ประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

Efficacy of *Streptococcus agalactiae* Vaccine for the Prevention of Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์[1] ทินวรรธน์ ศรีสุข[2] วรวิทย์ วัชชวัลคุ[3]
Visanu Boonyawiwat[1] Thinnawat Srisook[2] Worawidh Wajjwalku[3]

บทคัดย่อ

เตรียมวัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ด้วยวิธี formalin-killed เพื่อใช้ศึกษาการป้องกันโรคติดเชื้อสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล ให้วัคซีนแก่ปลาโดยฉีดเข้าทางช่องท้องที่ระดับความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 เซลล์/มล. ภายหลังการทำวัคซีนเป็นเวลา 12 วัน สุ่มเลือกปลาจากทุกกลุ่มการทดลองกลุ่มละ 25 ตัว เพื่อทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดเชื้อพิษทับด้วย *S. agalactiae* เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล. สังเกตการตายเป็นเวลา 9 วัน ค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 เซลล์/มล. มีค่าเท่ากับร้อยละ -6.25, 31.25 และ 62.5 ตามลำดับ ปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล. เท่านั้นที่มีระยะเวลาการปลอดเหตุการณ์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. agalactiae* ของปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุมและมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ผลการวิจัยสรุปได้ว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นสามารถใช้ป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลอย่างได้ผลเมื่อให้วัคซีนแก่ปลาโดยการฉีดเข้าทางช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล.

คำสำคัญ: วัคซีน โรคสเตรปโตคอคโคซิส ปลานิล
Keywords: vaccine, streptococcosis, tilapia

[1] ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Farm Animal Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphangsaen, Nakornpathom, 73140
[2] หน่วยบริการฟาร์มสัตว์เศรษฐกิจ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Farm Animal Health Extension Service Unit, Fuculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphangsaen, Nakornpathom, 73140
[3] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Pathology, Fuculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphangsaen, Nakornpathom, 73140

Abstract

Streptococcus agalactiae vaccine prepared by formalin-killed method was studied for the prevention of streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*). The efficacy of the vaccine was delivered to tilapia by an intraperitoneal (i.p.) injection at concentration of 10^3, 10^6, and 10^9 colony-forming units (CFU) /ml. Twelve days post-immunization, 25 tilapia of each treatment group were randomized and challenged by the i.p. injection at the concentration of 10^9 CFU/ml of *S. agalactiae*. The mortality was observed for 9 days. The relative percent survivals (RPS) of the vaccinated groups at concentration of 10^3, 10^6 and 10^9 CFU/ml were -6.25, 31.25 and 62.5, respectively. The survival analysis showed statistically significant difference between 10^9 CFU/ml vaccinated fish and the control group ($p<0.01$). Serological evaluation revealed that the vaccinated fish had higher antibody titers against *S. agalactiae* than the non-vaccinated fish. A positive correlation between the antibody titers and RPS values of all vaccinated fish was significant ($p<0.01$). The results suggest that the i.p. vaccination at the 10^9 CFU/ml provided protective immunity against streptococcus infection caused by *S. agalactiae* in tilapia.

บทนำ

โรคติดเชื้อสเตรปโตคอคโคซิสพบแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วโลกในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลาเทราท์ (*Oncorrhinchus mykiss*), ปลาคาร์ฟ (*Cyprinus carpus*) และปลานิลลูกผสม (*Oreochromis aura X O. nilotica*) (Perera et al., 1994) โดยเฉพาะในระบบการเลี้ยงปลาแบบหนาแน่น ประมาณการณ์ว่าโรคดังกล่าวทำให้เกิดความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาของโลกคิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่า 150 ล้านดอลล่าสหรัฐอเมริกาต่อปี (Shoemaker and Klesius, 1997) เชื้อสเตรปโตคอคคัสที่ก่อโรคในปลามีอยู่หลายชนิดโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกัน กลุ่มแรกคือ cool-water streptococcosis คือเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่ก่อโรคในภาวะที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 °C ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum* และ *Carnobacterium piscicola* กลุ่มที่สองคือ warm-water streptococcosis หรือเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสที่ก่อโรคในภาวะที่น้ำมีอุณหภูมิสูงกว่า 15°C ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อแบคทีเรีย *L. garvieae*, *Streptococcus parauberis*, *S. iniae* และ *S. agalactiae* หรือชื่อพ้อง *S. difficilis* (Mata et al., 2004; Kawamura et al., 2005) อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* หรือชื่อพ้อง *S. shiloi* (Eldar et al., 1995a) เป็นชนิดที่มีการรายงานการก่อโรคบ่อยครั้งที่สุด (Perera et al., 1994) และพบอัตรา

การตายที่สูงระหว่างร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 50 ในปลาที่ติดโรค (Eldar et al., 1995b) หรืออาจจะมีอัตราการตายที่มากกว่าร้อยละ 70 ถ้ามีการเลี้ยงปลาอย่างหนาแน่น และคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม (Perera et al., 1994) ปัญหาสำคัญของการควบคุมและป้องกันโรคนี้ก็คือ การดื้อยาของเชื้อ โดยมีรายงานการดื้อยาของเชื้อต่อยาแอมพิซิลินและฟูราโซลิโดน (Perera et al., 1994; Klesius et al., 2000) นอกจากนั้นเชื้อสเตรปโตคอคคัสยังสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน (Kitao et al.,1979) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคขึ้นใหม่หลังจากการรักษา หรือเกิดการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิสเป็นประจำในพื้นที่การเลี้ยงปลาที่เคยมีการระบาดของโรคนี้มาก่อน (Sakai et al., 1987; Perera et al., 1997) ดังนั้นการใช้วัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคนี้ให้กับปลาจึงเป็นมาตรการที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง (Klesius et al., 2000) ในการลดความเสียหายจากโรคดังกล่าว วัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลาได้ถูกพัฒนาขึ้นจากเชื้อหลายชนิด เช่น β-haemolytic *Streptococcus sp.* (Sakai et al., 1987), *S. difficile* (Eldar et al., 1995c), *S. iniae* (Eldar et al., 1997; Klesius et al., 2000) โดยพบว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อชนิดใดก็จะสามารถป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนั้นๆ ได้อย่างได้ผล ไม่มีหลักฐานถึงการป้องกันโรคในลักษณะข้ามชนิด (cross protection) ของเชื้อแบคทีเรียในตระกูลนี้ นอกจากนั้นมีรายงานถึงความไม่คงที่ของประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีนต่อเชื้อชนิดเดียวกันที่แยกได้จากต่างแหล่งกัน (Klesius et al., 2000) ดังนั้นจึงควรเลือกใช้วัคซีนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อชนิดที่ตรงกับที่มีการระบาดในพื้นที่เพื่อการป้องกันโรคอย่างได้ผลหรือการใช้วัคซีนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าว เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบเป็นเชื้อสาเหตุของโรค Streptococcosis ในปลาน้ำจืดของประเทศไทยได้บ่อยครั้งที่สุด (ข้อมูลไม่ได้รายงาน) การศึกษาครั้งนี้จะใช้เชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากพื้นที่นำมาเตรียมวัคซีนโดยวิธี formalin-killed และทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคของวัคซีน เมื่อให้วัคซีนแก่ปลานิลโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง และพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนจากค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรค (Relative percent survival, RPS) การวิเคราะห์การปลอดเหตุการณ์ (Survival analysis) และระดับแอนติบอดีไตเตอร์

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

ปลาทดลอง

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 3±1 กรัม ขนาดลำตัวยาว 2±0.3 นิ้ว ซึ่งผลิตขึ้นมารุ่นเดียวกันจากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิส แบ่งปลานิลออกเป็นจำนวน 4 กลุ่มๆ ละ 40 ตัว ถูกนำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในตู้กระจกขนาด 54 ลิตร โดยให้อากาศตลอดเวลา เปลี่ยนถ่ายน้ำปริมาตร 30% ทุกๆ 3 วัน และให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกปลาดุก วันละ 2 ครั้ง ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัว

คุณภาพน้ำ

วัดค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และอุณหภูมิของน้ำทุกวัน ด้วยเครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำรุ่น YSI 550 (Yellow Spring Instrument, Yellow Springs, OH) วัดค่าพีเอชของน้ำ และแอมโมเนียในน้ำทุกๆ 3 วันด้วยชุดทดสอบคุณภาพน้ำ (Aquamerck®)

แบคทีเรีย

เชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ 40M708 เป็นสายพันธุ์ก่อโรคที่แยกได้จากไตของปลานิลในประเทศไทย และผ่านการตรวจแยกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ rapid ID 32 STREP (BioMerieux® SA) ทำการเพาะเชื้อใน Brain-heart infusion broth (BHI) (Difco®, Detroit, MI, USA) ที่อุณหภูมิ 28°C นาน 24 ชั่วโมง เติม 30% sterile glycerol ในอัตราส่วน 1:1 เก็บที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะใช้

การเตรียมวัคซีน

เตรียมวัคซีนด้วยวิธี formalin-killed ตามวิธีการของ Sakai et al. (1987) มีวิธีการย่อๆ ดังนี้ เขี่ยเชื้อ *S. agalactiae* ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ปริมาตร 25 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ปริมาตร 500 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C นาน 72 ชั่วโมง ปั่นล้างด้วย normal saline 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเติมฟอร์มาลีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3% บ่มที่ 4°C ข้ามคืน ปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย normal saline และปรับให้วัคซีนมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^9 เซลล์/มล. หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรเท่ากับ 1.9 นำวัคซีนที่เตรียมได้มาตรวจการปนเปื้อนเชื้อใน bovine blood agar และสังเกตผลในเวลา 72 ชั่วโมง เก็บรักษาวัคซีนไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้

การให้วัคซีน

ปลานิลทั้ง 4 กลุ่มที่เลี้ยงแยกกันนั้นจะได้รับวัคซีนที่แตกต่างกันดังนี้ ปลา 3 กลุ่มได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.1 มล. ที่ความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 เซลล์/มล. ในกลุ่มควบคุมฉีด normal saline เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มล.

การทดสอบความคุ้มโรคและประสิทธิภาพของวัคซีน

หลังจากทำวัคซีนเป็นเวลา 12 วัน ทำการสุ่มเลือกปลาจากแต่ละกลุ่มมากลุ่มละ 25 ตัว เพื่อใช้ทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนโดยการฉีดเชื้อพิษทับด้วยเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้เตรียมวัคซีนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^9 เซลล์/มล. เข้าช่องท้องปลาทุกตัวๆ ละ 0.1 มล. และนำปลาแต่ละกลุ่มไปแยกเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 54 ลิตร ที่มีการจัดการเช่นเดิม นับจำนวนปลาตายในแต่ละกลุ่มวันละ 2 ครั้ง (08.00 และ 18.00 น.) เป็นเวลา 9 วัน นำปลาที่ตายมาเพาะเชื้อจากไตส่วนท้ายบน bovine blood agar และทดสอบแยกชนิดของเชื้อ จำนวนปลาที่ตายทั้งหมดในแต่ละกลุ่มนำมาคำนวณหาอัตราการตาย ค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรค (Sakai et al., 1987) และการวิเคราะห์การปลอดเหตุการณ์

การเก็บตัวอย่างเลือด และการตรวจระดับภูมิคุ้มกันทางซีรัมวิทยา

ปลาที่ไม่ได้รับเลือกเพื่อใช้ในการทดสอบความคุ้มโรคของทุกกลุ่มจะถูกสุ่มเลือกขึ้นมาเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดที่โคนหาง ในวันที่ 12 หลังการทำวัคซีน โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง 1 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่ม และแต่ละตัวอย่างจะเก็บเลือดจากปลาจำนวน 3 ตัวรวมกัน ทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นแยกซีรัมและเก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

วัดระดับภูมิคุ้มกันในซีรัมต่อเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี microtitration agglutination test ตามวิธีของ Klesius et al. (2000) ซึ่งมีวิธีการย่อๆ ดังนี้ เติม phosphate-buffered saline (PBS) พีเอช 7.4 ปริมาตร 50 µl ลงในทุกหลุมของ 96-well microtitration plate เติมตัวอย่างซีรัมของปลานิลปริมาตร 50 µl ลงในหลุมแรกของทุกแถว ผสมซีรัมกับ PBS ให้ดี เจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution กับหลุมที่เหลือในแถว เติม 50 µl ของเชื้อ *S. agalactiae* ลงในทุกหลุมและผสมให้เข้ากันดี บ่มในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิ 25°C นานข้ามคืน อ่านผลแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดที่ให้ผลบวกในรูปแบบ $\log_{10}$ base

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบระยะเวลาการตายของปลานิลหลังได้รับการฉีดเชื้อพิษทับด้วยการวิเคราะห์การปลอดเหตุการณ์ด้วยโปรแกรม STATA 8.2 และหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคกับระดับแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยวิธี Pearson correlation coefficient ด้วยโปรแกรม Minitab 14 สังเกตความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.01$

ผลการทดลอง

ค่าคุณภาพน้ำเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาในการทดลองมีดังนี้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ 6.5±0.23 ppm อุณหภูมิ 27±2.2°C พีเอช 7.6±0.1 และแอมโมเนียรวม 0.08±0.05 มก./ลิตร

การตายของปลานิลในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเริ่มต้นในวันที่ 3 หลังจากการฉีดเชื้อพิษทับ ในขณะที่การตายของปลาในกลุ่มควบคุมเริ่มในวันที่ 2 หลังจากการฉีดเชื้อพิษทับ โดยที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมสูงสุดร้อยละ 64 อย่างไรก็ตามมีเพียงอัตราการตายสะสมของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล. เท่านั้นที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 24 ค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคของการให้วัคซีนที่ความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 เซลล์/มล. มีค่าเท่ากับร้อยละ -6.25, 31.25 และ 62.5 ตามลำดับ (Table 1)

จากโค้งการปลอดเหตุการณ์ (Survival curve) ของปลานิลกลุ่มควบคุม และปลานิลที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 10^6 และ 10^9 เซลล์/มล. มีอัตราการรอดชีวิตภายหลังจากการฉีดเชื้อพิษทับเป็นเวลา 9 วันสูงกว่ากลุ่มควบคุมร้อยละ 20 และ

40 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 10^3 เซลล์/มล. (Figure 1) จากการวิเคราะห์การปลอดเหตุการณ์มีเพียงปลานิลกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล. เท่านั้นที่มีระยะเวลาการปลอดเหตุการณ์แตกต่างจากปลานิลในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.005$, Chi-square test) (Table 1)

ระดับแอนติบอดีที่ต่อต้านเชื้อ *S. agalactiae* ในซีรัมของปลานิลในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีแนวโน้มที่จะสูงกว่าของปลานิลในกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (Table 1) นอกจากนั้นระดับแอนติบอดีต่อเชื้อในซีรัมของปลานิลกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีความสัมพันธ์กับค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าสัมประสิทธิความสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.87 และ $p = 0.003$

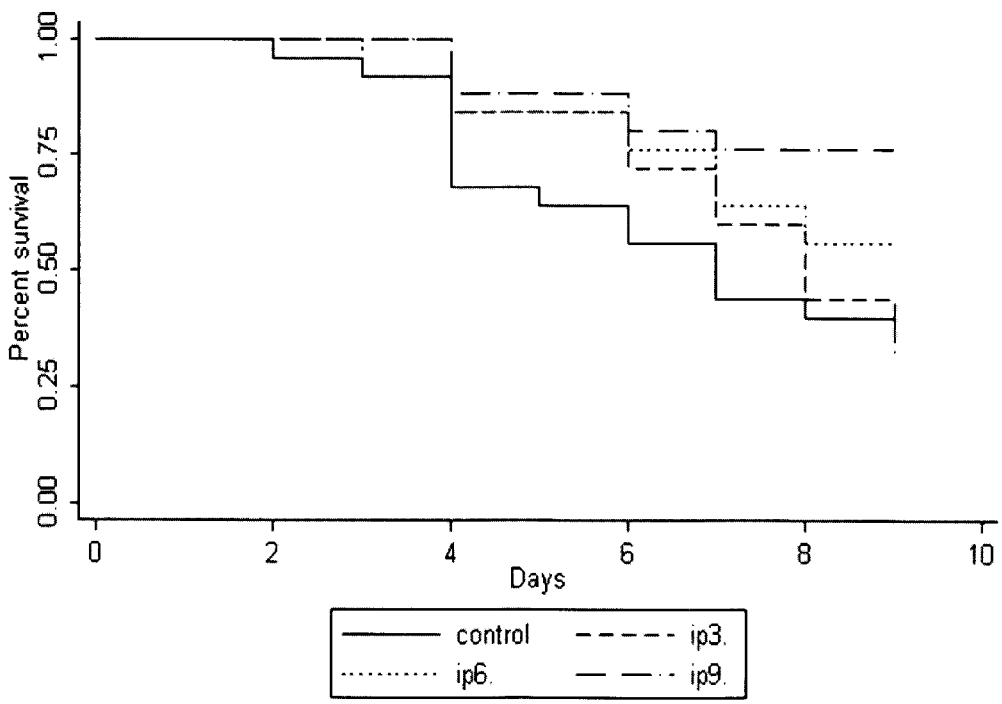

Figure 1 Kaplan-Meier survival curves of *S. agalactiae* i.p. vaccinated at concentration of 10^3(ip3), 10^6 (ip6) and 10^9 (ip9) CFU/ml and non-vaccinated (control) tilapia after challenged with *S. agalactiae* and observed for 9 days.

Table 1 Mortality, relative percent survival (RPS) and survival analysis of *S. agalactiae* i.p. vaccinated and non-vaccinated tilapia at 9 days post-challenged with *S. agalactiae*. Antibody titer against *S. agalactiae* of vaccinated and non-vaccinated tilapia after 12 days immunization.

N	Dose CFU	Mortality (%)	RPS	Survival analysis chi^2 (P)	$log\ base_{10}$ titer against *S. agalactiae*
25	10^3	68	-6.25	0.715	-0.903
25	10^6	44	31.25	0.133	-1.104
25	10^9	24	62.5	0.005	-1.505
25	control[a]	64	-	-	-0.602

[a] Non-vaccinated received normal saline (0.85% NaCl) only.

บทวิจารณ์

วัคซีนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี formalin-killed และนำไปให้แก่ปลานิล โดยการฉีดเข้าช่องท้องให้ผลในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีนนั้นมีความเกี่ยวข้องกับระดับความเข้มข้นของวัคซีนเป็นอย่างมาก โดยพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนที่มีความเข้มข้นมากขึ้นจะสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้นเช่นกัน จากผลการทดลองพบว่ามีเพียงกลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนซึ่งมีความเข้มข้น 10^9 เซลล์/มล. เท่านั้นที่มีค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคมากกว่าร้อยละ 60 ซึ่งถือว่าเป็นระดับที่วัคซีนสามารถมีผลในการป้องกันโรคได้ (Sakai et al., 1987) นอกจากนั้นกลุ่มทดลองดังกล่าวยังมีระยะเวลาการปลอดเหตุการณ์ (การตาย) ยาวนานกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อย่างไรก็ตามการให้วัคซีนแก่ปลาโดยการฉีดเข้าช่องท้องเป็นวิธีที่มีโอกาสน้อยที่จะนำไปใช้จริงในทางปฏิบัติ เนื่องจากปัญหาความยุ่งยากในการทำวัคซีน สิ้นเปลืองแรงงาน และปลาจะเครียดหรือบาดเจ็บได้ในระหว่างการทำวัคซีน จึงมีความพยายามให้วัคซีนแก่ปลาโดยวิธีการอื่น เช่น การแช่ปลาในวัคซีน และการให้กิน เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองการให้วัคซีนแก่ปลานิลโดยวิธีการกินร่วมด้วยแต่เนื่องจากข้อมูลการศึกษาไม่ครบถ้วนจึงไม่สามารถนำแสดงในรายงานนี้ แต่ผลที่ได้ก็พอจะแสดงให้เห็นแนวโน้มว่าการให้วัคซีนแก่ปลาโดยการให้กินวัคซีนในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ คือผสมวัคซีนกับอาหารสำเร็จรูปให้กินจำนวน 2 มื้อติดกัน ในขนาดตัวละ 0.1 มล./มื้อ ที่ความเข้มข้นของวัคซีน 10^9 เซลล์/มล. นั้นไม่สามารถกระตุ้นให้ปลาสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้อย่างเพียงพอเพื่อการป้องกันโรค อย่างไรก็ตามมีผลการศึกษาที่แสดงว่าการให้ปลาเรนโบว์ เทราท์ ที่มีขนาด 10 กรัม

กินวัคซีนในรูป whole cell bacteria ในความเข้มข้นสูง คือ ผสมเชื้อ *Vibrio anguillarum* เปียก (wet pack cell mass) ขนาด 6 มก. ต่ออาหารหนัก 1 กรัม โดยให้อาหารในอัตราร้อยละ 4.5 ของน้ำหนักตัวปลาต่อวัน ติดต่อกันนาน 5 วันและทดสอบความต้านทานโรคภายหลังการให้วัคซีนแล้วนาน 28 วัน พบว่าวัคซีนมีค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคถึงร้อยละ 83.3 (Palm et al., 1998) สาเหตุของความล้มเหลวในการป้องกันโรคของวัคซีนที่ให้แก่ปลาโดยวิธีการผสมอาหารให้กินนั้นอาจเกิดขึ้นจากการที่วัคซีนบางส่วนอาจสูญหายไปกับน้ำในระหว่างการให้อาหาร นอกจากนั้นวัคซีนอาจสูญเสียลักษณะทางแอนติเจนนิคไปบางส่วนจากการทำลายของกรดและน้ำย่อยระหว่างที่ผ่านกระเพาะและลำไส้ส่วนต้นของปลา ทำให้ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนลดลงได้ ดังนั้นความสำเร็จของการให้วัคซีนแก่ปลาด้วยวิธีการกินนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณวัคซีนที่ปลาได้รับว่าจะต้องมีปริมาณมากพอที่จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ และวัคซีนจะต้องคงสภาพแอนติเจนนิคเอาไว้ได้จนถึงลำไส้ส่วนท้ายของปลาซึ่งเป็นส่วนที่จะรับแอนติเจนและสร้างภูมิคุ้มกันขึ้น เพื่อแก้ปัญหานี้ได้มีการศึกษาวัคซีนในลักษณะ microcapsules โดยการใช้สาร alginate มาเคลือบวัคซีนเพื่อลดความสูญเสียของวัคซีนในขบวนการย่อยอาหารของปลาซึ่งก็ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (Gudding et al., 1999) การทำวัคซีนโดยวิธีการแช่ก็ได้ผลในการป้องกันโรคได้ดีเช่นกัน โดยมีการศึกษาถึงการทำวัคซีนชนิดแบคทีรินเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่าสามารถให้ค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคถึงร้อยละ 94.1 และ 100 เมื่อทดสอบความต้านทานโรคภายหลังการให้วัคซีนแล้วนาน 28 และ 91 วัน ตามลำดับ (Palm et al., 1998) อย่างไรก็ตามการให้วัคซีนโดยการแช่นั้นจะกระทำได้ก็ต่อเมื่อปลานั้นยังมีขนาดเล็ก และนิยมกระทำเฉพาะในช่วงก่อนที่จะปล่อยลูกปลาลงเลี้ยงในบ่อดิน หรือกระชังในแหล่งน้ำธรรมชาติเท่านั้น

จากการศึกษาพบว่าการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมีแนวโน้มที่จะกระตุ้นให้ปลานิลสร้างแอนติบอดีต่อต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคโคซิสได้ ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Palm et al. (1998) ที่สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *V. anguillarum* ได้ภายหลังจากการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว ส่วนการทำวัคซีนโดยการให้กินหรือแช่จะสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีได้ภายหลังการทำวัคซีนในครั้งที่สอง Gudding et al. (1999) กล่าวว่าระดับแอนติบอดีในซีรัมมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการป้องกันโรคของปลา ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่ระดับแอนติบอดีในซีรัมของปลานิลมีความสัมพันธ์กับค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนที่เตรียมขึ้นในการทดลองนี้พบว่ามีค่าน้อยกว่าการทดลองในลักษณะเดียวกัน เช่น การทดลองวัคซีนป้องกันเชื้อ *S. iniae* ในปลานิลของ Klesius et al. (2000) ให้ค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคสูงสุดถึงร้อยละ 93.7 เมื่อทำวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องและทดสอบความต้านทานโรคภายหลังจากการให้วัคซีนนาน 30 วัน ความแตกต่างนี้อาจเกิดเนื่องจากวิธีการเตรียมวัคซีนที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาดังกล่าวใช้ทั้ง

เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส และโปรตีนที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกันในการเตรียมเป็นวัคซีน โดยพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะมีโปรตีนบางชนิดที่แบคทีเรียสร้างและขับออกมาที่มีลักษณะเป็นแอนติเจนที่สำคัญต่อการป้องกันโรคติดเชื้อสเตรปโตคอคโคซิสได้ นอกจากนั้นค่าความคุ้มโรคที่แตกต่างกันนั้นอาจมีสาเหตุจากระยะเวลาหลังจากการทำวัคซีนจนถึงการทดสอบความคุ้มโรคในการทดลองนี้สั้นกว่าการศึกษาอื่นๆ ที่ปกติจะใช้เวลามากกว่า 4 สัปดาห์ จึงทำการทดสอบคุ้มโรค (Toranzo et al., 1995) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าปลาสามารถสร้างภูมิต้านทานจนถึงระดับที่สามารถคุ้มโรคได้ภายหลังจากการได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องในระยะเวลาเพียง 12 วัน

วัคซีนที่เตรียมขึ้นนี้แม้จะได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถใช้ป้องกันติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในปลานิลได้อย่างได้ผล แต่ยังจำเป็นต้องมีการพัฒนาทั้งในด้านวิธีการเตรียม การใช้สื่อ (adjuvant) ชนิดต่างๆ ที่จะมาผสมเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน รวมทั้งการพัฒนารูปแบบของวัคซีนเพื่อให้ง่ายต่อการใช้ ซึ่งจะทำให้วัคซีนนี้เหมาะแก่การนำไปใช้ได้จริงในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

กองทุนพัฒนานิสิต และโครงการพัฒนาวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้สนับสนุนทุนสำหรับงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Eldar, A., Frelier, P.F., Asanta, L., Varner, P.W., Lawhon, S. and Bercovier, H. 1995a. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 840-842.

Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitez, A. and Bercovier, H. 1995b. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. Vet. Microbiol. 43(1): 33-40.

Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. and Bercovier, H. 1995c. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. Vaccines 13(9): 867-870.

Eldar, A., Horovitez, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Vet. Immunol. Immunopathol. 56: 175-183.

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

Kawamura, Y., Itoh, Y., Mishima, N., Ohkusu, K., Kasai, H. and Ezaki, T. 2005. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar et al. 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). Int. J. Syst. Evol Microbiol. 55: 961-965.

Kitao, T., Aoki, T. and Iwata, K. 1979. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail (*Setiola quinqueradiafa)-I.* Distribution of *Streptococcus* sp. in seawater and muds round yellowtail farms. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45(5): 567-572.

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

Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Dominguez, L. and Fernandez-Garayzabal, J.F. 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3183-3187.

Palm Jr, R.C., Landolt, M.L. and Busch, R.A. 1998. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org. 33: 157-166.

Perera, R.P., Johnson, S.K. and Collins, M.D. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *T. nilotica* X *T. aurea* hybrids. J. Aquat. Anim. Health. 6(4): 335-340.

Perera, R.P., Johnson, S.K. and Lewis, D.H. 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. Aquaculture 152: 25-33.

Sakai, M., Kubota, R., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1987. Vaccination of rainbow trout *Salmo gairdneri* against β-haemolytic streptococcal disease. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 53(8): 1373-1376.

Shoemaker, C. and Klesius, P. 1997. Streptococcal disease problems and control – A review. In: Tilapia Aquaculture vol. 2, K. Fitzsimmons (ed). Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY, pp. 671-682.

Toranzo, A.E., Devesa, S., Romalde, J.L., Lamas, J., Riaza, A., Leiro, J. and Barja, J.L. 1995. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. Infection in turbot. Aquaculture 134: 17-27.