



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.)

Application of Vaccine to Prevent Disease Caused by *Streptococcus agalactiae* in

Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

นามผู้วิจัย นายภริศน์ มั่นใจองค์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์นันทวิทย์ อารีชัยน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริระภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สงศรี มหาสวัสดิ์, M.S.)

หัวหน้าภาควิชา

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล
(*Oreochromis niloticus* L.)

Application of Vaccine to Prevent Disease Caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia
(*Oreochromis niloticus* L.)

โดย

นายภิรัตน์ มั่นใจอาจค์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2552

กิริตน์ มั่นใจวงศ์ 2552: การทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

Streptococcus agalactiae ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์นันทวิทย์ อารีรักษ์ Ph.D. 87 หน้า

การศึกษาประสิทธิภาพการให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล แปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 51.33 ± 7.83 กรัม ในสภาพการเลี้ยงในฟาร์ม ให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องอย่างเดียว และการฉีดเข้าช่องท้องร่วมกับการกระตุ้นซ้ำโดยการให้วัคซีนผสมอาหาร และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ทำการประเมินประสิทธิภาพวัคซีนโดยการตรวจวัดค่าปริมาณแอนติบอดีในซีรัม และค่า Relative Percent Survival (RPS) จากการทดสอบความคุ้มโรค พบว่าภายหลังได้รับวัคซีนโดยการฉีด ระดับปริมาณแอนติบอดีในซีรัมของปลานิลในชุดการทดลองที่ให้วัคซีนมีค่าเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในส่วนชุดการทดลองที่ให้วัคซีนกระตุ้นซ้ำโดยการผสมอาหารพบว่าไม่สามารถเพิ่มระดับค่าแอนติบอดีในซีรัมได้อย่างชัดเจน ส่วนการทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* เข้าช่องท้อง พบว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีนทุกกลุ่มมีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และค่า RPS สูงขึ้นตั้งแต่เดือนที่สองจนสิ้นสุดการทดลอง โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ให้วัคซีนซ้ำโดยการผสมอาหารสองครั้งต่อเดือน พบว่ามีค่า RPS สูงถึง 92.3 ในเดือนที่ 4 ของการศึกษา แสดงให้เห็นว่าวัคซีนที่ให้สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในตัวปลานิลได้ และช่วยลดอัตราการตายจากการทดสอบความคุ้มโรค โดยเฉพาะการให้โดยการกระตุ้นซ้ำมีผลช่วยให้ความต้านทานโรคดีขึ้นเมื่อระยะเวลาของการเลี้ยงนานขึ้น

การศึกษารูปแบบวิธีการให้วัคซีนในลูกปลานิลแปลงเพศอายุ 21 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 0.26 กรัม โดยเปรียบเทียบระหว่างการแช่โดยตรง (Direct immersion) กับการแช่แบบ Hyperosmotic immersion และทดสอบความคุ้มโรคโดยการแช่ในเชื้อ *S. agalactiae* ในวันที่ 14 และ 28 หลังการให้วัคซีน พบว่าลูกปลาที่ได้รับวัคซีนทุกกลุ่มมีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณาจากค่า RPS พบว่าการแช่ทั้งสองแบบให้ผลใกล้เคียงกัน ผลการศึกษานี้แสดงว่าลูกปลานิลขนาดดังกล่าวมีการตอบสนองที่ดีต่อการให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่ และสามารถนำไปใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Pirat Manjaiang 2009: Application of Vaccine to Prevent Disease Caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 87 pages.

Study on the application of formalin-killed *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile-tilapia (*Oreochromis niloticus*) with average weight of 51.33 ± 7.83 gm was conducted in the farm. Efficacy of single intraperitoneal injection and injection and boosted by oral vaccine were compared by antibody production and relative percent survival (RPS) within the four-month experimental period. After injection, all vaccinated fish developed significant level of serum antibody titer ($P < 0.05$), however, the boosted vaccination in the feed did not clearly enhance the titer when compared with the non-boosted fish. Challenge test by intraperitoneal injection of virulent *S. agalactiae* clearly indicated that all vaccinated fish had significantly lowered mortality rate than the control ($P < 0.05$) and the RPS values were high at two months after vaccination. At the end of the trial, vaccinated fish with oral vaccine at twice a month had RPS value at 92.3. This study clearly showed that vaccination by single injection and boosted by oral vaccine could induce good protection against pathogenic *S. agalactiae* throughout the culturing period of Nile tilapia.

Effective method of vaccination by immersion in tilapia fry with average weight of 0.26 gm was determined. Direct and hyperosmotic immersion were applied with the fish and challenged by immersion in virulent *S. agalactiae* at 14 and 28 days after vaccination to determine RPS value. All vaccinated fish of both methods did show better resistance against *S. agalactiae* than the control ($P < 0.05$), however, the RPS values of both methods did not appear to be much different. This study demonstrated that tilapia fry did show good response to vaccination by immersion method which should be applicable for the effective approach for the prevention of *S. agalactiae* infection.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรักษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา ภูมิ กรรมการวิชาเอกและรองศาสตราจารย์สงศรี มหาสวัสดิ์ กรรมการวิชาการ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ทักษะและประสบการณ์ ที่ดีตลอดการเรียนการสอน คำแนะนำที่มีประโยชน์ และความช่วยเหลือในด้านการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ บริษัทไกรเบสท์ มารีน จำกัด สำหรับความเอื้อเฟื้อในเรื่องสถานที่ และพันธุ์ปลานิลในการทดลอง รวมถึงนักวิชาการประจำฟาร์ม ที่ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณทุกกำลังใจจากทุกคนในครอบครัว พี่น้อง และเพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการ สุขภาพสัตว์น้ำ ที่เป็นแรงผลักดันสำคัญในการศึกษาที่ดีตลอดมา

กิริตน์ มั่นใจองค์กร

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	31
ผลการศึกษา	41
วิจารณ์	57
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	69
ภาคผนวก	83
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> ในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>Streptococcus</i> ในรายงานการศึกษาอื่น ๆ	42
2 ค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไทเตอร์ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของปลานิลที่ได้รับวัคซีนที่เตรียมจาก เชื้อ <i>S. agalactiae</i> โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง และการฉีดเข้าช่องท้องร่วมกับการให้วัคซีนผสมอาหาร	47
3 เปอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมและค่า Relative Percent Survival ของปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคต่อเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ภายหลังได้รับวัคซีน	50
4 ค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมและค่า Relative Percent Survival ของปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคในช่วงเวลาต่าง ๆ ต่อเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ภายหลังได้รับการให้วัคซีนโดยการแช่	54
ตารางผนวกที่	
1 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบริเวณจุดที่ตั้งกระชังของปลาทดลอง ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ	84
2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของลูกปลานิล ในแต่ละวันในการทดสอบความคุ้มโรคครั้งที่ 1 (14 วัน หลังจากแช่วัคซีน)	85
3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของลูกปลานิล ในแต่ละวันในการทดสอบความคุ้มโรคครั้งที่ 2 (28 วัน หลังจากแช่วัคซีน)	86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และการติดย้อม (gram positive) ของเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (X 1000)	41
2 เพอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมของปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคต่อเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ภายหลังได้รับวัคซีน	51
3 เพอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมของลูกปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคกับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ภายหลังได้รับการให้วัคซีนโดยการแช่ผ่านไป 14 วัน	55
4 เพอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมของลูกปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคกับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ภายหลังได้รับการให้วัคซีนโดยการแช่ผ่านไป 28 วัน	56

การทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.)

Application of Vaccine to Prevent Disease Caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

คำนำ

ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันที่กำลังขยายตัวอย่างรวดเร็ว มีส่วนสำคัญอย่างมากในการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมภายในประเทศ ผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้สามารถตอบสนองความต้องการในการบริโภคของประชากรภายในประเทศและยังเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศมีมูลค่ามหาศาลในแต่ละปี โดยในปี 2545 ประเทศไทยสามารถส่งออกสัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีมูลค่ากว่า 3,676,427,000 ดอลลาร์สหรัฐ (Vannuccini, 2004) ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงมีส่วนสำคัญในการทดแทนปริมาณสัตว์น้ำในธรรมชาติที่มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วอันเนื่องจากปัญหามลภาวะต่าง ๆ ที่ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมในธรรมชาติเสื่อมโทรมลง

ในปัจจุบันรูปแบบการเลี้ยงปลาได้มีการเปลี่ยนแปลงจากการเลี้ยงแบบดั้งเดิมมาเป็นระบบการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาและแบบพัฒนา การเลี้ยงปลาแบบพัฒนาสามารถควบคุมและเพิ่มปริมาณผลผลิตให้สูงขึ้น โดยอาศัยการปล่อยปลาเลี้ยงอย่างหนาแน่นและใช้อาหารสมทบเป็นหลักในการผลิต ซึ่งการผลิตรูปแบบดังกล่าวจะมีข้อจำกัดขึ้นอยู่กับปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยง คุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่ใช้เลี้ยง และสุขภาพของปลาที่เลี้ยงเป็นหลัก จากข้อจำกัดด้านปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาส่งผลให้การเลี้ยงแบบพัฒนามักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคระบาดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อธุรกิจการเลี้ยงปลาในหลายเขตพื้นที่ทั่วโลก

โรค Streptococcosis เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* spp. พบระบาดได้ทั้งในปลาที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติ (Baya *et al.*, 1990) และปลาในฟาร์มเพาะเลี้ยง (Hoshina *et al.*, 1958; Perera *et al.*, 1997) สามารถพบการระบาดได้ทั้งในเขตน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม (Evans *et al.*, 2002) ความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นสร้างความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด (Inglis *et al.*, 1993) โดยในประเทศไทยพบการ

ระบาดของโรค Streptococcosis ในการเลี้ยงปลากะพงขาว (เขาวินิตย์ และคณะ, 2543) และปลานิล (ประเสริฐ, 2545) โดยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus iniae* เป็นชนิดที่มีรายงานการระบาดในการเลี้ยงปลานิลในพื้นที่เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ประเสริฐ, 2545; คริณญา และคณะ 2550) ขณะที่ภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทยมีรายงานการระบาดของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (Areechon *et al.*, 2005; นเรศ และคณะ, 2548) การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะประสบปัญหาการดื้อยาของเชื้อที่ก่อโรค ทำให้การรักษาไม่ได้ผลเท่าที่ควร การให้วัคซีนเป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อเสริมสร้างสุขภาพของสัตว์น้ำให้มีความต้านทานโรคอย่างเฉพาะเจาะจงและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคระหว่างการเพาะเลี้ยง (Gudding *et al.*, 1999) ซึ่งเหมาะสมกับรูปแบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบพัฒนาในปัจจุบัน ในส่วนของวัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis พบว่ามีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นทั้งในต่างประเทศ (Eldar *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 2004; Pasnik *et al.*, 2006) และในประเทศไทย (ธีราภรณ์ และคณะ, 2548; Prasad, 2002; นิอุบล และคณะ, 2549; วิศณุ และคณะ, 2550) ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรคในปลาเศรษฐกิจได้

สำหรับระบบการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย เกษตรกรนิยมปล่อยลูกปลาอายุประมาณ 21 วัน ที่เพิ่งผ่านการแปลงเพศ ลงเลี้ยงในบ่อดินหรือนำไปเลี้ยงซ้ำให้ได้ปลาน้ำหนัก 30-50 กรัม เพื่อนำไปเลี้ยงต่อในกระชัง โดยในช่วงเวลาที่มีการเคลื่อนย้ายปลาทั้งสองระยะ เป็นช่วงที่สามารถใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรคได้ โดยตลอดช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงจนถึงการเก็บเกี่ยวผลผลิต เป็นช่วงที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบาดต่าง ๆ ในขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันของปลาที่ได้รับวัคซีน มักจะมีระดับลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการกระตุ้นซ้ำเพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันในร่างกายอันจะนำไปสู่การเพิ่มช่วงระยะเวลาในการป้องกันโรคให้ยาวนานขึ้น ดังนั้นรูปแบบและวิธีการให้วัคซีนจึงต้องมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคในช่วงระยะเวลาของการเลี้ยงปลาได้ งานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบที่เหมาะสมในการใช้วัคซีนเชื้อตายของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เพื่อป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิลทั้งในระยะที่เพิ่งแปลงเพศและในปลาน้ำหนัก 30-50 กรัม รวมถึงประเมินประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการให้วัคซีนผสมอาหารเพื่อเป็นแนวทางในการใช้วัคซีนในระบบการเลี้ยงปลานิลต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมการเกิดโรค Streptococcosis ในระบบการเลี้ยงปลานิลแบบพัฒนา
2. ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยวิธีการฉีดและการให้ซ้ำโดยการผสมอาหาร ต่อความต้านทานการโรค Streptococcosis ในการเลี้ยงปลานิลในกระชัง
3. ศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในลูกปลานิล

การตรวจเอกสาร

1. ปลานิล

1.1 ประวัติความเป็นมา

ปลานิล หรือ Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) จัดอยู่ในกลุ่มของปลาทิลาเปีย (Cichlidae) ซึ่งมีความหลากหลายประมาณ 100 สายพันธุ์ (Black and Pickering, 1998) พบแพร่กระจายอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติในทวีปแอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว มีความแข็งแรงสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี มีรสชาติดีเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ทำให้ปลานิลนี้ได้รับการส่งเสริมให้มีการเลี้ยงและเพาะขยายพันธุ์ในเขตพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลกเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในช่วง 50 ปีที่ผ่านมา จนปัจจุบันปลานิลจึงกลายเป็นปลาที่มีบทบาทสำคัญทางด้านเศรษฐกิจอย่างมากในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก โดยในปี 2548 มีปริมาณผลผลิตของปลานิลทั่วโลกประมาณ 2 ล้านตันคิดเป็นมูลค่า 2,457 ล้านดอลลาร์สหรัฐ อเมริกา ประเทศจีนเป็นประเทศที่มีปริมาณผลผลิตมากที่สุดคิดเป็น 48 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั่วโลก (FAO, 2007)

ปลานิลเริ่มถูกนำเข้ามาในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ในปีพุทธศักราช 2508 โดยได้รับพระราชทานชื่อเรียกเป็นภาษาไทยว่าปลานิล จากพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ภายหลังจากที่กรมประมงได้รับพระราชทานพันธุ์ปลานิลจำนวนหนึ่งทีเพาะได้ภายในพระราชวังสวนจิตรลดา และนำไปเพาะเลี้ยงในสถานีประมงต่าง ๆ ทั่วประเทศ การส่งเสริมการเลี้ยงปลานิลของกรมประมง โดยการแจกจ่ายพันธุ์ปลาให้แก่เกษตรกรรวมถึงการปล่อยพันธุ์ปลานิลลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้ปลานิลกลายเป็นปลาน้ำจืดที่มีบทบาททางการประมงน้ำจืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในช่วงหลายปีที่ผ่านมาปริมาณผลผลิตของปลานิลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงและการจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี โดยในปี 2548 มีจำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล 233,122 ราย คิดเป็นพื้นที่การเพาะเลี้ยง 394,742 ไร่ สามารถผลิตปลานิลได้เท่ากับ 203,737 ตัน คิดเป็นมูลค่า 5,883 ล้านบาท (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2550)

1.2 ข้อมูลด้านชีววิทยา

การจัดจำแนกทางด้านอนุกรมวิธาน พบว่าปลานิลถูกจัดอยู่ในวงศ์ Cichlidae สกุล *Oreochromis* ปลานิลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในสกุลนี้ โดยปลาที่โตเต็มที่มีความยาวถึง 60 เซนติเมตร น้ำหนักมากกว่า 4 กิโลกรัม รูปร่างของปลานิลมีลักษณะคล้ายปลามอเทศ (*O. mossambicus*) ซึ่งเป็นปลาอีกชนิดหนึ่งในสกุลเดียวกัน แต่มีข้อแตกต่างกันในส่วนของสีลำตัวซึ่งปลานิลจะมีสีเขียวปนน้ำตาลและมีลายพาดขวาง 9-10 แถบ บริเวณส่วนหางของปลานิลจะมีแถบสีเทาในแนวดิ่ง 7-12 แถบ มีเกล็ด 3 แถบที่บริเวณแก้มและอีก 1 แถบตรงบริเวณเหนือเส้นข้างลำตัว เล็กน้อย ครีบหลังมีอันเดียวประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 16-18 อัน ก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 อัน ก้านครีบอ่อน 9-10 อัน บนแถบเส้นข้างลำตัวมีเกล็ด 33 เกล็ด ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มหนึ่งจุด บริเวณก้านครีบอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางจะมีจุดสีขาวและสีดำตัดขวางอยู่ทั่วไปในขณะที่ปลามอเทศจะมีลำตัวสีดำและบริเวณปลายของครีบหางและครีบหลังจะมีสีแดง (ทัศนีย์, 2524)

โดยปกติปลานิลจะอยู่รวมกันเป็นฝูงตามแหล่งน้ำธรรมชาติในเขตน้ำจืด แต่พบว่าสามารถอยู่อาศัยในน้ำกร่อยได้ด้วยคุณลักษณะของปลานิลที่มีความทนทานต่อสภาพสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ภายนอกได้เป็นอย่างดี ทำให้เราพบประชากรปลานิลในสภาพสิ่งแวดล้อมแตกต่างกัน ทั้งในเขตน้ำจืดและน้ำกร่อย โดยพบว่าปลานิลสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มสูงถึง 20 ppt และอาศัยอยู่ได้เป็นอย่างดีในช่วงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตั้งแต่ 14-33 องศาเซลเซียสในธรรมชาติ แต่สภาพการเลี้ยงในบางพื้นที่สามารถเพาะเลี้ยงปลานิลในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 7-40 องศาเซลเซียส (Trewavas, 1982) ปลานิลทนต่อสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำ (< 0.3 ppm) ได้ดี การควบคุมระดับออกซิเจนในน้ำช่วงเช้าไม่ให้ต่ำกว่า 0.7-0.8 ppm ปลานิลจะเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น ตามธรรมชาติปลานิลเป็นปลาที่สามารถกินได้ทั้งพืชและสัตว์ (Omnivorous) รวมทั้งยังสามารถกรองกินแพลงก์ตอนที่ลอยอยู่ในมวลน้ำได้เป็นอย่างดี

ปลานิลแพร่ขยายพันธุ์ได้ตลอดปีทั้งในบ่อเลี้ยง กระชัง และแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ในช่วง 1 ปี ปลาที่มีความสมบูรณ์สามารถวางไข่ได้ 5-6 ครั้ง ปลาเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วโดยเมื่อปลาอายุ 3-4 เดือนจะสามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ แต่ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ควรใช้แม่ปลาที่มีน้ำหนักไม่ต่ำกว่า 50 กรัม ส่วนพ่อปลาควรมีน้ำหนักไม่ต่ำกว่า 75 กรัม การเพาะพันธุ์ปลานิลจะใช้วิธีตามธรรมชาติคือมีการจับคู่ของปลาเพื่อหาคูผสมสร้างรัง เมื่อตัวเมียวางไข่ในรังตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อมาผสม โดยปลาเพศเมียจะวางไข่แต่ละครั้งประมาณ 500-2,000 ฟอง เมื่อวางไข่เสร็จ ไข่ที่

ได้รับการผสมจะถูกปลาเพศเมีย นำเก็บไว้ภายในปากเพื่อความปลอดภัยและสามารถได้รับออกซิเจนในปริมาณสูงเนื่องจากเกิดการไหลเวียนของน้ำอยู่ตลอดเวลา ไข่ปลานิลเป็นประเภทไข่จม ที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส ไข่จะฟักเป็นตัวหมักภายในเวลา 4 วัน (ทัศนีย์, 2524)

1.3 การแพร่กระจายและถิ่นอาศัย

ปลานิลเป็นปลาพื้นเมืองและมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาและลุ่มแม่น้ำจอร์แดน สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ทะเลสาบและแม่น้ำแทบทุกสาย การกระจายตัวของประชากรปลานิลพบทางตอนบนของกลุ่มแม่น้ำไนล์ในประเทศ ยูกันดา แพร่กระจายลงมาทางตอนกลางและตะวันออกของทวีปแอฟริกา ในเขตสาธารณรัฐซูดานและสาธารณรัฐในเจอร์ นอกจากนี้ในช่วง 50 ปีที่ผ่านมาได้มีการนำพันธุ์ปลานิลกระจายออกไปยังเขตพื้นที่ต่าง ๆ โดยเฉพาะประเทศในเขตอบอุ่นและเขตร้อน โดยในประเทศไทยปลานิลสายพันธุ์จิตรดา ที่กรมประมงได้รับพระราชทานจากพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเป็นประชากรปลานิลกลุ่มแรกที่ถูกนำส่งไปเพาะขยายพันธุ์ตามสถานีวิจัยต่าง ๆ จำนวน 15 แห่ง และแจกจ่ายให้แก่ประชาชนนำไปเพาะเลี้ยงและปล่อยลงสู่แหล่งน้ำต่าง ๆ เพื่อการประมงต่อไป จนในปัจจุบันสามารถพบปลานิลได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำต่าง ๆ (ทัศนีย์, 2524)

1.4 สายพันธุ์ปลานิล

1.4.1 ปลานิลสายพันธุ์จิตรดา 1

เป็นปลานิลที่ปรับปรุงพันธุ์มาจาก ปลานิลสายพันธุ์แบบคัดเลือกภายในครอบครัว เริ่มดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2528 จนถึงปัจจุบัน เป็นชั่วอายุที่ 7 ซึ่งทดสอบพันธุ์แล้วพบว่ามียอดการเจริญเติบโตดีกว่าปลานิลพันธุ์ที่เลี้ยงในสวนจิตรดาประมาณ 22 % (ยุพินท์ และพันธุ์ศักดิ์, 2543)

1.4.2 ปลานิลสายพันธุ์จิตรดา 2 Genetically Male Tilapia (GMT)

เป็นปลานิลที่พัฒนา โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการเปลี่ยนโครโมโซมเพศในพ่อพันธุ์ให้มีโครโมโซมเพศเป็น YY (Super male) เมื่อนำมาผสมกับแม่พันธุ์ปกติจะได้ลูกปลาเป็นเพศผู้เฉลี่ย 95.6 % แต่ด้วยเทคนิคการผลิตปลานิล Super male ที่มีความยุ่งยากทำให้มีอยู่

เฉพาะภายในห้องปฏิบัติการ สถาบันการศึกษา หรือหน่วยงานวิชาการ และมีปริมาณไม่มากนัก นอกจากนี้การผลิตปลานิล GMT อาจมีความจำเป็นต้องใช้ปลานิลเพศเมียจากสายพันธุ์เดียวกัน ทำให้เกิดปัญหาการผสมเลือดชิดเนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (ศิริ, 2542)

1.4.3 ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3

เป็นปลานิลที่ได้จากการผสมและคัดเลือกพันธุ์ จากปลา 7 สายพันธุ์ ประกอบด้วย สายพันธุ์ อียิปต์ กานา เคนยา สิงคโปร์ เซเนกัล อิสราเอล และได้หวัน พัฒนาโดยหน่วยงานราชการในประเทศฟิลิปปินส์ต่อเนื่องประมาณ 5 รุ่น ทำให้ได้สายพันธุ์ปลาที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วและมีอัตราการรอดสูง มีลักษณะเด่นคือ ส่วนหัวเล็ก ลำตัวกว้าง สีเหลืองนวล เนื้อหนา และแน่น รสชาติดี อายุ 6-8 เดือน สามารถเจริญเติบโตได้ขนาด 3-4 ตัวต่อกิโลกรัม ให้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าปลานิลพันธุ์ที่เกษตรกรเลี้ยง 40 % (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2543)

1.4.4 ปลานิลสายพันธุ์ ซี.พี.

เป็นปลานิลที่มีการคัดเลือกพันธุ์โดยบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ ทำให้ได้ปลาที่มีคุณสมบัติทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ดีสามารถเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มสูงได้ รสชาติเนื้อปลาที่ได้มีความใกล้เคียงกับเนื้อปลาทะเลเพราะไม่มีกลิ่นโคลนเหมือนปลานิลที่เลี้ยงในบ่อดินทั่วไป ส่งผลให้มีราคาสูงกว่าปลานิลปกติทั่วไป (ยุพินท์, 2543)

1.4.5 ปลาทับทิม

เป็นปลานิลที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์โดยบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและทนทานต่อความเค็มได้ถึง 30 ส่วนในพันส่วน (ppt) แต่ช่วงความเค็มที่เหมาะสมในการเลี้ยงอยู่ระหว่าง 15-20 ส่วนในพันส่วน เป็นปลาที่มีโครงกระดูกเล็กทำให้มีเปอร์เซ็นต์ซากต่ำ เมื่อมีสีขาว เจริญเติบโตดีในสภาพการเลี้ยงที่มีความหนาแน่นสูงเช่นการเลี้ยงในกระชัง โดยให้ผลผลิตสูงถึง 25 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรในระยะเวลา 3 เดือน (ยุพินท์, 2543)

1.5 รูปแบบการเพาะเลี้ยงปลานิล

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลานิลถือว่ามีรูปแบบที่ค่อนข้างหลากหลาย ทั้งการเลี้ยงในบ่อดิน การเลี้ยงในกระชัง การเลี้ยงในบ่อคอนกรีต การเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาแต่ก็ยังพบว่าการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาอยู่บ้างเช่นกัน เช่นการเลี้ยงปลานิลในนาข้าวที่มีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ การเลี้ยงปลาร่วมกับการทำปศุสัตว์ การเลี้ยงรวมกับปลาหรือสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ เช่น การเลี้ยงปลานิลกับปลาตะเพียนและปลาดุก โดยการศึกษาที่มีการปล่อยปลานิลในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามพบว่าลักษณะการเลี้ยงดังกล่าวสามารถให้ปริมาณผลผลิตปลานิลเพิ่มสูงขึ้นโดยไม่มีผลกระทบต่อผลผลิตของกุ้งก้ามกรามแต่อย่างใด (Rouse and Stickney, 1982) ส่วนในประเทศไทยมีรูปแบบการเพาะเลี้ยงปลานิล 2 รูปแบบหลัก ๆ คือ เป็นการใช้ระบบการเพาะพันธุ์ปลานิลในกระชังหรือบ่อดิน ร่วมกับการใช้ระบบการฟักไข่ในโรงเพาะฟัก ทำให้สามารถวางแผนการผลิตลูกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันในปริมาณมากตามที่กำหนดได้ และด้วยวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตให้สูงขึ้นต่อหน่วยพื้นที่ จึงทำให้มีการศึกษาแนวทางวิธีการในการผลิตปลานิลเพศผู้ล้วน เพื่อลดปัญหาปลาแน่นบ่ออันเนื่องมาจากการผสมพันธุ์วางไข่ในบ่อเลี้ยง เช่น แนวทางในการคัดพันธุ์ ผสมข้ามพันธุ์ การผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพและการใช้ฮอร์โมนเพศกำหนดการแสดงออกทางเพศในปลา ซึ่งแนวทางในการใช้ฮอร์โมนเพศผู้สามารถนำมาดัดแปลงใช้ร่วมกับระบบการเลี้ยงปลานิลในปัจจุบันได้เป็นอย่างดี โดยนำสายพันธุ์ปลาที่เลี้ยงง่ายโตเร็วมาแปลงเพศ โดยใช้ฮอร์โมนเพศผสมลงในอาหารให้ลูกปลานิลกินตั้งแต่ลูกไข่แดงยุบต่อเนื่องเป็นระยะเวลาประมาณ 21 วัน จากนั้นจึงนำลูกปลาวัยอ่อนไปอนุบาลในบ่อดินหรือในกระชังเพื่อให้เป็นปลาวัยรุ่น ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงให้ได้ขนาดตามที่ต้องการของตลาดต่อไป ด้วยลักษณะรูปแบบการเลี้ยงปลานิลแบบพัฒนาอาหารสมทบที่ใช้ในการเลี้ยงมีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตของปลานิลที่จะได้รับ ดังนั้นจึงควรให้อาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการในปริมาณที่เหมาะสมตามความต้องการของปลาในแต่ละขนาด โดยพบว่าสำหรับลูกปลาวัยอ่อนและลูกปลานี้จะมีความต้องการอาหารที่มีระดับโปรตีนประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และควรให้อาหาร 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ในขณะที่ในปลาใหญ่จะต้องการปริมาณโปรตีนในระดับ 25-30 เปอร์เซ็นต์ และให้เพียงประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ปัจจุบันได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางเพื่อหาแหล่งโปรตีนที่มีต้นทุนต่ำเพื่อใช้ในการผลิตอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงปลานิล โดยพบว่าพืชหลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตอาหารเพื่อใช้เลี้ยงปลานิลได้ (ไพรัตน์ และคณะ, 1986) เนื่องจากปลานิลสามารถนำโปรตีนจากพืชไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี

1.6 ปัญหาและอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงปลานิล

สำหรับปัญหาและอุปสรรคในการเลี้ยง อันได้แก่ ปัญหาด้านพื้นที่เพาะเลี้ยง โดยที่เพิ่มปริมาณการเลี้ยงตามแหล่งน้ำธรรมชาติมากขึ้นส่งผลต่อปัญหาคุณภาพน้ำ ปัญหาลูกพันธุ์ที่ไม่มีคุณภาพหรือมีราคาสูงในบางช่วงฤดู อาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงมีราคาแพง เกษตรกรขาดความรู้ด้านการใช้ยาและวิตามินในการรักษาโรค ปัญหาด้านการจัดการฟาร์ม ส่งผลให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากปัญหาสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม ขาดการจัดการที่ดีซึ่งก่อให้เกิดความเครียดในปลาที่เลี้ยงทำให้เกิดปัญหาโรคระบาดต่าง ๆ ตามมา อาทิ เช่น การระบาดของโรค Lymphocystis โรค Columnaris โรค Whirling disease โรค hemorrhagic septicemia และโรค Streptococcosis ในระบบการเลี้ยง ซึ่งมักเกิดในช่วงที่อุณหภูมิของน้ำลดต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Popma and Masser, 1999) ส่วนปัญหาโรคที่เกิดจากปรสิตภายนอกมักพบว่ามีผลกระทบสร้างความเสียหายให้กับระบบการผลิตและอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนและปลานขนาดเล็ก โดยเฉพาะการเลี้ยงในระบบที่มีความหนาแน่นสูง ซึ่งได้แก่โรคที่มีสาเหตุจากโปรโตซัว *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* และ *Epistylis* (Popma and Masser, 1999) โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส rickettsia-like organism และ Iridovirus เป็นสาเหตุของโรคที่สร้างความเสียหายในระบบการเลี้ยงปลานิลเช่นเดียวกัน (Enright, 2005)

2. แบคทีเรียสกุล *Streptococcus*

Streptococcus เป็นสกุลของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิดทั้งในคนและในสัตว์รวมถึงในพืชบางกลุ่ม โรคในมนุษย์ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus* ได้แก่โรคไข้กาฬหลังแอ่น โรคนิวโมเนีย โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และโรค Streptococcosis เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อที่ก่อโรค ยังพบว่ามีเชื้อ *Streptococcus* บางชนิดที่มีการดำรงชีวิตเป็นอิสระในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติหรืออาศัยในสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านโดยไม่ได้ก่อให้เกิดผลเสียใด ๆ ต่อร่างกาย (Bruner and Gillespie, 1973)

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ การเจริญเติบโตจะพบลักษณะการเรียงต่อกันเป็นสายของเซลล์ซึ่งอาจเป็นสายสั้นหรือยาวมากซึ่งขึ้นกับชนิดและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โดยการเรียงต่อกันเป็นสายเกิดจากการเชื่อมต่อระหว่าง

cytoplasm ของแต่ละเซลล์ ดังนั้นจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่ได้เกิดจากเซลล์เพียง 1 เซลล์แต่เกิดจากกลุ่มเซลล์ที่เรียงต่อกัน เชื้อ *Streptococcus* โดยทั่วไปเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ รูปร่างค่อนข้างกลม แต่สามารถพบความแตกต่างในส่วนของคุณภาพและรูปร่างได้โดยอาจพบเซลล์ที่มีลักษณะกลมแบนหรือยาวเป็นแท่งสั้น ๆ เป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายสั้น ๆ เชื้อสกุลนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ แต่บางชนิดสามารถสร้างแคปซูลได้ ได้แก่เชื้อในกลุ่ม A, B และ C แคปซูลจะช่วยป้องกันกระบวนการ phagocytosis ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค เชื้อดิดี แกรมบวก แต่เมื่ออายุเชื้อมากขึ้นจะสูญเสียคุณสมบัติการดิดีแกรม กลายเป็นแกรมลบ (นงลักษณ์, 2547) ค่าเปอร์เซ็นต์โมลของลำดับคู่เบส guanine และ cytosine บนสายดีเอ็นเออยู่ในช่วงระหว่าง 34-46 เปอร์เซ็นต์ (Austin and Austin, 1993; Hoshina *et al.*, 1958)

2.2 การเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก จึงต้องมีการเติมส่วนของเลือด ซีรัม หรือน้ำไขสันหลังลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Kitao, 1982), Todd-Hewitt Broth Agar (THBA), Nutrient Agar และ Horse Meat Infusion Agar (HMIA) เป็นอาหารที่สามารถใช้เลี้ยงเชื้อกลุ่มนี้ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะการแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเลือด (Blood agar) ร่วมกับเติมยาปฏิชีวนะ Oxolinic acid 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ Colistin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เฉพาะเชื้อในสกุล *Streptococcus* เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารนี้ได้ (Collins, 1976) อุณหภูมิที่ใช้เพาะเชื้ออยู่ที่ 20-37 องศาเซลเซียส โดยบ่มเป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร สีขาวขุ่น โปร่งแสง โคนนูนและมีขอบเรียบ

เชื้อ *Streptococcus* สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนแต่บางชนิดจำเป็นต้องอยู่ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดค้างในช่วง 5.5-9.5 เชื้อบางชนิดสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเกลือที่มีความเข้มข้น 6.5 % เชื้อส่วนใหญ่สามารถก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์โดยบางชนิดสามารถแพร่ระบาดจากสัตว์สู่คนได้ (zoonotic species) เช่น เชื้อ *S. agalactiae*, *S. bovis* และ *S. dysgalactiae* แต่ก็มีพวกที่ดำรงชีพอิสระตามธรรมชาติ การทดสอบปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์ catalase จะให้ผลเป็นลบเมื่อทดสอบกับเชื้อในสกุล *Streptococcus* ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกเชื้อสกุล *Streptococcus* ออกจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* (Walker, 1998)

2.3 การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus*

การจำแนกชนิดจะอาศัยคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* โดยเชื้อบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ Haemolysin มีคุณสมบัติย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ทำให้สามารถทำการแบ่งกลุ่มเบื้องต้น โดยดูจากรูปแบบการย่อยเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่รอบ ๆ โคโลนีของเชื้อบนอาหารซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้ดังนี้

Alpha-haemolytic เป็นกลุ่มที่มีลักษณะการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดไม่สมบูรณ์ เนื่องจากไม่สามารถทำให้รั่วควัตถุ hemoglobin หลุดจากเซลล์เม็ดเลือดได้ ซึ่งสังเกตได้จากโซนสีเขียวใส เกิดรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

Beta-haemolytic เป็นกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์ haemolysin ย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้ hemoglobin หลุดออกจากตัวเซลล์ ทำให้เกิดโซนใสจื้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

Nonhaemolytic (Gamma-haemolytic) เป็นกลุ่มที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดงทำให้ไม่เกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

ส่วนการแบ่งกลุ่มตามวิธีของ Lancefield จะเป็นวิธีการแบ่งกลุ่มที่อาศัยวิธีทางชีววิทยา โดยจะดูความแตกต่างของ lipoprotein ที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนซึ่งปรากฏอยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยสามารถแบ่งเชื้อตามคุณลักษณะของแอนติเจนออกได้เป็น 20 กลุ่ม ตั้งแต่กลุ่ม A-H และ K-V อย่างไรก็ตามพบว่า การแบ่งกลุ่มตามวิธีดังกล่าวจะมีความไม่แน่นอนมากนัก เนื่องจากเชื้อบางชนิดสามารถถูกจัดอยู่ได้หลายกลุ่ม และในแต่ละกลุ่มอาจประกอบด้วยเชื้อ *Streptococcus* หลายชนิด ซึ่งมีเพียงกลุ่ม B เท่านั้นที่ประกอบด้วยเชื้อ *S. agalactiae* เพียงชนิดเดียว

โดยสรุปสามารถจัดจำแนกเชื้อในสกุล *Streptococcus* (นงลักษณ์, 2547) ได้ดังนี้

เชื้อที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้สมบูรณ์ (Beta-haemolytic Streptococci) ได้แก่

กลุ่ม A ได้แก่เชื้อ *S. pyogenes* ก่อโรคในคนโดยเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อบริเวณคอหอย (pharyngitis) ivotต่อการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่ม bacitracin ซึ่งใช้วินิจฉัยเชื้อกลุ่มนี้

กลุ่ม B เชื้อในกลุ่มนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *S. agalactiae* เป็นเชื้อที่พบก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ แต่ไม่พบรายงานการแพร่เชื้อจากสัตว์สู่คน (non-zoonotic) ด้านทานต่อการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่ม bacitracin

กลุ่ม C ได้แก่เชื้อ *S. equi* (subsp. *equi*) *S. phocae* *S. dysgalactiae* (subsp. *equisimilis*) พบก่อโรคในสัตว์หลายชนิดเช่น วัว ม้า

กลุ่ม D ได้แก่เชื้อ *S. faecalis* ครอบคลุมเชื้อสกุล *Enterococcus* เป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเค็ม 6.5 % NaCl และมีความต้านทานต่อยา penicillin G พบได้ในทางเดินอาหารของคนและมักก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ ถุงน้ำดี และระบบหมุนเวียนโลหิต

กลุ่ม E ได้แก่เชื้อ *S. porcinus* เป็นเชื้อที่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ เช่นสุกร

กลุ่ม F, G, H และ K-U เชื้อ *Streptococcus* ในกลุ่มเหล่านี้ก่อโรคในคน เช่น *S. canis*

กลุ่ม N ได้แก่ *S. lactis* เป็นสาเหตุการบูดเสียของนม

เชื้อชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มในระบบ Lancefield ได้ เช่น *S. iniae* และ *S. didelphis*

เชื้อที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงหรือย่อยได้ไม่สมบูรณ์ (Non-beta-haemolytic Streptococci) ได้แก่เชื้อ *S. pneumoniae* และเชื้อในกลุ่ม Viridans Streptococci ที่มีสมาชิกอยู่ประมาณ 26 ชนิด ได้แก่ *S. mutans* ซึ่งทั้งหมดไม่สามารถจัดแบ่งกลุ่มตามระบบ Lancefield ได้เชื้อ *S. dysgalactiae* (subsp. *dysgalactiae*) (Lancefield กลุ่ม C) พบก่อโรคในสัตว์หลายชนิด เช่น โรคข้ออักเสบในวัว เชื้อใน Lancefield กลุ่ม D ได้แก่ *S. bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus*, *S. infantarius*, *S. pasteurianus* และ *S. lutetiensis* ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้สามารถพบในอวัยวะภายในที่เกิดการอักเสบเช่น หัวใจ กระเพาะปัสสาวะ ทั้งในคนและในสัตว์ ในกรณีของเชื้อ *S. suis* (Lancefield กลุ่ม R, S และ T) พบอย่างน้อย 35 serotypes เป็นเชื้อก่อโรคในสุกร และสามารถระบาดจากสัตว์สู่คนได้

เชื้อกลุ่ม Peptostreptococci เป็นเชื้อกลุ่มที่เชื้อเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น และมีความหลากหลายในส่วนของการปฏิบัติการย่อยเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (blood agar)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดทดสอบเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ ออกมามากมายรวมถึงที่ใช้ในการแยกชนิดเชื้อในสกุล *Streptococcus* อาทิเช่น ชุดทดสอบ

API STREP ชุดทดสอบ ATP expression system ชุดทดสอบ Microscan และชุดทดสอบ Biolog® GP microplate panels ซึ่งมีความสะดวกในการใช้งานและสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถแยกด้วยวิธีปกติได้ เช่น *S. iniae* ที่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มตามระบบ Lancefield ได้และไม่มีข้อมูลของเชื้อนี้ในระบบฐานข้อมูล แต่สามารถแยกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบ Biolog® GP microplate panels ได้โดยสามารถยืนยันความถูกต้องได้เมื่อมีการใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจยืนยันผล (Roach *et al.*, 2006)

3. โรค Streptococcosis

โรค Streptococcosis หรือโรค Streptococcal septicemia เป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* การระบาดที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำโดยเฉพาะในกลุ่มของปลา โดยสามารถพบการระบาดของโรคชนิดนี้ได้ในปลาหลากหลายชนิดทั้งที่อยู่ในธรรมชาติ (Baya *et al.*, 1990) และในระบบการเลี้ยง (Foo *et al.*, 1985) ในเขตน้จืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม (Toranzo *et al.*, 2005) ซึ่งมีรายงานการระบาดของโรคตั้งแต่ปี 1958 ต่อเนื่องจนถึงในปัจจุบัน โดยมีพื้นที่การระบาดกระจายอยู่ทั่วไปตามเขตพื้นที่การเพาะเลี้ยงทั่วโลก โดยในทวีปเอเชียญี่ปุ่นเป็นประเทศแรกที่มีรายงานการระบาดของโรคในฟาร์มปลา rainbow trout รวมถึงในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ เช่น ปลา yellowtail (Kusuda *et al.*, 1976; Sano and Fukuda, 1987) ปลา Japanese eel (Kusuda *et al.*, 1978) ปลา ayu (Kitao *et al.*, 1981) และปลา flounder (Nakatsugawa, 1983) ส่วนการระบาดของโรคในเขตพื้นที่อื่น ๆ ได้แก่การระบาดของโรคในปลา seabream ปลา mullet (Evans *et al.*, 2002) และปลา silver pomfret (Duremdez *et al.*, 2004) ในประเทศคูเวต ส่วนในประเทศซาอุดีอาระเบียพบการระบาดในปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) ในขณะที่ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรค Streptococcosis ทั้งปลากะพงขาว (เขาวนิตย์ และคณะ, 2543) และปลานิล (ประเสริฐ, 2545; นเรศ และคณะ 2548; ศรีบุญญา และคณะ, 2550; Areechon *et al.*, 2005) โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงปลานิลที่มีการระบาดของโรครุนแรงเกิดขึ้นทั่วแทบทุกภาคของประเทศและกลายเป็นโรคสำคัญที่กำลังสร้างปัญหาอยู่ในขณะนี้

3.1 ลักษณะอาการของโรค

อาการโดยทั่วไปของโรคส่วนใหญ่จะมีความคล้ายคลึงกันในปลาแต่ละชนิด อาการภายนอกโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตเห็นได้คือ ปลาที่เกิดการติดเชื้อจะมีสีของลำตัวที่เข้มขึ้น กินอาหารลดลงเกิดการตกเลือดตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเช่น แผ่นปิดเหงือก ฐานครีบว่ายน้ำ รอบปาก รอบรูทวาร ขอดหางบวม ท้องบวม มีเมือกปนเลือดไหลออกจากรูทวาร เกิดฝีบริเวณขากรรไกร ว่ายน้ำลอยหัวหรือควงส่วน มีอาการครีบกร่อนและฉีกขาด เกิดการอักเสบรอบ ๆ และภายในลูกตาทำให้เกิดอาการตาโปนและขุนขาว การเกิดโรคในปลานิลจะพบการแสดงอาการภายนอกของโรคดังที่กล่าวมาได้อย่างชัดเจน ดังเช่นในรายงานการศึกษาของ (Al-Harbi, 1994) ในขณะที่การเกิดโรคในปลาชนิดอื่น ๆ อาจมีลักษณะอาการที่แตกต่างออกไปได้บ้างตัวอย่างเช่น การศึกษาอาการของโรคในปลา silver pomfret ที่พบว่าปลาส่วนใหญ่ที่เกิดโรคกว่า 90 เปอร์เซ็นต์จะแสดงอาการท้องบวม แต่ไม่พบการตกเลือดตามผิวหนัง และมีปลาส่วนน้อยที่แสดงอาการตาโปนโดยอาการตาโปนจะพบได้เมื่อแสดงอาการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (Duremdez *et al.*, 2004) และอาการลำตัวคดงอที่เกิดขึ้นในปลากระบอก (Evans *et al.*, 2002) ในส่วนของอาการภายในที่พบได้คือทางเดินอาหารที่ว่างเปล่าเนื่องจากปลากินอาหารลดลง และด้วยลักษณะของการติดเชื้อที่สามารถแพร่กระจายตามกระแสเลือด (Septicemia) ทำให้เกิดการติดเชื้อภายในอวัยวะที่สำคัญในหลาย ๆ ระบบ โดยเฉพาะอวัยวะที่มีเลือดไปหล่อเลี้ยงเป็นจำนวนมาก เช่น สมอ น้ำไขสันหลัง ตับ ถุงน้ำดี ม้ามและไต จะถูกเชื้อเข้าทำลาย ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่าง ๆ เหล่านี้อย่างรุนแรง เกิดการอักเสบ อาการตกเลือดและมีหนองเกิดขึ้น เมื่อสังเกตด้วยตาจะพบความผิดปกติได้อย่างชัดเจน เช่น อาการตับมีสีซีดหรือสีน้ำตาลเลือดดำหนอง ถุงน้ำดีโต มีน้ำเลือดและน้ำหนองคลั่งอยู่ภายในช่องท้อง มีการตกเลือดภายในทางเดินอาหารในส่วนของกระเพาะและลำไส้ และมักพบอาการเลือดคลั่งในสมอ ในกรณีที่เกิดการติดเชื้อรุนแรงจะพบเส้นใย fibrin ยึดอวัยวะภายในติดกับเยื่อช่องท้อง จากการศึกษาทางพยาธิสภาพของอวัยวะปลานิลที่เกิดการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* พบอาการเยื่อหุ้มสมออักเสบ โดยพบอาการบวมของเยื่อหุ้มสมอ และมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันเช่น Mast cells อยู่ภายในชั้นของเยื่อหุ้มสมอเป็นจำนวนมาก ในส่วนของเนื้อเยื่อตับจะพบเซลล์ phagocyte และเซลล์แบคทีเรียกระจายอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะ mast cell เซลล์ตับจะมีลักษณะบวมเห็นขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจนและมีช่องว่างเกิดขึ้นภายในเซลล์ ในขณะที่ส่วนของม้ามจะพบการรวมกลุ่มของเซลล์ phagocyte (Melanomacrophages) เกิดขึ้นกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ (Areechon *et al.*, 2005)

3.2 การติดต่อและแพร่กระจายของเชื้อ (Epidemiology)

การระบาดของโรคมักเกิดในสภาวะที่สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงไม่เหมาะสม ก่อให้เกิดความเครียดในปลา เช่น มีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิหรือมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมเป็นระยะเวลานาน ดังตัวอย่างการศึกษาของ Baya *et al.* (1990) ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างปลา 3 ชนิด ได้แก่ ปลา Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) ปลา Striped bass (*Morone saxatilis*) และปลา Sea trout (*Cynoscion regalis*) จำนวน 17 ตัวอย่างจากบริเวณอ่าว Chesapeake และแม่น้ำสาขากัลเลียง พบว่าตัวอย่างปลาที่เก็บได้มีอาการของโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* โดยช่วงฤดูร้อนและต้นฤดูใบไม้ร่วง ที่มีอุณหภูมิและความเค็มของน้ำเพิ่มสูงขึ้นเป็นช่วงที่พบการตายของปลาในบริเวณดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง การแพร่กระจายเกิดได้จากปลาสู่ปลาโดยตรง ซึ่งอาจเกิดจากการกินปลาที่ป่วยเป็นโรคหรือติดจากเชื้อที่กระจายอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ ดังเช่นในการศึกษาของ Robinson and Meyer (1966) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแพร่กระจายของโรคเกิดได้เมื่อมีปลาที่แสดงอาการหรือตายจากโรคอาศัยอยู่ร่วมกับปลาปกติ และเมื่อทดสอบแช่ปลาในสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10^6 cfu/ml เป็นระยะเวลา 10 นาที พบว่าเกิดติดเชื้อและแสดงอาการของโรคในปลาที่นำมาทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่แขวนลอย (water-borne) อยู่ในน้ำสามารถผ่านเข้าสู่ตัวปลาและก่อให้เกิดโรคได้ นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา ก็แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อเกิดได้จากหลายช่องทาง ดังเช่นในงานทดลองของ Perera *et al.*, (1997) ที่ได้ทำการศึกษาร่องทางในการได้รับเชื้อ *Streptococcus* ของปลานิล โดยวิธีการต่าง ๆ กัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวปลาโดยวิธีการฉีดเป็นวิธีการที่สามารถก่อให้เกิดโรคในปลานิลได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่ปลาในสารละลายเชื้อและการให้ผ่านทางทางเดินอาหาร

4. ระบบภูมิคุ้มกันในปลากระดูกแข็ง

จากข้อมูลการศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกันแสดงให้เห็นว่า ปลากระดูกแข็ง (Teleost fish) มีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายค่อนข้างคล้ายคลึงกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง กล่าวคือ มีการจดจำ และตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมด้วยการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว หรือมีการสร้าง และหลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลากระดูกแข็งสามารถแบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก ๆ คือ

4.1 Innate immunity

ระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้พบว่า มีการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific) โดยเป็นภูมิคุ้มกันที่ถูกกำหนดมาตั้งแต่ germ line ทำให้ร่างกายสร้างตัวรับที่สามารถจดจำกลุ่มโครงสร้างที่เรียกว่า pathogen associated molecular patterns (PAMPs) เช่น polysaccharides, peptidoglycan และ lipopolysaccharide (LPS) เป็นต้น (Medzhitov and Janeway, 1997) การตอบสนองต่อ PAMPs เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากภูมิคุ้มกันแบบนี้สามารถทำงานได้ทันทีโดยไม่ต้องการโมเลกุลอื่นเข้าไปจับก่อน ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงของปลาแบบออกเป็น 3 ส่วนคือ

4.1.1 Physical barriers เป็นด่านแรกที่สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมได้แก่เกล็ด ผิวหนัง เหงือก และเมือก โดยที่ผิวหนังและเมือกยังมีโมเลกุลอื่น ๆ เช่น lectins, lysozyme, complement, antibacterial peptide และ immunoglobulin (Magnadottir, 2006) เพื่อจับและทำลายสิ่งแปลกปลอม

4.1.2 Humoral component ประกอบด้วยโมเลกุลหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้เกิดการจับตัวรวมกลุ่มและตกตะกอนของสิ่งแปลกปลอม หรือทำลายเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามา อันได้แก่ โปรตีน transferrin , lectin, interferon, C-reactive protein, lysozymes, proteases และ chitinases (Ellis, 1999)

4.1.3 Cellular component พบว่าในปลา มี non specific cells components คล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ พบ phagocytic cells, granulocyte (neutrophils), monocytes (macrophages) และ nonspecific cytotoxic cells (NCC) (ประพฤติดี, 2550)

4.2 Adaptive Immunity

ระบบการตอบสนองแบบนี้จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม (Antigen) และการตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดเดิมเป็นครั้งที่ 2 จะมีความรุนแรงและรวดเร็วกว่าการตอบสนองครั้งแรก ทั้งนี้เพราะระบบดังกล่าวนี้มีความสามารถในการจดจำต่อแอนติเจนและความจำเพาะเจาะจงสูงมาก โดยการทำงานดังกล่าวจะอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิดและโปรตีนบนผิวเซลล์เป็นสื่อกลางในการติดต่อสื่อสาร เพื่อการจดจำเชื้อโรค

หรือสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ และกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจงที่เรียกว่า แอนติบอดี หรือ Immunoglobulin (Ig) โดยชนิดของ Immunoglobulin ที่มีรายงานพบในปลากระดูกแข็งมีหลายชนิด ได้แก่ IgM, IgD (Morrison and Nowak, 2002) IgZ (Danilova *et al.*, 2000) และ IgT (Hansen *et al.*, 2005) แอนติบอดีที่ถูกผลิตขึ้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งและทำลายสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจงด้วยกลไกการทำงานหลายรูปแบบ อาทิเช่น ป้องกันการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียที่บริเวณเยื่อผิวต่าง ๆ (anti-adhesins) โดยแอนติบอดีจะเข้าจับกับโปรตีนบนผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้โครงสร้างหรือรูปแบบของโปรตีนบนผนังเซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถเข้าเกาะที่ผิวเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายได้ การลดความเป็นพิษของสารพิษที่แบคทีเรียสร้างออกมา (anti-toxin) เช่นการทำงานของแอนติบอดีในการลดความเป็นพิษของเอนไซม์ metallo-proteinase ที่เชื้อ *Aeromonas salmonicida* สร้างขึ้น (Gudmundsdottir and Magnadottir, 1997) รวมถึงกลไกในการกระตุ้นการทำงานของระบบ Classical Complement Pathway (CCP) โดยเมื่อมีการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนบนเซลล์แบคทีเรียจะมีผลไปกระตุ้นการทำงานของกลุ่มโปรตีน complement ในระบบหมุนเวียน เลือดการทำงานของ complement จะทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลาย (Ellis, 1999)

การทำงานของภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบที่กล่าวมา มีความเกี่ยวข้อง มีการประสานและส่งเสริมกัน โดยเมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคสามารถผ่าน Physical barriers เข้ามาในร่างกายได้ macrophage จะเข้ามาล้อมจับกินสิ่งแปลกปลอมและนำเข้าสู่ม้าม และไต เพื่อนำแอนติเจนเข้าสู่สัมผัสกับ T- และ B-lymphocyte ซึ่งจะเกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น ๆ โดย T-Cells จะผลิต Cytotoxic T-cells เพื่อทำลายเซลล์ผู้บุกรุก ส่วน B- cells จะทำหน้าที่ผลิต แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้น ๆ เพื่อจับเชื้อที่อยู่ในกระแสเลือด และผลิต memory B-cells ซึ่งพร้อมที่จะตอบสนองแบบจำเพาะทันทีที่มีการติดเชื้อดังกล่าวในอนาคตซึ่งอาจนานเป็นเดือนหรือปี ด้วยระบบการทำงานของภูมิคุ้มกันที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสัตว์ชั้นสูงจึงมีการนำความรู้ทางวิทยาภูมิคุ้มกันมาประยุกต์เพื่อใช้ในการดูแลสุขภาพสัตว์น้ำด้วยการวิจัยและพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ (ประพฤติกิตติ, 2550)

5. วัคซีน

วัคซีนเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่เตรียมจากจุลชีพ หรือส่วนประกอบของจุลชีพที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ โดยที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ได้รับให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค เซลล์ผิดปกติ หรือสารพิษ การใช้วัคซีนเป็นความพยายามเลียนแบบธรรมชาติในการต่อสู้กับ

เชื้อโรค วัคซีนจะทำให้ร่างกายพร้อมที่จะต่อสู้และกำจัดเชื้อโรคหรือสารพิษก่อนที่จะก่อโรค หรือหากเกิดโรคก็ทำให้มีอาการของโรคหรืออาการแทรกซ้อนจากโรคน้อยที่สุด โดยใช้ effector mechanisms ทั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสารน้ำ (humoral immune response หรือ HIR) และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immune response หรือ CMIR) (ประวรรณ, 2546) โดยทั่วไปแล้ววัคซีนมักจะหมายถึงผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อหรือโรคที่ยังไม่เกิด (preventive vaccine) การให้วัคซีนก่อนผู้ได้รับวัคซีนจะสัมผัสโรคเรียกว่า การป้องกันก่อนได้รับเชื้อ (pre-exposure prophylaxis) ซึ่งเป็นรูปแบบการใช้วัคซีนที่ปฏิบัติกันบ่อยที่สุด หากร่างกายสัมผัสกับเชื้อโรคแล้วจึงให้วัคซีนจะเรียกว่าการป้องกันหลังได้รับเชื้อ (post – exposure prophylaxis) ส่วนการให้วัคซีนเพื่อลดอาการและพยาธิสภาพของโรคจะเรียกว่า การให้วัคซีนเพื่อบำบัดโรค (therapeutic vaccination) (ประวรรณ, 2546)

การใช้วัคซีนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำถือว่าเริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะในระบบการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มปลา salmon ที่มีการใช้วัคซีนอย่างแพร่หลายและให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระบบการเลี้ยงได้เป็นที่น่าพอใจ ดังเช่นการใช้วัคซีนป้องกันโรค Enteric Redmouth (ERM) ในลูกปลา salmon ในระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น (Ellis, 1988c) และการใช้วัคซีนยังสามารถลดอัตราการตายของปลา rainbow trout ได้ถึง 84 เปอร์เซ็นต์จากการเก็บข้อมูลในฟาร์มเลี้ยง 3 แห่งในช่วงระยะเวลา 2 ปี (Tebbit *et al.*, 1981)

ประเภทของวัคซีน วัคซีนที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทหลัก ๆ คือ

5.1 วัคซีนเชื้อตาย (inactivated vaccine)

วัคซีนประเภทนี้เตรียมจากเชื้อโรคที่ถูกฆ่าด้วยสารเคมีหรือความร้อน จัดเป็นวัคซีนที่มีความคงตัวสูงและปลอดภัยเพราะเชื้อโรคที่ใช้เตรียมนั้นจะไม่กลับเป็นเชื้อโรคที่รุนแรงได้อีก

5.2 วัคซีนเชื้อเป็นแต่อ่อนฤทธิ์ (Live attenuated vaccine)

วัคซีนประเภทนี้ได้จากการนำเชื้อโรคมานำเพาะพันธุ์ในสภาวะพิเศษต่าง ๆ ของห้องปฏิบัติการ ทำให้ความรุนแรง (Virulence) ของเชื้อลดหายไป วัคซีนประเภทนี้เสื่อมง่ายถ้าเก็บ

รักษาไม่ดี แต่มีข้อดีที่การกระตุ้นเพียงครั้งเดียวก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดภูมิคุ้มกันชนิด HIR และชนิด CMIR (ประวรรณ, 2546) ข้อพึงระวังของวัคซีนประเภทนี้คือการที่เชื้ออาจเปลี่ยนแปลงกลับมาเป็นเชื้อที่รุนแรงขึ้นได้อีก (Gudding *et al.*, 1999)

5.3 วัคซีนที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ

วัคซีนกลุ่มนี้สามารถแบ่งย่อยได้หลายประเภท เช่น วัคซีนหน่วยย่อยที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (Subunit recombinant vaccine), วัคซีนเชื้อเป็นอาศัยเชื้ออื่นเป็นพาหะ (lived vector vaccine) และ วัคซีนดีเอ็นเอ (DNA vaccine) (ประวรรณ, 2546) งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้วัคซีนที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพในการเลี้ยงสัตว์น้ำแสดงให้เห็นถึงโอกาสความเป็นไปได้ในการพัฒนาวัคซีนกลุ่มนี้เพื่อใช้ในวงการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเช่นเดียวกับการใช้ในสัตว์บกทั่วไป Anderson *et al.* (1996) เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่ฉีดวัคซีนพลาสมิดหรือวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนในการสร้าง glycoprotein จากเชื้อ rhabdovirus ที่ก่อให้เกิดโรค infectious haematopoietic necrosis (IHN) ให้กับลูกปลา trout พบว่าลูกปลาเหล่านี้สามารถสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อดังกล่าวซึ่งสามารถตรวจสอบโดยเทคนิค ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) และต่อมาได้นำปลาชุดดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดโรค โดยการใส่เชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงลงในน้ำ พบว่า ลูกปลาในชุดควบคุมตายถึง 75% ในขณะที่ปลาที่ได้รับวัคซีนนั้นมีอัตราการตายเพียง 15-17% ส่วน Lorenzen *et al.* (1998) ได้ฉีดวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนสร้างไกลโคโปรตีนจากเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค viral haemorrhagic septicemia (VHS) พบว่า สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา trout และป้องกันการตายจากโรคติดเชื้อดังกล่าว วัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนสร้าง glycoprotein จาก rhabdovirus สามารถสร้าง interferon ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ป้องกันไวรัสได้

6.วิธีการให้วัคซีน วิธีการให้วัคซีนในสัตว์น้ำโดยทั่วไปแบ่งออกได้ 3 วิธี คือ

6.1 การให้วัคซีนโดยการฉีด

เป็นการให้วัคซีนโดยฉีดเข้าในตัวสัตว์น้ำได้โดยตรง ในตำแหน่งต่าง ๆ เช่นการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและการฉีดเข้าช่องท้อง การให้วัคซีนโดยการฉีดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพราะสามารถทราบปริมาณวัคซีนที่ปลาได้รับ แต่ข้อเสียของการให้โดยวิธีนี้คือการฉีดจะสร้างความเครียดให้กับปลาทำให้เกิดความเครียดโดยเฉพาะในปลาขนาดเล็ก โดยขนาดปลาที่เหมาะสมสำหรับการให้ด้วยวิธีนี้ควรมีน้ำหนักมากกว่า 15 กรัมขึ้นไป การใช้ยาสดบเพื่อสะดวกในการ

ทำงานและลดความเครียดและอาการบาดเจ็บในปลาก่อนที่จะได้รับวัคซีน เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถทำได้ ในลักษณะการแช่ปลาในน้ำที่เติมยาสลบเช่น MS 222 หรือ Benzocaine ก่อนที่จะลำเลียงปลาขึ้นมาทำการฉีดวัคซีนและปล่อยลงกลับในสถานที่เลี้ยงต่อไป อย่างไรก็ตามการฉีดก็ยังมีข้อเสียเปรียบคือจะใช้ได้กับเฉพาะการเลี้ยงในระบบปิดและต้องใช้แรงงานจำนวนมากในการปฏิบัติงาน (Horne and Ellis, 1988)

6.2 การให้วัคซีนโดยวิธีการแช่

เป็นวิธีการนิยมใช้ในลักษณะการให้วัคซีนในสัตว์น้ำขนาดเล็กปริมาณมาก ๆ พร้อมกัน เป็นวิธีที่สะดวกเหมาะสมกับการให้วัคซีนในลูกปลานขนาดเล็กกว่า 10 กรัมลงไป เป็นวิธีที่สร้างความเครียดและอาการบาดเจ็บให้กับปลาน้อยกว่าการฉีด และมีความคุ้มค่าในแง่ของต้นทุนค่าวัคซีนและแรงงาน ระหว่างการแช่สารละลายวัคซีนจะถูกดูดซึมผ่านเข้าสู่ตัวปลาในบริเวณเหงือกและเส้นข้างลำตัว (Navot *et al.*, 2004) แต่หากมีบาดแผลก็จะเป็นอีกตำแหน่งที่วัคซีนจะถูกนำเข้าสู่ตัวปลาได้เช่นกัน ดังเช่นการศึกษาของ Nakanishi *et al.* (2002) ที่แสดงให้เห็นว่าการสร้างบาดแผลเล็ก ๆ ที่ผิวหนังปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Multiple puncture instrument ก่อนแช่ปลาดังกล่าวในวัคซีนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ใกล้เคียงกับการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องคือ ปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธี Multiple puncture instrument มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมในการทดสอบความคุ้มโรคเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่การฉีดเข้าช่องท้องมีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเท่ากับ 35 เปอร์เซ็นต์

การให้วัคซีนโดยวิธีการแช่สามารถแบ่งย่อยได้อีก 4 วิธีหลัก ๆ ตามเทคนิควิธีการและระยะเวลาในการแช่ดังที่ Smith (1988) ได้ให้รายละเอียดไว้ดังนี้

6.2.1 การแช่แบบ direct immersion ซึ่งจะเป็นลักษณะที่แช่ปลาลงในสารละลายวัคซีนโดยตรง อาจจะแยกเป็น การแช่ระยะสั้น (Dip vaccination) ซึ่งจะใช้ระยะเวลาในการแช่เป็นวินาทีหรือนาที และการแช่ระยะยาว (Bath vaccination) ที่ใช้ระยะเวลานานเป็นชั่วโมงในการแช่ ทั้งนี้ขึ้นกับระดับความเข้มข้นของวัคซีนที่ใช้และจำนวนครั้งในการให้วัคซีน

6.2.2 การแช่แบบ hyperosmotic immersion เป็นวิธีการเพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านของแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายได้มากขึ้น โดยทำให้ร่างกายของปลาเกิดการสูญเสียน้ำอันเนื่องจากการแช่ในสารละลายน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85-8.0 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง

ก่อนนำไปแช่ต่อในสารละลายวัคซีน ซึ่งร่างกายปลาจะดูดกลืนน้ำเข้าร่างกายอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย การแช่วัคซีนด้วยวิธีนี้จึงสามารถเพิ่มปริมาณวัคซีนที่เข้าร่างกายปลาได้มากกว่าการแช่แบบ direct immersion เมื่อเปรียบเทียบจากระยะเวลาการแช่ที่เท่ากัน แต่วิธีนี้จะส่งผลให้เกิดความเครียดในตัวปลาได้ในระดับหนึ่ง

6.2.3 การแช่แบบ vacuum หรือ hyperosmotic infiltration เป็นการแช่วัคซีนภายใต้สภาวะที่มีการลดและเพิ่มความกดอากาศ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของความกดอากาศจะสามารถช่วยเพิ่มปริมาณแอนติเจนให้เข้าสู่ตัวปลาได้มากขึ้น

6.2.4 การพ่นวัคซีน Spray vaccination นิยมใช้วิธีนี้กับปลาขนาดใหญ่โดยฉีดพ่นวัคซีนลงบนบริเวณที่มีลักษณะของเยื่อเมือกเช่น ผิวหนัง เส้นข้างลำตัว ช่องจมูก เพื่อให้วัคซีนซึมผ่านเข้าสู่ร่างกายและกระตุ้นในส่วนของระบบภูมิคุ้มกันในเยื่อเมือก

6.3 การให้วัคซีนโดยการผสมอาหาร

เป็นการให้วัคซีนในลักษณะการผสมลงในอาหารซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกในแง่ของการจัดการ เหมาะสำหรับการเลี้ยงแบบ Extensive ในบ่อเลี้ยงขนาดใหญ่ซึ่งมีการจับปลาเพียงครั้งเดียวในช่วงจับขายเท่านั้น วิธีการนี้สามารถใช้ได้กับปลาทุกขนาดโดยไม่ก่อให้เกิดความเครียดและให้กับปลาที่ละจำนวนมาก ๆ ได้อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวนี้ ให้ผลในการป้องกันโรคค่อนข้างต่ำเนื่องจากปริมาณวัคซีนที่ปลาแต่ละตัวได้รับมีปริมาณไม่แน่นอนตามปริมาณการกินอาหารและพบว่าปริมาณวัคซีนส่วนหนึ่งจะถูกทำลายเมื่อผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน (ชนกันต์, 2544) ซึ่งปัญหาดังกล่าวทำให้มีความพยายามในการพัฒนาวิธีการเพื่อป้องกันหรือลดการถูกทำลายของวัคซีนในทางเดินอาหาร ดังเช่น การศึกษาของ Romalde *et al.* (2004) ที่ได้ทำการเคลือบห่อหุ้มวัคซีนไว้ในไมโครแคปซูล โดยภายหลังการให้วัคซีนผ่านไป 16-24 ชั่วโมงสามารถตรวจพบไมโครแคปซูลในทางเดินอาหารตอนปลายได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไมโครแคปซูลสามารถทนต่อสภาพที่เป็นกรดและเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนต้นได้ ส่วนในการศึกษาการใช้ liposome ซึ่งมีลักษณะเป็นถุง vesicle ที่มีชั้นของ phospholipid ที่มีคุณสมบัติทนต่อสภาพความเป็นกรด และการย่อยของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร โดยเมื่อนำ Bovine Serum Albumin (BSA) ที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนใส่ใน liposome แล้วนำไปให้ปลา carp กินเพื่อกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งพบว่า ปลา carp ที่ได้รับ BSA ที่บรรจุใน liposome มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ Bovine Serum Albumin โดยตรวจวัดได้ทั้งใน ซีรัม

เมื่อกินทางเดินอาหาร และน้ำดื่ม ในปริมาณที่สูงกว่าปลา carp ที่ได้รับ BSA ที่ไม่ได้บรรจุใน liposome อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Irei *et al.*, 2003)

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการให้วัคซีน

ทั้งในส่วนของปัจจัยจากภายในตัวสัตว์น้ำ (อายุ ขนาดและ ความแข็งแรง) และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับวัคซีนรวมถึงปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (วิธีการให้ ปริมาณวัคซีนที่ใช้ การใช้ adjuvant และอุณหภูมิน้ำ) ล้วนแล้วแต่มีผลต่อการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันที่จะตอบสนองต่อวัคซีนที่สัตว์น้ำได้รับ และมีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันโรคต่าง ๆ ของวัคซีน การจัดการในด้านการเลี้ยงให้มีสภาพที่เหมาะสมจะช่วยยกระดับประสิทธิภาพของวัคซีนให้เพิ่มสูงขึ้นได้ Ellis (1988b) ได้อธิบายถึงปัจจัยที่ควรพิจารณาเพื่อการใช้วัคซีนอย่างมีประสิทธิภาพดังนี้

7.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลมาจากสภาพการเลี้ยง

ตัวอย่างเช่น การเลี้ยงในสภาพความหนาแน่นสูง คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม การขนย้าย ซึ่งจะทำให้เกิดความเครียดในตัวสัตว์น้ำโดยจะไปมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้การตอบสนองต่อวัคซีนที่ให้ลดน้อยลง สารอาหารที่สัตว์น้ำควรได้รับในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เช่น วิตามินซี และวิตามินอี มีส่วนสำคัญในการเสริมสร้างการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ดังเช่นลูกปลา channel catfish ที่ได้รับปริมาณวิตามินซี ที่มากเกินไปจะช่วยให้เพิ่มความต้านทาน เชื้อก่อโรค *Edwardsiella tarda* และ *E. ictaluri* และลูกปลาที่ได้รับวิตามินในระดับความเข้มข้นที่มากเกินไปจะช่วยให้เพิ่มการตอบสนองการสร้างแอนติบอดี (Durve *et al.*, 1982) ในขณะที่การได้รับปริมาณวิตามินอี ที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 3-4 เดือนในปลา rainbow trout จะส่งผลต่อการตอบสนองการสร้างแอนติบอดี และขบวนการ phagocytosis ในระบบภูมิคุ้มกัน (Blazer *et al.*, 1984) ในส่วนของอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมที่มักจะมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิและฤดูกาล ซึ่งมีรายงานจากการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในตัวสัตว์น้ำจะลดลงเมื่ออุณหภูมิภายนอกลดต่ำลง ดังเช่นผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำอย่างกระทันหันที่พบว่า มีผลต่อปริมาณเซลล์ phagocyte ในระบบภูมิคุ้มกันของปลากระรังและปลากระพงขาวที่มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (เขยานิตย์ และจิรนนท์, 2544) และยังพบว่าปลาที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิที่ต่ำกว่าช่วงที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตจะส่งผลให้การผลิตแอนติบอดีในร่างกายเกิดขึ้นช้าลงและอาจยับยั้งการเกิดการจดจำในระบบภูมิคุ้มกัน

(Immune memory) ดังเช่นการศึกษาปริมาณการผลิตแอนติบอดีในปลา Atlantic salmon ที่ได้รับวัคซีนและเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณต่ำกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนและเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส (Gudding *et al.*, 1999)

7.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประเภทและวิธีการใช้วัคซีน

ปัจจัยที่มีความสำคัญในด้านการบริหารจัดการและเป็นที่ได้รับความสนใจในการศึกษาถึงแนวทางการปฏิบัติที่จะนำไปสู่ประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรค เช่นความเข้มข้นของวัคซีน (แอนติเจน) ที่ปลาได้รับพบว่ามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองในการผลิตแอนติบอดีของระบบภูมิคุ้มกัน แต่การกระตุ้นให้เกิดการจดจำของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจะมีความสัมพันธ์กับประเภทของวัคซีนที่ใช้มากกว่า ในส่วนของวิธีการให้วัคซีน (Palm *et al.*, 1998 อ้างตาม Gudding *et al.*, 1999) ได้แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการให้วัคซีนโดยการฉีด การแช่ และการผสมอาหาร โดยการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม มีความสัมพันธ์กัน แต่สำหรับการแช่และการผสมอาหารจะสามารถตรวจพบการสร้างแอนติบอดีหลังจากมีการให้วัคซีนกระตุ้นซ้ำเท่านั้น

7.3 ปัจจัยจากภายในตัวสัตว์น้ำ

อายุและขนาดของปลาที่ได้รับวัคซีน ในลูกปลาวัยอ่อนโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันยังมีการพัฒนาไม่สมบูรณ์เหมือนในปลาเต็มวัย โดยเฉพาะการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งทำให้อายุและขนาดของปลากลายเป็นปัจจัยที่จะส่งผลต่อการตอบสนองของวัคซีนที่ใช้ การศึกษาในลูกปลา rainbow trout อายุ 1 สัปดาห์ ที่ได้รับวัคซีนโดยการแช่ ไม่ปรากฏการสร้างแอนติบอดีตอบสนองวัคซีนที่ให้ แต่จะพบการตอบสนองในปลาอายุ 4 สัปดาห์ ส่วนการตอบสนองในด้านการจดจำ (memory immune response) จะพบได้ในลูกปลาอายุ 8 สัปดาห์ขึ้นไป (Tatner, 1986) ในส่วนของระยะเวลาในการป้องกันโรคของวัคซีนก็พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับอายุและขนาดของปลาที่ได้รับวัคซีนเช่นเดียวกัน โดยในการศึกษาของ ซลิดา และนันทวิทย์ (2537) พบว่า ปลาอุกอุณหภูมิที่มีน้ำหนักตัวมากกว่า 1 กรัมขึ้นไป มีการตอบสนองต่อการให้วัคซีนโดยวิธีการแช่ได้ดีกว่าลูกปลาที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 1 กรัม ส่วนการทดลองการใช้วัคซีนป้องกันโรค ERM และ Vibriosis ในปลา rainbow trout พบว่า ในลูกปลาน้ำหนัก 1 กรัมการให้วัคซีนจะให้ระยะเวลาในการป้องกันโรคประมาณ 120 วัน ส่วนลูกปลาขนาด 2 กรัมจะมีระยะเวลาในการป้องกันโรคของวัคซีนที่ยาวนานกว่าคือ 180 วัน (Tatner

and Horne, 1983) ในขณะที่ใช้วัคซีนในปลาขนาด 4 กรัม จะเพิ่มระยะเวลาในการป้องกันโรค ยาวนานกว่า 1 ปี (Johnson *et al.*, 1982)

8. การใช้วัคซีนในการป้องกันโรค Streptococcosis

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis ในระบบการเลี้ยงปลาเศรษฐกิจหลายชนิด แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ในการพัฒนาวัคซีนเพื่อควบคุมการเกิดโรค ซึ่งมีการพัฒนาทั้งในส่วนของตัววัคซีนที่ใช้ เทคนิควิธีการให้และการศึกษาปัจจัยที่มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้วัคซีน

ตัวอย่างการศึกษาการใช้วัคซีนในการป้องกันโรค Streptococcosis ในต่างประเทศมีรายงานดังนี้

Iida *et al.* (1981) ได้ทำการศึกษาวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. iniae* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินแก่ปลาหางเหลือง (*S. quinquerediata*) เพื่อป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis ด้วยวิธีการให้วัคซีนผสมอาหาร เปรียบเทียบกับวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและการแช่แบบ hyperosmotic infiltration ซึ่งพบว่าการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมีประสิทธิภาพสูงสุดในด้านความต้านทานโรค ในขณะที่วิธีการแช่แบบ hyperosmotic infiltration มีประสิทธิภาพลดลงมาและการให้วัคซีนผสมอาหารมีประสิทธิภาพต่ำสุด

Sakai *et al.* (1987) ทดลองให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. iniae* ในปลา rainbow trout โดยการเตรียมวัคซีนและวิธีการให้ที่แตกต่างกัน คือ การให้วัคซีนชนิดเชื้อตาย (formalin-killed vaccine) ผสม adjuvant การให้วัคซีนชนิดเชื้อตาย (formalin-killed vaccine) ไม่ผสม adjuvant โดยการฉีดเข้าช่องท้องและการแช่ปลาในสารละลายวัคซีนชนิดเชื้อตายเป็นระยะเวลา 3 นาที ผลการศึกษาพบว่า วิธีการแช่ให้ผลในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคดีกว่าวิธีการฉีด 70 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดของปลา เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรคและพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีน เมื่อนำส่วนของเลือดและไตมาตรวจสอบ พบว่าไม่มีการติดเชื้อที่อวัยวะดังกล่าว

Akhlaghi *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ passive และ active immunization ที่มีต่อโรค Streptococcosis ในปลา rainbow trout โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าในเหงา กระต่าย และปลา rainbow trout จากนั้นแยกเอาส่วนของแอนติ-

บอดี (Anti-*Streptococcus* sp. Antibody : ASA) ฉีดกลับเข้าไปในปลาอีกครั้งแล้วติดตามผลด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ซึ่งพบว่าปลาที่มีการสร้างแอนติบอดีได้ยาวนานกว่า 60 วันหลังการฉีดวัคซีนและมีการตอบสนองแบบ Humoral Immune Response ต่อ ASA ที่ได้รับภายในระยะเวลา 2 เดือน ส่วนการทดสอบ active immunization โดยการฉีดและแช่ในสารละลายวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp. เมื่อทำการทดสอบความคุ้มโรค พบว่าในเดือนแรกค่า Relative Percent Survival (RPS) ของปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดและการแช่ มีค่าเท่ากับ 88.1 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเดือนที่สองพบว่ามีค่า RPS ลดลงคือ 38.1 และ 4.7 เปอร์เซ็นต์ และในเดือนที่ 3 ค่า RPS ที่คำนวณได้ในกลุ่มของปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการแช่มีค่าเท่ากับ 0 ดังจะเห็นได้ว่า ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีนที่ปลาได้รับจะมีระดับลดต่ำลงเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงผ่านไปมากขึ้น

Eldar *et al.* (1997) ทำการศึกษาการใช้วัคซีนชนิดเชื้อตาย (formalin-killed vaccine) ที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus iniae* ในฟาร์มเลี้ยงปลา rainbow trout โดยการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีการตอบสนองโดยสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อและสามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมได้ยาวนานกว่า 6 เดือน และมีอัตราการรอดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อัตราการรอดตายของปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนมีเพียง 50 เปอร์เซ็นต์

Klesius *et al.* (1999) รายงานถึงประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจากเชื้อ *S. iniae* โดยวัคซีนประกอบด้วยส่วนของเซลล์แบคทีเรีย (Whole cell) และสารโปรตีนที่เซลล์แบคทีเรียผลิตออกมา (Extracellular product) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 kDa โดยฉีดเข้าช่องท้องปลานิล น้ำหนักเฉลี่ย 25 และ 100 กรัม ผลการทดสอบความคุ้มโรคภายหลังจากที่ปลาได้รับวัคซีนผ่านไปเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีน มีจำนวนการตายและแสดงอาการของโรคน้อยกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีน โดยค่า RPS ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 84 ถึง 100

Klesius *et al.* (2000) ได้ทำการพัฒนาวัคซีนให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค Streptococcosis เพิ่มสูงขึ้น โดยการเตรียมวัคซีนจากเชื้อ *S. iniae* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค 2 isolates ARS-10 และ ARS-60 และทำการทดสอบเปรียบเทียบกับการให้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ 1 isolate ARS-10 โดยการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องและฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ผลการทดสอบความคุ้มโรคภายหลังให้วัคซีนผ่านไป 30 วัน พบว่า ปลานิลที่ได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ ARS-10 โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อทดสอบด้วยเชื้อก่อโรค ARS-60 (heterologous isolate) ค่า RPS ที่ได้มีค่าสูงถึง 93.7 % โดยมีค่าสูงกว่าเมื่อทดสอบด้วยเชื้อโรค isolate ARS-10 ที่ใช้ในการเตรียมวัคซีน

(RPS เท่ากับ 45.6 %) เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลที่ได้รับวัคซีน (ARS-10) โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (RPS เท่ากับ 17.7) และ ในขณะที่ปลานิลที่ได้รับวัคซีน ARS-10+ARS- 60 โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ จะให้ค่า RPS เมื่อทดสอบด้วยเชื้อก่อโรค ARS-10 เท่ากับ 63.1 และ 87.3 % เมื่อทดสอบด้วยเชื้อก่อโรค ARS-60 ผลการทดลองนี้แสดงว่าวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ 2 isolates มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคสูงกว่าวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อเพียง isolate เดียว ARS-10 เมื่อทำการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อเหมือนกัน ซึ่งการเพิ่ม antigenic heterogeneity ในวัคซีนเชื้อรวม (ARS-10+ARS- 60) น่าจะมีส่วนสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันโรคของวัคซีนได้

Nakanishi *et al.* (2002) ทำการพัฒนาวิธีการให้วัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis ในปลา rainbow trout ที่เรียกว่า Multiple puncture immersion method ซึ่งเป็นการสร้างบาดแผลเล็กให้เกิดขึ้นบนตัวปลาด้วยอุปกรณ์ที่เรียกว่า multiple puncture instrument บาดแผลเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นจะเป็นช่องทางให้วัคซีนเข้าสู่ตัวปลาได้ดียิ่งขึ้น ปลาที่ผ่านวิธีการนี้จะถูกนำไปแช่ในสารละลายวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. iniae* และทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและการแช่ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธี Multiple puncture immersion method มีระดับการป้องกันการเกิดโรคใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง และมีระดับสูงกว่าการแช่แบบธรรมดา

Evans *et al.* (2004) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายที่ประกอบด้วยเซลล์แบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินและสารที่แบคทีเรียผลิตออกมา (Extracellular products) ในปลานิลขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 5 กรัม และ 30 กรัม ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและวิธีการแช่ ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคสูงกว่าการให้วัคซีนโดยวิธีการแช่ โดยเฉพาะการให้วัคซีนในปลานิลขนาด 30 กรัม แต่ในขณะที่ในปลานิลขนาด 5 กรัม กลับพบว่าการให้วัคซีนโดยการฉีดมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการให้โดยการแช่ ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าขนาดของปลาจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงในด้านการจัดการเกี่ยวกับการใช้วัคซีนในการเลี้ยงปลา

Pasnik *et al.* (2006) ศึกษาวิธีการ Passive immunization โดยการให้แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *S. agalactiae* ที่ได้จากการฉีดเชื้อกระตุ้นในปลานิลตัวเต็มวัย เมื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปฉีดเข้าช่องท้องลูกปลานิล พบว่าลูกปลาสามารถต้านทานต่อการเกิดโรค Streptococcosis สูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับการฉีดแอนติบอดี (กลุ่มควบคุม) เมื่อทำการทดสอบความ

คุ้มโรค จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคระบาดในปลาได้

ในส่วนการศึกษาวัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาเพิ่มมากขึ้นในช่วง 4-5 ปี ดังนี้

Prasad (2002) ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ในปลานิลแดงขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 150 กรัม โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและเก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีในซีรัม ซึ่งพบว่า ภายหลังการให้วัคซีนเข็มแรกค่าแอนติบอดีไทเตอร์ที่ตรวจพบ มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2 แต่เมื่อฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนเข็มที่ 2 สามารถยกระดับค่าแอนติบอดีได้โดยค่าไทเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น 101.3 ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจดจำของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นทำให้การตอบสนองต่อวัคซีนในครั้งที่สองเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรงกว่าครั้งแรก และจากการทดลองแช่ดูปลานิลแดงในสารละลายวัคซีนเชื้อดังกล่าว ภายหลังการทดสอบความคุ้มโรคด้วยการแช่พบว่า ค่า RPS ของปลาที่ได้รับวัคซีนมีค่าเท่ากับ 42.5 ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานบ่งบอกถึงการให้วัคซีน โดยการแช่ยังให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไม่ดีพอ

ธีราภรณ์ และคณะ (2548) ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยวิธีการผสมอาหาร ปลานิลทดลองมีอายุ 5 เดือน และมีน้ำหนักเฉลี่ย 230.00 ± 5.71 กรัม หลังจากได้รับวัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ KKU 44002 ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ จึงนำปลามาทดสอบความคุ้มโรค โดยการฉีดเชื้อเป็น *S. agalactiae* สายพันธุ์ KKU 44002 พิจารณาจากอัตราการตายและค่า Relative Percent Survival (RPS) ซึ่งพบว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีน โดยวิธีการผสมอาหารเป็นเวลาตั้งแต่ 6 สัปดาห์ขึ้นไปมีอัตราการตายต่ำกว่าปลานิลในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และค่า RPS ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 53% ผลทดลองชี้ให้เห็นว่าการให้วัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis โดยการผสมอาหารในปลานิล สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทานของปลานิลต่อโรคนี้ได้

นิลุบล และคณะ (2549) ศึกษาเกี่ยวกับความเป็นไปได้การให้วัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis ในการเลี้ยงปลานิล ทั้งในสภาพห้องทดลองและในสภาพการเลี้ยงจริง สำหรับการศึกษานในห้องปฏิบัติการ การให้วัคซีนจะใช้วิธีการฉีด โดยเปรียบเทียบการฉีดเข้าช่องท้องและ

การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปลาชนิดที่ใช้ในการศึกษามีขนาด 230.0 ± 5.7 กรัม วัคซีนที่ใช้เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ KKU 44002 ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน จากผลการศึกษาพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดสัมผัสสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมีค่า RPS และอัตราการรอดสัมผัสสูงกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริง ทดลองกับ ปลาชนิดที่เลี้ยงในกระชังของเกษตรกร ในแม่น้ำชี อ. ท่าประทาย จ. มหาสารคาม ปลาจำนวน 2 กระชัง จากทั้งหมด 7 กระชัง ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ผ่านการฆ่าด้วยฟอร์มาลิน เข้าทางช่องท้อง พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดเฉลี่ยสะสมสูงถึง 97.5 % ในขณะที่ปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดสะสมเท่ากับ 73 % แสดงให้เห็นว่าการใช้วัคซีนสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายของปลาชนิดที่เลี้ยงได้เพิ่มสูงขึ้น

วิศณุ และคณะ (2550) ศึกษาการใช้วัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis ในลูกปลานิล โดยเตรียมวัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ด้วยวิธี formalin-killed โดยลูกปลานิลขนาด 3 กรัมจะได้รับการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (10^3 , 10^6 และ 10^9 เซลล์/มล.) การทดสอบความคุ้มโรคภายหลังการให้วัคซีนผ่านไป 12 วัน โดยการฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล. พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคุ้มโรค (RPS) ของกลุ่มการทดลองที่ได้รับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 10^3 , 10^6 และ 10^9 เซลล์/มล. มีค่าเท่ากับร้อยละ -6.25, 31.25 และ 62.5 ตามลำดับ สรุปว่าวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล. สามารถสร้างความต้านทานต่อการเกิดโรค Streptococcosis ในลูกปลานิลได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ลูกปาลานิลแปลงเพศอายุ 21 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 0.26 กรัม
2. ปาลานิลแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัม
3. กระชังในลอนขนาด 4 X 4 X 2 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 12 กระชัง
4. บ่อซีเมนต์ ขนาด 1.2 X 1.2 X 1 ลูกบาศก์เมตร
5. ตู้กระจกขนาดความจุ 150 ลิตร
6. โหลแก้วขนาดความจุ 15 ลิตร
7. โหลแก้วขนาดความจุ 2 ลิตร
8. อาหารเม็ดลอยน้ำสำหรับปาลานิลโปรตีน 28-30 %
9. อาหารกบเม็ดเล็กโปรตีน 40 %
10. อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 10.1 Brain Heart Infusion Agar (BHIA)
 - 10.2 Brain Heart Infusion Broth (BHB)
 - 10.3 Tryptic soy Agar + Human Blood 5 %
11. สารเคมี
 - 11.1 ฟอร์มาลิน
 - 11.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %
 - 11.3 เกลือ
 - 11.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
 - 11.5 1% tetramethyl-p-phenylene-diaminehydrochloride
 - 11.6 Heparin lithium salt
12. เครื่องแก้ว
 - 12.1 Erlenmeyer flask ขนาด 200, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
 - 12.2 Beaker ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
 - 12.3 Cylinder ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร

- 12.4 Pipette ขนาด 10 และ 20 มิลลิลิตร
- 12.5 Test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 12.6 Conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร
- 12.7 Petri dish
- 12.8 Triangle
- 12.9 Slide และ Cover slide

- 13. Loop เขี่ยเชื้อ
- 14. Micropipette และ Multichannel Pipette
- 15. อุปกรณ์ฉีดวัคซีน
 - 15.1 Auto injector
 - 15.2 กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
 - 15.3 เข็มฉีดยาขนาด 26G X 1 นิ้ว และ ขนาด 27G X 1 นิ้ว
 - 15.4 ขวดใส่วัคซีน

- 16. Microagglutination plates
- 17. ชุดสีย้อมแกรม
- 18. ชุดทดสอบจำแนกชนิดแบคทีเรีย API 20 STREP (Biomérieux)
- 19. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 20. เครื่องเขย่า Water Bath Shaker
- 21. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- 22. เครื่องปั่นตกตะกอน (Centrifuge)
- 23. เครื่องเขย่าตะกอน (Vortex mixer)
- 24. เครื่อง Spectrophotometer
- 25. เครื่องชั่งวัดทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง
- 26. กล้องจุลทรรศน์
- 27. เครื่อง Dissolved oxygen meter รุ่น YSI model 52
- 28. pH- meter
- 29. ชุดทดสอบน้ำสำเร็จรูป Tetratest, Germany

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดแบคทีเรีย

1.1 เก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากปาลานิลที่แสดงอาการของโรค Streptococcosis ในบริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลของบริษัทโกรเบสท์ มารีนจำกัด ซึ่งตั้งอยู่ที่อำเภอเขาชัย จังหวัดเพชรบุรี เก็บตัวอย่างเชื้อด้วยวิธีปลอดเชื้อจากอวัยวะภายใน อันได้แก่ ตับ ม้าม ไตส่วนหลัง และสมอง โดยใช้ Loop ที่เผาไฟแล้วเขี่ยเชื้อจากอวัยวะลงบนอาหาร BHIA ด้วยวิธี Simple Streak เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำไปป้อนในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะของโคโลนีกลมเล็ก สีขาวขุ่น ขอบเรียบ และขึ้นเป็นจำนวนมากที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารใหม่ ด้วยวิธี Cross Streak เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์

1.3 จำแนกกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ได้โดยเทคนิคการย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่างของเซลล์และคุณสมบัติของผนังเซลล์ เชื้อแกรมบวก รูปร่างกลม จะถูกคัดเลือกเพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase เพื่อใช้แยกเชื้อในสกุล *Streptococcus* ออกจากเชื้อในสกุล *Staphylococcus* และทดสอบคุณสมบัติในการย่อยเม็ดเลือดแดง โดยเขี่ยเชื้อแบบ Simple Streak ลงบน blood agar และจำแนกชนิดของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่เก็บได้โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 STREP เพื่อคัดเลือกชนิดของเชื้อก่อนนำไปศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือก isolate ของเชื้อเพื่อใช้ในการเตรียมวัคซีนและการทดสอบความคุ้มโรค

คัดเลือก isolate ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคในปลานิลโดยฉีดเชื้อในระดับความเข้มข้นและปริมาณที่มากพอที่จะสามารถก่อโรคในปลาที่นำมาทดสอบทั้งหมดเกินกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีวิธีการดังนี้

2.1 นำปลานิลแปลงเพศขนาดประมาณ 40-50 กรัม เลี้ยงปรับสภาพในตู้กระจกขนาดความจุ 150 ลิตร จำนวน 5 ตัวต่อตู้ทั้งหมด 3 ตู้ เป็นระยะเวลา 3 วัน

2.2 เตรียมเชื้อ *S. agalactiae* โดยเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการปั่นแยกตัวเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 2,500 รอบต่อนาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ก่อนปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียโดยการวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ระดับความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ให้ได้สารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^9 , 10^{12} และ 10^{15} cfu/ml

2.3 นำเชื้อที่เตรียมได้ในแต่ละระดับความเข้มข้นฉีดเข้าช่องท้องปลานิลที่เตรียมไว้ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

2.4 สังเกตและตรวจนับจำนวนปลาที่ตายหรือแสดงอาการของโรค ในแต่ละระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ฉีดเป็นระยะเวลา 14 วัน นำตัวอย่างปลาที่แสดงอาการมาเช็ชเชื้อเพื่อยืนยันสาเหตุของการเกิดโรค โดย isolate และระดับความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* ที่สามารถก่อโรคในปลานิลที่นำมาทดสอบได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ จะถูกใช้ในการเตรียมวัคซีนและทดสอบความคุ้มโรคต่อไป

3. การเตรียมวัคซีน

วัคซีนที่ใช้ศึกษาครั้งนี้เป็นวัคซีนประเภทเชื้อตาย (Formalin-Killed) โดยวิธีการเตรียมตามวิธีของ นนทวิทย์ (2537)

3.1 นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* isolate ที่คัดเลือกไว้ เลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.2 จากนั้นปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 2,500 รอบต่อนาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติมน้ำเกลือลงในตะกอนแบคทีเรีย เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer

3.3 เติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนโดยนำมาเจือจางลงบนอาหาร BHI agar เพื่อตรวจสอบการตายของเซลล์แบคทีเรีย หากไม่มีโคโลนีของเชื้อขึ้นบนอาหารภายหลังการบ่ม สารละลายแบคทีเรียจะถูกนำไปปั่นล้างฟอร์มาลิน ออกด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 % 3 รอบ แล้วปรับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^9 cfu/ml ก่อนจะนำไปใช้เป็นวัคซีนในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* โดยวิธีการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องและการฉีดวัคซีนร่วมกับการให้วัคซีนผสมอาหารในปลานิลแปลงเพศ

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนจากรูปแบบวิธีการให้ที่แตกต่างกัน โดยประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรคจากปริมาณการสร้างแอนติบอดีไคเตอร์ที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนในซีรัม อัตราการตายสะสม และค่า Relative Percent Survival ในการทดสอบความคุ้มโรค ตลอดช่วงระยะเวลาในการศึกษา

1.1 ปลานิลและการวางแผนการทดลอง

สภาพการเลี้ยงปลาในการทดลองเป็นการเลี้ยงในกระชังขนาด 4 X4 X1.5 ลูกบาศก์เมตรจำนวน 12 กระชังที่แขวนในบ่อดินบ่อเดียวกันที่มีพื้นที่บ่อประมาณ 50 ไร่ ภายในฟาร์มเลี้ยงปลานิลของบริษัท โกโรเบสท์ มารีน จำกัด ตั้งอยู่ที่ ตำบลหนองปลาไหล อำเภอเขาชัย จังหวัดเพชรบุรี วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete randomized design) แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองรวมชุดควบคุม แต่ละชุดการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ สุ่มปลานิลแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัมที่ได้รับการสุ่มตรวจดูค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในซีรัมเพื่อบ่งบอกถึงปลาที่ใช้ทดลองไม่เคยได้สัมผัสกับเชื้อ *S. agalactiae* มาก่อน ปล่อยลงเลี้ยงกระชังละ 400 ตัว ปลานิลทดลองจะได้รับการให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 2 มื้อในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว

1.2 การให้วัคซีนและการกระตุ้นซ้ำ

รูปแบบการให้วัคซีนและการกระตุ้นซ้ำโดยการให้วัคซีนผสมอาหารจัดแบ่งตามชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) ปลานิลจะได้รับการฉีดน้ำเกลือ ความเข้มข้น 0.85 % เข้าช่องท้องปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรและไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลจะได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเลี้ยงด้วยอาหารปลานิลสำเร็จรูปปกติตลอดการทดลองโดยไม่มีการกระตุ้นซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลจะได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเลี้ยงด้วยอาหารปลานิลสำเร็จรูปสลับกับการให้อาหารผสมวัคซีน 1 ครั้ง (2 มื้อ เช้า-เย็น) ต่อเดือนตลอดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลจะได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเลี้ยงด้วยอาหารปลานิลสำเร็จรูปสลับกับการให้อาหารผสมวัคซีน 2 ครั้ง (2 มื้อ เช้า-เย็น) ต่อเดือนตลอดการทดลอง

1.3 การเตรียมอาหารผสมวัคซีน

สารละลายวัคซีนที่เตรียมไว้ถูกนำมาสเปรย์ลงบนอาหารเม็ดสำหรับปลานิล โดยวิธี Top dress ในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตรวัคซีนต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผึ่งอาหารให้แห้งก่อนนำไปใช้ การเตรียมอาหารผสมวัคซีนจะเตรียมให้เพียงพอสำหรับ 1 วัน ตามช่วงระยะเวลาในการให้

1.4 การเก็บเลือดปลาและการตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์

ทำการสุ่มเจาะเลือดจากเส้นเลือด Caudal vein จากตัวอย่างปลานิลกระชังละ 5 ตัวในแต่ละชุดการทดลอง โดยเก็บเลือดครั้งแรกภายหลังทำการฉีดวัคซีนเข็มแรกผ่านไป 1 สัปดาห์ เมื่อระยะเวลาครบ 1 เดือนจึงสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดอีกครั้งและทำต่อเนื่องทุกเดือนเป็นระยะเวลา 4 เดือน การตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์ใช้วิธีการ direct agglutination โดยการเจือจางซีรัมแบบ

two-fold dilution ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ใส่อยู่ในหลุมของ microagglutination plate โดยใส่ซีรัมของตัวอย่างปลา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของแต่ละแถว จากนั้นเจือจางซีรัมกับน้ำเกลือตามหลุมของแต่ละแถวให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร เท่ากันทุกหลุม จากนั้นเติมแอนติเจน (วัคซีนที่เตรียมไว้) ใส่ลงในหลุมหลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับ control ซึ่งมีเฉพาะน้ำเกลือกับแอนติเจน ค่าที่อ่านได้จากผลบวกในหลุมที่มีการเจือจางของซีรัมสูงสุดที่ไม่มีการตกตะกอนของแอนติเจนที่กั้นหลุมภายหลังผ่านการบ่ม

1.5 การทดสอบความคุ้มโรค

การทดสอบความคุ้มโรคโดยพิจารณาจากอัตราการตายสะสมและอัตราการรอดสัมพัทธ์ (Relative Percent Survival) ของปลานิลเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมกับชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีน โดยทำการสุ่มปลานิลในแต่ละกระชังของแต่ละชุดการทดลอง กระชังละ 10 ตัว ปล่อยลงเลี้ยงปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ 3 วัน ก่อนทำการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* isolate ที่ใช้ทำวัคซีนเข้าช่องท้องในระดับความเข้มข้นและปริมาตร ที่สามารถก่อโรคในปลานิลปกติได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยปลาลงเลี้ยงในบ่อเพื่อเฝ้าดูอาการปลาที่แสดงลักษณะของโรค Streptococosis ภายในระยะเวลา 14 วัน นำปลาที่ตายหรือแสดงอาการของโรคมาน้ำแช่แยกเชื้อเพื่อยืนยันสาเหตุของการเกิดโรค บันทึกจำนวนปลาที่ตายและแสดงอาการของโรคเพื่อคำนวณค่า Relative Percent Survival ตามวิธีของ Ellis (1988a) จากสูตร

$$RPS = 1 - \frac{(\% \text{การตายสะสมของปลาที่ได้รับวัคซีน})}{(\% \text{การตายสะสมของปลาในกลุ่มควบคุม})} \times 100$$

การทดสอบความคุ้มโรคจะเริ่มทำการครั้งแรกหลังจากปลานิลได้รับวัคซีนเข็มแรกผ่านไป 1 เดือน และทดสอบต่อเนื่องทุกเดือนตลอดการทดลอง

1.6 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ระหว่างการทดลองทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทุก ๆ 4 สัปดาห์ โดยกำหนดจุดเพื่อสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณที่วางกระชังทดลองทั้งหมด 3 จุด ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งที่บริเวณผิวน้ำและบริเวณพื้นน้ำด้านล่าง โดยทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ ได้แก่

1.6.1 อุณหภูมิของน้ำและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำโดยใช้ เครื่อง

Dissolved oxygen meter รุ่น YSI model 52 (หน่วยที่วัด องศาเซลเซียสและ มิลลิกรัมต่อลิตร)

1.6.2 ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำ โดยใช้เครื่อง pH-meter

1.6.3 ปริมาณแอมโมเนีย ($\text{NH}_3\text{-N}$) และไนไตรท์ (NO_2^-) ใช้ชุดทดสอบคุณภาพน้ำสำเร็จรูป TetraTest, Germany (หน่วยที่วัด มิลลิกรัมต่อลิตร)

1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไดเตอร์ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมในการทดสอบความคุ้ม ของปลาแต่ละชุดการทดลอง ถูกนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way Analysis of Variances: One-way ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างจะนำข้อมูลค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม SPSS Version 13.0

การทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* โดยวิธีการแช่ในลูก ปลานิลแปลงเพศ

2.1 ปลานิลและการวางแผนการทดลอง

นำลูกปลานิลแปลงเพศอายุประมาณ 21 วันจำนวน 3,000 ตัว มาเลี้ยงปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 1 ตัน ให้อาหารกบเม็ดเล็ก วันละ 2 มื้อเช้าเย็น มีระบบให้อากาศตลอดเวลา ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ 3 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete randomized design) แบ่งชุดการทดลองออกทั้งหมด 5 ชุดการทดลองรวมชุดควบคุมแต่ละชุดการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำใช้ลูกปลานิลซ้ำละ 100 ตัว โดยแบ่งชุดการทดลองตามวิธีการให้วัคซีนดังนี้

ชุดควบคุม ไม่มีการแช่ลูกปลาในวัคซีน และในสารละลายน้ำเกลือ

ชุดการทดลองที่ 1 ไม่มีการแช่วัคซีน แต่จะแช่ลูกปลาในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 นาที

ชุดการทดลองที่ 2 แช่ลูกปลาในสารละลายวัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ด้วยวิธีการแช่โดยตรง (Direct immersion, DI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 3 แช่ลูกปลาในสารละลายวัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ด้วยวิธีการแช่โดยตรง (Direct immersion, DI) เป็นระยะเวลา 60 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 ให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่ลูกปลาในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 นาที ก่อนแช่ในสารละลายวัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* (Hyperosmotic immersion, HI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 5 ให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่ลูกปลาในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 นาที ก่อนแช่ในสารละลายวัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* (Hyperosmotic immersion, HI) เป็นระยะเวลา 60 นาที

2.2 วิธีการแช่วัคซีน

2.2.1 การแช่วัคซีนโดยตรง (Direct immersion, DI)

สุ่มลูกปลานิลที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวน 300 ตัว ใส่โหลแก้วขนาดความจุ 15 ลิตร ที่บรรจุสารละลายวัคซีนที่มีระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาตร 5 ลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการแช่ตามชุดการทดลองที่ตั้งไว้ คือ 30 และ 60 นาทีตามลำดับ ระหว่างการแช่มีการให้อากาศ และตรวจวัดอุณหภูมิตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดระยะเวลา ทำการย้ายลูกปลานิลใส่ในตู้กระจก ขนาด 150 ลิตร ตู้ละ 100 ตัวตามจำนวนซ้ำของแต่ละชุดการทดลอง

2.2.2 การแช่ด้วยวิธี (Hyperosmotic immersion, HI)

สุ่มลูกปลานิลที่เตรียมไว้จำนวน 300 ตัวของแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ชุดการทดลองที่ 1, 4 และ 5 แช่ในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 ลิตร เป็นระยะเวลา 2 นาที ในโหลแก้วขนาด 15 ลิตรที่มีการให้อากาศตลอดเวลา จากนั้นจึงทำการย้ายลูกปลานิลลงแช่ในสารละลายวัคซีนสารละลายวัคซีนที่มีระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาตร 5 ลิตร ที่บรรจุในโหลแก้วความจุ 15 ลิตร เป็นระยะ 30 และ 60 นาที ตามชุดการทดลอง โดยมีการให้อากาศและวัดอุณหภูมิตลอดเวลา จากนั้นจึงทำการแบ่งย้ายลูกปลาลงเลี้ยงในตู้กระจกขนาดความจุ 150 ลิตร ตู้ละ 100 ตัวตามจำนวนซ้ำของแต่ละชุดการทดลอง

2.3 การทดลอง

ภายหลังจากดำเนินการแช่วัคซีนตามวิธีการและระยะเวลาที่กำหนด ลูกปลานิลจะถูกเลี้ยงในตู้กระจก โดยมีการให้ระบบอากาศและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ 3 วัน มีการให้อาหารสำเร็จรูปในปริมาณเพียงพอ วันละ 2 มื้อ เช้า-เย็น เมื่อครบกำหนด 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ภายหลังจากการแช่วัคซีน จะทำการสุ่มลูกปลาในแต่ละซ้ำของแต่ละชุดการทดลองมาทดสอบความคุ้มโรคเพื่อประเมินประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนในการป้องกันโรคต่อไป

2.4 การทดสอบความคุ้มโรค

2.4.1 การหาระดับความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ทดสอบความคุ้มโรค

เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่สามารถก่อโรคในปลานิลปกติที่นำมาทดสอบได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระดับความเข้มข้นดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบความคุ้มโรคต่อไป สุ่มลูกปลานิลแปลงเพศอายุประมาณ 21 วันที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ลงเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 15 ลิตร จำนวนโหลละ 20 ตัว ทั้งหมด 12 โหล แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยชุดการทดลองที่ 1 ถึง 3 เติมสารละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^6 , 10^7 และ 10^8 cfu/ml ตามลำดับในน้ำปริมาตร 5 ลิตร และมีชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลายแบคทีเรีย สังเกตและบันทึกจำนวนลูกปลาที่ตายแสดงอาการของโรคทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ตัวอย่างปลาที่ตายส่วนหนึ่งจะนำไปตรวจวินิจฉัยเพื่อหาสาเหตุการตาย ค่าเฉลี่ยอัตราการตายของลูกปลาในแต่ละระดับความเข้มข้นจะถูกนำมาพิจารณาเพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบความคุ้มโรคต่อไป

2.4.2 การทดสอบความคุ้มโรค

หลังจากแช่ลูกปลาในสารละลายวัคซีนผ่านไป 14 และ 28 วัน ทำการทดสอบความคุ้มโรคโดยสุ่มลูกปลาในแต่ละซ้ำของแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 20 ตัว ลงเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 15 ลิตร ทั้งหมด 18 โหล โดยแต่ละโหลจะเติมสารละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับระดับความเข้มข้นที่หาได้จากการทดลองในข้อ 2.4.1 โดยใช้ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถก่อโรคในปลานิลที่นำมาทดสอบได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ สังเกตและบันทึกจำนวนลูกปลาที่ตายหรือแสดงอาการของโรคทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ตัวอย่างปลาที่ตายส่วนหนึ่งจะนำไปตรวจวินิจฉัยเพื่อหาสาเหตุการตาย ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของลูกปลาในแต่ละชุดการทดลองจะถูกนำมาประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน และคำนวณหาค่า Relative Percent Survival (RPS) ข้อมูลค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของปลาแต่ละชุดการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way Analysis of Variances: One-way ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างจะนำข้อมูลค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม SPSS

สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มเลี้ยงปลานิลบริษัท โกรเบสท์ มาร์ีน จำกัด ตำบลหนองปลาไหล อำเภอบางบาล
จังหวัดเพชรบุรี

ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

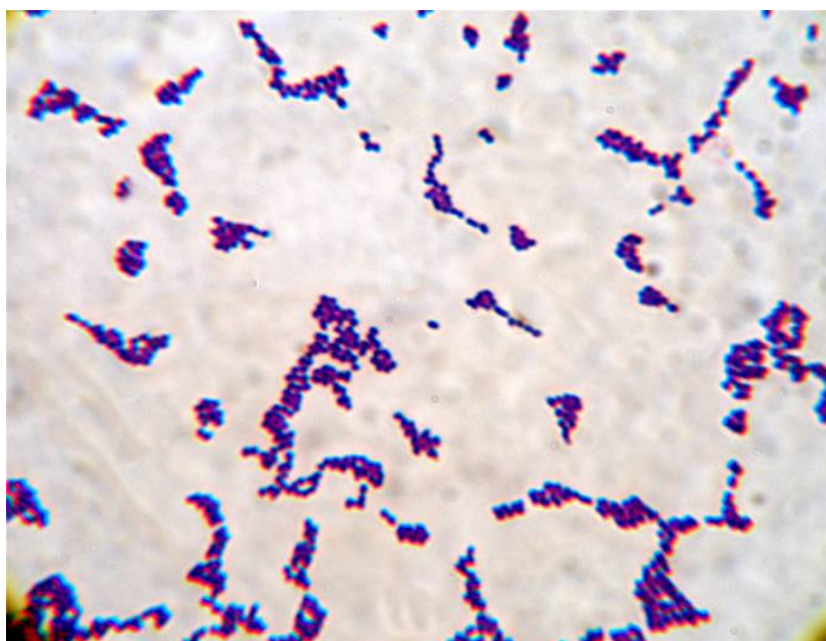
ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2550 สิ้นสุดการทดลองเดือนมีนาคม 2551

ผลการศึกษา

1. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปาลานิลที่แสดงอาการของโรค Streptococcosis ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar พบว่ามีลักษณะโคโลนี กลมเล็ก ขอบเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร สีขาวขุ่น เมื่อทำการย้อมแกรมพบว่า เซลล์แบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเซลล์เป็นแบบ cocci อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเรียงต่อเป็นสายยาว (ภาพที่ 1) การทดสอบ Catalase test ให้ผลลบ เมื่อนำโคโลนีของเชื้อไปหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดลักษณะของ Clear zone ขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่ผสมอยู่ในอาหารในรูปแบบการย่อยสลายแบบ β -haemolytic การจำแนกชนิดของเชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโดยชุดทดสอบ API 20 STREP แสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้คือ เชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ค่าความเชื่อมั่น 99.9% ดังข้อมูลใน ตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และการติดย้อม (Gram positive) ของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (X 1,000)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับเชื้อ *Streptococcus* ในรายงานการศึกษาอื่น ๆ

การทดสอบ	<i>S. agalactiae</i> ปลานิล การศึกษารุ่นนี้	<i>Streptococcus</i> sp. ปลากะพงขาว (เฉลิม 2550)	<i>S. agalactiae</i> ปลานิล (จริญญาและคณะ, 2550)	<i>S. agalactiae</i> ปลา Silver pomfret (Duremdez <i>et al.</i> , 2004)
Gram stain	+	+	+	+
Haemolysis	β	γ	β	β
Catalase	-	-	-	-
Sodium pyruvate (VP)	+	-	+	-
Hippuric acid (HIP)	+	-	+	+
Esculin ferric citrate (ESC)	-	+	-	-
Pyroglutamic acid β - naphthylamide (PYRA)	-	+	-	-
6-bromo-2-naphthyl- α -D- Galactopyranoside (α GAL)	-	-	-	-
Naphthol ASBI-gucuronic acid (β GUR)	-	-	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

การทดสอบ	<i>S. agalactiae</i> ปลานิล การศึกษารุ่นนี้	<i>Streptococcus</i> sp. ปลากะพงขาว (เฉลิม 2550)	<i>S. agalactiae</i> ปลานิล (ปริญญาและคณะ, 2550)	<i>S. agalactiae</i> ปลา Silver pomfret (Duremdez <i>et al.</i> , 2004)
2-naphthyl- β D-galactopyranoside (β GAL)	-	-	-	-
(2-naphthyl phosphate) (PAL)	+	-	+	+
L-leucine- β -naphthylamide (LAP)	+	-	+	+
L-arginine (ADH)	+	+	+	+
D-Libose (RIB)	+	+	+	+
L-arabinose (ARA)	-	-	-	-
D-mannitol (MAN)	-	+	-	-
D-Sorbitol (SOR)	-	-	-	-
D-lactose (LAC)	-	-	-	-
D-trehalose (TRE)	+	+	+	+
Inulin (INU)	-	-	-	-
D-raffanose(RAF)	-	-	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

การทดสอบ	<i>S. agalactiae</i> ปลานิล การศึกษารั้งนี้	<i>Streptococcus</i> sp. ปลากะพงขาว (เฉลิม 2550)	<i>S. agalactiae</i> ปลานิล (ศรีบุญและคณะ, 2550)	<i>S. agalactiae</i> ปลา Silver pomfret (Duremdez <i>et al.</i> , 2004)
Starch 2 (AMD)	-	+	-	-
Glycogen (GLYG)	-	-	-	-

** + = ปฏิกริยาให้ผลบวก, - = ปฏิกริยาให้ผลลบ, nr = ไม่มีรายงานการทดสอบ

ลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิลที่ถูกนำมาเก็บแยกเชื้อเพื่อใช้เตรียมวัคซีน รวมถึงปลาที่ถูกฉีดเชื้อเพื่อกระตุ้น (re-virulent) ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อและปลานิลที่ถูกฉีดเชื้อในการทดสอบความคุ้มโรค มีอาการที่สังเกตได้จากภายนอกคือ ปลาที่ติดเชื้อจะมีสีสันทึบกว่าปลาปกติทั่วไป มีอาการเซื่องซึม กินอาหารน้อยลง พบการอักเสบบวมและตกเลือดตามบริเวณแผ่นปิดเหงือก โคนครีบบ้วยน้ำ ลำตัว และขอบหาง มีการอักเสบและกร่อนของครีบ เกิดการอักเสบบริเวณภายในลูกตาทำให้เกิดอาการตาโปนและมีสีขาวขุ่น ว่ายน้ำลอยหัวและหมุนควงเป็นระยะๆ เกิดการติดเชื้อภายในช่องท้องมีน้ำเหลืองปนเลือดขังอยู่ภายในช่องทำให้เกิดอาการท้องบวมและมีเมือกปนเลือดไหลออกทางรูทวาร มีการติดเชื้อของอวัยวะภายใน ตับ ม้าม ไต และถุงน้ำดี มีลักษณะบวมโต มีสีซีดจางลง หรือแดงช้ำเลือดช้ำหนอง

2. ผลการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลต่อการให้วัคซีน โดยการฉีดเข้าช่องท้องและการฉีดเข้าช่องท้องร่วมกับการผสมอาหาร

การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลที่ได้รับวัคซีนโดยการตรวจวัดค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในซีรัม แสดงให้เห็นว่า ปลานิลในชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* สามารถตรวจพบการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อดังกล่าว ค่าแอนติบอดีไคเตอร์ของปลานิลที่ได้จากการตรวจวัดในช่วงเวลาต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าก่อนได้รับวัคซีนประชากรปลานิลที่ใช้ในการทดลองไม่มีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* isolate ที่ใช้เตรียมวัคซีน แต่หลังจากมีการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องผ่านไป 1 สัปดาห์ สามารถตรวจพบค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในทุกชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีนโดยมีค่าเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 2) โดยในชุดการทดลองที่ 3 (ให้ซ้ำโดยการผสมอาหาร 2 ครั้ง) มีค่าแอนติบอดีสูงสุดคือมีค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไคเตอร์เท่ากับ 15.06 ± 4.47 ในขณะที่เมื่อระยะเวลาในการทดลองผ่านไป 1 เดือนนับจากการฉีดวัคซีนและมีการให้วัคซีนผสมอาหารครบจำนวนครั้งตามที่กำหนด พบว่าค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีนยังคงมีค่าสูงมากกว่าปลานิลในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไคเตอร์กลับพบค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งค่าที่ได้มีความแตกต่างจากค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลการตรวจวัดค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในช่วงเดือนที่ 2 ของการศึกษา พบว่ามีค่าเฉลี่ยลดต่ำลงจากในเดือนที่ 1 เมื่อนำค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองมาเปรียบเทียบพบว่าในช่วงเดือนที่ 2 ค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ยังคงมีค่าสูงกว่า และแตกต่างจากค่าเฉลี่ยในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในช่วงเดือนที่ 3 ของการทดลอง

พบว่าค่าเฉลี่ยแอนติบอดีไตเตอร์ในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ยังคงมีแนวโน้มลดต่ำลงซึ่งทำให้ไม่พบความแตกต่างเมื่อนำค่ามาเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยในชุดควบคุม ในขณะที่ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ 3 กลับมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจาก 3.06 ± 0.46 ในช่วงเดือนที่ 2 เพิ่มขึ้นเป็น 9.27 ± 1.23 ซึ่งแตกต่างกับค่าเฉลี่ยในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในเดือนที่ 4 ของการเก็บข้อมูลพบว่าระดับปริมาณแอนติบอดีในซีรัมของปลานิลในชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีนมีค่าเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากค่าเฉลี่ยในชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่าสูงถึง 486.40 ± 36.20 , 297.60 ± 33.94 , 331.60 ± 10.70 ในชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ขณะที่ในชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 0 เช่นเดียวกับค่าที่ตรวจวัดได้ในเดือนที่ 3 และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุดแตกต่างจากค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในระยะเวลาต่าง ๆ ของปลานิลที่ได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและการฉีดเข้าช่องท้องร่วมกับการให้วัคซีนผสมอาหาร

ช่วงเวลาในการตรวจวัด	ค่าเฉลี่ยค่าแอนติบอดีไคเตอร์ (Mean±S.D.)			
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3
ก่อนได้รับวัคซีน	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
1 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน	2.13±1.85 ^a	8.4±1.06 ^b	11.2±2.77 ^{bc}	15.06±4.74 ^c
1 เดือนหลังได้รับวัคซีน	0 ^a	10.58±1.23 ^b	25.0±9.54 ^c	10.17±4.65 ^b
2 เดือนหลังได้รับวัคซีน	0.2±0.20 ^a	4.2±2.61 ^b	2.8±0.40 ^b	3.06±0.46 ^b
3 เดือนหลังได้รับวัคซีน	0 ^a	0.8±0.40 ^a	1.73±0.50 ^a	9.27±1.23 ^b
4 เดือนหลังได้รับวัคซีน	0 ^a	486.40±36.20 ^b	297.60±33.94 ^c	331.60±10.70 ^c

** ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดควบคุม คือ ปลานิลได้รับการฉีดน้ำเกลือ 0.85% เข้าช่องท้อง และเลี้ยงด้วยอาหารปลานิลสำเร็จรูปตลอดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ปลานิลได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง และเลี้ยงด้วยอาหารปลานิลสำเร็จรูปตลอดการทดลองโดยไม่มีการกระตุ้นซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ปลานิลได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง และกระตุ้นซ้ำโดยให้อาหารผสมวัคซีน 1 ครั้ง ต่อเดือนตลอดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ปลานิลได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง และกระตุ้นซ้ำโดยให้อาหารผสมวัคซีน 2 ครั้ง ต่อเดือนตลอดการทดลอง

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อความต้านทานโรคในปลานิลที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องและการฉีดร่วมกับการให้ผสมอาหาร ต่อเชื้อก่อโรค *S. agalactiae*

ตัวอย่างปลานิลที่ได้รับวัคซีนในแต่ละชุดการทดลอง ถูกนำมาทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* เพื่อสังเกตลักษณะอาการของโรค ตรวจดูเปอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสม และนำมาคำนวณค่า Relative Percent Survival เพื่อนำมาพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการให้วัคซีนต่อความต้านทานโรค

การทดสอบความคุ้มโรคในเดือนที่ 1 ภายหลังการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1.0×10^{12} cfu/ml ในปลานิลของแต่ละชุดการทดลองที่นำมาทดสอบ และเก็บข้อมูลของปลาที่แสดงอาการของโรคและตายเนื่องจากโรค Streptococcosis ในช่วงระยะเวลา 14 วันหลังจากฉีดเชื้อ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของปลาในแต่ละชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ค่า RPS ที่คำนวณได้มีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 3 มีค่าเท่ากับ 22.3 ซึ่งสูงกว่าค่า RPS ในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

การทดสอบความคุ้มโรคในเดือนที่ 2 ภายหลังการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1.0×10^{12} cfu/ml พบว่ามีความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมในปลานิล โดยในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมเท่ากับ 15.0 ± 7.07 และ 5.0 ± 7.07 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ 3 อย่างนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ในชุดการทดลองที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมเท่ากับ 35.0 ± 7.07 ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) จากค่าเฉลี่ยในชุดควบคุม (ตารางที่ 4) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมที่ต่ำในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ส่งผลให้ ค่า RPS ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 62.5 และ 87.5 ซึ่งสูงกว่า ค่า RPS ในชุดการทดลองที่ 3 ที่มีค่าเพียง 12.5 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

การทดสอบความคุ้มโรคในเดือนที่ 3 ภายหลังการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1.0×10^{15} cfu/ml พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของปลานิลในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 40.00 ± 17.32 ซึ่งสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของปลานิลในชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ไม่พบการตายของปลานิลในชุดการทดลองที่ 2 และพบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเท่ากับ 10.00 ± 10.00 และ 10.00 ± 0.00 ในชุดการทดลองที่ 1 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ค่า RPS ที่ได้มีค่าสูงถึง 100 ในชุดการทดลองที่ 2 และ มีค่าเท่ากับ 60 ในชุดการทดลองที่ 1 และ 3 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

การทดสอบความคุ้มโรคในเดือนที่ 4 พบว่าหลังจากทำการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1.0×10^{15} cfu/ml เข้าช่องท้องปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของปลานิลในชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 43.33 ± 5.77 , 20.0 ± 10.00 , 20.0 ± 10.00 และ 3.33 ± 5.77 ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยในชุดควบคุมยังคงมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมค่อนข้างต่ำโดยเฉพาะชุดการทดลองที่ 3 ที่มีค่าเฉลี่ยต่ำที่สุดแตกต่างจากค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ขณะที่ค่า RPS ที่คำนวณได้มีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 98.5 สูงกว่าค่า RPS ในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ที่มีค่า RPS เท่ากับ 53.8 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมและค่า Relative Percent Survival ของปลานิลที่ได้รับ การทดสอบความคุ้ม โรคต่อเชื้อ *S. agalactiae* ภายหลัง ได้รับวัคซีน

ชุดการทดลอง	ช่วงเวลาการทดสอบความคุ้ม โรคลงท้ายหลัง ได้รับวัคซีน							
	เดือนที่ 1		เดือนที่ 2		เดือนที่ 3		เดือนที่ 4	
	ค่าเฉลี่ยการตายสะสม	RPS	ค่าเฉลี่ยการตายสะสม	RPS	ค่าเฉลี่ยการตายสะสม	RPS	ค่าเฉลี่ยการตายสะสม (%)	RPS
	(%)		(%)		(%)			
ชุดควบคุม	30±17.32 ^a	-	40.0 ±14.14 ^a	-	40.0±17.32 ^a	-	43.33±5.77 ^a	-
1	30±0.00 ^a	0	15.0 ±7.07 ^b	62.5	10.0±10.00 ^b	60	20.0±10.00 ^b	53.8
2	36.67±20.82 ^a	-	5.0 ± 7.07 ^b	87.5	0±0.00 ^b	100	20.0±10.00 ^b	53.8
3	23.33±23.10 ^a	22.3	35.0 ±7.07 ^a	12.5	10.0±0.00 ^b	60	3.33±5.77 ^c	92.3

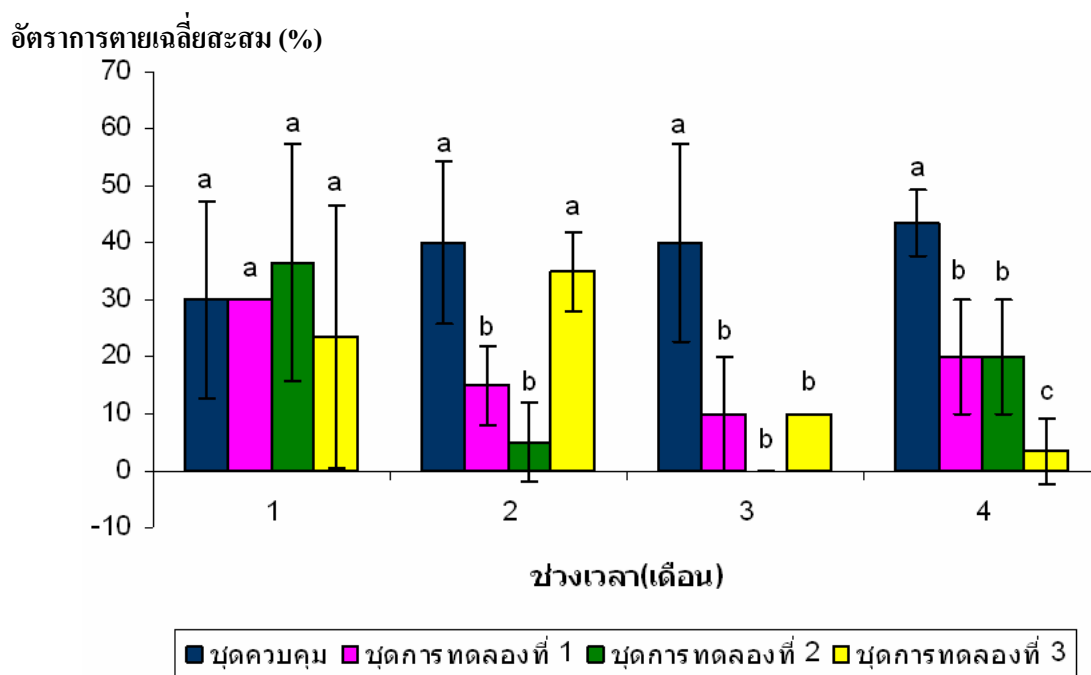
******ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ชุดควบคุม คือ ปลานิลได้รับการฉีดน้ำเกลือ 0.85%เข้าช่องท้อง และเลี้ยงด้วยอาหารปลานิลสำเร็จรูปตลอดการทดลองโดยไม่มีการกระตุ้นซ้ำ

ชุดการทดลอง 1 คือ ปลานิลได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง และเลี้ยงด้วยอาหารปลานิลสำเร็จรูปตลอดการทดลองโดยไม่มีการกระตุ้นซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ปลานิลได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง และกระตุ้นซ้ำโดยให้อาหารผสมวัคซีน 1 ครั้ง ต่อเดือนตลอดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ปลานิลได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง และกระตุ้นซ้ำโดยให้อาหารผสมวัคซีน 2 ครั้ง ต่อเดือนตลอดการทดลอง



ภาพที่ 2 เปอร์เซนต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมของปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคต่อเชื้อ *S. agalactiae* ภายหลังได้รับวัคซีน

4. ผลวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณกระชังที่ทำการศึกษาลดการทดลองเพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ค่าที่ได้แสดงในตารางผนวกที่ 1 โดยพบว่า อุณหภูมิของน้ำที่บริเวณผิวน้ำ มีเฉลี่ยระหว่าง 27.86 ± 0.42 องศาเซลเซียส ถึง 29.90 ± 0.49 องศาเซลเซียส ส่วนบริเวณพื้นน้ำมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 26.35 ± 0.11 องศาเซลเซียส ถึง 28.73 ± 0.14 องศาเซลเซียส ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ที่บริเวณผิวน้ำ มีเฉลี่ยระหว่าง 4.73 ± 0.06 มก./ลิตร ถึง 8.06 ± 1.01 มก./ลิตร ส่วนบริเวณพื้นน้ำมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 2.86 ± 0.51 มก./ลิตร ถึง 6.56 ± 0.75 มก./ลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH) ที่บริเวณผิวน้ำ มีเฉลี่ยระหว่าง 7.44 ± 0.11 ถึง 8.34 ± 0.14 ส่วนที่บริเวณพื้นน้ำมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 7.03 ± 0.01 ถึง 7.86 ± 0.23 ค่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำ ที่บริเวณผิวน้ำ มีเฉลี่ยระหว่าง 0.13 ± 0.05 มก./ลิตร ถึง 0.50 ± 0.00 มก./ลิตร ที่บริเวณพื้นน้ำมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.20 ± 0.10 มก./ลิตร ถึง 0.50 ± 0.00 มก./ลิตร และค่าปริมาณไนไตรท์ที่บริเวณผิวน้ำ มีเฉลี่ยระหว่าง 0 มก./ลิตร ถึง 0.06 ± 0.03 มก./ลิตร ที่บริเวณพื้นน้ำมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0 มก./ลิตร ถึง 0.06 ± 0.03 มก./ลิตร

5. ประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* โดยวิธีการแช่โดยตรง (Direct-Immersion) และการแช่แบบ Hyperosmotic immersion ในลูกปลานิลแปลงเพศ

ลูกปลานิลแปลงเพศอายุประมาณ 21 วัน ที่ได้รับวัคซีนโดยการแช่โดยตรง (Direct immersion) และการแช่แบบ Hyperosmotic immersion ในสารละลายวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ตามชุดการทดลองที่กำหนด หลังจากได้รับวัคซีนผ่านไปเป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการให้วัคซีนครั้งที่ 1 โดยการทดสอบความคุ้มโรคต่อเชื้อ *S. agalactiae* โดยการสุ่มตัวอย่างลูกปลานิลของแต่ละชุดการทดลองเลี้ยงในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเริ่มพบการตายของลูกปลานิลเกิดขึ้นหลังทำการทดสอบผ่านไปเป็นระยะเวลา 1 วัน ยกเว้นในชุดการทดลองที่ 2 ที่ไม่พบการตายของลูกปลาอย่างใดก็ตามในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 5 การตายของลูกปลานิลในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ 1 ที่มีการตายสะสมสูงถึง 50 และ 61.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 2 และภาพที่ 3) และเมื่อครบกำหนด 7 วัน พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเฉลี่ยในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการแช่วัคซีนมีค่าเท่ากับ 50.00 ± 15.00 ส่วนชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งลูกปลาได้รับการแช่ในสารละลายน้ำเกลือโดยไม่ได้รับการแช่วัคซีนพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 66.67 ± 5.77 ลูกปลานิลที่ได้รับการแช่วัคซีนโดยตรงในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเฉลี่ยต่ำกว่าชุดควบคุมโดยมีค่าเท่ากับ 21.67 ± 7.63 และ 26.67 ± 2.88 ตามลำดับ และในชุดการทดลองที่ 4 และ 5 ซึ่งเป็นการแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic immersion ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่ได้มีค่าเท่ากับ 43.33 ± 16.67 และ 31.67 ± 20.81 ตามลำดับ และเมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง พบเพียงค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ 2 (แช่วัคซีนโดยตรงเป็นระยะเวลา 30 นาที) เท่านั้น ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมและค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ไม่มีการแช่วัคซีนแก่ลูกปลานิล และไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่มีการให้วัคซีน (ชุดการทดลองที่ 2, 3, 4 และ 5) ในส่วนของค่า RPS ที่ได้จากการคำนวณของแต่ละชุดการทดลองแสดงค่าในตารางที่ 5 โดยพบค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 60 และค่าต่ำที่สุดในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 20

ในการทดสอบประสิทธิภาพของการให้วัคซีนภายหลังลูกปลาได้รับวัคซีนผ่านไป 28 วัน โดยการทดสอบความคุ้มโรคต่อเชื้อ *S. agalactiae* สุ่มตัวอย่างลูกปลานิลในแต่ละชุดการทดลองเลี้ยงในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เป็นระยะเวลา 7 วัน

เริ่มพบการตายของลูกปลาในทุกชุดการทดลองที่นำมาทดสอบเมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 วัน ยกเว้นลูกปลาในชุดการทดลองที่ 2 ที่เริ่มพบการตายในวันที่ 3 ของการทดสอบ (ตารางภาคผนวกที่ 3 และภาพที่ 4) และเมื่อครบ 7 วัน พบว่าลูกปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ 1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเฉลี่ยสูงถึง 60.00 ± 5.00 และ 66.67 ± 5.77 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่มีการให้วัคซีนทั้ง 4 ชุดการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มของชุดการทดลองที่มีการแซ่วัคซีน พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเฉลี่ยของลูกปลานิลในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าสูงที่สุด แตกต่างจากค่าเฉลี่ยชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 41.67 ± 5.77 , 21.67 ± 7.63 , 26.67 ± 2.88 และ 18.33 ± 5.77 ตามลำดับ ในส่วนของค่า RPS ที่ได้จากการคำนวณพบว่า มีชุดการทดลองที่มีค่า RPS สูงมากกว่า 60 ทั้งหมด 2 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลองที่ 2 และ 5 ซึ่งมีค่า RPS เท่ากับ 63.88 และ 69.45 ตามลำดับ และพบค่า RPS ต่ำที่สุดในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30.55

ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมและค่า Relative Percent Survival ของปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคในช่วงเวลาต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ภายหลังได้รับการให้วัคซีนโดยการแช่

ชุดการทดลอง	ช่วงเวลาการทดสอบความคุ้มโรคภายหลังได้รับการแช่วัคซีน			
	14 วัน		28 วัน	
	ค่าเฉลี่ยการตายสะสม(%)	RPS	ค่าเฉลี่ยการตายสะสม(%)	RPS
ชุดควบคุม	50.00±15.00 ^{ab}	-	60.00±5.00 ^a	-
1	66.67±5.77 ^a	-	66.67±5.77 ^a	-
2	21.67±7.63 ^c	60	21.67±7.63 ^b	63.88
3	26.67±2.88 ^{bc}	46.66	26.67±2.88 ^b	55.55
4	43.33±16.67 ^{abc}	20	41.67±5.77 ^c	30.55
5	31.67±20.81 ^{bc}	36.66	18.33±5.77 ^b	69.45

**ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ชุดควบคุม คือ ปลานิลไม่ได้รับการแช่วัคซีน

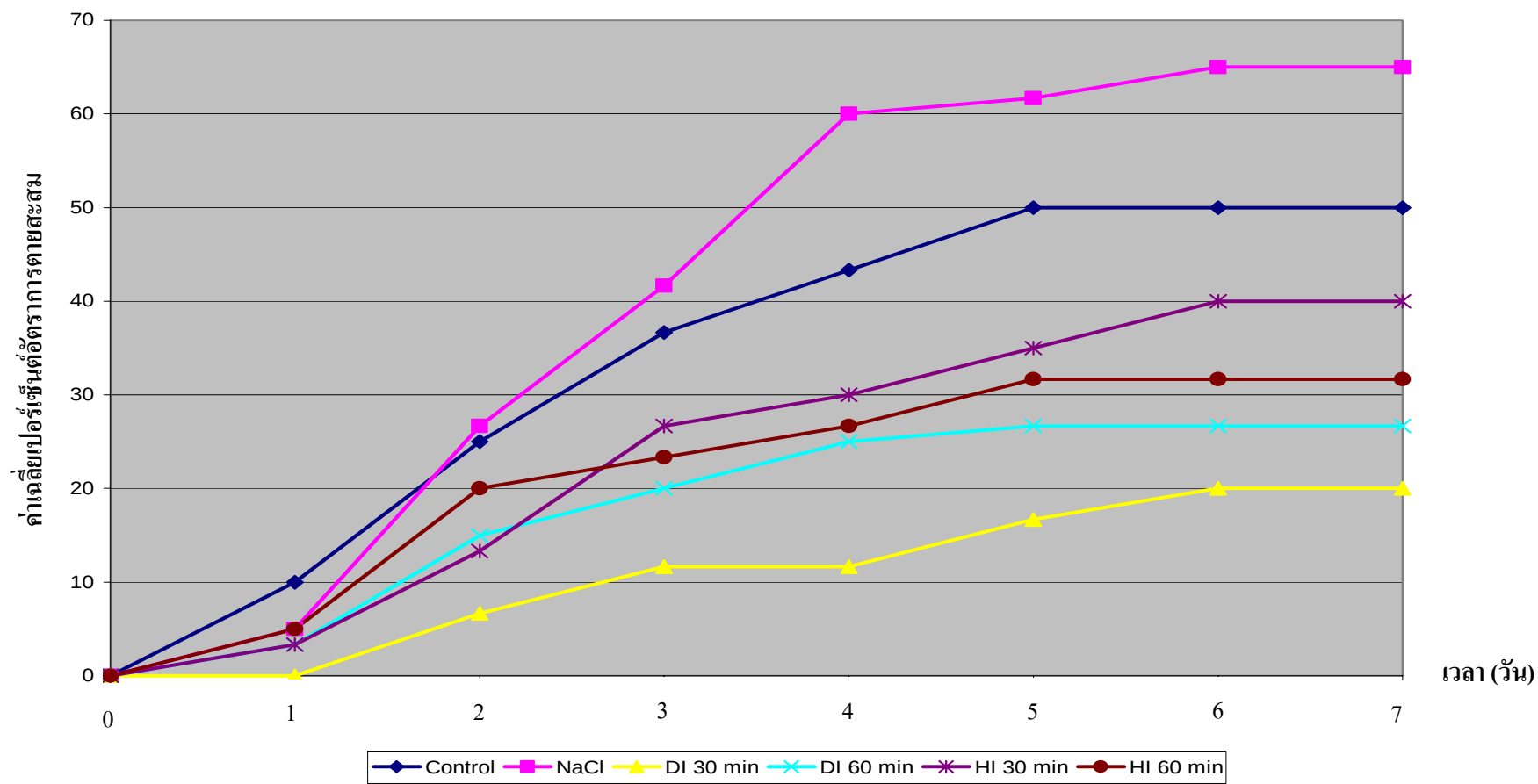
ชุดการทดลองที่ 1 คือ ปลานิลได้รับการแช่ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 1.5 %

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ปลานิลได้รับการแช่วัคซีนโดยตรง (Direct Immersion, DI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

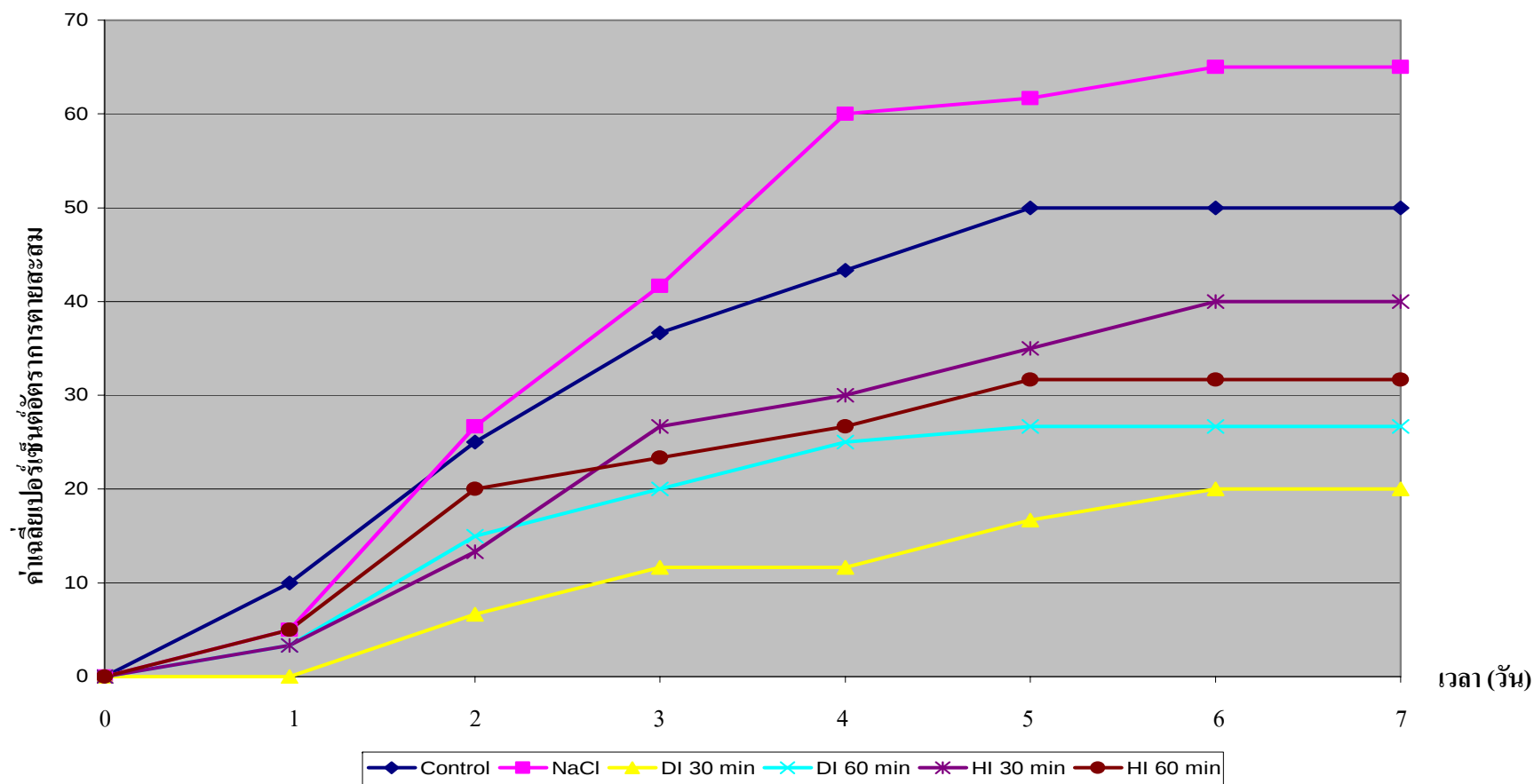
ชุดการทดลองที่ 3 คือ ปลานิลได้รับการแช่วัคซีนโดยตรง (Direct Immersion, DI) เป็นระยะเวลา 60 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 คือ ปลานิลได้รับการแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic Immersion (HI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 5 คือ ปลานิลได้รับการแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic Immersion (HI) เป็นระยะเวลา 60 นาที



ภาพที่ 3 เปอร์เซนต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมของลูกปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคกับเชื้อ *S. agalactiae* ภายหลังได้รับการให้วัคซีนโดยการแช่ผ่านไ้ 14 วัน



ภาพที่ 4 เปอร์เซนต์อัตราการตายเฉลี่ยสะสมของลูกปลานิลที่ได้รับการทดสอบความคุ้มโรคกับเชื้อ *S. agalactiae* ภายหลังได้รับการให้วัคซีนโดยการแช่ผ่านไประยะ 28 วัน

วิจารณ์

1. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอวัยวะภายในของปลานิลที่แสดงอาการของโรค Streptococcosis ภายในบริเวณฟาร์มเลี้ยงปลานิลที่ใช้เป็นสถานที่การทดลองพบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค Streptococcosis ที่มีรายงานการระบาดในการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศ (ประเสริฐ, 2545; นเรศ และคณะ 2548; ศรีบุญญา และคณะ 2550; Areechon *et al.*, 2005) และในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ (Duremdez *et al.*, 2004; Evan *et al.* 2002) โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ (เฉลิมและคณะ, 2548; ศรีบุญญา และคณะ, 2550; Duremdez *et al.*, 2004) คือมีลักษณะเซลล์รูปร่างกลม อยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่หรือต่อเรียงกันเป็นสาย สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้สมบูรณ์ (beta-haemolytic streptococci) แต่พบความแตกต่างจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากระพงขาว ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (gamma-haemolytic streptococci) (เฉลิม, 2550) การศึกษาครั้งนี้อาการของตัวอย่างปลาที่ใช้แยกเชื้อ ปลาที่ใช้ในการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ และปลาที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มโรค มีความคล้ายคลึงกัน ความรุนแรงของโรคค่อนข้างเฉียบพลัน (sub-acute) โดยจะแสดงอาการของโรคภายในระยะเวลา 14 วันหลังทำการฉีดเชื้อ การว่ายน้ำเสียการทรงตัว (Erratic swimming) สีสันที่คล้ำขึ้น ตาโปน (Exophthalmia) หนึ่งหรือทั้งสองข้างร่วมกับอาการขุนขาวของกระเจกตา อาการตกเลือดตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย แผลหลุม และฝีที่เกิดตามตัว ซึ่งเป็นอาการที่พบได้เสมอในปลาที่เป็นโรค Streptococcosis ซึ่งคล้ายคลึงกับลักษณะอาการของโรคที่เกิดในปลาหลายชนิดดังที่มีรายงานก่อนหน้านี้ จิราพร และคณะ (2529) บรรยายถึงอาการของปลาบุทรายที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ว่าพบลักษณะอาการตาโปนและขุนขาว มีของเหลวปนเลือดขังอยู่ภายในลูกตา พบการตกเลือดตามซอกเกล็ด ดับและไต่บวม ดับมีสีเหลืองซีดตกเลือดเป็นแห่ง ๆ ส่วนในปลากระพงขาวพบว่า ปลาที่ป่วยจะมีคล้ำขึ้น พบบาดแผลและการตกเลือดตามลำตัว ว่ายน้ำช้าและเสียการทรงตัว ว่ายน้ำควงส่วเป็นระยะ ๆ มีอาการตาโปนหนึ่งหรือสองข้าง ท้องบวมมีของเหลวในช่องท้อง อวัยวะภายในเช่น ดับ ม้าม และไต มีอาการอักเสบ บวม และมีสีซีด (เขาวินิตย์ และคณะ, 2543)

2. การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลต่อการให้วัคซีน โดยการฉีดเข้าช่องท้องและ การฉีดเข้าช่องท้องร่วมกับการผสมอาหาร

การให้วัคซีนเป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Adaptive immune system) ก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสารน้ำ (Humoral immune response) และการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบฟิงเซลล์ (Cell-mediated immune response) มีผลให้ร่างกายของปลาเกิดความพร้อมในการต้านทานต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมพร้อมกับเกิด Immunological memory ซึ่งทำให้ lymphoid cells จดจำ และตอบสนองได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีการกระตุ้นซ้ำด้วยสิ่งแปลกปลอมชนิดเดิม

ระดับปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจวัดจากซีรัมของปลานิลที่ได้รับวัคซีน แสดงให้เห็นว่า วัคซีนเชื้อตาย (Whole-cell) ที่เตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* ที่ผ่านฆ่าเชื้อและเก็บรักษาไว้ใน สารละลายฟอร์มาลีน มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้ปลาผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะขึ้นมาเพื่อ ทำการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ วัคซีนเชื้อตาย เพื่อใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจหลายชนิด อาทิเช่น การศึกษาของ Eldar *et al.* (1995) ที่พบว่าวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมได้จากเซลล์ของแบคทีเรีย *Streptococcus difficile* สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อดังกล่าวในระบบหมุนเวียน เลือดของปลานิลได้เช่นกัน การเตรียมวัคซีนโดยใช้สารละลายฟอร์มาลีนเพื่อฆ่าเชื้อและคงสภาพ ของเซลล์แบคทีเรียไว้ ทำให้ได้วัคซีนที่ปลอดภัยและมีความคงตัวสูง รวมถึงยังคงรักษาลักษณะ ความเป็น Immunogen ที่ดีเอาไว้ เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลบนผิวเซลล์ ที่มีคุณสมบัติเป็น Epitope ยังคงปรากฏอยู่ ส่งผลให้เกิดการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างของ โมเลกุลนั้น ๆ ต่อไป ซึ่งจากการศึกษาพบว่าบนผิวเซลล์ของเชื้อ *S. agalactiae* มีโครงสร้างที่ ประกอบด้วยโมเลกุลคาร์โบไฮเดรต 2 กลุ่มใหญ่ และโมเลกุลประเภทที่เป็นโปรตีนแอนติเจน หลายชนิด ได้แก่ Cα Protein, Cβ Protein และ Rib Protein เป็นต้น (Hughes *et al.*, 2002)

ค่าแอนติบอดีไคเตอร์ที่ตรวจวัดได้หลังจากการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องปลานิล เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาของ เฉลิม (2550) ที่ สามารถวัดค่าแอนติบอดีไคเตอร์ในซีรัมของปลากะพงขาวได้ ภายหลังจากการฉีดวัคซีนป้องกัน โรค Streptococcosis ผ่านไปเป็นระยะเวลา 10 วัน ซึ่งผลการตอบสนองต่อวัคซีนที่เกิดขึ้นอย่าง รวดเร็วยังหลังได้รับวัคซีนผ่านไปเพียง 1 สัปดาห์ ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ ใช้ในการพัฒนาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันทางสารน้ำ (Humoral Immune

Response) ในตัวปลานิลเกิดขึ้นได้ค่อนข้างเร็วและน่าจะส่งผลโดยตรงต่อความพร้อมในการป้องกันต่อเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้เช่นกัน การให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องเป็นวิธีการให้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพและข้อได้เปรียบกว่าการให้วัคซีนโดยวิธีการอื่น ๆ ในด้านของปริมาณและความเข้มข้นของวัคซีนที่ปลาได้รับ ซึ่งก่อให้เกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วตามมา รวมถึงปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในตัวปลา เช่น อุณหภูมิของน้ำเป็นส่วนหนึ่งที่น่าจะมีอิทธิพลต่อผลการตอบสนองดังกล่าว เพราะการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมักเกิดได้ช้าในปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมทางด้านสรีรวิทยาของปลาชนิดนั้น ๆ Rijkers *et al.* (1980) ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลาไน (*Cyprinus carpio*) ที่เลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าปลาไนที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส จะสามารถตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเมดิเลียดแดงแเกาะ ภายหลังการฉีดกระตุ้นผ่านไป 9 วัน ในขณะที่ปลากลุ่มที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส จะตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีได้ในวันที่ 49 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อระยะเวลาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก ในส่วนของอุณหภูมิในบ่อทดลองของการวิจัยครั้งนี้พบว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของปลานิลคืออยู่ในช่วง 26-29 องศาเซลเซียส (ตารางภาคผนวกที่ 1) การตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำโดยการให้วัคซีนผสมอาหารโดยเปรียบเทียบค่าแอนติบอดีในซีรัมของปลานิลในแต่ละชุดการทดลองพบว่าระดับค่าไคเตอร์ในแต่ละชุดการทดลองมีความแปรผันค่อนข้างสูง กล่าวคือไม่มีความโน้มแนบเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แต่กลับมีแนวโน้มลดลงในช่วง 3 เดือนแรก อาจเป็นเพราะสาเหตุบางอย่างที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนที่ปลาได้รับโดยการกิน ซึ่งส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากปริมาณของวัคซีนที่เข้าไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีน้อยเกินไปเนื่องจากตัววัคซีนส่วนหนึ่งถูกทำลายโดยสภาพความเป็นกรดในทางเดินอาหารและเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลล์แบคทีเรียในสารละลายวัคซีน ทำให้วัคซีนที่ผ่านไปยังบริเวณที่พบการรวมกลุ่มของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหาร (Gut-Associated Lymphoid Tissue) มีปริมาณลดน้อยลง ดังเช่นการศึกษาของ Joosten *et al.* (1995) ที่ทดลองให้วัคซีนผสมอาหารในปลาไน (*Cyprinus carpio*) พบว่าปริมาณวัคซีนส่วนหนึ่งถูกทำลายโดยสภาพความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้ส่วนต้น แต่พบวัคซีนส่วนหนึ่งที่สามารถผ่านไปถึงบริเวณลำไส้ส่วนหลังได้ซึ่งจะไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในชั้น Mucosa และมีรายงานที่แสดงว่าการให้วัคซีนผสมอาหารสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในเนื้อเยื่อชั้น Mucosa ในเมือกบริเวณผิวหนัง และในน้ำดี แต่ไม่พบแอนติบอดีในซีรัม (Davidson *et al.*, 1993) ส่วนการให้วัคซีนโดยการฉีดผ่านทางช่องท้องจะตรวจพบแอนติบอดีในเมือกและน้ำดีได้ช้ากว่าการให้วัคซีนโดยการกิน (Vervarcke *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามหากมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันลักษณะดังกล่าวในบริเวณทางเดินอาหารก็น่าจะมีผลช่วยลดโอกาสในการเกิดโรคได้

เนื่องจากภายในทางเดินอาหารเป็นช่องทางหนึ่งที่สามารถเกิดการติดต่อและแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ ประกอบกับรายงานการศึกษาของ Al-Harbi and Uddin (2004) ที่ตรวจพบปริมาณแบคทีเรียในบริเวณลำไส้ของปลานิล มีอยู่ในช่วง 6.8×10^6 cfu/g ถึง 7.5×10^7 cfu/g และมีรายงานพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *Streptococcus* sp. สูงถึง 12 % จากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในบริเวณทางเดินอาหารของปลานิล (Al-Harbi *et al.*, 2005) ดังนั้นจากผลการศึกษาในครั้งนี้ แม้ว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยให้วัคซีนผสมอาหารจะไม่สามารถเพิ่มระดับปริมาณแอนติบอดีในซีรัมได้อย่างชัดเจน แต่หากมีผลเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันภายในบริเวณทางเดินอาหารได้ น่าจะมีผลช่วยป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในทางเดินอาหารได้เช่นกัน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในช่วงเดือนที่ 4 ของการทดลอง ค่าไตเตอร์ของปลานิลในชุดการทดลองที่ได้รับวัคซีนมีค่าเพิ่มขึ้นสูงกว่าในช่วง 3 เดือนแรกค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งไม่มีการให้วัคซีนผสมอาหารกระตุ้นซ้ำ จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการให้วัคซีนผสมอาหารในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีผลช่วยกระตุ้นให้ร่างกายผลิตแอนติบอดีออกมาในซีรัมได้ แต่ค่าแอนติบอดีที่เพิ่มสูงขึ้นในช่วงเดือนที่ 4 อาจเกิดจากในช่วงเวลาดังกล่าวปลานิลในแต่ละชุดการทดลองได้สัมผัสกับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ ทำให้เกิดการตอบสนองให้มีการผลิตแอนติบอดีออกมาในปริมาณสูง การสัมผัสกับเชื้อในธรรมชาติจึงเปรียบเสมือนการกระตุ้นซ้ำและยกระดับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้เพิ่มสูงขึ้นกว่าในช่วง 3 เดือนแรก

3. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อความต้านทานโรคในปลานิลที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องและการฉีดร่วมกับการให้ผสมอาหารต่อเชื้อก่อโรค *S. agalactiae*

การทดสอบความคุ้มโรคจากตัวอย่างปลานิลในแต่ละชุดการทดลองโดยทำการทดสอบต่อเนื่องทุกเดือนภายหลังการให้วัคซีนโดยการฉีดผ่านช่องท้อง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม และค่า Relative Percent Survival (RPS) ที่คำนวณได้ในแต่ละชุดการทดลอง

การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในเดือนที่ 1 ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของทุกชุดการทดลองระหว่างค่าเฉลี่ยในชุดควบคุม และระหว่างค่าเฉลี่ยภายในชุดการทดลองที่มีการใช้วัคซีน ส่งผลให้ค่า Relative Percent Survival ที่คำนวณได้มีค่าในเกณฑ์ที่ต่ำ แสดงให้เห็นว่าช่วงเดือนแรกภายหลังได้รับวัคซีนปลานิลยังสามารถเกิดโรค Streptococcosis ได้เช่นเดียวกับปลานิลที่ไม่ได้รับวัคซีน

แม้ว่าการให้วัคซีนโดยการฉีดจะมีข้อได้เปรียบในแง่ของการกำหนดความเข้มข้นและปริมาณของวัคซีนที่เข้าสู่ตัวปลาได้และน่าจะทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งก็ได้แสดงให้เห็นแล้วในผลการตรวจวัดระดับค่าแอนติบอดีไคเตอร์ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการจัดการการให้วัคซีนโดยการฉีดยังมีข้อเสียที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบทางด้านลบต่อสุขภาพของปลาได้เช่นกัน การดำเนินการขนย้ายปลาเพื่อดำเนินการฉีดวัคซีน อาจก่อให้เกิดแผลหรืออาการบาดเจ็บที่ก่อให้เกิดภาวะเครียด (Stress) ในตัวปลา ซึ่งมีผลไปลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบหมุนเวียนเลือดมีปริมาณลดลงและการผลิตแอนติบอดีที่มีปริมาณลดลงด้วย ดังรายงานของ Thompson *et al.* (1993) พบว่าปริมาณแอนติบอดีในปลาที่ได้รับการกระตุ้นภูมิด้วยเชื้อ *Aeromonas salmonicida* ถูกผลิตออกมาได้น้อยลงในปลาที่อยู่ในสภาวะเครียด และยังส่งผลให้การทำงานของเซลล์ leukocyte ในขบวนการ respiratory burst ลดลง ดังนั้นการฉีดวัคซีนเพื่อกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จึงอาจให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควรในช่วงแรกภายหลังได้รับวัคซีนเพราะเกิดปัจจัยด้านลบจากภาวะเครียด มีผลต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน แต่เมื่อดูข้อมูลการทดสอบความคุ้มโรคในเดือนที่ 2 ถึง 4 จะเห็นได้ว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับวัคซีนทุกชุดการทดลอง มีค่าต่ำกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นถึงความต้านทานต่อโรค Streptococcosis ที่เพิ่มสูงขึ้นในชุดการทดลองที่ได้รับการให้วัคซีน ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ปราศจากปัจจัยด้านลบที่เกิดก่อให้เกิดความเครียดจะช่วย

ส่งเสริมให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดที่ได้รับการให้วัคซีนมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า Relative Percent Survival (RPS) พบว่าส่วนใหญ่ค่าที่ได้สูงเกินกว่า 60 ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพที่ดีของวัคซีน ซึ่งการประเมินประสิทธิภาพวัคซีนจากค่า RPS ระดับค่าที่มากกว่า 60 ถือว่าวัคซีนที่ให้มีประสิทธิภาพสูงในระดับที่น่าพอใจ (Ellis, 1988a) ดังนั้นในการดำเนินการให้วัคซีนจึงควรคำนึงถึงผลกระทบด้านลบที่อาจมีผลต่อการตอบสนองและการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของปลาดูด้วยเช่นกัน

สำหรับการพิจารณาเปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างวิธีการให้วัคซีนโดยการฉีดเพียงอย่างเดียวกับการให้โดยการฉีดร่วมกับการให้ผสมอาหารตามระยะเวลาที่กำหนด เพื่อศึกษาวิธีการในการยกระดับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้องกันการเกิดโรค ดังเช่นการศึกษาของ Romalde *et al.* (2004) ที่รายงาน ถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่อยู่ในรูปแบบแคปซูลขนาดเล็ก ซึ่งเมื่อนำไปผสมอาหารให้ปลากิน ในลักษณะของการกระตุ้นซ้ำ ภายหลังจากที่ปลาเคยได้รับการฉีดวัคซีนมาแล้ว พบว่าสามารถเพิ่มระยะเวลาในการป้องกันโรคได้ยาวนานขึ้นจาก 3 เดือน เป็น 6 เดือน ส่วนในการศึกษาครั้งนี้ ด้วยวัตถุประสงค์ของการกระตุ้นซ้ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและเวลาในการป้องกันการเกิดโรคของวัคซีนเช่นเดียวกัน ซึ่งพบว่าการให้วัคซีนโดยการฉีดร่วมกับการกระตุ้นซ้ำโดยการผสมอาหาร (ชุดการทดลองที่ 2 และ 3) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ยาวนานขึ้นโดยจะเห็นได้จากค่า RPS ในชุดการทดลองที่ 3 ที่ยังมีค่าสูงถึง 92.3 ในเดือนที่ 4 ของการศึกษา แม้ว่าค่า RPS ในแต่ละชุดการทดลองจะมีความผันผวนบ้างในแต่ละเดือน แต่เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาในการเลี้ยงที่ยาวนานขึ้น (เดือนที่ 3 และ 4) ค่า RPS ที่เพิ่มขึ้น น่าจะบ่งบอกได้ว่าการกระตุ้นซ้ำโดยการผสมอาหารสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและระยะเวลาในการป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis ได้ดีกว่าการได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องเพียงอย่างเดียว แต่ในบางรายงานกลับแสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนกระตุ้นซ้ำไม่สามารถเพิ่มระดับการป้องกันโรคให้เพิ่มสูงขึ้นได้ ดังตัวอย่างการทดลองของ Thorburn and Jansson (1988) ที่ไม่พบความแตกต่างในอัตราการตายของลูกปลา rainbow trout ในการทดสอบความคุ้มโรคระหว่างปลาที่ได้รับการแช่วัคซีนเพียงครั้งเดียวและปลาที่ได้รับการแช่วัคซีนกระตุ้นซ้ำเป็นครั้งที่สอง ในส่วนของจำนวนครั้งการให้วัคซีนผสมอาหารพบว่าเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่ น่าจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการใช้วัคซีน จากการศึกษาของนิลบล (2534) ที่พบว่าปลาคูอุยที่ได้รับการให้อาหารผสมวัคซีน *Aeromonas hydrophila* จำนวน 2 ครั้งจะให้ผลในการป้องกันโรคดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมวัคซีนเพียงครั้งเดียวเมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยในการทดสอบความคุ้มโรค เช่นเดียวกับการศึกษาของ นนทวิทย์ และกรองแก้ว (2541) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาในการให้อาหารผสมวัคซีน *Aeromonas hydrophila* ในลักษณะของการให้

เพื่อกระตุ้นร่างกายหลังจากที่ได้มีการให้วัคซีนโดยการแช่แก่ลูกปลาทุกผสม ซึ่งพบว่า ระยะเวลาการให้วัคซีนผสมอาหารทุกวันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ต่อเดือน ให้ผลในการป้องกันการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาคือการให้ 3, 2 และ 1 สัปดาห์ตามลำดับ ดังนั้นจำนวนครั้งในการให้วัคซีนผสมอาหารที่เพิ่มมากขึ้นน่าจะช่วยเพิ่มโอกาสและปริมาณวัคซีนที่จะไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชดเชยในส่วนของปริมาณวัคซีนที่สูญเสียไปในขั้นตอนการให้และการดูดซึมผ่านทางระบบทางเดินอาหารซึ่งน่าจะช่วยส่งเสริมให้ระบบภูมิคุ้มกันจะสามารถตอบสนองต่อวัคซีนได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจากผลการศึกษาในเดือนที่ 4 ก็แสดงให้เห็นว่า ปลาชนิดที่ได้รับการให้อาหารผสมวัคซีนจำนวน 2 ครั้งต่อเดือนมีค่า RPS ที่สูงกว่าการให้วัคซีนผสมอาหารเพียง 1 ครั้งต่อเดือน

4. ประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* โดยวิธีการแช่โดยตรง (Direct Immersion) และการแช่แบบ Hyperosmotic Immersion ในลูกปลานิลแปลงเพศ

การแช่วัคซีนเป็นรูปแบบวิธีการที่มีความสะดวกด้านการจัดการในการใช้กับปลาได้ทุกขนาด โดยเฉพาะในปลาขนาดเล็กที่ไม่สามารถให้วัคซีนโดยการฉีดได้ อีกทั้งยังสามารถให้วัคซีนกับปลาปริมาณมากพร้อมกันได้ ซึ่งช่วยประหยัดเรื่องแรงงานและปริมาณวัคซีนที่ใช้ นอกจากนี้การแช่วัคซีนยังก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของปลาน้อยกว่าการให้โดยฉีด โดยช่องทางที่วัคซีนเข้าสู่ตัวปลา เกิดจากการถูกดูดโดยเมื่อกบบริเวณ เหงือก ผิวหนัง เส้นข้างลำตัวและทางเดินอาหาร ก่อนที่จะนำผ่านเข้าไปในชั้นของเยื่อผิวหนัง (Ototake *et al.*, 1996; Navot *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นช่องทางเดียวกับที่เชื้อแบคทีเรียในธรรมชาติบุกรุกเข้าสู่ตัวปลา

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลูกปลาวัยอ่อนพบว่าบางครั้งอาจเป็นเพียงการเตรียมความพร้อมซึ่งร่างกายอาจยังไม่มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะออกมาได้ แต่จะสามารถผลิตออกมาหลังจากที่ระบบการทำงานของอวัยวะและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในตัวปลาที่พัฒนาอย่างสมบูรณ์แล้ว (Tatmer, 1996) ถึงแม้ว่าจะไม่มีรายงานยืนยันถึงช่วงอายุของลูกปลานิลที่มีการเจริญพัฒนาของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ดังเช่นที่มีรายงานในปลาลูกลูกผสมที่พบว่าเริ่มมีการเจริญของต่อมไทมัส และไตส่วนหน้าเมื่อมีอายุได้ 2 และ 4 วัน ตามลำดับ (จงดี และคณะ, 2535) ส่วนในปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) พบเซลล์ lymphocyte ปรากฏบริเวณม้ามและไตส่วนหน้า ในวันที่ 9 และ 14 หลังการปฏิสนธิของไข่ปลาตามลำดับ (Tatmer, 1996) จึงคาดว่าลูกปลานิลอายุได้ประมาณ 21 วัน จะมีความพร้อมในด้านการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Evans *et al.*, 2004) ดังนั้นขนาดของลูกปลาที่เลือกทดลอง

ครั้งนี้จึงเป็นขนาดที่เหมาะสมสำหรับการเสริมสร้างความพร้อมของระบบภูมิคุ้มกันในการตอบสนองต่อวัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis ได้

ส่วนการทดลองแช่วัคซีนในลูกปลานิลแปลงเพศเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ในส่วนของอัตราการตาย สะสมระหว่างการทดสอบความคุ้มโรค และค่า RPS ของแต่ละชุดการทดลอง ระหว่างปลาที่ได้รับวัคซีนและปลาในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการแช่วัคซีน การเพิ่มประสิทธิภาพของการแช่วัคซีนด้วยวิธี Hyperosmotic immersion โดยการแช่ลูกปลาในน้ำเกลือ (hypertonic saline solution) ก่อนนำมาแช่ในสารละลายวัคซีนเพื่อเพิ่มปริมาณการดูดซึมวัคซีนเข้าสู่ตัวปลา รวมถึงระยะเวลาในการแช่ลูกปลาในสารละลายวัคซีนถูกนำมาพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการป้องกันโรค

จากผลการทดลอง การทดสอบความคุ้มโรคครั้งที่ 1 ภายหลังการให้วัคซีนเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า ลูกปลานิลที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่โดยตรงเป็นระยะเวลา 30 นาทีมีค่าเฉลี่ยการตายสะสมต่ำที่สุด และมีค่า RPS สูงที่สุดเมื่อเทียบกับผลในชุดการทดลองอื่น ๆ แม้ว่าการแช่วัคซีนด้วยวิธี Hyperosmotic immersion จะมีการทดลองในการใช้กับลูกปลาหลายชนิดก่อนหน้านี้ และให้ผลที่ดีกว่าการแช่วัคซีนโดยตรง อาทิเช่น การศึกษาการทดลองแช่วัคซีนในลูกปลาดุก ถูกผสมที่พบว่าการแช่ลูกปลาในสารละลายเกลือความเข้มข้นนาน 1.5% เป็นระยะเวลา 2 นาที ก่อนนำมาแช่ในสารละลายวัคซีนของเชื้อ *A. hydrophila* นาน 60 นาที เป็นวิธีที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *A. hydrophila* ได้สูงสุด (ชลิดา และนนทวิทย์, 2537) แต่ในผลการศึกษครั้งนี้ กลับพบว่าการให้วัคซีนโดยการแช่โดยตรงสามารถเพิ่มความต้านทานโรคในลูกปลานิลได้ดีกว่าการแช่แบบ hyperosmotic immersion ซึ่งเป็นไปได้ว่าการแช่ลูกปลานิลในน้ำเกลือระดับความเข้มข้น 1.5% ไม่ได้ช่วยให้มีปริมาณวัคซีนเข้าสู่ตัวปลาเพิ่มมากขึ้นเมื่อนำลูกปลาลงแช่ในสารละลายวัคซีน เนื่องจากปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ในน้ำได้ดี (Euryhaline) ระบบสมดุลเกลือแร่ในร่างกายสามารถปรับตัวเพื่อลดการสูญเสียน้ำออกจากร่างกายเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือแร่สูงกว่าในร่างกาย (Hypertonic environment) ได้ดี คล้าย ๆ กับปลาสองน้ำบางชนิด ดังเช่นในรายงานการศึกษาของ Pisam et al. (1995) ที่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะลักษณะรูปร่างส่วนปลายของ tubulovesicular structures ใน chloride cell ชนิด alpha และ beta ที่บริเวณ gill filaments ในปลา Atlantic salmon ที่ปรับตัวจากสภาพการเลี้ยงในน้ำจืดมาสู่น้ำเค็ม โดย alpha cell จะทำหน้าที่ขับปริมาณ chloride ส่วนเกินออกจากร่างกายส่วน beta cell จะทำหน้าที่ขับ Sodium ส่วนเกินออกจาก

ร่างกาย เมื่อปลาต้องปรับตัวอยู่สภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นสูง รวมถึงการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อโดยการหลั่งฮอร์โมน prolactin ที่มีบทบาทสำคัญในเรื่องการควบคุมสมดุลเกลือแร่ในปลากลุ่ม Euryhaline (Manzon, 2002) ในส่วนของเกล็ดที่ปกคลุมร่างกายภายนอกของปลาเป็นอีกโครงสร้างหนึ่งที่มีส่วนสำคัญในการป้องกันการแพร่ของน้ำเข้าสู่ร่างกายทำให้ ปริมาณน้ำเกลือแร่ และ เซลล์แบคทีเรียที่จะแพร่เข้าสู่ร่างกายเกิดได้ยากกว่าในกลุ่มปลาหนัง ดังนั้น การปรับตัวเพื่อลดการสูญเสียน้ำขณะแช่ในน้ำเกลือเข้มข้น 1.5% และการมีเกล็ดป้องกันการแพร่น้ำเข้าสู่ร่างกายจึงอาจทำให้ การแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic immersion ไม่สามารถเพิ่มปริมาณวัคซีนเข้าสู่ตัวลูกปลานิลได้ ซึ่งในการศึกษาของ ธีราภรณ์ (2547) แสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนปลานิลระยะ pre-mature ด้วยวิธี การแช่โดยตรงและการแช่แบบ Hyperosmotic immersion พบว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีนทั้งสองวิธีมีความต้านทานโรคใกล้เคียงกัน ซึ่งแม้ว่างานวิจัยที่ผ่านมาเทคนิค Hyperosmotic immersion จะสามารถเพิ่มระดับการดูดซึมวัคซีนเข้าสู่ตัวปลาได้มากขึ้นในระยะเวลาการแช่ที่เท่ากันกับการแช่โดยตรง (นิลบล, 2534; ชลิดา และนนทวิทย์, 2537; นนทวิทย์ และกรองแก้ว, 2541) แต่ในรายงานการศึกษาเพื่อติดตามปริมาณแอนติเจน (Bovine serum albumin) ที่เข้าสู่ตัวปลาในขณะทำการแช่ กลับพบว่าทั้งการแช่โดยตรงและการแช่แบบ Hyperosmotic immersion ปริมาณแอนติเจนที่เข้าสู่ตัวปลามีปริมาณไม่แตกต่างกัน (Moore *et al.*, 1998) ประกอบกับผลกระทบทางด้านลบที่อาจเกิดกับลูกปลานิลในขณะการแช่ในสารละลายเกลือเข้มข้น 1.5% อาจก่อให้เกิดความเครียดและความเสียหายบริเวณเยื่อผิวหนังซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสำคัญในการแทรกผ่านของวัคซีนเข้าสู่ตัวปลา เมื่อเนื้อเยื่อบริเวณเหล่านั้นถูกทำลายจึงทำให้ปริมาณวัคซีนที่ปลาได้รับมีจำนวนลดลง ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคต่ำกว่าการแช่แบบโดยตรง ดังเช่นการศึกษาของ Huisin *et al.* (2003) ที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับความดัน osmotic อย่างรวดเร็วก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์บริเวณเยื่อผิวหนังที่สัมผัสกับสารละลาย Hypertonic solution และเกิดลักษณะการตายของเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว อีกทั้งความเครียดยังมีผลให้ระดับฮอร์โมน cortisol ใน plasma มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วยซึ่งทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายลดต่ำลง ดังนั้นการแช่วัคซีนโดยวิธี Hyperosmotic immersion ซึ่งลูกปลานิลจะถูกแช่ในสารละลายน้ำเกลือก่อนแช่วัคซีน จึงอาจไม่ได้ช่วยเพิ่มโอกาสให้ลูกปลาได้รับปริมาณวัคซีนเข้าสู่ร่างกายมากขึ้นแต่กลับส่งผลกระทบด้านลบต่อสุขภาพซึ่งมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของลูกปลาได้ ดังจะเห็นได้จากค่า RPS ในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นการแช่วัคซีนโดยตรง มีค่า RPS เท่ากับ 60 และ 46.66 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่า ค่าในชุดการทดลองที่ 4 และ 5 ซึ่งเป็นการแช่แบบ Hyperosmotic immersion (ค่า RPS เท่ากับ 20 และ 36.66 ตามลำดับ) (ตารางที่ 5)

ส่วนของระยะเวลาในการแช่วัคซีนเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่น่าจะมีส่วนในการช่วยเพิ่มโอกาสให้ปลาได้รับวัคซีนเพิ่มมากขึ้นอันจะนำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น โดยพบว่ามีความแปรผันตามกันระหว่างปริมาณแอนติเจนที่เข้าสู่ตัวปลากับระยะเวลาในการแช่ และความเข้มข้นของสารละลายแอนติเจน กล่าวคือเมื่อระยะเวลาในการแช่ยาวนานขึ้นหรือทำการแช่ในสารละลายแอนติเจนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ปริมาณแอนติเจนที่เข้าสู่ตัวปลาจะมีมากขึ้นตามไปด้วย (Moore *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับ Tatner *et al.* (1984) ที่พบว่าการแช่ปลา rainbow trout ในสารละลายวัคซีนเชื้อ *A. salmonicida* เป็นระยะเวลา 30 นาที จะพบเซลล์แบคทีเรียได้ในบริเวณ ส่วนของเหงือก ผิวหนัง ม้าม ตับและหัวใจ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการแช่เป็น 8 ชั่วโมงจะพบเซลล์แบคทีเรียในบริเวณลำไส้ได้ด้วย (Tatner, 1987) และการศึกษาของชลิดาและนนทวิทย์ (2537) แสดงให้เห็นว่าการแช่ลูกปลาดุกลูกผสมในสารละลายวัคซีน ระยะเวลาในการแช่ที่เพิ่มขึ้น มีผลให้ระดับการป้องกันโรคมียาคสูงขึ้นทั้งการแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนด้วยวิธี Hyperosmotic immersion โดยเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งนี้กลับพบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการแช่วัคซีน กลับให้ผลของค่าเฉลี่ยการตายสะสมของลูกปลานิลไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ทั้งรูปแบบการแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่แบบ Hyperosmotic immersion ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการเพิ่มระยะเวลาการแช่วัคซีนที่ยาวนานขึ้นไม่ได้เพิ่มปริมาณวัคซีนที่เข้าสู่ตัวปลาให้มากขึ้นตามไปด้วย ด้วยลักษณะวิธีการแช่ปลาในสารละลายวัคซีนที่มีความเข้มข้นสูง มักจะใช้ระยะเวลาในการแช่ค่อนข้างสั้นเพราะการแช่ในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นไม่ได้ให้ความแตกต่างในส่วนของประสิทธิภาพและระยะเวลาป้องกันโรคของวัคซีนให้เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย (Smith, 1988) ซึ่งวัคซีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถือว่ามีระดับความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง (10^8 cfu/ml) ดังนั้นการแช่ลูกปลานิลในสารละลายวัคซีนจึงควรใช้ระยะเวลาในการแช่ที่เหมาะสมซึ่งการศึกษานี้ที่ ระยะเวลา 30 นาทีในการแช่ถือว่าเพียงพอในการเพิ่มความต้านทานโรคให้แก่ลูกปลา ซึ่งจากการประเมินจากค่า RPS พบว่า การแช่วัคซีนโดยตรงเป็นระยะเวลา 30 นาทีเป็นวิธีการที่ให้ค่า RPS เท่ากับ 60 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ ในส่วนการทดสอบความคุ้มโรคครั้งที่ 2 ภายหลังการแช่วัคซีนผ่านไป 28 วัน แสดงให้เห็นว่าการแช่วัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis มีระยะเวลาในการป้องกันโรคยาวนานถึง 28 วัน โดยประเมินจากค่า RPS ในทุกชุดการทดลองที่ให้วัคซีนที่ยังคงมีค่าสูงใกล้เคียงกับการทดสอบในวันที่ 14 ภายหลังการให้วัคซีน

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีการให้วัคซีนโดยการแช่เป็นรูปแบบวิธีการที่สามารถประยุกต์ใช้ลูกปลานิลขนาดเล็กได้ โดยวิธีการแช่วัคซีนโดยตรงเป็นระยะเวลา 30 นาที มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรค *Streptococcus agalactiae* ได้ในระดับที่น่าพอใจ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การใช้วัคซีนเชื้อตาย (formalin killed) ที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ฉีดเข้าช่องท้องปลาในขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัม สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในตัวปลาให้มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในระดับที่สูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
2. การกระตุ้นซ้ำโดยการให้วัคซีนผสมอาหาร 1 และ 2 ครั้งต่อเดือน ไม่สามารถเพิ่มระดับของแอนติบอดีในซีรัมให้สูงกว่าการฉีดวัคซีนกระตุ้นเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียวได้ เมื่อพิจารณาข้อมูลในเดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 4
3. การทดสอบความคุ้มโรคในช่วงเดือนที่ 2, 3 และ 4 แสดงให้เห็นว่าการใช้วัคซีนสามารถลดอัตราการตายของปลาที่นำมาทดสอบได้โดยความต้านทานโรคของปลาที่ได้รับวัคซีนอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ และจากค่า RPS ที่มีค่ามากกว่า 60 ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนจากวิธีการที่ให้พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงยาวนานขึ้นปลาที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยการให้วัคซีนผสมอาหารจะมีความต้านทานโรคสูงกว่าปลาที่ได้รับการฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว
4. การแช่วัคซีนในลูกปลาในแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 0.26 กรัมโดยวิธีการแช่โดยตรงเป็นระยะเวลา 30 นาทีสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในการต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *Streptococcus agalactiae* ได้ในระดับที่ดี

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการให้วัคซีนกระตุ้นซ้ำที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งในส่วนจากรูปแบบวิธีการให้วัคซีนผสมอาหาร ปริมาณและระยะเวลาในการให้ที่สามารถเพิ่มความต้านทานต่อโรคตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง
2. ควรมีการศึกษาในส่วนของปัจจัยแวดล้อมในสภาพการเลี้ยงจริงเช่น คุณภาพน้ำ ความหนาแน่น มลภาวะทางน้ำ เช่น โลหะหนัก ยาฆ่าแมลง รวมถึงยาและสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการเลี้ยงที่อาจส่งผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลาในการตอบสนองต่อวัคซีนที่ได้รับเพื่อนำไปใช้พิจารณาควบคู่กับการใช้วัคซีน
3. ควรศึกษาการป้องกันแบบ Cross protection ระดับ Serotype ของเชื้อ *S. agalactiae* ของวัคซีนที่เตรียมขึ้น เพื่อนำวัคซีนไปใช้ป้องกันโรค Streptococcosis ในพื้นที่ต่าง ๆ ได้เพิ่มมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2550. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2548. ศูนย์สารสนเทศ, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ
- ศิริ กอนันตกุล. 2542. การเพาะเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ
- จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุญยรัตผลิน และกิจการ สุขมาตย์. 2529. *Streptococcus* sp. กับโรคในปลาน้ำจืด. วารสารสงขลานครินทร์ 8 (3): 329-332.
- จงดี ศรีนพรัตน์วัฒนา, สุปรานี ชินบุตร และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2535. การศึกษาเปรียบเทียบการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อระหว่างปลาคูกลุผสม (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*) และปลาคูอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) วารสารวิทยาศาสตร์การประมง 2:163-185
- เฉลิม หวันหมาน, ธนาวุฒิ กล้าเกลี้ยง และกิจการ สุขมาตย์. 2548. โรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). สงขลานครินทร์ วทท.(ฉบับพิเศษ 1) : วารสารศาสตร์ 27: 291-305.
- เฉลิม หวันหมาน. 2550. ประสิทธิภาพของวัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่อความต้านทานโรคในปลากะพงขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ชลิดา ชมานนท์ และ นนทวิทย์ อารีรักษ์. 2537. การศึกษาขนาดที่เหมาะสมของปลาคูกลุผสมเพื่อการใช้วัคซีนของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยวิธีการแช่, น. 32-38. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชนกันต์ จิตนัส. 2544. ความรู้เกี่ยวกับวัคซีนเพื่อป้องกันโรคปลา. วารสารการประมง 54(6): 515-520.

เจริญญา จันทวรรณ, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ. 2550. การศึกษาชนิดและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลานิล, น. 204-211. ใน **เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง.**

ทัศนีย์ ภูมิพิพัฒน์. 2524. ชีวประวัติของปลานิล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2524. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ธีรภรณ์ มอไชยสง. 2547. ศักยภาพของการใช้วัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มอัตราการรอดของปลานิลต่อโรค Streptococcosis. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธีรภรณ์ มอไชยสง, นิลุบล กิจอันเจริญ, เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดียว และ บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล. 2548. ประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนโดยการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิล. วารสารวิจัย มข.(บศ.) 5(1). 50-58.

นิลุบล กิจอันเจริญ. 2534. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคในปลาดุกอุย. วิทยานิพนธ์วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิลุบล กิจอันเจริญ, ชุตินา หาญจวนิช และ นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2549. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. **KKU. Res. J.** 11(1): 53-62.

นเรศ ช้วนยุค, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร คงประดิษฐ์ และกิจการ สุขมัตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วารสารสงขลานครินทร์ 27: 307-319.

นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2537. การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรค Aeromonad Septicemia ในการเลี้ยงปลาบึกอุย (รายงานการวิจัย ปี 2537-2538). คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นนทวิทย์ อารีรักษ์ และกรองแก้ว พลายมาศ. 2541. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยการแช่และการให้อาหารในปลาคูกลูกผสม, น. 118-125. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

ประพุดดี ปิยะวิริยะกุล. 2550. แนวคิดและการประยุกต์ทางวิทยาภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ, น. 329-334. ใน การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 33. หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประเสริฐ ดั่งธนกุล. 2545. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง. รายงานประกอบการศึกษาวิชาปัญหาพิเศษ. ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประวรรณ สุนทรสมัย. 2546. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับวัคซีน, น. 1-16. ใน พรณี ปิติสุทธิธรรม และชยันต์ พิเชียรสุนทร. ตำราวิทยาว่าด้วยวัคซีนรุ่นใหม่. คณะเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ไพรัตน์ กอสุธารักษ์, ประเสริฐ สิตะสิทธิ์ และวิมล จันทรโรทัย. ม.ป.ป. การทำอาหารสัตว์น้ำสำเร็จรูปแบบพื้บ้าน. กองควบคุมและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ กองส่งเสริมการประมง กรมประมง.

ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และพันธ์ศักดิ์ ไชยบุตร. 2543. การเลี้ยงปลานิล. เอกสารแนะนำ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์. 2543. สัมมนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจเพื่อการส่งออก เรื่องการเลี้ยงปลานิลในกระชังสัตว์เศรษฐกิจปี 2000. วารสารการประมง 53(3): 221-230.

เขาวนิตย์ ดนยคณ, สถาพร คิเรกนุชราคม และเพ็ญศรี เมืองเขาว. 2543. คุณสมบัติของเชื้อและการเกิดโรคจากเชื้อ β -hemolytic *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2543. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, จังหวัดสงขลา.

เขาวนิตย์ ดนยคณ และ จีรนนท์ อุไรประสิทธิ์. 2544. ผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันในปลากะรังและปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2544. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์, ชินวรรณ ศรีสุข และวรวิทย์ วัชชวลิต. 2550. ประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอกคัสในปลานิล. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 17 (1): 43-52.

Afonso, A., S. Gomes, J. Da Silva, F. Marques and M. Henrique. 2005. Side effect in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. **Fish Shellfish Immunol.** 19: 1-16

Akhlaghi, M., B.L. Munday and R.J. Whittington. 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). **J. Fish Dis.** 19: 251-258.

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.

_____ and M.N. Uddin. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacteria flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*) culture in earthen ponds in Saudi Arabia. **Aquaculture** 299: 37-44.

_____. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture in brackish water in Saudi Arabia. **Aquaculture** 250: 566-572.

- Anderson, E. D., D. V. Mourich, S.C. Fahrenkrug, S.C. Lapatra, J. Shepherd and J. C. Leong, 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. **Mol. Mar. Biol. Biotech.** 5: 114-22.
- Areechon, N., M. Endo, D. Jantawan, P. Srisapoome and N. Pirarat. 2005. Streptococcal infection in Tilapia culture of Thailand, pp. 166-174. *In* **Proceedings of the JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar 2005**, Productivity Techniques and Effective Utilization of Aquatic Animal Resources into the New Century. Kasetsart University, Thailand.
- Austin, B. and D.A. Austin . 1993. **Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish**. 2nd ed. Ellis Horwood Ltd.
- Baya, A. M., B. Lupiani, F. M. Hetrick, B. S. Roberson, R. Luckacovic, E. May and C. Poukish. 1990. Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. **J. Fish Dis.** 13: 251-253.
- Black, K. D. and A. D. Pickering. 1998. **Biology of Farmed Fish**. Sheffield Academic Press.
- Blazer, V. S. and R. E. Wolke. 1984. Effect of diet on the immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Can. J. Fish Aqua. Sci.** 41: 1244-1247.
- Bowden, T.J., D. Menoyo-Luque, I.R. Bricknell and H. Wergeland. 2002. Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Fish Shellfish Immunol.** 12: 283-285.
- Bruner, D. W. and J. H. Gillespie. 1973. **Hargan's Infections Disease of Domestic Animal**. 6th edition , Cornell University Press Ltd, London.

- Collins, C. H. 1976. **Microbiological Methods**. Butterworth's, London .
- Danilova, N., V.S. Hohman, E.H. Kim and L.A. Steiner. 2000. Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish. **Immunogenetic** 52: 81-91.
- Davidson, G.A., A.E. Ellis and C.J. Secombes. 1993. Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). **Dev. Comp. Immunol.** 17: 373-376.
- De Kinkelin, P. 1988. Vaccination against viral haemorrhagic septicaemia, pp. 172-192. In A. E. Ellis. ed. **Fish Vaccination**. Academic Press. London.
- Dominguez, M., A. Takemura and M. Tsuchiya. 2005. Effect of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.. **Aquaculture** 36: 391-397.
- Duremdez, R., A. Al- marzouk, J. A. Qasem, A. Al-Harbi and H. Gharabally. 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. **J. Fish Dis.** 27: 307-310.
- Durve, V. S. and R.T. Lovell. 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Can. J. Fish Aqua. Sci.** 39: 948-951.
- Eldar, A., Y. Bejeano, A. Livoff, A. Horovitz and H. Bercovier. 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Vet. Microbiol.** 43: 33-40.
- Eldar, A., A. Horovitz and H. Bercovier. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Vet. Immuno. Immunopatho.** 56(1-2): 175-183.

Ellis, A. E. 1988a. General Principles of Fish Vaccination, pp. 1-19. *In* A. E. Ellis. ed. **Fish Vaccination**. Academic Press. London.

_____. 1988b. Optimizing factors for fish vaccination, pp. 32-46. *In* A. E. Ellis. ed. **Fish Vaccination**. Academic Press. London.

_____. 1988c. Vaccination against enteric redmouth, pp. 85-92. *In* A. E. Ellis. ed. **Fish Vaccination**. Academic Press. London.

_____. 1999. Immunity to bacteria in fish. **Fish Shellfish Immunol.** 9(4): 291-308.

Enright, W. 2005. Disease of tilapia. **Intervet Aquatic Animal Health Newsletter** 11: 5-8.

Evans, J. J., P.H. Klesius, P. M. Gilbert, C. A. Shoemaker, M. A. Al Srawi, J. Landsberg, R. Duremdez, A. Al Marzouk and S. Al Zenki. 2002. Characterization of β - haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **J. Fish Dis.** 25: 505-513.

Evans, J. J., C. A. Shoemaker and P. H. Klesius. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (Group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine** 22: 3769-3773.

FAO Fishery and Aquaculture Information and Statistics Service. 2007. **Aquaculture Production 2005**. FAO Yearbook of Fishery Statistic Vol 100/2. 202p.

Foo, J.T. W., B. Ho and T.J. Lam. 1985. Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. **Aquaculture** 49: 185-195.

Gudding, R., A. Lillehaug and Ø. Evensen. 1999. Recent developments in fish vaccinology. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 72: 203-212.

- Gudmundsdottir, B. K. and B. Magnadottir 1997. Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* sp. *achromogenes*. **Fish Shellfish Immunol.** 7(1): 55-69.
- Hansen, J.D., E.D. Landis. and R.B. Phillips. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **J. Immunol.** 102 (19): 6919-6924.
- Horne, M. T. and A. E. Ellis. 1988. Strategies of fish vaccination, pp 55-66. In A. E. Ellis.(ed.) **Fish Vaccination**. Academic Press. London. 255 p.
- Hoshina, T., T. Sano and Y. Morimoto. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. **J. Tokyo Univ. Fish.** 44: 57-68.
- Hughes, M.J., J.C. Moore, J.D. Lane, R. Wilson, P.K. Pribul, Z.N. Younes, R.J. Dobson, P. Everest, A.J. Reason, J.M. Redfern, F.M. Greer, T. Paxton, M. Panico, H.R. Morris, R.G. Feldman and J.D. Santagelo. 2002. Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. **Infect. Immun.** 70 (3): 1254-1259.
- Huising, M. O., T. Guichelaar, C. Hoek, B.M. Lidy Verburg-van Kemenade, G. Flik, H. F.J. Savelkoul and J. H.W.M. Rombout. 2003. Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. **Vaccine** 21: 4178-4193
- Iida, T., H. Wakabayashi and S. Egusa. 1981. Vaccination for control of streptococcal disease in culture yellowtail. **Fish Pathol.** 16(4): 201-206.
- Inglis, V., R. J. Roberts and N. R. Bromage. 1993. Streptococcal infections, pp. 196-210. In V. Inglis, R.J. Roberts and N.R. Bromage. eds. **Bacterial Diseases of Fish**. Blackwell Scientific Publications.

- Irei, T., S. Watarai and H. Kodama. 2003. Humoral immune response of carp (*Cyprinus carpio*) induced by oral immunization with liposome-entrapped antigen. **Dev. Comp. Immunol.** 27: 413–421.
- Johnson, K. A., J. K. Flynn and D. F. Amend. 1982. Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. **J. Fish Dis.** 5: 207-213.
- Joosten, P.H.M., M.J. Aviles-Trigueros, P. Sorgeloos and J.H.M. Roombout. 1995. Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin. **Fish Shellfish Immunol.** 5: 289-299.
- Kitao, T. 1982. The methods for detection of *Streptococcus* sp., causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Especially, their cultural, biochemical and serological properties. **Fish Pathol.** 17: 17-26.
- _____, T. Aoki and R. Sakoh. 1981. Epizootic caused by beta-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. **Fish Pathol.** 15: 301–307.
- Klesius, P. H., C. A. Shoemaker and J. J. Evans. 1999. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.** 19(1): 1-3.
- _____. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus inae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture** 188: 237-246.

- Kusuda, R., I. Komatsu and K. Kawai. 1978. A comparative study of fish pathogenic *Streptococcus* sp. isolated from an epizootic of cultured eels. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 44 : 295-298.
- _____, K. Kawai, T. Toyoshima and I. Komatsu. 1976. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus* isolated from an epizootic of cultured yellowtail. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 42: 1345-1352.
- Lorenzen N., E. Lorenzen , K. Eoner-jensen, J. Heppell , T. Wu and H. Davis. 1998. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. **Fish Shellfish Immunol.** 8:261–70.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immunol.** 20: 137-151.
- Manzon, L. A. 2002. The Role of Prolactin in Fish Osmoregulation: A Review. **Gen. Comp. Endo.** 125(2): 291-310
- Medzhitov, R. and C.J. Janeway. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell** 91: 295-298.
- Moore, J. D., M. Ototake and T. Nakanishi. 1998. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolong exposure and the roles of skin and gill. **Fish Shellfish Immunol** 8: 393-407.
- Morrison, R. N. and B. F. Nowak. 2002. The antibody response of teleost fish. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine** 11: 46 -54.

- Nakanishi T, I. Kiryu and M. Ototake. 2002. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine** 20: 3764–3769.
- Nakatsugawa, T. 1983. A streptococcal disease of cultured flounder. **Fish Pathol.** 17: 281-285.
- Navot, N., E. Kimmel and R. R. Avtalion. 2004. Enhancement of antigen uptake and antibody production in goldfish (*Carassius auratus*) following bath immunization and ultrasound treatment. **Vaccine** 22: 2660-2666.
- Ototake, M.; G. K. Iwama and T. Nakanishi. 1996. The uptake of bovine serum albumin by the skin of bath immunised trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Shellfish Immunol.** 6: 321–333.
- Pasnik, D. J., J. J. Evans and P. H. Klesius. 2006. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. **Fish Shellfish Immunol.** 21: 365-371.
- Perera, R. P., S. K. Johnson and D. H. Lewis. 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. **Aquaculture** 152: 25-33.
- Pisam, M., C. Le Moal, B. Auperin, P. Prunet and A. Rambourg. 1995. Apical Structure of “mitochondria-rich” alpha and beta cells in euryhaline fish. **Anat. Rec.** 241: 13-24.
- Plam Jr., R. C., M. L Landolt, and R.A. Busch. 1998. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Dis. Aquat. Org.** 33: 157-166.

- Popma, T. and M. Masser. 1999. **Tilapia: life history and biology**. Southern Regional Aquaculture Center Publication 283, Stoneville, MS.
- Prasad, S. 2002. **Efficacy of Formalin-Killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. Vaccine in Red Tilapia**. M.S. Thesis (Aquaculture). Graduate School, Kasetsart University.
- Rijkers, G.T., E.M.H. Frederixs- Walters and W.B. Van Muiswinkel. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody production cells in crap (*Cyprinus carpio*). **Immunology** 41: 91-97.
- Roach, J. C. McK., P. N. Levett and M. C. Lavoie. 2006. Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems. **J. Microbiol. Methods** 67: 20-25.
- Robinson, J. A. and F. P. Meyer. 1966. Streptococcal fish Pathogen. **J. Bacteriol.** 92(2): 512.
- Romalde, J. L., A. Luzardo-Alvares, C. Ravelo, A. E. Toranzo and J. Blanco-Méndez. 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. **Aquaculture** 236: 119-129.
- Rouse, D. B. and R. R. Stickney. 1982. Evaluation of the production potential of *Macrobrachium rosenbergii* in monoculture and polyculture with *Tilapia aurea*. **J. World Mariculture Soc.** 13: 73-85.
- Sakai, M., R. Kubota, S. Atsuta and M. Kobayashi. 1987. Vaccination of rainbow trout *Salmo gairdneri* against β -haemolytic streptococcal disease. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 53: 1373-1376.
- Sano, T. and H. Fukuda. 1987. Principal microbial diseases of mariculture in Japan. **Aquaculture** 67: 59-69.

- Smith, P. D. 1988. Vaccination against vibriosis, pp. 67-84. *In* A. E. Ellis. ed. **Fish Vaccination**. Academic Press. London.
- Tatner, M. F. 1986. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout *Salmo gairdneri*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 12: 93-105.
- _____. 1987. The quaitative relationship between vaccine dilution, length of immersion time and antigen uptake using radiolabelled *Aeromonas salmonicida* bath in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture** 62: 173-185
- _____. 1996. Natural changes in the immune system of fish, pp. 255-287. *In* Iwama, G. and T. Nakanishi. eds. **The Fish Immune System**. Academic press, USA.
- _____. 1993. Fish vaccine, pp.199-224. *In* A.R. Peter. ed. **Vaccine for Verterinary Application**. Butterworth -Heiremann Ltd.
- _____, C. M. Johnson and M. T. Horne 1984. The tissue localization of *Aeromonas salmonicida* bath in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, following three methods of administration. **J. Fish Biol.** 25: 95-108
- _____ and M. T. Horne. 1983. Susceptibility and immunity to *Vibrio anguillarum* in post-hatching rainbow trout fry, *Salmo gairdneri* Richardson 1836. **Dev. Comp. Immunol.** 7: 465-472.
- Tebbit, G. L., J. D. Erickson and R. B. Vande Water. 1981. Development and use of *Yersinia ruckeri* bacterins to control enteric red month disease. **Dev. Biol. Standard.** 49: 395-401.
- Thompson, I., A. White, T. C. Fletcher, D. F. Houlihan and C. J. Secombes. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing

different amounts of vitamin C. pp. 276. *In* European Aquaculture Soc. 19, **World Aquaculture Int. Conf.**, Torremolinos, Spain.

Thorburn, M. A. and E. L. K. Jansson. 1988. The effects of booster vaccination and fish size on survival and antibody production following *Vibrio* infection of bath vaccinated rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture** 71: 285-291.

Toranzo, A. E. T, B. Magarinos and J. L. Romalde. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture** 246: 37-61.

Trewavas, E. 1982. Tilapia : Taxonomy and speciation, pp.3-13. *In* R. S. V. Pullin and R.H. Lown-McConnell (eds.) **The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings 7**, International Center for Living Aquatic Resourced Management, Manila, Philippines.

Vannuccini, S. 2004. **Overview of fish production, utilization, consumption and trade based**. FAO, Fishery Information, Data and Statistics Unit November 2004, Rome, Italy.

Vervarcke S., F. Ollevier, R. Kinget and A. Michoel. 2005. Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O2 antigen via different routes. **Fish Shellfish immunol.** 18: 125-133.

Walker, T. S. 1998. **Microbiology**. Saunders Text, Philadelphia Pennsylvania.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบริเวณจุดที่ตั้งกระชังของปลาทดลองในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

เวลาการ ตรวจวัด	ค่าพารามิเตอร์ (Mean $\pm$ S.D.)									
	อุณหภูมิ (C ⁰)		ปริมาณออกซิเจน (mg/L)		ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)		ปริมาณแอมโมเนีย (mg/L)		ปริมาณไนไตรท์ (mg/L)	
	บริเวณผิวน้ำ	บริเวณพื้นน้ำ	บริเวณผิวน้ำ	บริเวณพื้นน้ำ	บริเวณผิวน้ำ	บริเวณพื้นน้ำ	บริเวณผิวน้ำ	บริเวณพื้นน้ำ	บริเวณผิวน้ำ	บริเวณพื้นน้ำ
สัปดาห์ที่										
1	28.78 $\pm$ 0.58	26.56 $\pm$ 0.67	8.06 $\pm$ 1.01	3.50 $\pm$ 1.30	7.71 $\pm$ 0.07	7.62 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.00	0.33 $\pm$ 0.14	0.06 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.03
สัปดาห์ที่										
2	29.90 $\pm$ 0.49	28.73 $\pm$ 0.14	7.23 $\pm$ 0.32	6.56 $\pm$ 0.75	7.44 $\pm$ 0.11	7.03 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.10	0.06 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.03
สัปดาห์ที่										
4	29.18 $\pm$ 0.43	27.81 $\pm$ 0.12	6.56 $\pm$ 0.11	4.63 $\pm$ 0.15	7.54 $\pm$ 0.10	7.09 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.03
สัปดาห์ที่										
8	27.86 $\pm$ 0.42	26.35 $\pm$ 0.11	5.86 $\pm$ 1.20	2.86 $\pm$ 0.51	8.34 $\pm$ 0.14	7.86 $\pm$ 0.23	0.16 $\pm$ 0.30	0.50 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.06
สัปดาห์ที่										
12	29.25 $\pm$ 0.34	28.61 $\pm$ 0.36	4.73 $\pm$ 0.06	2.93 $\pm$ 0.11	8.08 $\pm$ 0.11	7.47 $\pm$ 0.22	0.50 $\pm$ 30.00	0.50 $\pm$ 0.00	0	0
สัปดาห์ที่										
16	27.98 $\pm$ 0.40	26.96 $\pm$ 0.81	6.93 $\pm$ 0.11	3.83 $\pm$ 0.15	7.56 $\pm$ 0.10	7.09 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.06

ตารางผนวกที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของลูกปลานิลในแต่ละวัน ในการทดสอบความคุ้มโรคครั้งที่ 1 (14 วัน หลังจากแช่วัคซีน)

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสม (%) ในแต่ละวัน						
	1	2	3	4	5	6	7
ชุดควบคุม	10	25	36.67	43.33	50	50	50
1	5	26.67	41.67	60	61.67	65	65
2	0	6.67	11.67	11.67	16.67	20	20
3	3.33	15	20	25	26.67	26.67	26.67
4	3.33	13.33	26.67	30	35	40	40
5	5	20	23.33	26.67	31.67	31.67	31.67

ชุดควบคุม คือ ลูกปลาไม่ได้รับการแช่วัคซีน

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ลูกปลาได้รับการแช่ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 1.5 %

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนโดยตรง (Direct Immersion, DI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนโดยตรง (Direct Immersion, DI) เป็นระยะเวลา 60 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 คือ ลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic Immersion (HI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 5 คือ ลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic Immersion (HI) เป็นระยะเวลา 60 นาที

ตารางผนวกที่ 3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของลูกปลานิลในแต่ละวัน ในการทดสอบความคุ้มโรคครั้งที่ 2 (28 วัน หลังจากแช่วัคซีน)

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสม (%) ในแต่ละวัน						
	1	2	3	4	5	6	7
ชุดควบคุม	3.33	10	28.33	45	58.33	60	60
1	1.67	13.33	26.67	46.67	60	66.67	66.67
2	0	0	3.33	8.83	18.33	21.67	21.67
3	0	5	11.67	20	25	26.67	26.67
4	3.33	11.67	25	35	40	41.67	41.67
5	1.67	6.67	11.67	18.33	18.33	18.33	18.33

ชุดควบคุม คือ ลูกปลาไม่ได้รับการแช่วัคซีน

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ลูกปลาได้รับการแช่ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 1.5 %

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนโดยตรง (Direct Immersion, DI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนโดยตรง (Direct Immersion, DI) เป็นระยะเวลา 60 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 คือ ลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic Immersion (HI) เป็นระยะเวลา 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 5 คือลูกปลาได้รับการแช่วัคซีนแบบ Hyperosmotic Immersion (HI) เป็นระยะเวลา 60 นาที

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายกริทธิ์ มั่นใจอาจค์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	10 สิงหาคม 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) ชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-