RESEARCH ARTICLE

Efficacy of Vaccine Combined Freud's Complete Adjuvant to Prevent Streptococcosis in Nile Tilapia

Bundit Tengjaroenkul[1*], Surapong Yowarach[2]

Abstract

Objective — To evaluate efficacy of streptococcal vaccine and the vaccine combined with Freud's complete adjuvant given by intraperitoneal injection in Nile tilapia.

Materials and Methods — Fish were randomly assigned into 3 groups, 20 fish in each group. In the first group (control), each fish was injected with 0.1 ml phosphate buffer saline. In the second group, each fish was injected with vaccine without adding Freud's complete adjuvant (FCA). In the third group, each fish was injected the vaccine with FCA ratio 1:1 w/w. All fish were injected twice at 2 weeks interval. Blood samples were collected for antibody titer assay (direct agglutination test) at day 14 after the second injection. Then, a week later, all fish were challenged with live *Streptococcus agalactiae* at concentration 10^7 cells/ml. Survival rates of fish in each group were observed within 7 days.

Results — Antibody titers of fish in control group, fish received vaccine without adding FCA and fish received vaccine with FCA were significantly different from each other (with the values of 0, 292 and ≥2,048, respectively). Survival analysis showed significant difference between fish in different groups. The survivals of fish in control group, fish received vaccine without FCA and fish received vaccine with FCA were 60, 84.44 and 93.56%, respectively.

Conclusion — The vaccine combined with Freud's complete adjuvant when administered by intraperitoneal injection in Nile tilapia was more effective than that of without the adjuvant.

KKU Vet J. 2009;19(2):188-196 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: Streptococcus; Vaccine; Adjuvant; Survival; Tilapia

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

[2]Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

*__Corresponding author__: Tel. 043-364491, E-mail: btengjar@kku.ac.th

ประสิทธิภาพวัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล[1*], สุรพงษ์ โยวะราช[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนและวัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ทดลองประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย *Streptococcus agalactiae* ความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในปลานิลในสภาพการเลี้ยงจริง โดยแบ่งปลาเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมฉีดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีน 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว และกลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ในอัตราส่วน 1:1 โดยทุกกลุ่มจะให้โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง และฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกครั้งในวันที่ 14 หลังการให้วัคซีนครั้งแรก ตรวจค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากซีรั่มในวันที่ 14 หลังการให้วัคซีนครั้งที่ 2 จากนั้น 3 สัปดาห์หลังการให้วัคซีนครั้งที่ 2 ทำการฉีดเชื้อเป็น *S. agalactiae* 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเข้าทางช่องท้อง แล้วบันทึกอัตรารอดภายใน 7 วันหลังการฉีดเชื้อ

ผลการศึกษา พบว่าปลากลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับวัคซีนไม่ผสมแอดจูแวนท์ และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 0, 292 และไม่น้อยกว่า 2048 ตามลำดับ ปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าปลากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังการฉีดเชื้อเป็น ปลากลุ่มควบคุมมีอัตรารอด 60% กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตรารอด 84.44% กลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผสมแอดจูแวนท์มีอัตรารอด 93.56%

ข้อสรุป การให้วัคซีนผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์เพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลมีประสิทธิภาพดีกว่าการให้วัคซีนเพียงอย่างเดียว

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19(2):188-196 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: สเตรปโตคอคคัส วัคซีน แอดจูแวนท์ อัตรารอด ปลานิล

[1]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[2]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** โทร. 043-364491 E-mail: btengjar@kku.ac.th

บทนำ

ที่ผ่านมาการเพาะเลี้ยงปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) ในประเทศไทย มีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้การเพาะเลี้ยงเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบเชิงพาณิชย์มากขึ้น เป็นการเลี้ยงในสภาพความหนาแน่นสูง ซึ่งทำให้ปลาเครียด อ่อนแอ ป่วยง่าย และทำให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคตามมา โรคที่มักพบในปลานิลคือโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งก่อผลกระทบกับปลาทุกระยะของการเลี้ยงในระดับความรุนแรงที่แตกต่างกันไป จิตต์เกษม และคณะ [1] พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มักทำให้เกิดโรคในปลาน้ำจืด ได้แก่ สกุล Aeromonads ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ชนิดที่พบบ่อยคือ *A. hydrophila* นอกจากนี้ยังมีสกุล Streptococcus ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่เป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล ชนิดที่มีรายงานในสัตว์น้ำ ได้แก่ *S. Iniae* [2] และเชื้อ *S. agalactiae* [3] เชื้อ Streptococcus มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ส่วนใหญ่กลุ่มที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบ β และ γ-haemolysis เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปลานิลตาย [2,4,5] ส่วนกลุ่มที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบ α-haemolysis นั้นพบเป็นส่วนน้อยโดยมีรายงานว่าเป็นสาเหตุการตายของปลานิลลูกผสมระหว่าง *O. niloticus* และ *O. aureus* ที่เลี้ยงในประเทศซาอุดิอาระเบีย และอิสราเอล [6,7] ในประเทศไทยมีการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังและบ่อดินในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีสาเหตุจากเชื้อ Streptococcus กลุ่ม β-haemolysis

ปัญหาสำคัญของการรักษาโรคนี้คือ การดื้อยาของเชื้อ ทำให้การรักษาไม่ได้ผลดี ดังนั้นการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคจึงมีความจำเป็น เพื่อลดความเสียหายจากโรคดังกล่าว [8] ผลการใช้วัคซีนในสัตว์น้ำมีการศึกษากันมากในต่างประเทศและพบว่าได้ผลดี [9] การใช้วัคซีนจึงน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ในการป้องกันโรคปลา การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด แม้จะค่อนข้างยุ่งยาก สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน แต่ก็เป็นวิธีที่ให้ผลในการป้องกันโรค จึงได้เกิดแนวคิดในการเพิ่มความต้านทานโรคโดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันผสมในวัคซีนชนิดฉีดคือ ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ หรือ Freund's Complete Adjuvant (FCA) ซึ่งเป็นน้ำแขวนลอยน้ำมันที่มีการผสมเชื้อตายของ *Mycobacterium butyricum* ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการใช้วัคซีนและการใช้วัคซีนผสมแอดจูแวนท์ โดยพิจารณาจากระดับการสร้างแอนติบอดี และอัตรารอดหลังปลาได้รับเชื้อ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ปลาทดลอง

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนักประมาณ 92 กรัม จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดและไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคสเตรปโตคอคโคซิส แบ่งปลานิลออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ในกระชัง และให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว

การเตรียมวัคซีน

เตรียมวัคซีนด้วยวิธี formalin-killed โดยเขี่ยเชื้อ *S. agalactiae* ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปั่นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับให้วัคซีนมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วเติมฟอร์มาลีนความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ปั่นล้างฟอร์มาลินด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การให้วัคซีน

ปลานิลทั้ง 3 กลุ่มที่เลี้ยงแยกกันนั้นจะได้รับวัคซีนที่แตกต่างกันดังนี้ ปลากลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมฉีดฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2 ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนผสมแอดจูแวนท์ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดปลาทุกกลุ่ม 2 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การเก็บตัวอย่างเลือด และการตรวจระดับภูมิคุ้มกันทางซีรั่มวิทยา

ทำการเก็บตัวอย่างจากหลอดเลือดที่โคนหางในวันที่ 14 โดยเริ่มนับจากการทำวัคซีนครั้งที่ 2 เก็บเลือดจากปลาแล้วทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นแยกซีรั่มและนำไปตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี direct agglutination test [7]

การทดสอบความต้านทานโรคและประสิทธิภาพของวัคซีน

หลังจากให้วัคซีนครั้งที่ 2 เป็นเวลา 3 สัปดาห์จะฉีดเชื้อเป็นของ *S. agalactiae* เข้าช่องท้องในปลาทุกกลุ่มเพื่อทดสอบความต้านทานโรคและประสิทธิภาพของวัคซีนโดยความเข้มข้นที่ใช้ในการฉีดเชื้อ คือ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตรต่อตัว จากนั้นนับจำนวนปลาตายทุกวันนาน 1 สัปดาห์ นำปลาที่ตายมาเพาะเชื้อจากไตบน blood agar และทดสอบแยกชนิดของเชื้อ จำนวนปลาตายทั้งหมดในแต่ละกลุ่มนำมาคำนวณหาอัตราการตายและอัตรารอด

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันจากค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิลทั้ง 3 กลุ่ม ด้วย Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SAS 6.1

ผลการศึกษา

ในการศึกษาเปรียบเทียบการให้วัคซีนกับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วทำการตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ พบว่ากลุ่มควบคุมไม่มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย 292 และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ในอัตราส่วน 1:1 มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ไม่น้อยกว่า 2,048 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มอื่น ($p<0.05$) (**Table 1**)

การตายของปลานิลเริ่มพบในวันที่ 3 หลังจากการฉีดเชื้อพิษทับ ในขณะที่การตายของปลาในกลุ่มที่ให้วัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีน้อยที่สุดคือ เฉลี่ย 6.44 ± 1.85% และอัตราการรอดเฉลี่ยสูงสุดเฉลี่ย 93.56 ± 1.85 % ส่วนในกลุ่มที่ให้วัคซีนที่ไม่ได้ผสมแอดจูแวนท์พบว่า ปลามีอัตราการตายมากกว่ากลุ่มที่ผสมแอดจูแวนท์ แต่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีอัตราการตายเฉลี่ย 15.56 ± 3.34 % และอัตราการรอดเฉลี่ย 84.44 ± 3.34 % ส่วนกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายเฉลี่ยสูงสุดคือ 40 ± 6.67% และอัตรารอดเฉลี่ย 60 ± 6.67 % โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (**Table 2, Figure 1**)

Table 1. Antibody Titers in Nile Tilapia After Intra-peritoneal Injection

Treatments	Average of the Titers
Control (no vaccine)	0±0
Vaccine without adjuvant added	292±11.5[a]
Vaccine with adjuvant (ratio = 1:1)	≥2048±0[b]

[a,b]Different superscripts indicate a significant difference.

Table 2. Survival Rates of Nile Tilapia After Injected with *S. Agalactae* 10^7 cells/ml

Treatments	Survival rates (%)
Control (no vaccine)	60 ± 6.67
Vaccine without adjuvant added	84.44 ± 3.34[a]
Vaccine with adjuvant (ratio = 1:1)	93.56 ± 1.85[b]

[a,b]Different superscripts indicate a significant difference.

วิจารณ์

จากผลการทดลองนี้ที่ใช้วัคซีนเชื้อตาย *S. agalactiae* ผสมคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรในปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ขนาดประมาณ 92 กรัม มีระดับแอนติบอดี้ไตเตอร์เฉลี่ยไม่น้อยกว่า 2,048 หลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการฉีดเชื้อตายชนิดที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ ($p<0.05$) ผลการทดลองนี้ให้ผลคล้ายคลึงงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งสรุปว่าการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องในปลานิลและปลาชนิดอื่นๆ เป็นวิธีการที่กระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในซีรั่มที่มีประสิทธิภาพ [3,7,8,10] วิธีการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมักทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันดีกว่า การฉีดเข้ากล้าม และผสมอาหาร การฉีดวัคซีนครั้งเดียวกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่สูงเท่าการฉีดอย่างน้อย 2 ครั้ง [8,10-12] เช่นเดียวกันกับการวิจัยของ Surendra [13] ที่ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตายจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าการให้วัคซีนเชื้อตายเฉพาะครั้งที่สองเท่านั้นที่มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูง ผลการใช้

แอดจูแวนท์ต่ออัตรารอดในครั้งนี้ก็สอดคล้องกับรายงานของ Surendra [13] ที่ได้ศึกษาการใช้วัคซีนเชื้อตายซึ่งเตรียมจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดง (*O. niloticus*, Linn) โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตรารอดสูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน Eldar และคณะ [7] กล่าวว่าการฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ของเชื้อ *S. difficilis* เข้าช่องท้องแก่ปลานิลให้ผลในการป้องกันโรคได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่เป็นโฮโมโลกัสและเฮทเทอโรไซกัสวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus* spp. แต่วัคซีนให้ผลในการป้องกันโรคได้ค่อนข้างต่ำ ในปลานิลแดง คือ 42.55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในปลาเทราท์สายรุ้งให้ผลในการป้องกันโรคได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ [11]

Figure 1. Fish Died from Experimentally Challenged with *S. Agalactiae*

Arrows indicate hemorrhage in head, body, and fin of the fish.

ความเข้มข้นของวัคซีนที่ใช้ก็มีผลโดยตรงต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่ง Eldar และคณะ [10] ได้ทดลองให้วัคซีนเชื้อตายแก่ปลาเทราท์สายรุ้ง พบว่าวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น $3x10^{11}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปลาต้านทานโรคได้ดีกว่าการให้วัคซีนในระดับที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ Klesius และคณะ [8] รายงานว่า ความเข้มข้นของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus sp.* ที่ฉีดเข้าช่องท้องส่วนใหญ่มีค่าประมาณ $1x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ดี เช่นเดียวกับในปลานิลแดงซึ่งได้รับการฉีดวัคซีนที่ระดับ $1x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้ปลานิลแดงตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร [14] และ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร [15] ก็สามารถให้ปลานิลตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน ขนาดและอายุของสัตว์ก็มีผลต่อระดับการสร้างภูมิคุ้มกัน

สัตว์ที่มีขนาดใหญ่และอายุมากมักตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่าสัตว์ที่มีขนาดเล็กและอายุน้อยกว่า Thorburn และ Jansson [16] ได้ทำการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลาเทราท์สายรุ้งขนาดต่างๆ กันให้ได้รับวัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* ที่ระดับความเข้มข้น 1:500 พบว่าปลาขนาดเล็กจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันน้อยกว่าปลาขนาดใหญ่ และ Quentel และ Baulny [17] ได้ทำการทดลองฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพียงครั้งเดียวเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาเทอร์บอท (*S. maximus*) วัยรุ่น ที่อายุต่างกัน พบว่าอัตราการรอดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุระหว่าง 90-104 วัน หลังจากได้รับการฉีดวัคซีนเป็นเวลา 2 เดือน

แอดจูแวนท์เป็นสารผสมในวัคซีนหรือแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท [18] ดังนี้ 1) สารอนินทรีย์ เช่น อลูมิเนียมฟอสเฟต 2) อิมัลชั่น เช่น ฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ แอดจูแวนท์ชนิดอินคอมพลีทไม่นิยมใช้เพราะมักก่อให้เกิดฝีที่ตำแหน่งฉีดและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมักมีประสิทธิภาพต่ำกว่าแบบคอมพลีทแอดจูแวนท์ 3) สารประกอบจำพวกไขมัน (lipophilic compound) เช่น ซาโปนิน และวิตามินเอ และ 4) แบคทีเรีย เช่น เชื้อบอเดทเทลล่าเพอทูซิส (*Bordetella pertussis*) และเชื้อไมโคแบคทีเรียม (*Mycobacterium spp.*) ชนิดเชื้อตายที่ผสมในฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ ผนังเซลล์ของเชื้อในโครงสร้างที่เรียกโพลีเมอริค เปปติโดไกลแคน (polymeric peptidoglycan) ซึ่งจะมีน้ำตาล 1 โมเลกุลเกาะอยู่กับอะมิโนแอซิด 3 ตัว ปัจจุบันมีการใช้สารสังเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เลียนแบบโครงสร้างข้างต้นที่เรียก muramyl dipeptide (MDP) แต่สารนี้จะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเมื่ออยู่ในรูปละลายน้ำ

จากการทดลองพบว่าการให้วัคซีนที่ผสมแอดจูแวนท์ให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์มาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของจิตต์เกษมและคณะ [1] ที่ให้ FCA ผสมกับเชื้อ *A. hydrophila* ในอัตราส่วน 1:1 แล้วฉีดเข้าช่องท้องปลาช่อนพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์จะมีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนที่ไม่มีแอดจูแวนท์ อัตราส่วนของวัคซีนต่อแอดจูแวนท์ไม่มีผลต่อค่าแอนติบอดีไตเตอร์ จากการศึกษาของ Ruangpan และคณะ [19] พบว่าเมื่อให้วัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อตาย *A. hydrophila* ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องให้ผลไม่แตกต่างกันระหว่างการฉีดแบบผสมแอดจูแวนท์และไม่ผสมแอดจูแวนท์ ส่วนนิลุบล [3] พบว่าการฉีดวัคซีนทั้งแบบผสมและไม่ผสมแอดจูแวนท์ สามารถกระตุ้นให้ปลาดุกอุยมีความต้านทานโรคซึ่งเกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* ได้ ธีราภรณ์ [20] พบว่าหลังการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปลานิลครั้งแรก ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ค่อนข้างต่ำ หลังจากการกระตุ้นวัคซีน ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ เริ่มมีค่าสูงขึ้น และ Grabowski และ Cain [21] รายงานว่าปลานิลไนล์ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย *Flovobacterium columnare* ผสมฟรอยด์แอดจูแวนท์ อัตราส่วน 1:1 มีระดับแอนติบอดี้ไตเตอร์เฉลี่ย 11,200 หลังการทำวัคซีนครั้งแรก และเพิ่มขึ้นเป็น 30,600 หลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งแตกต่างอย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ที่มีระดับไตเตอร์เฉลี่ย 67 หลังการทำวัคซีน 6 สัปดาห์ Ali-Harbi [6] รายงานว่าระดับภูมิคุ้มกันของปลานิลไนล์ที่ทำวัคซีนเชื้อตาย *A. hydrophila* ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์ ไม่แตกต่างจากฟรอยด์อินคอมพลีทแอดจูแวนท์ ระดับไตเตอร์ของวัคซีนผสมแอดจูแวนท์เริ่มลดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 8 หลังทำวัคซีนครั้งที่ 2 แอดจูแวนท์ชนิดน้ำปนน้ำมันหรือชนิดน้ำมัน

ปนน้ำ มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนในรูปน้ำที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์

จากการทดลองสรุปได้ว่าการให้วัคซีนที่ผสมฟรอยด์คอมพลีทแอดจูแวนท์มีประสิทธิภาพ สูงสุดในการต่อต้านโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

เอกสารอ้างอิง

1. จิตต์เกษม จันทร์ผ่อง, สุปราณี ชินบุตร และวรเทพ ศุภเมธากร. 2536. การศึกษาทางด้านการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาช่อนหลังจากการให้วัคซีน. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี.กรมประมง.หน้า 313-317.
2. Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *streptococcus difficile:* two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbiol.* 1994;28:139-143.
3. นิลุบล กิจอันเจริญ, ชุติมา หาญจวนิช และนงนุช สุวรรณเพ็ง. 2545. ประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. วารสารวิจัย มข. 2545; 11:53-61.
4. Cook DW, Lofton SR. Pathogenicity studies with *Streptococus* sp. isolated from fishes in an Alabama-Florida fish kill. *Transaction's of the American Fisheries Society.* 1975;104:286-288.
5. Kitao T, Aoki T, Sakou R. Epizootic cause by β-haemolytic Streptococcus species in fresh water fish. *Fish Pathol.* 1981;15:301-307.
6. Al-Harbi AH. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. *Aquaculture.* 1997;128:195-201.
7. Eldar A, Shapiro O, Bejerano Y, Bercovier H. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. *Vaccine.* 1995; 13:867-870.
8. Klesius PH, Shoemaker CA, Evans, JJ. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intra-peritoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 2000;188:237-246.
9. Ellis AE. Fish Vaccination. DAFS Marine Laboratory PO Box 101 Victoria Road Aberdeen AB9 8D8. New York: Academic Press; 1988.
10. Eldar A, Horovitcz A, Bercovier H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Vet Immonol Immunopathol.* 1997;56:175-183.
11. Sakai M, Kamiya H, Ishii S, Atsuta S, Kobayashi M. The immuno-stimulating effects of chitin in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). In: Shariff, M., Subasighe, R.P. Arthur, J.R. (Eds.), Diseases Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillippines, 1992. pp. 413-417.
12. Matsuyama H, R.E.P. Mangindaan and Tomoki Yano. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture.*1992; 101:197-203.
13. Surenda, P. Efficacy of formalin-killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. vaccine in red tilapia. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of master of Science (Aquaculture). Graduate School, Kasetsart University. 2002.

14. เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง, ณัฐวุฒิ เหล่าพงศ์ไพศาล และ สมเกียรติ เดชะคุณ. 2546. การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรค Streptococcosis ในปลานิล. รายงานการศึกษาประจำวิชาปัญหาพิเศษ. ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18 หน้า.
15. Shellby RA, Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *J Fish Dis.* 2002;25:1-6.
16. Thorburn MA, Jasson ELK. The effect of booster vaccinations and fish size on survival and antibody production following Vibrio infection of bath-vaccinated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Aquaculture.* 1988;71:285-291
17. Quentel C, Baulny MO. Vaccination on juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L, against vibriosis. *Aquaculture.* 1995;132:125-131
18. Maureen Dale M, Foreman JC. Textbook of Immunopharmacology. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1984.
19. Ruangpan L, Kitao T, Yoshida T. Protective efficiency of *Aeromonas hydrophila* vaccines *in* Nile tilapia. *Vet Immunol Immunopathol.* 1986;12:345-350.
20. ธีราภรณ์ มอไธสง. 2547. ศักยภาพของการใช้วัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มอัตราการรอดของปลานิลต่อโรค Streptococcosis. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 48 หน้า.
21. Grabowski LD, Cain LaPata KD. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare. J Fish Dis.* 2004;27:573-581.