นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตวัคซีนเชื้อตายจาก *Streptococcus* sp. และการประยุกต์ใช้ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

เฉลิม หวันหมาน[1] นพรัตน์ แท่นมาก[2] และ กิจการ ศุภมาตย์[3]

Abstract

Wanman, CH., Tanmark, N. and Supamattaya, K.
Production of killed vaccine from *Streptococcus* sp. and its application in sea bass (*Lates calcarifer*)
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(5) : 1251-1261

Fish with an average length of 3.0-4.0 inches vaccinated with formalin-killed vaccine of *Streptococcus* sp. either by intraperitoneal injection and immersion methods had a survival rate of 100% indicating that the vaccine is safe to be used with sea bass. The highest efficacy was received when the vaccine containing bacterin at 2.50×10^{10} CFU/ml. Injection of vaccine together with adjuvant (CFA) was highly effective against *Streptococcus* sp. infection. The relative percent survival (RPS) of fish injected with vaccine alone and vaccine plus adjuvant were 100 (10 days post vaccination), 54.06 and 92.29 (20 days post vaccination) and 31.58 and 73.68 (30 days post vaccination) respectively. The fish which received vaccine by hyperosmotic immersion showed higher resistance to the disease than by direct immersion with the RPS of 30.77 and 71.80 (10 days post vaccination), 9.75 and 70.73 (20 days post vaccination) and 7.14 and 16.67 (30 days post vaccination) for direct immersion and hyperosmotic immersion, respectively.

Key words : vaccine, *Streptococcus* sp., seabass, *Lates calcarifer*

Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkhla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]วท.ม. (วาริชศาสตร์) [2]วท.บ. (วาริชศาสตร์) [3]Dr. rer. Nat. (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
Corresponding e-mail: kidchakan.s@psu.ac.th
รับต้นฉบับ 13 ตุลาคม 2549 รับลงพิมพ์ 14 มีนาคม 2550

บทคัดย่อ

เฉลิม หวันหมาน นพรัตน์ แท่นมาก และ กิจการ ศุภมาตย์

การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus* sp. และการประยุกต์ใช้ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(5) : 1251-1261

เมื่อนำวัคซีนเชื้อตายของเชื้อ *Streptococcus* sp. มาทดสอบในปลากะพงขาวขนาด 3.0-4.0 นิ้ว พบว่าความปลอดภัยของการให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและการแช่ปลาในวัคซีน มีค่าเท่ากับ 100% การตอบสนองของปลากะพงขาวต่อปริมาณเซลล์ของวัคซีน พบว่าปลาตอบสนองดีที่สุดที่ปริมาณเซลล์ของวัคซีนเท่ากับ 2.50×10^{10} CFU/ml การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดวัคซีนที่ผสม CFA (Complete Freund's Adjuvent) มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยพบว่าค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของการให้วัคซีนเพียงอย่างเดียวและการฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่าเท่ากับ 100% (วันที่ 10) ส่วนในวันที่ 20 มีค่าเท่ากับ 54.06 และ 97.29 และในวันที่ 30 มีค่าเท่ากับ 31.58 และ 73.68 ตามลำดับ ส่วนการให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกัน พบว่า ค่า RPS ของการแช่ปลาในวัคซีนโดยตรงและการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic มีค่าเท่ากับ 30.77 และ 71.80 (วันที่ 10) ส่วนในวันที่ 20 มีค่าเท่ากับ 9.75 และ 70.73 และในวันที่ 30 มีค่าเท่ากับ 7.14 และ 16.67 ตามลำดับ

เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่พบในประเทศไทยเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคสเตรฟโตคอคโคซีสในปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmoratus*) (จิราพร และคณะ, 2529) ต่อมาได้มีรายงานพบโรคชนิดนี้ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (สถาพร และเยาวนิตย์, 2530) และยังคงมีการระบาดของโรคนี้อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะการเลี้ยงปลากะพงขาวในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสงขลา (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543) การป้องกันรักษาโรคชนิดนี้มักจะใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ออกซี่เตตร้าซัยคลิน ฟลูมิควิน เพนนิซิลลินและซัลฟาไตร-เมโธพริม (จิรศักดิ์, 2543) จึงทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาในตัวปลาและในธรรมชาติ รวมทั้งเกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ดังนั้นการใช้วัคซีนจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ จึงได้มีการผลิตวัคซีนขึ้นมาใช้ในปลา เช่น วัคซีนป้องกันโรคแอนเทอร์ริคเรดเมาท์ (enteric red mouth) โรคฟูรันคูโลซีส (furunculosis) (Ellis, 1988) โรควิบริโอที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio anguillarum* และ *V. ordalii* (Mowat and Rweyemamu, 1997) และโรคสเตรฟโตคอคโคซีส (Romalde *et al.*, 1999; Klesius *et al.*, 2000; Shelby *et al.*, 2002) สำหรับประเทศไทย การผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคในปลา ยังเป็นเพียงการทดลอง ยังไม่มีการผลิตเพื่อจำหน่าย โดยมีการทดลองฉีดวัคซีนจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เข้าช่องท้องของปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) พบว่าปลามีการตอบสนองและสามารถสร้างแอนติบอดี้ได้สูงหลังจากการฉีดวัคซีนภายใน 9 วัน (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2525) และการทดลองของ จิตต์เกษม และคณะ (2536) ได้ทำการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันปลาช่อน (*Channa striata*) โดยฉีดวัคซีนจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่าปลาสามารถสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้อได้ดี จึงอาจจะกล่าวได้ว่าการใช้วัคซีนในปลาจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น ดังนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยเน้นถึงการผลิตวัคซีนจากเชื้อแบคทีเรียและวิธีการที่เหมาะสมในการใช้วัคซีนในปลากะพงขาว เพื่อนำไปสู่การป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพและเป็นแนวทางการผลิตวัคซีนในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การผลิตวัคซีน

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่บริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1% ของปริมาตร TSB เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการเขี่ยสารละลายแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อเจริญให้เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1% แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญทำการปั่นล้างเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียตกตะกอน เทส่วนใสของสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง จากนั้นทดสอบการปลอดเชื้อ (sterile) ของวัคซีน โดยนำวัคซีนที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อไม่เจริญก็สามารถนำมาเป็นวัคซีนได้ โดยจะทำการเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 0.1% เก็บวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ (จิตต์เกษม และคณะ, 2536)

2. ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน

นำวัคซีนที่เตรียมไว้มาใช้กับปลากะพงขาว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และแช่ปลาในวัคซีน โดยใช้ปลาขนาด 3.0-4.0 นิ้ว จำนวน 60 ตัว/กลุ่ม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากที่ปลาได้รับวัคซีนจะเลี้ยงปลาเป็นเวลา 7 วัน โดยจะเก็บข้อมูลอัตราการตาย เพื่อนำมาหาค่าความปลอดภัยในการใช้วัคซีน (Cardella and Eimers, 1990)

3. ทดสอบการตอบสนองของปริมาณวัคซีนที่ใช้ในปลากะพงขาว

ให้วัคซีนแก่ปลากะพงขาวด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มล. โดยใช้ปริมาณวัคซีน 4 ระดับ คือ 0, 2.50×10^8, 2.50×10^9 และ 2.50×10^{10} CFU/ml (Dec *et al.*, 1990) โดยใช้ปลาขนาด 3.0-4.0 นิ้ว จำนวน 60 ตัว/ระดับความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากให้วัคซีนผ่านไปแล้ว 10, 20 และ 30 วัน หาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ โดยใช้วิธีการเกาะกลุ่ม (agglutination) (Roberson, 1990) จากนั้นทำการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 1.937×10^3 CFU/ml (LD_{50} ที่ 14 วัน) ให้กับปลาตัวละ 0.1 มล. และทำการบันทึกการตายของปลาทุกวันเป็นเวลา 14 วัน เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การตาย ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (Relative Percent Survival : RPS) (Ellis, 1988)

4. ศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว

การทดสอบวิธีการให้วัคซีนจะใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD : Completely Randomized Design) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง (treatment) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (replication) ใช้ปลากะพงขาวขนาด 3.0-4.0 นิ้ว จำนวน 200 ตัว/ชุดการทดลอง

4.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

ทำการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มล. ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml และฉีดวัคซีนที่ผสม CFA (Complete Freund's Adjuvant) ที่อัตรา 1:1 (ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml) ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

4.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่

ทำการแช่ปลาในวัคซีนโดยตรง (direct immersion) เป็นเวลา 30 วินาที ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml และแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic โดยแช่ปลาในน้ำทะเลที่ความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่ลงในวัคซีนเป็นเวลา 30 วินาที โดยแช่ปลา 20 ตัว/วัคซีน 1 ลิตร (ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml) ส่วนชุดควบคุมแช่ปลาในน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% เป็นเวลา 30 วินาที

นำปลาของแต่ชุดการทดลองมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ถังละ 200 ตัว/ชุดการทดลอง ในระหว่างการเลี้ยงให้อาหารผสมอัดเม็ดชนิดจมน้ำ โดยให้กินจนอิ่มทุกวันวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น (ทุกชุดการทดลอง) ใช้ระบบน้ำหมุนเวียน ให้อากาศตลอดเวลา วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955) และวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่น เปอร์เซ็นต์การตาย ค่า RPS และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์

5. ศึกษาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน

ปลาชุดนี้เป็นปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดและการแช่ โดยหาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์หลังจากปลาได้รับวัคซีนไปแล้ว 10, 20 และ 30 วัน โดยทำการสลบปลาด้วย Quinaldin

2-5 พันส่วนในล้านส่วน ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหาง (caudal vein) เลือดที่เจาะได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเลือดมาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 2 ชั่งโมง ดูดซีรั่มใส่หลอดเล็ก ๆ การหาค่าแอนติบอดี้โดยใช้วิธีเจือจางเป็น 2 เท่า (two-fold dilution) เริ่มเจือจาง 1:2 โดยใช้น้ำเกลือเข้มข้น 0.85% ที่ผสมกับฟอร์มาลิน 0.1% เป็นตัวทำเจือจางซีรั่ม (diluent) ให้มีปริมาตรในแต่ละหลุม (well) เท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจน (เชื้อ *Streptococcus* sp.) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ Mc-Farland No.0.5 ลงไป 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 22 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูตะกอนที่เกิดขึ้น (Roberson, 1990)

ผลการทดลอง

1. การผลิตวัคซีน

หลังจากที่นำเชื้อ *Streptococcus* sp. มาเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1% แล้วนำไปปั่นล้างเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ก็จะได้ตะกอนของเชื้อ *Streptococcus* sp. เมื่อนำไปทดสอบการปลอดเชื้อไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จึงสามารถนำมาใช้ได้

2. ความปลอดภัยของวัคซีน

การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ คือฉีดเข้าช่องท้องและแช่ปลาในวัคซีน พบว่า วัคซีนไม่เป็นอันตรายต่อปลากะพงขาวในทุกกลุ่มการทดลอง เมื่อเลี้ยงไว้นาน 7 วัน ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นมามีความปลอดภัยต่อการใช้ในปลากะพงขาว

3. การตอบสนองของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องในปริมาณที่แตกต่างกัน

การตอบสนองต่อปริมาณเซลล์วัคซีนในปลากะพงขาวจะแปรผันตามปริมาณเซลล์ แม้จะพบว่าอัตราการตายของปลากะพงขาวที่ 10 วันหลังจากได้รับวัคซีน ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^8 และ 2.50×10^9 CFU/ml ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีอัตราการตายเท่ากับ 36.67 และ 36.67% คิดเป็นค่า RPS เท่ากับ 55.99 เท่ากัน และที่ 20 วัน ที่ปริมาณเซลล์ของวัคซีน 2.50×10^9 และ 2.50×10^{10} CFU/ml ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีอัตราการตายเท่ากับ 30.00 และ 23.33% คิดเป็นค่า RPS เท่ากับ 64.00 และ 72.00 แต่ที่ 30 วัน อัตราการตายของปลากะพงขาวมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ในแต่ละปริมาณเซลล์วัคซีน มีอัตราการตายเท่ากับ 80.00, 66.67 และ 40.00% คิดเป็นค่า RPS เท่ากับ 14.28, 28.57 และ 57.14 ตามลำดับ (Table 1)

นอกจากนี้ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในชุดที่ได้รับวัคซีนและในชุดที่ไม่ได้รับวัคซีน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p< 0.05$) โดยไม่พบว่าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในชุดควบคุม ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับปริมาณเซลล์วัคซีนมาก จะมีไตเตอร์ของแอนติบอดี้สูงด้วย (Table 2) ดังนั้นที่ปริมาณเซลล์ของวัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml จะให้ความคุ้มโรค (RPS) และแอนติบอดี้ดีที่สุด

4. การศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว

4.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

ในการทดลองจะให้วัคซีน 2 แบบ คือ ฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA (Complete Freund's Adjuvant) และฉีดวัคซีนผสม CFA ที่อัตรา 1:1 จากนั้นเก็บข้อมูลมาวิเคราะห์อัตราการตาย ค่า RPS และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ ในวันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากฉีดวัคซีน

เมื่อฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ให้แก่ปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน แล้วติดตามอัตราการตายของปลาที่ได้รับวัคซีนทั้งแบบไม่ผสม CFA และวัคซีนผสม CFA ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากฉีดวัคซีน พบว่า ที่ 10 วัน การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่ทำให้ปลาตาย คิดเป็นค่า RPS เท่ากับ 100 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีอัตราการตาย 60% ส่วนที่ 20 และ 30 วัน พบว่า การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการฉีดวัคซีนผสม CFA มีอัตราการตาย 1.67 และ 16.67% คิดเป็นค่า RPS เท่ากับ 97.29 และ 73.68 ตามลำดับ ส่วนวัคซีนไม่ผสม CFA มีอัตราการตายเท่ากับ 28.33 และ 43.33% คิดเป็นค่า RPS เท่ากับ 54.06 และ 31.58 ตาม

Table 1. Mortality and relative percent survival (RPS) of sea bass contain different levels of vaccine.

Levels of vaccine (CFU/ml)	Post vaccination (days)					
	10		20		30	
	Mortality	RPS	Mortality	RPS	Mortality	RPS
0	83.33 [a]	-	83.33 [a]	-	93.33 [a]	-
$2.5x10^8$	36.67 [b]	55.99 [a]	43.33 [b]	48.00 [a]	80.00 [b]	14.28 [a]
$2.5x10^9$	36.67 [b]	55.99 [a]	30.00 [c]	64.00 [b]	66.67 [c]	28.57 [b]
$2.5x10^{10}$	16.67 [c]	80.00 [b]	23.33 [c]	72.00 [b]	40.00 [c]	57.14 [c]

Mean values in the same column with same superscript are not statistically different at $p<0.05$

Table 2. Antibody titers of sea bass contain different levels of vaccine.

Post vaccination (days)	Levels of vaccine (CFU/ml)			
	0	$2.50x10^8$	$2.50x10^9$	$2.50x10^{10}$
10	0 [a]	1:16 [b]	1:32 [c]	1:64 [d]
20	0 [a]	1:32 [ab]	1:64 [b]	1:128 [c]
30	0 [a]	1:4 [ab]	1:8 [b]	1:16 [c]

Mean values in the same row with same superscript are not statistically different at $p<0.05$

Table 3. Mortality and relative percent survival (RPS) of sea bass injection vaccine.

Vaccination	Post vaccination (days)					
	10		20		30	
	Mortality	RPS	Mortality	RPS	Mortality	RPS
Control	60.00 [a]	-	61.67 [a]	-	63.33 [a]	-
Vaccine	0.00 [b]	100 [a]	28.33 [b]	54.06 [a]	43.33 [b]	31.58 [a]
CFA Vaccine	0.00 [b]	100 [a]	1.67 [c]	97.29 [b]	16.67 [c]	73.68 [b]

Mean values in the same column with same superscript are not statistically different at $p<0.05$

ลำดับ (Table 3)

การหาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่พบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในชุดควบคุม และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากฉีดวัคซีน โดยการฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ1:64, 1:128 และ 1:128 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA อย่างมีนัยสำคัญที่มีค่าเท่ากับ 1:32, 1:32 และ 1:32 ตามลำดับ (Table 4)

4.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่

ในการทดลองจะให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่ 2 แบบ คือ การแช่ปลาในวัคซีนโดยตรงเป็นเวลา 30 วินาที และการ

Table 4. Antibody titers of sea bass injection vaccine.

Post vaccination (days)	Vaccination		
	Control	Vaccine	CFA Vaccine
10	0 [a]	1:32 [b]	1:64 [c]
20	0 [a]	1:32 [b]	1:128 [c]
30	0 [a]	1:32 [b]	1:64 [c]

Mean values in the same row with same superscript are not statistically different at p<0.05

Table 5. Mortality and relative percent survival (RPS) of seabass immersion vaccine.

Vaccination	Post vaccination (days)					
	10		20		30	
	Mortality	RPS	Mortality	RPS	Mortality	RPS
Control	65.00 [a]	-	68.33 [a]	-	70.00 [a]	-
Direct immersion	45.00 [b]	30.77 [a]	61.67 [a]	9.75 [a]	65.00 [a]	7.14 [a]
Hyperosmotic	18.33 [c]	71.80 [a]	20.00 [b]	70.73 [b]	58.33 [b]	16.67 [a]

Mean values in the same column with same superscript are not statistically different at p<0.05

แช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic โดยแช่ในน้ำเกลือที่มีความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปแช่วัคซีนอีก 30 วินาที จากนั้นเก็บข้อมูลมาวิเคราะห์อัตราการตาย ค่า RPS และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในวันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากแช่ปลาในวัคซีน

เมื่อฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ให้แก่ปลาที่ได้รับวัคซีน แล้วติดตามอัตราการตายของปลากะพงขาว พบว่าที่ 10 วัน อัตราการตายของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) มีอัตราการตายเท่ากับ 45.00 และ 18.33% คิดเป็นค่า RPS เท่ากับ 30.77 และ 71.80 โดยชุดควบคุมมีอัตราการตาย 65.00% และที่ 20 วัน พบว่าอัตราการตายของชุดควบคุมและชุดแช่ปลาในวัคซีนโดยตรง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 68.33 และ 61.67% (RPS = 9.75) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic มีอัตราการตายเท่ากับ 20% (RPS = 70.73) ส่วนที่ 30 วัน พบว่าอัตราการตายของชุดควบคุมและชุดแช่ปลาในวัคซีนโดยตรง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) มีอัตราการตายเท่ากับ 70.00 และ 65.00% (RPS = 7.14) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic มีอัตราการตายเท่ากับ 58.33% (RPS = 16.67) (Table 5)

การหาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่พบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในชุดควบคุม พบว่าที่ 10 วัน ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ปลาในวัคซีนโดยตรงและการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 1:8 และ 1:16 และที่ 20 วัน พบว่า การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1:8 และ 1:64 ส่วนที่ 30 วัน พบว่าชุดควบคุมและชุดที่แช่ปลาในวัคซีนโดยตรงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่มีค่าเท่ากับ 0 และ 1:4 แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดที่แช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic ซึ่งมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงสุดเท่ากับ 1:16 (Table 6)

Table 6. Antibody titers of seabass immersion vaccine.

Post vaccination (days)	Vaccination		
	Control	Vaccine	CFA Vaccine
10	0 [a]	1:8 [b]	1:16 [b]
20	0 [a]	1:8 [b]	1:64 [c]
30	0 [a]	1:4 [a]	1:16 [b]

Mean values in the same row with same superscript are not statistically different at $p<0.05$

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ความปลอดภัยของวัคซีนและการตอบสนองต่อปริมาณเซลล์วัคซีน

ในการทดลองครั้งนี้ใช้วัคซีนชนิด formalin-killed vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนที่สามารถผลิตขึ้นได้ง่าย สามารถทำได้ในแลปขนาดเล็กและเป็นวัคซีนที่นิยมผลิตขึ้นในเชิงการค้า (Mowat and Rweyemamu, 1997) นอกจากนี้ยังมี heat-killed vaccine โดยพบว่าการใช้วัคซีนชนิด formalin-killed vaccine จะทำให้ปลามีค่าไตเตอร์สูงและสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้นานกว่าการใช้วัคซีนชนิด heat-killed vaccine เนื่องจากวัคซีนชนิด formalin-killed vaccine จะมีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนที่ดีกว่า heat-killed vaccine (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2525)

วัคซีนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเก็บไว้ในฟอร์มาลินเข้มข้น 0.1% ก่อนที่จะนำไปใช้ในปลากะพงขาว โดย Xu และ Rogers (1993) รายงายว่าฟอร์มาลินจะตกค้างอยู่ในปลาไม่ควรเกิน 0.1% นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์ของปลาจะพบฟอร์มาลิน 12-55.2 ส่วนในล้านส่วน (ฟอร์มัลดีไฮด์ 3-12 ส่วนในล้านส่วน) โดยพบในกล้ามเนื้อ ผิวหนัง และอวัยวะภายใน เนื่องจากฟอร์มัลดีไฮด์เป็นสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ปกติในร่างกาย ดังนั้นในการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปลากะพงขาว พบว่าปลากะพงขาวไม่ตาย เป็นเพราะแบคทีเรียถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินและไม่มีฟอร์มาลินตกค้างเกินระดับของเซลล์ที่รับได้

ในการทดสอบความปลอดภัยของการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ คือ การฉีดเข้าช่องท้องและการแช่ปลาในวัคซีน พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย 100% แสดงว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นไม่เป็นอันตรายต่อปลาและระดับของฟอร์มาลินในวัคซีนอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อปลากะพงขาว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cardella และ Eimers (1990) ที่ใช้วัคซีน formalin-killed *V. anguillarum* และ *V. odalii* ในปลา trout พบว่า ปลามีอัตราการรอดตาย 99.9% หลังจากให้วัคซีนและค่า RPS เท่ากับ 90 โดยทั่วไปแล้วจะกำหนดให้ค่า RPS ของวัคซีนมีค่าสูงกว่า 60 จึงถือว่าวัคซีนนั้นมีประสิทธิภาพดี (Ellis, 1988)

จากการทดสอบการตอบสนองของปลากะพงขาวต่อปริมาณเซลล์วัคซีน โดยฉีดวัคซีนที่ปริมาณเซลล์วัคซีนต่าง ๆ กัน คือ 2.50×10^{8}, 2.50×10^{9} และ 2.50×10^{10} CFU/ml แล้วทำการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ในวันที่ 10, 20 และ 30 หลังจากได้รับวัคซีน พบว่า ปริมาณเซลล์วัคซีนที่ 2.50×10^{10} CFU/ml มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด ค่า RPS และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงกว่าปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{8} และ 2.50×10^{9} CFU/ml อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการทดลองของ Pradit (1984) พบว่าการฉีดวัคซีนที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 5.00×10^{9} CFU/ml สามารถกระตุ้นให้ปลากดอเมริกันสร้างแอนติบอดี้ได้สูงสุด และจากการทดลองของ Gould และคณะ (1979) ที่ใช้วัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาแซลมอนด้วยวิธีการแช่ปลาในวัคซีนนาน 2 นาที พบว่าปริมาณเซลล์วัคซีนที่ 5.00×10^{5} CFU/ml จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* อาจเป็นผลมาจากชนิดของปลาแตกต่างกัน ชนิดของเชื้อที่แตกต่างกัน รวมทั้งสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนแต่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน จึงทำให้ปริมาณเซลล์วัคซีนแตกต่างกัน การให้วัคซีนในปริมาณเซลล์วัคซีนที่ต่ำเกินไป จะไม่สามารถที่จะกระตุ้นให้ปลามีการตอบสนอง

ทางภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นในการให้วัคซีนจะต้องคำนึงถึงปริมาณเซลล์วัคซีนด้วย เพื่อป้องกันการไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน สุทธิพันธ์ (2537) ได้รายงานว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น ปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ วิธีการให้แอนติเจน และคุณสมบัติของแอนติเจน ซึ่งเกิดจากการไม่ตอบสนองของ helper T lymphocyte และ B lymphocyte ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของ suppressor T cell โดยการหลั่งสารออกมาควบคุมการทำงานของ B cell หรือ T cell และยังเป็นการยับยั้งการสร้างแอนติบอดี้

2. วิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว

2.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

จากผลการให้วัคซีนด้วยการฉีด 2 แบบ คือ การฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA และการฉีดวัคซีนผสม CFA พบว่าอัตราการตายของปลากะพงขาวที่ 10 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม โดยปลามีการรอดตาย 100% ส่วนที่ 20 และ 30 วัน พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการการฉีดวัคซีนผสม CFA มีอัตราการตายต่ำกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการฉีดวัคซีนผสม CFA จะทำให้ปลามีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น และยังกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้นานยิ่งขึ้น จึงทำให้สามารถป้องกันโรคได้ดีกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA โดยไปกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ กระบวนการจับกินและยังกระตุ้นให้เอ็นเคเซลล์ (NK-cell) และเม็ดเลือดขาวเพิ่มปริมาณมากขึ้น (Kajita *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995) และปลาที่ฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่า RPS สูงกว่าปลาที่ฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA จึงถือได้ว่าการฉีดวัคซีนผสม CFA มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจาก CFA มีผนังเซลล์ของ *Mycobacterium tuberculosis* ผสมอยู่ จึงสามารถกระตุ้นแมคโครฟาจให้หลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1 : IL-1) ซึ่งมีผลทำให้การนำเสนอแอนติเจนและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับวัคซีนผสมออยแอดจูแวนท์ (oil adjuvant) ที่มีการทดลองในปลา baltic salmon (Buchmann *et al.*, 1997) และปลา ayu (Rahman *et al.*, 2000)

ส่วนค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ พบว่า การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการให้วัคซีนผสม CFA มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงกว่าการให้วัคซีนไม่ผสม CFA ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจาก CFA เป็นแอดจูแวนท์ที่อยู่ในรูปของ water-in oil emulsion จึงเป็นตัวช่วยให้แอนติเจนค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยและกระจายจากตำแหน่งที่ฉีดอย่างช้า ๆ จึงทำให้มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอยู่ตลอดเวลา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Areechon และคณะ (1991) ที่ศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาดุกอุยต่อวัคซีนเชื้อ *A. hydrophila* โดยการฉีดเข้าช่องท้อง แล้วเปรียบเทียบการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ คือ การฉีดวัคซีนไม่ผสมแอดจูแวนท์และการฉีดวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ พบว่าการฉีดวัคซีนผสมแอดจูแวนท์มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสมแอดจูแวนท์ ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในชุดควบคุม แสดงว่าปลากะพงขาวที่นำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. มาก่อน จึงไม่มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. และปลาที่มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ต่ำอาจมีสาเหตุมาจากความเครียดของปลาอันเนื่องมาจากการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่ม

2.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่

การทดลองให้วัคซีนแก่ปลากะพงขาวด้วยการแช่ 2 แบบ คือ การแช่ปลาในวัคซีนโดยตรงและการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic พบว่า อัตราการตายในชุดควบคุมและการแช่ปลาในวัคซีนโดยตรงไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic เนื่องจากการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic จะทำให้ปลามีการสูญเสียน้ำ เมื่อนำมาแช่ในวัคซีนจึงทำให้มีการดูดน้ำกลับเข้าสู่ตัวปลาได้สูง จึงทำให้วัคซีนเข้าสู่ร่างกายเพิ่มมากกว่าการแช่ปลาในวัคซีนโดยตรง เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาที่สัมผัสกับวัคซีนเท่ากัน (Croy and Amend, 1977; Antipa *et al.*, 1980) ส่วนค่า RPS ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการแช่ พบว่าการแช่ปลาในวัคซีนโดยตรงและการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยค่า RPS จะสูงในการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Antipa และคณะ (1980) ที่ทำการศึกษาการให้วัคซีนต้านทานเชื้อ *V. anguillarum* ในปลา sockeye salmon โดยแช่ปลาในน้ำเกลือเข้มข้น 8% เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปแช่ในวัคซีนอีก 1.5 นาที และการแช่วัคซีนโดยตรง นาน 1.5 นาที พบ

ว่าการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ให้ผลในการป้องกันโรคสูงกว่าการแช่วัคซีนโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการทดลองของ Areechon และ Plaimast (1999) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาดุกลูกผสมโดยการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic และการกินอาหารที่ผสมวัคซีน โดยแช่ปลาในน้ำเกลือเข้มข้น 1.5% นาน 2 นาที แล้วจึงแช่ปลาลงในวัคซีนนาน 60 นาที จากนั้นนำปลาไปเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน จึงทำการทดสอบความต้านทานโรค พบว่าปลาที่แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic มีความสามารถในการป้องกันโรคสูงกว่าปลาที่กินอาหารผสมวัคซีน

ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการแช่ พบว่า ในช่วงแรก (10 วัน) ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่โดยตรงและการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อาจเนื่องจากปลามีการตอบสนองแบบไม่จำเพาะและมีการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ยังไม่มากพอ (Ellis, 1988) จึงทำให้การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเวลานานขึ้น (30 วัน) ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ลดลงต่ำมาก ซึ่งถ้าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์มีค่าต่ำมาก ๆ จะทำให้ปลาไม่สามารถต้านทานต่อโรคได้ (Agius *et al.*, 1983)

สรุปผลการทดลอง

การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ คือ การฉีดเข้าช่องท้องและการแช่ปลาในวัคซีนมีความปลอดภัยต่อปลากะพงขาว เนื่องจากพบว่าไม่มีการตายของปลาในกลุ่มทดลองหลังให้วัคซีนไปแล้ว 7 วัน และปลากะพงขาวตอบสนองได้ดีที่สุดที่ปริมาณเซลล์วัคซีนเท่ากับ 2.50×10^{10} CFU/ml ในการให้วัคซีนด้วยวิธีฉีด พบว่าการฉีดวัคซีนผสม CFA สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้ดี โดยมีค่า RPS เท่ากับ 100 ส่วนการให้วัคซีนด้วยวิธีแช่ พบว่าการแช่ปลาในวัคซีนแบบ hyperosmotic สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้ดีจะเห็นได้ชัดในช่วง 10-20 วัน ของการให้วัคซีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีแช่ สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น, NRCT-JSPS) ปีงบประมาณ 2547-48 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แก่นายเฉลิม หวันหมาน

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สายธนู โสมทัต วงศ์สว่าง และ เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2525. ประสิทธิภาพของแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟีล่า วัคซีน 2 ชนิด ในการทำให้เกิดแอนติบอดี้ในปลาดุกด้าน. วารสารโรคสัตว์น้ำ 5(1) : 1-8.

จิตต์เกษม จันทร์ผ่อง สุปราณี ชินบุตร และ วรเทพ ศุภเมธากร. 2536. การศึกษาทางด้านการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาช่อน หลังจากการให้วัคซีน. **ใน** รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2536, หน้า 313-317. กรุงเทพฯ : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2543. ผลของยาต้านจุลชีพในกุ้งกุลาดำ. เทคโนโลยีชาวบ้าน 13 (249) : 75-76.

จิราพร เกษรจันทร์ สิทธิ บุณยรัตผลิน และกิจการ ศุภมาตย์. 2529. *Streptococcus* sp. กับโรคในปลาบู่ทราย. ว.สงขลานครินทร์ 8(3) : 329-332.

เยาวนิตย์ ดนยดล สถาพร ดิเรกบุษราคม และเพ็ญศรี เมืองเยาว์. 2543. คุณสมบัติของเชื้อและการเกิดโรคจากเชื้อ β- hemolytic *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2543. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สถาพร ดิเรกบุษราคม และเยาวนิตย์ ดนยดล. 2530. โรคระบาดที่เกิดจาก non-hemolytic *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2530. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงน้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ. 2537. อิมมูโนวิทยา. กรุงเทพฯ : เค.พี. พริ้นติ้ง.

Agius, C., Horne, M.T. and Ward, P.D. 1983. Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. J. Fish Dis. 6 : 129-134.

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

Antipa, R., Gould, R. and Amend, D.F. 1980. *Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) by direct and hyperosmotic immersion. J. Fish Dis. 3 : 161-165.

Areechon, N. and Plaimast, K. 1999. Efficacy study of *Aeromonas hydrophila* vaccine by immersion and oral administration in hybrid catfish. Proceedings of the 37th Kasetsart University. Text and Journal Publication Co. pp. 118-125.

Areechon, N., Kitancharoens, N., Chutintrasri, B. and Tonguthai, K. 1991. Immune response of walking catfish (*Clarias macrocephalus*, Gunther) to vaccination by injection methods. J. Fish Sci. 1 : 1-5.

Buchmann, K., Dalsgaard, I., Nielsen, M.E., Pedersen, K., Uldal, A., Garcia, J.A. and Larsen, J.L. 1997. Vaccination improves survival of Baltic salmon (*Salmo salar*) smolts in delayed release sea ranching (net - pen period). Aquaculture 156 : 335-348.

Cardella, M.A. and Eimers, M.E. 1990. Safety and potency testing of federally licensed fish bacterins. J. Aquat. Anim. Health 2 : 49-55.

Croy, T.R. and Amend, D.F. 1977. Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. Aquaculture 12 :317-325.

Dec, C., Angelidis, P. and Baudin Laurencin, F. 1990. Effects of oral vaccination against vibriosis in tutbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and seabass, *Dicentrarchus labrax* (l.). J. Fish Dis. 13 : 369-376.

Duncan, D.W. 1955. Mutiple - range and mutiple F - tests. Biometrics. 11 : 1-42.

Ellis, A.E. 1988. Fish Vaccination. London : Academic Press Limited.

Gould, R.W., Antipa, R. and Amend, D.F. 1979. Immersion vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) with two pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. J. Fish Res. Board Can. 36 : 222-225.

Hoel, K., Olstad, G.H. and Lillehaug, A.1998. Adjuvant activities of a *Vibrio salmonicida* bacterin on T-dependent and T-independent antigens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunol 8 : 287-293.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1992. Immunopotentiation activity of Freund's complete adjuvant in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 58 : 433-437.

Karunasagar, I., Rosalind, G. and Karunasagar, I. 1991. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. J. Fish Dis. 14 : 413-417.

Kawai., K. and Hatamoto, K. 1999. Encapsulation of oral delivery vaccine against *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Bull. Mar. Sci. Fish Kochi. Univ. 19 : 71-78.

Klesius, P. H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolatate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 155 : 237-246.

Mowat, N. and Rweyemamu, M.1997. Vaccine Manual : The production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries. Italy : Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Pradit Chonchuenchob. 1984. Histopathological observation on cellular response of vaccinated channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. Master of Science, Auburn University.

Rahman, M.H., Ototake, M., Iida, Y., Yokomizo, Y. and Nakanishi, T. 2000. Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in Ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish Pathol 35 : 199-203.

Roberson, B.S. 1990. Bacterial agglutination. **In** Techniques in fish immunology (ed. Stolrn, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B.). pp. 81-86. Fair Haven, New Jercy : SOS Publication.

Romalde, J.L., Magarinos, B. and Toranzo, A.E. 1999. Prevention of streptococcosis in turbot by intraperitioneal vaccination : A review. J. Appl. Ichthyol 15 : 153-158.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1995. Efficacies of combined vaccine for *vibrio anguillarum* and *Streptococcus* sp. Fish Sci. 61 : 359 -360.

Shelby, R.A., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. J. Fish Dis. 25 : 1-6.

Xu, D. and Rogers, W.A. 1993. Formaldehyde residue in striped bass muscle. J. Aquat. Anim. Health 5 : 306-312.