีดวัคซีน (ชนกันต์, 2544)

วัคซีนเชื้อเป็น (Live attenuated vaccine) เป็นวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อที่ลดความรุนแรงของเชื้อลง เมื่อนำเข้าสู่ร่างกายสัตว์ทดลองไม่ทำให้เกิดโรคแต่สามารถเพิ่มจำนวน เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งวิธีการลดความรุนแรงสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ การใช้ความร้อนหรือสารเคมีทำลายเชื้อแต่ไม่ถึงตาย ซึ่งเชื้อจะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปจากเดิม แต่วิธีนี้เสี่ยงใน

การเกิดโรคขึ้นมาอีก อีกวิธีคือการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม หรือการผ่านเชื้อนั้นเข้าไปในเซลล์ของผู้ถูกอาศัย (Host) ที่ไม่ใช่ผู้อาศัยปกติ (โฮสต์, 2538) เช่น การแยกเชื้อไวรัสจากปลาที่ป่วยมาเลี้ยงในเซลล์สัตว์ทดลองภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการเป็นเวลานานๆ จนเชื้อนั้นลดความรุนแรงลง จากนั้นนำไปฉีดให้กับสัตว์ทดลองเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น วัคซีนป้องกันโรค Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) ในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) วัคซีนนี้ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในระบบของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์ (รัชนิ และอนุทิน, 2532; ชนกันต์, 2544)

วัคซีนที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นวัคซีนที่ได้จากการดัดแปลงสายพันธุ์ของเชื้อก่อนนำเข้าสู่กระบวนการ การผลิตวัคซีนสำเร็จรูป ซึ่งอาจมีหรือไม่มีส่วนประกอบของสารอื่นร่วมด้วย (ชนกันต์, 2544) Vaughan et al. (1993) ได้ทำการตัดยีน Aro A ออกจากเชื้อ *A. salmonicida* แล้วฉีดให้กับปลา salmon พบว่าสามารถลดอัตราการตายของปลาเนื่องจากการติดเชื้อ *A. salmonicida* ที่เป็นเชื้อก่อโรค furunculosis ภายใต้สภาวะในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ Lawence et al. (1997) ได้ทำการทดลองทำให้เชื้อ *Edwardsiella ictaluri* ลดความรุนแรงโดยทำการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์กรรมที่ตำแหน่ง pur-A พบว่าวัคซีนสามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ นอกจากนี้ สุกัลค์และคณะ (2547) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีของปลาอุกอุกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้หนึ่งชนิด คือ B6 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น IgG เมื่อทำการทดสอบการกรสร้างแอนติบอดีของปลาอุกหลังจากได้รับวัคซีนพบว่าการสร้างแอนติบอดีสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 และแอนติบอดีที่ได้รับมีความคุ้มโรคต่อเชื้อ *A. hydrophila* สายพันธุ์ที่ผลิตวัคซีน

สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการใช้วัคซีนนั้น พบว่าเมื่อมีแอนติเจนชนิดเดียวกันมากระตุ้นซ้ำ (booster) การตอบสนองจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและรุนแรงกว่าการตอบสนองครั้งแรก (สิทธิพันธ์ และคณะ, 2537) การเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยการให้วัคซีน มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความทรงจำในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อที่จำเพาะเจาะจง สำหรับแนวโน้มการใช้วัคซีนในอนาคตนั้นสิ่งที่ต้องพิจารณาถึง คือ วิธีการเตรียมวัคซีนให้มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรค และวิธีการให้แก่สัตว์น้ำ ในแง่ของ mass immunization เพื่อที่จะใช้ในฟาร์มเลี้ยงปลาที่มีขนาดใหญ่ (สิทธิ, 2527) ปัจจุบันมีการผลิตวัคซีนมาใช้ในสัตว์น้ำเป็นการค้าได้แก่ วัคซีนป้องกันโรค vibriosis ซึ่งเตรียมได้จากเชื้อ *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii* ใช้ในปลาน้ำกร่อยและปลาทะเล และเตรียมจากเชื้อ *Vibrio* spp. ใช้ในกุ้ง Penaeids บางชนิด วัคซีนป้องกันโรค enteric redmouth ซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Yersinia ruckeri* ใช้ในปลา trout วัคซีนป้องกันโรค furunculosis เตรียมจากเชื้อ *A. salmonicida* ใช้ในปลา trout และ ปลา salmon และวัคซีนป้องกันโรค enteric septicemia ซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Edwardsella ictaluri* ใช้ในปลา channel catfish สำหรับวัคซีนที่ใช้ในสัตว์น้ำของประเทศแถบเอเชีย คือ วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ

Vibrio spp. ใช้ในกุ้ง *V. anguillarum* และ *Y. ruckeri* ใช้ในปลา สำหรับวัคซีนชนิดอื่นกำลังอยู่ระหว่างการศึกษา (Plumb, 1995)

วิธีการให้วัคซีนในสัตว์น้ำมีด้วยกัน 3 วิธี คือ การฉีด การแช่ และการผสมอาหาร ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป

1. การให้วัคซีนโดยการฉีด (injection vaccination) จะใช้วัคซีนที่ไม่มีภูมิคุ้มกันหรือไม่สามารถทำให้ปลาเกิดโรคได้ (Cossarini-Dunier, 1985) การฉีดอาจฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection, IM) (Gutierrez and Miyazaki, 1994) หรือฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection, IP) การให้วัคซีนโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเนื่องจากการให้วัคซีนที่แน่นอน ข้อเสียของวิธีนี้คือ ไม่สามารถใช้กับปลาขนาดเล็ก อีกทั้งทำให้ปลาเครียด บอบช้ำ เสียเวลา และสิ้นเปลืองแรงงาน (Dunn et al., 1990; Nakanishi et al., 2002; ชนกันต์, 2544) สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการให้วัคซีนโดยการฉีดในสัตว์น้ำพบว่าให้ผลดี (นิลบล, 2534; บุญกว้างและนันทวิทย์, 2536) ได้ศึกษาความต้านทานโรคและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *A. hydrophila* ของปลาดุกบิ๊กอุย (*C. gariepinus* x *C. macrocephalus*) พบว่าปลาที่ได้รับการฉีดวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องครั้งแรกในสัปดาห์ที่หนึ่งมีค่าแอนติบอดีไทเตอร์เท่ากับ 78.93 และครั้งที่สองในสัปดาห์ที่สี่เท่ากับ 614.40 เมื่อทดสอบความต้านทานโรคหลังจากการฉีดวัคซีนพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดสูงถึง 97.78 เปอร์เซ็นต์ Eldar et al. (1995) ได้ทดลองฉีดวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ซึ่งฆ่าด้วยฟอร์มาลินในปลา rainbow trout ด้วยการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าสามารถป้องกันโรคได้ดีมีอัตราการติดเชื้อเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ Klesius et al. (2000) ได้รายงานผลศึกษาการเตรียมวัคซีนเชื้อตายจากเชื้อสายพันธุ์เดียวกับ *S. iniae* (homologous) และจากต่างสายพันธุ์ (heterologous) ใช้ฟอร์มาลินเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความต้านทานโรค Streptococcosis 50 เปอร์เซ็นต์ และสามารถป้องกันการติดเชื้อ *Streptococcus* ข้ามสายพันธุ์ได้ด้วย ต่อมานิลบล และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ KKU 44002 ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน ในการป้องกัน Streptococcosis ในปลานิล โดยการฉีดเข้าช่องท้อง และการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ พบว่าปลาที่ได้รับการฉีดวัคซีนมีอัตราการรอดเฉลี่ยสูงกว่าปลาในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน

2. การให้วัคซีนโดยการแช่ (immersion vaccination) เป็นการทำให้สารละลายวัคซีนดูดซึมผ่านทางผิวหนังหรือทางเหงือก เป็นวิธีที่เหมาะสมกับปลาจำนวนมาก นิยมใช้กับปลาขนาดเล็ก การให้วัคซีน จากการศึกษาพบว่าปลาที่แช่ในสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ซึ่ง BSA ส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมเข้าทางเส้นข้างลำตัว (lateral line) และบางส่วนจะซึมเข้าทางเหงือก ซึ่งการให้วัคซีนโดยวิธีนี้สะดวก ทำให้ปลาเกิดความเครียดน้อย ใช้แรงงานน้อยกว่าการให้โดยการฉีด (Dunn et al., 1990) และยังพบว่าสามารถช่วยให้เซลล์ epidermis ที่ผิวหนังของปลา มี

ความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้น (Hayakawa et al., 1988) การให้วัคซีนโดยการแช่สามารถทำได้ 2 วิธีคือ การแช่โดยตรง (direct immersion) และการแช่แบบ hyperosmotic immersion ซึ่งจะทำให้ปลาในน้ำเกลือในระยะเวลาสั้นๆ ก่อนที่จะนำปลามาแชในสารละลายแอนติเจน วิธีนี้จะช่วยให้แอนติเจนสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายและมากขึ้น (Ward, 1982) นิคุบิล (2534) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *A. hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินเพื่อตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในปลาคูอุย (*Clarias macrocephalus*, Gunther) โดยวิธีการแช่โดยตรง และแช่แบบ hyperosmotic immersion พบว่าการแช่แบบ hyperosmotic immersion ให้ผลในการสร้างแอนติบอดีและความต้านทานโรคสูงกว่าการแช่โดยตรง Iida et al. (1982) ได้ศึกษาการให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. iniae* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินเพื่อควบคุมโรค Streptococcosis ในปลา yellowtail (*S. quinquedactylus*) ด้วยวิธีการผสมอาหาร เปรียบเทียบกับการให้ด้วยวิธีการฉีดและการแช่แบบ hyperosmotic infiltration พบว่าการให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดและการแช่ให้ผลในการต้านทานโรคดีกว่าวิธีการผสมอาหาร จากรายงานของ Clark et al. (2003) กล่าวว่าปลานิลที่เลี้ยงในกระชังและในบ่อดินของประเทศฟิลิปปินส์เมื่อถูกปลาได้รับวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *S. iniae* โดยวิธีการแช่ และผสมอาหาร พบว่ามีอัตราการตายต่ำเพียงร้อยละ 10-15 เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน

3. การให้วัคซีนผสมอาหารในสัตว์น้ำ (oral vaccination) เป็นวิธีที่สะดวกที่สุด สามารถใช้ได้กับจำนวนมาก ทุกขนาด และปลาไม่เกิดความเครียด อีกทั้งไม่เสียเวลาและแรงงาน แต่การให้วัคซีนในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันน้อยกว่าการฉีดและการแช่ และต้องใช้วัคซีนเป็นจำนวนมากเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาให้ทำงานเนื่องจากแอนติเจนบางส่วนจะถูกทำลายในระหว่างขบวนการย่อยในระบบทางเดินอาหารของปลา (Johnson and Amend, 1983; Lillhaug, 1989; Bogwald et al., 1994) ชีราภรณ์ และคณะ (2548) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิลซึ่งเตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ KKU 44002 ปลาที่ได้รับวัคซีนผสมอาหารมีแอนติบอดีไทเตอร์สูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน เมื่อทดสอบความต้านทานโรค พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนโดยการผสมอาหารเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ขึ้นไปและอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน สอดคล้องกับการศึกษาของกรองแก้ว (2541) ซึ่งทำการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนของเชื้อ *A. hydrophila* โดยการแช่และผสมอาหารในปลาคูอุยผสม ซึ่งพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือนมีผลทำให้ปลามีความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม Joosten et al. (1995) ได้ศึกษาการให้วัคซีนโดยการผสมอาหารกับลูกปลาใน (*Cyprinus carpio*) พบว่าสิ่งสำคัญคือการป้องกันแอนติเจนถูกทำลายจากกรดในกระเพาะอาหาร และขบวนการย่อยโปรตีนของลำไส้ส่วนหน้า อย่างไรก็ตามการให้วัคซีนโดยวิธีจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในส่วนของชั้น mucosal ให้สูงขึ้นและพบว่าแอนติเจนจะถูกนำเข้าไปในเซลล์โดย

ขบวนการจับกิน (Rombout et al., 1985; Rombout and Berg, 1989; Joosten et al., 1996) การให้วัคซีนผสมอาหารนั้นปัจจุบันมีการปรับปรุงโดยพัฒนารูปแบบของอาหารที่ใช้เพื่อป้องกันการย่อยสลายแอนติเจนจากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของปลา เช่น encapsulation, microcapsule, microbead และ chitosan microcapsule (Dunn et al., 1990)

วิธีการวิจัย

1. ปลาทดลอง

ในการทดลองใช้ปลานิลสายพันธุ์จิตรดา 3 ที่ได้รับการแปลงเพศด้วยฮอร์โมน 17 α -methyl-testosterone จากวิบูลย์ฟาร์ม จ. กาฬสินธุ์ ปลาที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นปลารุ่นเดียวกัน ปลาที่ใช้ในการศึกษาจะนำมาปรับให้เข้ากับสภาพการทดลองในบ่อทดลองขนาด 1.5 x 2.0 x 0.6 เมตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง ระบบน้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นระบบไหลผ่านตลอด (flow-through system) ซึ่งนำหนักก่อนทดลอง โดยปลานิลที่ใช้ทำการทดลองผลของเบต้า-กลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 55.20 ± 4.30 กรัม สำหรับการศึกษาการใช้เบต้า-กลูแคนร่วมกับวัคซีนใช้ปลานิลน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 127.30 ± 5.10 กรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองชั่งน้ำหนักปลานิลเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, SGR) ของปลานิลตามวิธีการของ Ricker (1979)

$$SGR = \frac{\ln(\text{น้ำหนักสุดท้าย}) - \ln(\text{น้ำหนักเริ่มต้น})}{\text{ระยะเวลาทดลอง}} \times 100$$

2. การเตรียมเบต้า-กลูแคน

เบต้า-กลูแคนที่ใช้ได้มาจากยีสเซลล์ซีสด์ (*Saccharomyces cerevisiae*) นำมาผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปชนิดลอยน้ำ ไฮเกรด เบอร์ 9951 บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูปที่มีระดับโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ในอัตรา 100.0, 200.0 และ 300.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม และเคลือบด้วยสารเหนียวจากนั้นนำมาผสมกับ โดยทำการผสมเบต้า-กลูแคนกับอาหารปลาก่อนให้อาหาร 1 ชั่วโมง

3. การทดสอบผลของเบต้า-กลูแคนต่อค่า Haematocrit index, ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์จับกิน (phagocytic cells)

การศึกษาแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 ตัว โดยให้เบต้า-กลูแคนในอัตรา 100.0, 200.0 และ 300.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม

ซึ่งได้รับอาหารปกติ เลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการแยกเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตับปลา เพื่อนำมาทดสอบหาค่า haematocrit index (HI) ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว % phagocyte และ phagocytic index (PI) โดยวัดจากการจับกิน Zymosan A (Sigma, Germany) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Secombes (1990)

4. การหาค่า Haematocrit index (HI)

การหาค่า haematocrit index ของปลาโดยเก็บตัวอย่างเลือดปลาในสัปดาห์ที่ 12 จากบริเวณเส้นเลือดด้านท้ายของลำตัว (caudal fin) โดยเก็บ 1 มิลลิลิตร ต่อตัว โดยใช้ EDTA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด นำเลือดมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Haematocrit 24 (Hettich centrifugen, Germany) ด้วยความเร็ว 12,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อหาค่า haematocrit index โดยอ่านค่าจากสเกลในเครื่อง

5. การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตับของปลานิล จากตับโดยนำชิ้นส่วนตับไปแช่ใน Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 6.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดเนื้อเยื่อของตับผ่าน nylon mesh ขนาดตา 100 ไมโครเมตร แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับให้มีปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil, monocyte และ macrophage โดยใช้ hemacytometer (Neubauer Improved Birth-Line HBG, Germany) ส่วนที่เหลือเก็บไว้สำหรับหาค่า phagocytic index

6. การหา % phagocyte และค่า Phagocytic index (PI)

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมได้จากข้อ 5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติม Zymosan A เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไป smear บนสไลด์ ตัวอย่างปลา 1 ตัวอย่าง จะทำ 3 ซ้ำ รอให้แห้งนำไปย้อมด้วย Wright's Giemsa stain จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว และจำนวนเซลล์จับกิน เพื่อหา % phagocyte ตามวิธีของ Scott and Klesius (1981) ดังนี้

$$\% \text{ Phagocyte} = \frac{\text{จำนวน Phagocytes}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด (200 เซลล์)}} \times 100$$

สำหรับการหาค่า Phagocytic index จะนับจำนวน Zymosan A ในเซลล์จับกินแต่ละเซลล์ จากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว 40 เซลล์ (Scott and Klesius, 1981)

$$\text{Phagocytic index (PI)} = \frac{\text{จำนวนของ Zymosan A ที่ถูกจับกินใน phagocytes}}{\text{จำนวน phagocytes ที่จับกิน (40 เซลล์)}}$$

7. การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

วัคซีนเตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ KKU 02057 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนใน Brain Heart Infusion Broth (BHIB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาล้างใน normal saline 3 ครั้ง นำไปทำให้หมดฤทธิ์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทดสอบการเจริญของเชื้อโดยนำมาเลี้ยงบน BHIA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

สำหรับการเตรียมแอนติเจนนั้นมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีน โดยใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (นิลุปล, 2534)

8. การให้อาหารผสมเบต้า-กลูแคนร่วมกับการให้วัคซีน

ในการทดลองแบ่งปลานิลเป็น 4 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 3 ซ้ำ โดยมีจำนวนปลา 100 ตัวต่อซ้ำ เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด $1.5 \times 2.0 \times 0.6$ เมตร กลุ่มทดลองที่ 1 คือ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ กลุ่มทดลองที่ 2 ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนในอัตรา 200.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม ร่วมกับการให้วัคซีน กลุ่มทดลองที่ 3 ได้รับวัคซีนเพียงอย่างเดียว และกลุ่มทดลองที่ 4 ให้เฉพาะอาหารผสมเบต้า-กลูแคนผสมอาหารเพียงอย่างเดียวโดยใช้เบต้า-กลูแคนในอัตรา 200.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

การให้วัคซีนให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องแต่ละ 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม สำหรับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนฉีดด้วย normal saline เข้าช่องท้องปลาในอัตราส่วน 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม ให้วัคซีนครั้งแรกหลังให้เบต้า-กลูแคนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เจาะเลือดปลาทั้งหมดเพื่อตรวจวัดค่าแอนติบอดีไคเตอร์หลังฉีดวัคซีน 2 สัปดาห์ ให้วัคซีนครั้งที่ 2 หลังจากได้รับวัคซีนครั้งแรกเป็นเวลา 3 สัปดาห์

9. การหาค่าแอนติบอดีไคเตอร์

การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไคเตอร์โดยวิธี Indirect agglutination โดยเจือจางซีรัมแบบ Two-fold dilution ใน normal saline ให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมแอนติเจนที่เตรียมไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ครบทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับ negative control (นิลุปล, 2534)

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลค่า haematocrit index ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว, % phagocyte, ค่า phagocytic index และค่าแอนติบอดีไทเตอร์ มาวิเคราะห์โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.12 (Schotzhauer and Littell, 1997)

ผลการวิจัย

ผลของเบต้า-กลูแคนต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลานิล

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่ได้รับเบต้า-กลูแคนผสมอาหารในอัตราแตกต่าง คือ 100.0, 200.0 และ 300.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอัตราต่างๆ ไม่แตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 0.79 ± 0.32 กรัมต่อวัน ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนที่อัตราต่างกัน (n=250)

เบต้า-กลูแคน (มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย กรัม/วัน (Means $\pm$ S.D.)
กลุ่มควบคุม	0.79 ± 0.32^a
100.0	0.80 ± 0.15^a
200.0	0.81 ± 0.29^a
300.0	0.81 ± 0.11^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ผลของเบต้า-กลูแคนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิล

1. ผลของเบต้า-กลูแคนต่อค่า Haematocrit index (HI) ของปลานิล

การศึกษาผลของไคโตซานในอัตราแตกต่างกันต่อค่า Haematocrit index (HI) ของปลานิล พบว่าค่า HI ของปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราการให้ที่เพิ่มขึ้นเบต้า-กลูแคนโดยปลานิลกลุ่มที่ได้รับไคโตซานในอัตรา 200.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า haematocrit index สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับปลานิลกลุ่มอื่นที่ได้รับเบต้า-กลูแคนและกลุ่มควบคุม ($P>0.05$)

ตารางที่ 2 ค่า HI ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนในอัตราต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เบต้า-กลูแคน (มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม)	ค่า Hematocrit Index (% , Means $\pm$ SD)
กลุ่มควบคุม	48.54 $\pm$ 3.47 ^a
100.0	47.90 $\pm$ 2.89 ^a
200.0	49.46 $\pm$ 4.26 ^a
300.0	48.34 $\pm$ 3.70 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวนอนนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

2. ผลของเบต้า-กลูแคนต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลานิล

การศึกษาผลของเบต้า-กลูแคนในอัตราที่ต่างกันต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลานิล จากการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลานิลทุกกลุ่มทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราการให้ที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-กลูแคน โดยปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม ของปลานิลกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน ในอัตรา 300.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงที่สุดแตกต่างกับกลุ่มที่มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวรองลงมา คือกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอัตรา 100.0 และ 200.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนที่อัตราต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เบต้า-กลูแคน (มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม)	Leukocytes no./ตับ 100 กรัม (Means $\pm$ SD)
กลุ่มควบคุม	458.98 $\pm$ 3.48 ^d
100.0	743.80 $\pm$ 3.92 ^c
200.0	861.13 $\pm$ 3.80 ^b
300.0	985.63 $\pm$ 3.48 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

3. ผลของเบต้า-กลูแคนต่อ % phagocyte ของปลานิล

การศึกษาผลของเบต้า-กลูแคนในอัตราต่างกันต่อ % phagocyte ของปลานิล ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอัตรา 200.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม % phagocyte สูงที่สุดแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอัตรา 100.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอัตรา 300.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและ % phagocyte ของปลานิลทุกกลุ่มทดลองสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 % phagocyte ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนที่อัตราต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เบต้า-กลูแคน (มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม)	% Phagocyte (Means $\pm$ SD)
กลุ่มควบคุม	19.28 $\pm$ 1.07 ^c
100.0	30.13 $\pm$ 1.20 ^b
200.0	36.15 $\pm$ 1.28 ^a
300.0	35.67 $\pm$ 1.04 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

4. ผลของเบต้า-กลูแคนต่อค่า Phagocytic index (PI) ของปลานิล

จากการศึกษาผลของเบต้า-กลูแคนในอัตราที่แตกต่างกันต่อค่า PI (ตารางที่ 5) พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนในอัตรา 200.0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า PI สูงที่สุด

แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนในอัตรา 100.0 และ 300.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 5 ค่า PI ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนที่อัตราต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เบต้า-กลูแคน (มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม)	Phagocytic Index (Means $\pm$ SD)
กลุ่มควบคุม	3.48 $\pm$ 0.05 ^d
100.0	3.73 $\pm$ 0.04 ^b
200.0	5.03 $\pm$ 0.04 ^b
300.0	4.36 $\pm$ 0.05 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ผลของการใช้เบต้า-กลูแคนร่วมกับวัคซีนต่อการสร้างแอนติบอดีของปลานิล

จากตารางที่ 6 เมื่อตรวจวัดค่าแอนติบอดีไคเตอร์หลังจากที่ฉีดวัคซีนครั้งที่ 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนร่วมกับการให้วัคซีนมีค่าแอนติบอดีไคเตอร์เฉลี่ยสูงสุด แตกต่างทางสถิติกับทุกกลุ่มทดลอง ($P < 0.05$) ค่าแอนติบอดีไคเตอร์เฉลี่ยของกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารผสมเบต้า-กลูแคนสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ในการวัดหาค่าแอนติบอดีไคเตอร์เฉลี่ยครั้งที่ 2 กลุ่มทดลองเสียหายเนื่องจากปัญหาระบบน้ำขัดข้องในระหว่างการทดลองทำให้ไม่สามารถหาค่าแอนติบอดีไคเตอร์เฉลี่ยได้

ตารางที่ 6 ค่าแอนติบอดีไคเตอร์เฉลี่ยของปลานิลแต่ละกลุ่มทดลองภายหลังการได้รับเบต้า-กลูแคนร่วมกับการได้รับวัคซีนครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 (n=50)

กลุ่มทดลอง	Antibody titer (Means $\pm$ S.D.)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
กลุ่มควบคุม	2.26 $\pm$ 0.12 ^d	ND*
เบต้า-กลูแคน	8.21 $\pm$ 1.75 ^c	ND
วัคซีน	24.13 $\pm$ 1.56 ^b	ND
เบต้า-กลูแคน + วัคซีน	44.16 $\pm$ 3.90 ^a	ND

หมายเหตุ การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยเป็นการทดสอบทางสถิติโดยใช้ค่า log transformation และตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

* ND ไม่สามารถตรวจหาค่าได้

สรุปและอภิปรายผล

จากผลการศึกษาพบว่าเบต้า-กลูแคนไม่มีผลต่อการอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและค่า HI ของปลานิล ถึงแม้ปลานิลที่ได้รับเบต้า-กลูแคนผสมอาหารในอัตรา 200.0 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการเจริญเติบโตและค่า HI สูงที่สุดในกลุ่มทดลอง ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Whittington et al. (2005) ที่ได้ทำการศึกษาในปลานิลพบว่าปลานิลที่ให้อาหารผสมเบต้า-กลูแคนในอัตรา 200 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักลดลงกว่าปลานิลที่ได้รับเบต้า-กลูแคนผสมอาหารในอัตรา 50 และ 100 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในทางสถิติ Lim (1989) รายงานว่าถึงแม้ปลานิลจะไม่สามารถย่อยอาหารที่มีเส้นใยสูงได้ดี แต่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบซับซ้อนเป็นแหล่งพลังงานได้ ดังนั้นระดับของเบต้า-กลูแคนที่ใช้จึงไม่น่าจะมีผลต่อการย่อยและการดูดซึมอาหารของปลานิล

ผลของการให้เบต้า-กลูแคนผสมอาหารในอัตราต่างๆ ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะนั้น พบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว % phagocyte และค่า PI ของปลานิลพบว่าการให้เบต้า-กลูแคนผสมอาหารมีแนวโน้มทำให้ค่าดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น โดยปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนในอัตรา 200.0 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้ผลสูงที่สุด ซึ่ง Duncan and Klesius (1996) รายงานว่าเบต้า-กลูแคนช่วยกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจและการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลเพื่อไปจับกินสิ่งแปลกปลอมในปลา channel catfish นอกจากนั้น เบต้า-กลูแคนยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไลโซไซม์ในปลา rainbow trout (Engstad et al., 1992) แต่จากผลการศึกษาพบว่าปลานิลที่ได้รับเบต้า-กลูแคนสูงกว่า 200.0 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มทำให้ค่า % phagocyte และค่า PI ของปลานิลลดลง ซึ่ง Anderson (1992) และ Couso et al. (2003) รายงานว่าการได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับสูงเป็นเวลานานจะมีผลในเชิงลบต่อความต้านทานโรคในปลาได้

จากผลการศึกษาพบว่าเบต้า-กลูแคนมีผลต่อการสร้างแอนติบอดีในเชิงบวก โดยกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคนร่วมกับการให้วัคซีนมีค่าเฉลี่ยแอนติบอดีไทเตอร์สูงสุด รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับวัคซีน กลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้า-กลูแคน และกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ

ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chen and Ainsworth (1992) ซึ่งทำการศึกษาในปลา channel catfish พบว่าเบต้า-กลูแคนช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดี

อย่างไรก็ตาม การนำเบต้า-กลูแคนมาใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเบต้า-กลูแคนมีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำสูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งในกรณีนี้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์น้ำอาจต้องคำนึงถึงมูลค่าของสัตว์น้ำเพื่อให้คุ้มต่อการลงทุนด้วยเช่นกัน

บรรณานุกรม

- กรองแก้ว พลายมาศ. 2541. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยการแช่และการผสมอาหารในปลาดุกอุกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนกันต์ จิตมนัส. 2544. ความรู้เกี่ยวกับวัคซีนเพื่อป้องกันโรคปลา. วารสารการประมง 54(6): 515-520.
- ชนกันต์ จิตมนัส. 2545. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา. วารสารสงขลานครินทร์ 24(4): 739-747.
- ธีรารณ มอโธสง, นิลุบล กิจอันเจริญ, เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดี่ยว และบัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล. 2548. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิล. วารสารวิจัย มข.(ฉบับบัณฑิตศึกษา) 5(1): 50-58.
- นันทริกา ชันชื้อ. 2539. แบคทีเรียวิทยาในปลา. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 88 หน้า.
- นิลุบล ยูอาสะ. 2534. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในปลาดุกอุย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิลุบล ยูอาสะ. 2544. โรคปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. เอกสารประกอบการสอนวิชา 118 341 โรคปลาและปรสิตสัตว์น้ำ. ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 100 หน้า.
- นิลุบล ยูอาสะ. 2545. การพัฒนาวิธีการในการป้องกันรักษาโรคที่เกิดกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารประกอบงานวิจัยทุนอุดหนุนประจำปี 2545. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นิลุบล กิจอันเจริญ, ชุตินา หาญจวนิช และ นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2549. ประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. วารสารวิจัยวิจัย มข. 11(1): 53-61.
- นเรศ ช้วนยุค, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร คงประดิษฐ์ และกิจการ สุขมัตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27 (ฉบับพิเศษ 1): 307-319.
- บุญกว้าง การุณ และนนทวิทย์ อารีรักษ์. 2536. การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ของปลาดุกอุกผสมโดยการทดลอง ใน บทคัดย่อรายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32 . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

- ประเสริฐ ดั่งชนกุล. 2545. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลาที่เลี้ยงในกระชัง. รายงานประกอบการศึกษาวิชาปัญหาพิเศษ (118 494). ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 20 หน้า.
- เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดิว. 2543. สภาพการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย. วารสารแก่นเกษตร. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 28(4): 173-181.
- รัชนี อัดดี และอนูทิน หาญวีระพล. 2532. การใช้วัคซีนอย่างมีประสิทธิภาพ. *Journal of Veterinary Biology* 6(1): 1-8.
- เรืองทอง กิจเจริญปัญญา. 2543. วิทยาแบคทีเรียและเห็ดราทางสัตวแพทย์. ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 205 หน้า.
- สิทธิ บุญยรัตนผลิน. 2527. วัคซีนป้องกันโรคปลา. เอกสารเผยแพร่สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ ฉบับที่ 1. กรมประมง กรุงเทพมหานคร. 21 หน้า.
- สิทธิพันธ์ สารสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธ์, นภาพร บานชื่น, ทศนี สุโกศล, ธนารัตน์ ชารากุล และ ศันสนีย์ เสนะวงษ์. 2537. อิมมูโนวิทยา. มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร. 390 หน้า.
- โสมทนต์ วงศ์สว่าง. 2538. วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 118 หน้า.
- Akramiene D., et al. 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43(8):597-606.
- 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.
- Anderson, D. A. 1992. In vitro immunization of fish spleen sections and NBT, phagocytic, PFC and antibody assays for monitoring the immune response. In: Stolen, J.S. et al. (eds.) *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publication, Fair heaven, NJ, pp. 79-88.
- Anderson, D. P. and A. K. Siwicki. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *The Progressive Fish Cult.* 56: 258-261.
- Chen, D. and A. Ainsworth. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.* 15:295-304.
- Cossarini-Dunier, M. 1985. Effect of different adjuvants on the humoral immune response of rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology* 9: 141-142.
- Couso et al., 2003. Effects of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture* 219:99-109.

- Domenech, A and Seven coauthors. 1996. Streptococcosis in culture turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) associated with *Streptococcus parauberis*. Journal of Fish Disease 19: 33-38.
- Dunn, J., A. Polk, J. Scarrett, G. Olivier, S. Lall and F. A. Goosen. 1990. Vaccine in aquaculture : the search for an efficient delivery system. Aquaculture 9: 23-32.
- Eldar, A., Y. Bejerano and H. Bercovier. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Current Microbiology 28: 139-143.
- Eldar, A., O. Shapiro, Y. Bejerano and H. Bercovier. 1995. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. Vaccine 13(9): 867-870.
- Eldar, A., A. Horovitz and H. Bercovier. 1997. Development and efficiency of vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology 56: 175-183.
- Ellis, A. E. 1988. Fish Vaccination. Academic Press, New York.
- El-Sayed, A. F. M. 2006. Tilapia culture. CABI Publishing is a division of CAB International USA. 277 p.
- Engstad et al., 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediates haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol. 2:287-297.
- FAO. 2006. Aquaculture production 2006. In :Yearbooks of Fishery Statistics Summary tables <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-4.pdf> . [Accessed Oct 7, 2011].
- Gutierrez, M. A. and T. Miyazaki. 1994. Response of Japanese eel to oral challenge with *Edwardsiella tarda* after vaccination with formalin-killed cell or lipopolysaccharide of the bacterium. Journal Aquatic Animal Health 6: 110-117.
- Hon, D. N. S. 1996. Chitin and Chitosan : Medical Application In: Polysaccharides in Medicinal Application Edited by Dumitri, S. New York. pp. 631-649
- Hoshina, T., T. Sano and Y. Morimoto. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. Journal of Tokyo University of Fisheries 44: 57-68.
- Hunter K., R. Gault, F. Jordan. 2001. "Mode of Action of B-Glucan Immunopotentiators-Research Summary Release," Department of Microbiology, University of Nevada School of Medicine, USA.

- Iida, T., K. Furukawa, M. Sakai and H. Wakabayashi. 1986. Non-haemolytic *Streptococcus* Isolated from the brain of the vertebral deformed Yellowtail. *Fish Pathology* 21(1): 33-38.
- Inglis, V., R. J. Robert and N. R. Bromage. 1993. *Bacterial Diseases of fish*. Blackwell Science, Oxford. 312 p.
- Joosten, P. H. M., M. J. Aviles-Trigueros., P. Sorgeloos and J. M. H. Rombout. 1995. Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gillthead (*Sparus aurata*) with biocapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 289-299.
- Joosten, P. H. M., W. J. Kruijer and J. M. H. Rombout. 1996. Anal immunization of carp and rainbow trout with different fraction of a *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish and Shellfish Immunology* 6: 541-551.
- Klesius, P. H., C. A. Shoemaker and J. J. Evan. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188: 237-246.
- Kusada, R., I. Komatsu and K. Kawai. 1978. *Streptococcus* sp. isolated from epizootic of culture eels. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44 (3): 295.
- Lawrence, M.L., R.K. Low and R.L. Thune. 1997. Attenuation, persistence, and vaccine potential of an *Edwardsiella ictaluri* pure –A mutant. *Infectious Immunity* 65: 4642-4651.
- Leung, K. Y., L. S. Wong, K. W. Low and Y. M. Sin. 1997. Mini-Tn5 induced growth and protease deficient mutants of *Aeromonas hydrophila* as live vaccines for blue gourami, *Trichogaster trichoptreus* (Pallas). *Aquaculture* 158: 11-22.
- Li. Q., E. T. Dunn, E. W. Grandmason and M. F. A. Goosen. 1992. Application and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymer* 7: 370-395.
- Lim, C. 1989. Digestion and metabolism. In: Lovel, T. (ed.) *Nutrition and Feeding of Fish*. Van Norstrand Reinhold, New York, NY, pp. 73-91.
- Matsuyama, H., et al. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 101: 197-203.
- Meira, D.A., et al. 1996. The Use of Glucan as Immunostimulant in the Treatment of Paracoccidioidomycosis; *Am J. Trop Med Hyg* 55(5), 496-503.
- Miyazaki, T. 1982. Pathological study on Streptococcosis histopathology of infected fish. *Fish Pathology* 17: 167-172.

- Miyazaki, T., et al. 1984. A histopathological study of streptococcal disease in tilapia. *Fish Pathology* 19: 167-172.
- Nakanishi, T., et al. 2002. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of application of a multiple instrument. *Vaccine* 20 (31-32): 3764-3769.
- Nakatsugawa, T. 1983. A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology* 17(4): 281-285.
- Othman R. A., et al. 2011. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan. *Nutr. Rev.* 69(6):299-309.
- Pappalardo, R. and Boemare. 1982. An intracellular *Streptococcus* causative agent of slowly developing disease in the Mediterranean carp, *Carcinus mediterraneus*. *Aquaculture* 28: 283-292.
- Pascho, R. J., et al. 1997. Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of *Renibacterium salmoninarum* bacterins affected by persistence of bacterial antigens. *Journal of Aquatic Animal Health* 9:99-107.
- Perera, R. P., et al. 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture* 152: 545-553.
- Plumb, J. A. 1995. Chemotherapy vs vaccination a reality for Asian aquaculture, pp. 43-53. In: Fish Health Section, Asian Fisheries Society (ed.). Second Symposium on Disease in Asian Aquaculture, 25-29 October 1995.
- Robertsen, B. et al., 1994. β -glucans as immunostimulants. In: Stolen, J., et al. (eds.) *Modulators of Fish Immune Response*. SOS, Fair Heaven, NJ, pp83-99.
- Rombout, P. H. W. M., C. H. J. Lamers and M. H. Helfrich. 1985. Uptake and transport of intact macromolecules in intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell and Tissue Research* 239: 519-530.
- Rombout, P. H.W. M., and A. A. Berg. 1989. Immunological importance of second gut segment of carp I. Uptake and processing of antigen by epithelial cell and macrophage. *Journal Fish Biology* 35: 13-331.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172 : 63-92.
- Sano, T. And H. Fukuda. 1987. Principal microbial diseases of mariculture in Japan. *Aquaculture* 67 : 59-69.
- Scott, A. L. and Klesius, P. H. 1981. Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in

- fish. Development Biology Standard. 49:243–254.
- Schotzhauer, S. D. and R. C. Littell. 1997. SAS System for Elementary statistical analysis. 2nd Edition. SAS Institute., Gary, NC, USA.
- Secombes, C. J. 1990. Isolation of Salmonid Macrophages and Analysis of their Killing Activity. In: Stolen, J. S., T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. Van Muiswinkel. 1990. Techniques in Fish Immunology. SOS Publication. Fair Heaven, NJ, pp. 137-155.
- Vaughan, L. M., et al. 1993. An aeromonic-dependent mutant of fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid
- Ward, P. D. 1982. The development of bacterial vaccines for fish, pp. 47-57. In: Roberts, R. J. (ed.). Microbial Disease of Fish. Academic Press, London.
- Whittington, R., et al. 2005. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 248:217-225.
- Wood P. L., et al. 1994. Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subject. Eur. J. Clin. Nutr. 48:46-74.
- Yin, Z., et al. 1997. Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*: a defense against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 7: 93-104.
- Yuasa, K., et al. 1999. *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. Journal of Aquatic Animal Health 11: 87-93.