บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยมีการพัฒนาอย่างมาก โดยระบบการเลี้ยงส่วนใหญ่เป็นแบบหนาแน่น (intensive) ซึ่งการเลี้ยงในระบบนี้มักจะทำให้สภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำเสื่อมโทรมอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดโรคแก่สัตว์น้ำได้ง่ายกว่าปกติ โดยเฉพาะการเลี้ยงปลากะพงขาว ซึ่งเป็นสัตว์น้ำอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง รองลงมาจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีรสชาดดีเป็นที่นิยมของผู้บริโภค และเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ ประกอบกับราคาของปลากะพงขาวที่จำหน่ายค่อนข้างสูง ทำให้เกษตรกรสนใจและนิยมเลี้ยงกันมากขึ้น โดยเฉพาะการเลี้ยงในกระชังที่มักจะประสบปัญหาการเกิดโรคปรสิต ไวรัส และแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในปลากะพงขาวได้แก่ เชื้อ *Flexibacter columnaris*, *Vibrio* sp. และ *Streptococcus* sp. โดยเฉพาะเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรฟโตคอคโคซีส (Streptococcosis) ในปลากะพงขาว สามารถทำให้ปลาตายภายใน 24 – 72 ชั่วโมง การป้องกันรักษาโรคชนิดนี้เกษตรกรมักจะใช้ยาปฏิชีวนะเช่น ออกซี่เตตร้าซัยคลิน ฟลูมิควิน เพนนิซิลลินและซัลฟาไตรเมโธพริม (จิรศักดิ์, 2543) จึงทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาในตัวปลาและในธรรมชาติ รวมทั้งเกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ดังนั้นการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาหรือการใช้วัคซีน จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดปัญหาได้ Ellis (1988) รายงานว่าการใช้วัคซีนในปลาในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ทำให้ความเสียหายลดน้อยลงกว่าครั้งแรกอย่างชัดเจน และความเสียหายจะลดลงจนแทบจะไม่ปรากฏในปีต่อมา จึงอาจจะพูดได้ว่าการใช้วัคซีนในปลาประสบความสำเร็จอย่างมากและจัดเป็นสิ่งสำคัญและเป็นประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบหนาแน่น

การวิจัยครั้งนี้ต้องการที่จะศึกษาเชื้อ *Streptococcus* sp. และผลต่อปลากะพงขาว รวมทั้งประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยเน้นถึงการผลิตวัคซีนจากเชื้อแบคทีเรียและวิธีการที่เหมาะสมในการใช้วัคซีนในปลากะพงขาว เพื่อนำไปสู่การป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพและอาจจะเป็นแนวทางการผลิตวัคซีนในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

ปลากะพงขาว (Seabass)

ปลากะพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* (Bloch) และมีชื่อสามัญว่า seabass, white seabass, silver seabass, giant perch, plamer, cock - up, baramundi, two - finned seabass (Rabanal and Soesanto, 1982) นักวิทยาศาสตร์ได้จัดจำแนกปลากะพงขาว ตามหลักอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Pisces

Subclass Teleostomi

Order Percomorphi

Suborder Percoidei

Family Latidae

Genus *Lates*

Species *calcarifer*

1.1 ลักษณะภายนอก

ปลากะพงขาวมีลำตัวค่อนข้างยาวและหนา แบนข้างเล็กน้อย บริเวณไหล่โค้งมน ส่วนตัวจะลาดชันและเว้า ขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย ปากกว้าง ขอบปากบนเป็น

แผ่นใหญ่แยกเป็นแนวตอนต้นและตอนท้ายอย่างชัดเจน บริเวณส่วนปากจะยืดหดได้บ้าง ช่องปากเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย มีฟันเล็กละเอียด มีตาขนาดกลางไม่มีเยื่อไขมันหุ้ม แผ่นปิดเหงือกมีขนาดใหญ่ที่ขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่ ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องจะมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบก้น ครีบหางมีสีเทาปนดำบางๆ ครีบหลังมี 2 ตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบแข็งแหลมคมขนาดใหญ่ 7 - 8 ก้าน เชื่อมต่อกันเป็นเยื่อบางๆ ครีบหลังตอนที่ 2 แยกจากตอนแรกชัดเจน มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมีปลายแตกแขนง 10 - 11 ก้าน ครีบอกและครีบหูยาวไม่ถึงรูก้น ครีบก้นมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีบหลังตอนที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 7 - 8 ก้าน ข้อหางสั้น ครีบหางค่อนข้างกลม เส้นข้างลำตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 52 - 61 เกล็ด (กรมประมง, 2531)

1.2 **ถิ่นที่อยู่อาศัย**

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีการแพร่กระจายในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน คือสามารถพบได้ในพื้นที่ระหว่างเส้นลองจิจูด (longitude) ที่ 50 -160 องศาตะวันออก และเส้นละติจูด (latitude) ที่ 24 องศาเหนือ ถึง 25 องศาใต้ โดยจะครอบคลุมอาณาบริเวณเขตน่านน้ำของประเทศจีนจนถึงอ่าวเปอร์เซีย และยังแพร่กระจายตามหมู่เกาะต่างๆ ในประเทศฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย พม่า ออสเตรเลียและศรีลังกา สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีการแพร่กระจายโดยทั่วไปตาม แนวชายฝั่งทะเลทั้งทางด้านอ่าวไทยและมหาสมุทรอินเดีย โดยจะมีความชุกชุมในบริเวณ ปากแม่น้ำ ลำคลองและเขตทะเลสาบที่ติดต่อกับทะเล สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำจืดและ น้ำทะเล จึงจัดเป็นปลาสองน้ำ โดยจะสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 0 - 35 ส่วนในพันส่วน (ppt : part per thousand) (Chomdej, 1986)

1.3 **ฤดูผสมพันธุ์และวางไข่**

การแยกเพศปลากะพงขาว สามารถสังเกตได้จากลักษณะภายนอก ปลาเพศผู้จะมีลำตัวเรียวยาวกว่าปลาเพศเมีย ลำตัวมีส่วนลึกน้อยกว่าปลาเพศเมีย และมีน้ำหนักน้อยกว่าปลาเพศเมียที่มีขนาดลำตัวยาวเท่ากัน สำหรับปลาเพศเมียเมื่อถึงฤดูวางไข่ ส่วนท้องจะบวมเป่งสังเกตได้ชัดเจน เมื่อเอามือคลำที่ท้องจะมีไข่ไหลออกมา (กรมประมง, 2531)

ปลากะพงขาวจะวางไข่ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน ในพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่าวไทย และในเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคมในท้องที่ภาคใต้ฝั่งมหาสมุทรอินเดีย ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นเพราะได้รับอิทธิพลฤดูมรสุมทั้งสองครั้งในรอบปี ฤดูผสมพันธุ์จะเริ่มขึ้นกลางฤดูร้อน โดยที่พ่อแม่ปลาที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์จะเดินทางจากแหล่งน้ำจืดสู่แหล่งน้ำกร่อย และจะไปอาศัยอยู่ในทะเล จนถึงฤดูวางไข่ ก็จะอพยพกลับเข้ามายังปากแม่น้ำหรือปากทะเลสาบ แล้วจะผสมพันธุ์กันบริเวณปากแม่น้ำที่ติดต่อกับทะเล ซึ่งจะมีความเค็มประมาณ 25 - 32 ส่วนในพันส่วน การผสมพันธุ์พ่อแม่ปลาจะรวมฝูงกันบริเวณกลางน้ำ อัตราส่วนเพศเมียต่อเพศผู้เท่ากับ 1 : 3 - 5 เวลาผสมพันธุ์ระหว่าง 19.00 – 22.00 น. และการฟักตัวของไข่จะใช้เวลา 17 – 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27 - 29 องศาเซลเซียส (ดุสิตและคณะ, 2528) ลูกปลาที่ฟักเป็นตัวใหม่ๆ จะมีความยาวประมาณ 1.2 มิลลิเมตร โดยลูกปลาจะลอยตัวที่ผิวน้ำและจะล่องลอยตามกระแสน้ำเข้าไปอาศัยในบริเวณแอ่งน้ำตามชายฝั่งรวมทั้งบริเวณป่าชายเลนที่น้ำทะเลท่วมถึง (สุจินต์และคณะ, 2524)

ปัจจุบันการเลี้ยงปลากะพงขาวมีทั้งการเลี้ยงในบ่อดินและในกระชัง แต่ผลผลิตส่วนใหญ่ (ร้อยละ 75.94) ได้มาจากการเลี้ยงในกระชัง ที่เหลืออีกร้อยละ 24.06 ได้มาจากการเลี้ยงในบ่อดิน (กรมประมง, 2540) แหล่งเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดินที่สำคัญอยู่ที่จังหวัดปัตตานี นราธิวาส ฉะเชิงเทรา สมุทรสงคราม สตูล กระบี่ สุราษฎร์ธานี ตราด ประจวบคีรีขันธ์และระนอง ตามลำดับ (กรมประมง, 2540) โดยมีการเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีกำลังคลื่นลมไม่มากนัก เช่น บริเวณทะเลสาบ ลำคลองขนาดใหญ่หรือคลองซอยที่มีน้ำทะเลท่วมถึง เกษตรกรรายย่อยนิยมเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง เนื่องจากเป็นที่ต้องการของผู้ซื้อและผู้บริโภคมากกว่าการเลี้ยงในบ่อดิน

ประเทศไทยสามารถผลิตปลากะพงขาวได้ในอัตราที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปี จากปี พ.ศ. 2534 มีปริมาณ 1,650 ตันและเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงปี พ.ศ. 2540 มีปริมาณ 4,090 ตัน ซึ่งผลผลิตในปี พ.ศ. 2540 นี้จะแบ่งเป็นผลผลิตจากกระชัง 3,106 ตัน และผลผลิตจากบ่อดิน 984 ตัน (กรมประมง, 2540)

การจับปลากะพงขาวจากธรรมชาติมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ในอัตราเฉลี่ยร้อยละ 14.38 ต่อปี ในช่วงปี พ.ศ. 2532 สาเหตุสำคัญที่ทำให้การจับปลากะพงขาวในธรรมชาติลดลง เนื่องจากความเสื่อมโทรมของทรัพยากรทางทะเล อันเป็นผลจากการจับสัตว์น้ำเกินศักยภาพการผลิตและการเกิดภาวะมลพิษในแหล่งน้ำ รวมทั้งการทำลายทรัพยากรป่าชายเลนอันเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนรวมทั้งปลากะพงขาวด้วย

การเพาะเลี้ยง ในช่วงปี พ.ศ. 2534-2540 ผลผลิตปลากะพงขาวจากการเพาะเลี้ยงได้เพิ่มขึ้น ส่วนพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน สังเกตจากปี พ.ศ. 2534 ที่มีจำนวนพื้น ที่ 352 ไร่ และได้ขยายพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงปี พ.ศ. 2540 มีพื้นที่บ่อ 1,701 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 94.59 ของพื้นที่เลี้ยงปลากะพงขาวทั้งหมด โดยเป็นพื้นที่ที่เลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง 92 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 5.41 ของพื้นที่เลี้ยงปลากะพงขาวทั้งหมด

ถึงแม้จะมีการเลี้ยงปลากะพงขาวเพิ่มมากขึ้น แต่เกษตรกรก็ยังประสบปัญหาเกี่ยวกับการจัดการในการเลี้ยงและสุขภาพของปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาจากโรค ทั้งที่เกิดจากการติดเชื้อปรสิต โรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียในระบบการเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นอย่างมาก เกษตรกรต้องแก้ไขโดยการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ซึ่งอาจจะถือได้ว่าเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรควิบริโอซีส (Vibriosis) และ โรคสเตรฟโตคอคโคซีส เป็นโรคที่ทำให้ปลากะพงขาวมีอัตราการตายสูงถึง 70 - 80 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 วัน (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543)

2. **โรคสเตรฟโตคอคโคซีส** (Streptococcosis)

โรคสเตรฟโตคอคโตซีส เป็นโรคที่เกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1957 พบในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น (Hoshina *et al.*,1958 อ้างโดย Inglis *et al.*,1993) ในเวลาต่อมามีการพบโรคชนิดนี้ในปลาอีกหลายชนิดทั่วโลก ทั้งปลาทะเลและปลาน้ำจืด รวมทั้งสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น กบ (Teska and Shotts, 1994) โดยทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากต่อวงการเลี้ยงปลาน้ำจืดและปลาทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาหางเหลือง (yellowtail, *Seriola quinqueradiata*) ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งคิดมูลค่าความเสียหายประมาณ 30 ล้านบาท ในปี ค.ศ. 1974 (Kusuda *et al.*,1976 อ้างโดย Austin and Austin,1987) นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคในปลาไหลทะเล (*Anguilla japonica*) ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น (Kusuda *et al.*,1978) และปลาสลิดหิน (*Siganus canaliculatus*) ที่เลี้ยงในประเทศสิงคโปร์ (Foo *et al.*,1985) และสำหรับปลาน้ำจืดที่เป็นโรคชนิดนี้ เช่น ปลาเรนโบว์เทร้าท์ ปลาเอยู (ayu, *Plecoglossus altivelis*) และปลานิล (*Tilapia nilotica*) ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น (Kitao *et al.*,1981)

โรคนี้เป็นที่รู้จักกันในนามของโรคป๊อปอาย (pop-eye) ซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าท์ในอเมริกาใต้ (Barham *et al.*,1979) ปลาแอตแลนติกโครคเคอร์ (Atlantic croaker, *Macropogon undulatus*) ปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus*

punctatus) ปลาโกลส์เดนไชเนอร์ (golden shiner, *Notemigonus crysoleuca*) ปลาแมนฮาเดนน์ (menhaden, *Brevoortia patronus*) และปลากระบอก (striped mullet, *Mugil cephalus*) ที่เลี้ยงในประเทศสหรัฐอเมริกา (Cook and Lofton,1975 อ้างโดย Austin and Austin,1987) นอกจากนี้ยังมีการแพร่ระบาดของโรคอย่างรุนแรงและรวดเร็วในประเทศไต้หวัน (Tung *et al.*,1987) และประเทศซาอุดิอาระเบีย โดยเฉพาะปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *O.aureus*) (Al-Harbi,1994)

นอกจากนี้ยังพบว่าโรคสเตรฟโตคอคโตซีส ยังมีความคล้ายคลึงกับโรคแลคโตคอคโคซีส (Lactococcosis) ซึ่งมีการแพร่ระบาดทั่วโลก ซึ่งได้มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1991 โดยมีการติดเชื้อในปลาน้ำจืด เช่นปลาเรนโบว์เทร้าท์และปลาทะเล เช่น ปลาหางเหลือง (Ghittino *et al.*, 2002) และยังมีการติดเชื้อในสัตว์น้ำชนิดอื่นด้วย เช่น กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Yimin *et al.*, 1999)

สำหรับในประเทศไทยได้มีรายงานการเกิดโรคสเตรฟโตคอคโคซีส ครั้งแรกในปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmoratus*) (จิราพร และคณะ, 2529) ต่อจากนั้นในปี พ.ศ. 2530 ได้มีรายงานการพบโรคชนิดนี้ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (สถาพร และเยาวนิตย์, 2530) หลังจากนั้นเป็นต้นมา พบว่ายังมีการระบาดของโรคชนิดนี้และยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในปลากะพงขาวที่เลี้ยงบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสงขลา (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543)

เชื้อ *Streptococcus* sp. จัดอยู่ในวงศ์ Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคในคน เช่น *S. pyogenes* และ *S. pneumoniae* (นันทนา, 2537) ซึ่งจะทำให้เกิดโรคไฟลามทุ่ง (Erysipelas) ไข้อีดำอีแดง (Scarlet fever) คอหอยอักเสบ (Pharyngitis) และโลหิตเป็นพิษ (Puerperal sepsis) (Smith, 1969 และ1973 ; Myrvik *et al.*, 1974) นอกจากนี้เชื้อ *Streptococcus* sp. ยังทำให้เกิดโรคในปลา มีผลทำให้เกิดการตกเลือดบริเวณตาหรืออวัยวะภายใน โดยโรคชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นแบบฉับพลัน (acute) สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ตัวปลาภายใน 48 – 72 ชั่วโมง และพบการตายภายใน 4 – 5 วัน หลังจากได้รับเชื้อหรืออาจเกิดขึ้นในลักษณะเรื้อรัง (chronic) เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในปลาได้แก่ *S. iniae* , *S. parauberis* , *S. faecium* และ *S. equisimilis* (Plumb,1994)

Bridge และ Sneath (1983) ได้แยกชนิดของเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยดูจากคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำให้ได้เชื้อหลายชนิด เช่น *S. faecalis, S. equinus, S. lactis* และ *S. casseliflavus* ส่วน Austin และ Austin (1987) ได้รายงานชนิดของเชื้อ *Streptococcus* sp.

ได้แก่ *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. equisimilis*, *S. faecium*, *S. pyogenes* และ *S. zooepidemicus*

2.1 คุณสมบัติของเชื้อ Streptococci

2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

เชื้อ *Streptococcus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.8 -1 ไมโครเมตร เชื้อแบ่งตัวเป็นแนวเดียว จะเห็นลักษณะการเรียงตัวอยู่เป็นคู่ๆ หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth) จะได้เชื้อแบคทีเรียที่ต่อกันเป็นสายยาว ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) ไม่มีการสร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างรงควัตถุ เจริญได้ดีทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ที่ผสมกลูโคส (glucose) 0.5 เปอร์เซ็นต์ Brain heart infusion (BHI) และ Todd-Hewitt agar (THA) (Inglis *et al*.,1993) และ Blood agar (BA) (Schuhardt, 1987)

เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เจริญใน Sheep blood agar และ Todd-Hewitt agar จะมีโคโลนีขนาดเล็กประมาณ 0.1 - 1.0 มิลลิเมตร มีสีขาวขุ่นอมเทา นูนเล็กน้อยบน Blood agar และนูนโค้งเป็นครึ่งวงกลมบน Todd-Hewitt agar และมีการย่อยเม็ดเลือดแดง (haemolytic) บน Sheep blood agar แต่จะไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง บน Blood agar ที่เติมเลือดมนุษย์ ม้า หรือกระต่าย (นันทนา, 2537)

จิราพร และคณะ (2529) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ลักษณะโคโลนีของเชื้อจะมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร ขอบเรียบ โคโลนีกลมนูนขึ้นเล็กน้อย มีสีขาว ส่วน Inglis และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Todd-Hewitt agar โคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 -1.0 มิลลิเมตร มีสีเหลืองครีม สีขาวขุ่น และนูน ขอบโคโลนีจะบาง นอกจากนี้ Bragg และคณะ (1989) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrazolium agar โคโลนีของเชื้อจะเป็นสีแดง

2.1.2 คุณสมบัติทางชีวเคมี

หากพิจารณาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ โดยการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีบน Todd - Hewitt agar และ Blood agar แต่จะเจริญเติบโตช้าใน Tryptic soy agar ไม่สามารถเจริญเติบโตที่ความเป็นกรด - ด่าง (pH) 9.6 และอาหารที่มีเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่

เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20 - 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และ catalase (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543) และเจริญได้ใน 40 เปอร์เซ็นต์ น้ำดี (bile salt) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kawahara และ Kusuda (1987) ได้ทำการแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เป็น β - haemolytic ในประเทศญี่ปุ่น เมื่อพิจารณาการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อชนิดนี้จะไม่เจริญเติบโตที่ความเป็นกรด - ด่าง 9.6 และอาหารที่มีเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ใน 40 เปอร์เซ็นต์ น้ำดี

Kusuda และคณะ (1978) ทำการแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. จากปลาไหล (*Anguilla japonica*) ที่ป่วยเป็นโรค พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10 - 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด - ด่าง 7.5 อาหารที่มีเกลือ 1 – 4 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ methylene blue milk

Perera และคณะ (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. iniae* ที่ทำให้เกิดโรคในปลานิลลูกผสม (*Tilapia nilotica x T. aurea*) กับความเป็นกรด - ด่าง ความเค็มและอุณหภูมิ พบว่าเชื้อแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ความเป็นกรด - ด่าง 5.5 - 8.5 อุณหภูมิที่ 10 - 45 องศาเซลเซียส และความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน

สำหรับการผลิตกรดจากน้ำตาล พบว่าสามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลหลายชนิด เช่น glucose maltose mannitol sucrose fructose และ trehalose แต่จะไม่ผลิตกรดจากน้ำตาล arabinose lactose และ xylose (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543) จากการทดลองของ Boomker และคณะ (1979) อ้างโดย Austin และ Austin (1987) ทำการแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. จากทวีปอเมริกาใต้ โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถสลาย sodium hippurate และสามารถผลิตกรดจากแป้งและน้ำตาล galactose glucose lactose maltose salicin และ trehalose แต่จะไม่ผลิตกรดจาก inulin และน้ำตาล arabinose mannitol raffinose sorbitol sucrose และ xylose แต่เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่น ไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หรือไม่สามารถสลาย sodium hippurate (Kitao *et al.*,1981) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลาต่างๆ

	เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้			
คุณสมบัติของเชื้อ	**เยาวนิตย์** **และคณะ** (2543) Seabass	Foo **และคณะ** (1985) *Siganus canaliculata*	Perera **และคณะ** (1994) Hybrid tilapia	Doménech **และคณะ** (1996) Turbot
Gram stain	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Haemolysis	β	α	β	α
Tolerance of :				
pH 9.6	-	+	-	-
6.5 % NaCl	-	+	-	-
10 C^0	-	+	+	+
45 C^0	-	-	+	+
40 % bile	+	-	+	NT
Hydrolysis of :				
Gelatin	NT	-	-	NT
Starch	+	+	+	+
Hippurate	NT	-	-	NT
Arginine	+	NT	+	NT
Acid from :				
Arabinose	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Glycerol	NT	NT	-	NT
Inulin	NT	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

	เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้			
คุณสมบัติของเชื้อ	เยาวนิตย์ และคณะ (2543) Seabass	Foo และคณะ (1985) *Siganus canaliculata*	Perera และคณะ (1994) Hybrid tilapia	Doménech และคณะ (1996) Turbot
Raffinose	NT	-	-	-
Salicin	NT	+	-	+
Trehalose	+	+	+	NT
Xylose	-	NT	-	-

NT : Not test

\+ : Positive

\- : Negative

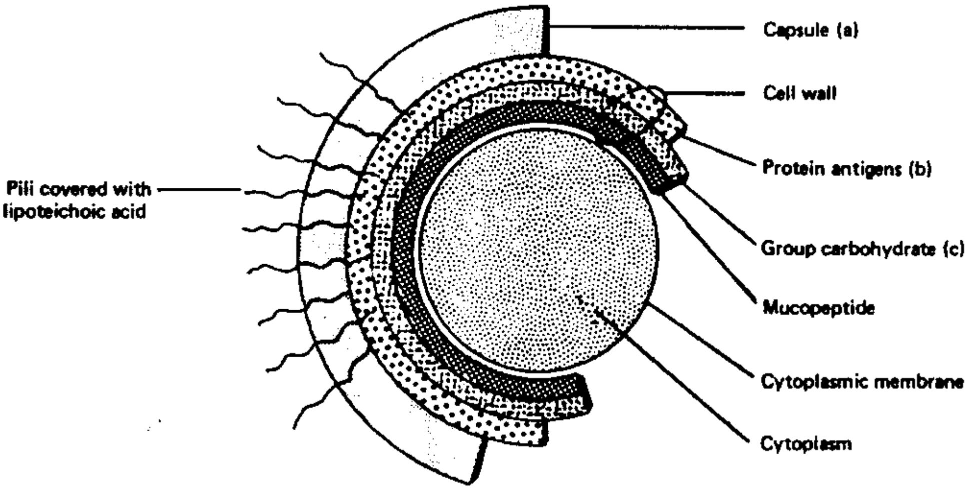
2.1.3 คุณสมบัติทางแอนติเจน

ก. Lancefield grouping ผนังเซลล์ (cell wall) ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะพบมากในเชื้อ streptococci และเป็นรูปแบบสำคัญในการจำแนกกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อ β - hemolytic streptococci ออกเป็นกลุ่ม โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับแอนติบอดี้ที่จำเพาะ วิธีดังกล่าวเรียกว่า Lancefield grouping ซึ่งเตรียมได้โดยนำเชื้อมาเลี้ยงและทำการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) กรดไนตรัส (nitrous acid) เอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์ เช่น เปปซิน (pepsin) หรือทริพซิน (trypsin) หรือนำสารละลายเชื้อ streptococci ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ในการตรวจหาแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต โดยใช้กรดอะมิโนของน้ำตาล เช่น streptococci กลุ่ม A จะมีความจำเพาะกับ rhamnose – N - acetylglucosamine

ข. M protein สารนี้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของ group A Streptococci ส่วนมากพบในเชื้อที่มีโคโลนีเป็นแบบ mucoid แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาหลายๆ ครั้ง อาจทำให้สูญเสียการสร้าง M protein สารนี้มีคุณสมบัติช่วยขัดขวางการจับกินโดยเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ group A streptococci สามารถจำแนกเป็น subgroup (serotype) โดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของ M protein

ค. T substance เป็นแอนติเจนที่ไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ ซึ่งไม่เหมือนกับ M protein T substance ถูกทำลายได้ด้วยกรดและความร้อน ในการแยก T substance ออกจากเชื้อ streptococci โดยปฏิกิริยา hydrolysis ซึ่งสามารถทำลาย M protein ได้อย่างรวดเร็ว ในการจำแนกเชื้อ streptococci โดยวิธีการตกตะกอน (agglutination) ที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดี้ ซึ่งเรียกว่า R protein

ง. Nucleoprotein ซึ่งจะสกัดจากเชื้อ streptococci โดยใช้อัลคาไลล์ผสมกับโปรตีนและสารอื่นๆ ที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดี้ได้น้อย เรียกว่า P substances ซึ่งเป็นตัวที่สร้างเซลล์ของเชื้อ streptococci (Jawetz *et al.*, 1989)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของแอนติเจนของเชื้อ streptococci

ที่มา : Jawetz และคณะ (1989)

2.1.4 คุณสมบัติทางซีรั่มวิทยา

ในการจำแนกเชื้อ *Streptococcus* sp. จะใช้วิธีการของ Lancefield's (1933) อ้างโดย Inglis และคณะ (1993) ในการจำแนกเชื้อ β - haemolytic Streptococci สามารถทำได้โดยวิธีการ precipitin, gel diffusion precipitation (Rotta *et al.*, 1971) และ electrophoresis (Dajani, 1973 อ้างโดย Inglis *et al.*, 1993) ในแต่ละตัวอย่างจะใช้ antigen ที่เน้นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะมีอยู่ด้วยกัน 4 วิธี คือ hot acid method, hot formamide method, autoclave method

และ enzyme method ส่วนวิธี coagglutination และ immunofluorescence สามารถที่จะนำมาใช้ได้เช่นกัน

ในการแยกชนิดของ Streptococci ส่วนมากจะใช้เทคนิคทางซีรั่มวิทยา โดยใช้ Lancefield's group antisera (A - U) ที่มีขายอยู่ในท้องตลาดแบคทีเรียที่นำมาใช้ได้มาจากปลา ซึ่งเน้นเชื้อ β - haemolytic *Streptococcus* sp. (Stokes and Ridgwar, 1987 ; Baya *et al.*, 1990 ; Boomker *et al.*, 1979 อ้างโดย Inglis *et al.*, 1993) แต่เชื้อ *S. iniae* และ α - haemolytic *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลาหางเหลืองในประเทศญี่ปุ่น จะไม่ได้ผลต่อวิธี Lancefied's group antisera ทั้งนี้เนื่องจาก antisera ที่ผลิตขึ้นจะมีความจำเพาะกับกลุ่ม β - haemolytic *Streptococcus* sp.

2.2 การจำแนกกลุ่มของ *Streptococcus* sp.

โดยทั่วไปเชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถแยกตามคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (haemolytic reaction) ได้ 3 กลุ่มคือ

2.2.1 non - haemolytic หรือ gamma - haemolytic Streptococci คือเชื้อที่ไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดง จึงไม่มีวงใสรอบๆ โคโลนี (Smith, 1969 และ 1973) เช่น *S. faecalis* ซึ่งเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคสเตรฟโตคอคโคซีสในปลาได้หลายชนิด เช่น ปลาทะเลในอ่าวเม็กซิโก (Plumb *et al.*, 1974) ปลากัลฟ์คิลลิฟิช (gulf killifish, *Fundulus grandis*) ทางตอนใต้ของมลรัฐอะลาบามา (Alabama) ประเทศสหรัฐอเมริกา (Rasheed and Plumb, 1984)

2.2.2 alpha - haemolytic Streptococci เป็นเชื้อที่ทำลายเม็ดเลือดแดงได้บางส่วน จะเห็นลักษณะรอบๆ โคโลนีของเชื้อมีสีน้ำตาล หรือสีเขียวอ่อนๆ (Smith, 1969 และ 1973) การจำแนกชนิดของ alpha - haemolytic *Streptococcus* sp. จะใช้การทดสอบ Optochin susceptibility test และ Bile solubility test (Stokes and Ridgwar, 1987 ; นันทนา, 2537) ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *S. pneumoniae* (Stokes and Ridgwar, 1987 ; Jawetz *et al.*, 1989) *S. salivarius* และ *S. viridans* (นันทนา, 2537) โดยเชื้อในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคสเตรฟโตคอคโคซีสในปลาบางชนิด เช่น ปลาสลิดหิน (*Siganus canaliculatus*) ที่เลี้ยงในประเทศสิงคโปร์ (Foo *et al.*,1985) ปลานิลลูกผสม (*O. niloticus* X *O.aureus*) ที่เลี้ยงในประเทศซาอุดิอาระเบีย (Al-Harbi,1994) และปลาเทอร์บอท (turbot, *Scophthalmus maximus*) ที่เลี้ยงในประเทศสเปน (Doménech *et al.*,1996)

2.2.3 beta - haemolytic Streptococci เป็นเชื้อที่ทำลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ และเห็นลักษณะรอบๆ โคโลนีมีขอบใส (Smith, 1969 และ 1973 ; Stokes and Ridgwar, 1987 ; Jawetz *et al.*, 1989) การจำแนกชนิดของ beta - haemolytic *Streptococcus* sp. จะใช้การทดสอบ Lancefield grouping (Stokes and Ridgwar, 1987) L – pyrrolidonyl – beta - naphthylamide (PYR test) และ Bacitracin test (นันทนา, 2537) ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *S. pyogenes* group A, *S. agalactiae* group B, *S. equisimilis* group C, *S. bovis* group D และ *S. milleri* group F (Stokes and Ridgwar,1987) มีรายงานการพบเชื้อ *S. iniae* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม beta - haemolytic *Streptococcus* sp.ในปลาหลายชนิด เช่น ปลาหางเหลือง (Kawahara *et al.*,1984) ปลานิลลูกผสม (*Tilapia nilotical* x *T. aurea*) (Perera *et al.*,1994) และปลาสทริพแบสส์ลูกผสม (striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*) (Evans *et al.*,2000)

Kitao และคณะ (1981) ทำการแยกเชื้อ beta-haemolytic *Streptococcus* sp. โดยใช้วิธี Cross - agglutination ต่อ antiserum ในการแยกเชื้อ *S. iniae* ส่วน Kawahara และ Kusuda (1987) ใช้วิธี Fluorescence antibody technique ซึ่งแสดงให้เห็นว่า beta - haemolytic *Streptococcus* sp. ที่แยกจากปลาเอยูที่เป็นโรค สามารถที่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *S. iniae* ซึ่งผลที่ได้สามารถนำมาใช้จำแนกเชื้อ *S. iniae*

2.3 สารพิษและเอนไซม์ของเชื้อ Streptococci

เชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถสร้าง extracellular product ได้มากกว่า 20 ชนิด ชนิดที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการก่อโรคได้แก่ (Jawetz *et al.*, 1989)

1. Streptokinase (fibrinolysin) beta -haemolytic *Streptococcus* sp. group A, C และ G จะสร้าง streptokinase ซึ่งสามารถเปลี่ยน plasminogen ในซีรั่ม ให้เป็น plasmin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไฟบริน (fibrinX และโปรตีนอื่นได้

2. Streptodornase (Dnase) depolymerize DNA เป็นเอนไซม์ที่สามารถ depolymerize DNA และแอนติบอดี้ต่อเอนไซม์ชนิดนี้ จะตรวจพบภายหลังการติดเชื้อ

3. Hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยกรด hyaluronic และมีคุณสมบัติ เช่นเดียวกับที่พบในเชื้อ *Staphylococcus* sp.

4. Erythrogenic toxin (Dick toxin) เป็นทอกซินที่สร้างจากเชื้อ *Streptococcus* sp. group A, C และ G มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนและถูกทำลายโดยความร้อน 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 ชั่วโมง

5. Haemolysin เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการทำลายเม็ดเลือดแดงแตกต่างกัน เชื้อ beta-haemolytic Streptococci group A สร้าง haemolysin 2 ชนิด คือ

- Streptolysin O เป็นโปรตีน ถูกทำลายโดยออกซิเจน มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดี้ในซีรั่มของสัตว์ ที่ติดเชื้อ Streptococci กลุ่ม A
- Streptolysin S เป็นสารที่ทนต่อออกซิเจน ทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน

2.4 เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ

การพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Streptococcus* sp. กับสัตว์น้ำเป็นการยากมากที่จะนำมาตัดสินใจว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ตัวใดที่ทำให้เกิดโรคในปลา ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดย่อมจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปของแต่ละกลุ่ม หรือบางครั้งอาจจะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก โดยเชื้อที่ทำให้เกิดโรคจะมีสัดส่วนของ guanine และ cytosine บนสาย DNA เท่ากับ 34 – 46 เปอร์เซ็นต์ (Inglis *et al.*,1993) อย่างไรก็ตามเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดง (beta - haemolytic) ได้อย่างชัดเจน จะเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้มากกว่ากลุ่มอื่น (non - haemolytic และ alpha - haemolytic) เชื้อ *Streptococcus* sp. จะมีอยู่ด้วยกัน 3 ลักษณะ คือ α, β - haemolytic และ non - haemolytic แต่เชื้อ *S. agalactiae* จะมีทั้งชนิด α และ β - haemolytic (Cowan, 1974 อ้างโดย Austin and Austin, 1987) Bridge และ Sneath (1983) ทำการแยกชนิดของเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยดูลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมี ซึ่งจะมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น *S. faecalis, S. equinus, S. lactis* และ *S. casseliflavus* ส่วน Austin และ Austin (1987) ได้รายงานชนิดของเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้แก่ *S. agalactiae, S. dysgalactiae, S. èqui, S. equisimilis, S. faecium, S. pyogenes* และ *S. zooepidemicus*

สำหรับการแยกเชื้อ *Streptococcus* sp.ในประเทศญี่ปุ่น จะปรากฏเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกันมาก คือ *S. faecalis* และ *S. faecium* (Kitao, 1993 อ้างโดย Plumb, 1994) และยังทำให้เกิดโรคในปลาเรนโบว์เทร้าท์ในประเทศอิตาลี (Ghittino and Prearo, 1992)

เชื้อ *S. shiloi* และ *S. difficile* เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตที่ความเป็นกรด - ด่าง 9.6 แต่ไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เจริญใน 40 เปอร์เซ็นต์ น้ำดี และเจริญในอาหารที่มีเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ DNA (เปอร์เซ็นต์ G+C = 37 เปอร์เซ็นต์) เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลานิลและปลาเรนโบว์เทร้าท์ในประเทศอิสราเอล (Eldar *et al.*,1994)

เชื้อ *S. parauberis* เป็นเชื้อแกรมบวก ท่อนสั้นหรือกลมจนถึงเป็นท่อน อยู่กันเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เจริญเติบโตที่ความเป็นกรด - ด่าง 9.6 อาหารที่มีเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส Doménech และคณะ (1996) ได้รายงานการเกิดโรคสเตรพโตคอคโคซีสในปลาเทอร์บอทในประเทศสเปน โดยพบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเป็นเชื้อ *S. parauberis* และยังทำให้เกิดโรคในปลาแอมเบอร์แจ๊ค (amberjack, *Seriola dumerili*) (Alcaide *et al.*, 2000)

เชื้อ *S. iniae* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคสเตรพโตคอคโคซีสในปลานิล *(O. niloticus)* ได้มากที่สุด รวมทั้งปลาสทริพแบสส์ลูกผสม (Evans *et al.*, 2000) Eldar และคณะ (1999) รายงานว่าเชื้อ *S. iniae* สามารถทำให้เกิดโรคในปลาเรดดรัม (red drum, *Sciaenops ocellatus*) โดยปลาจะเกิดอาการตาโปนและสูญเสียการทรงตัว นอกจากนี้ยังพบบาดแผลบนผิวหนังและเกิดการอักเสบของกล้ามเนื้อ Bromage และคณะ (1999) รายงานว่าพบเชื้อ *S. iniae* ครั้งแรกในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) ในทวีปออสเตรเลีย ส่วน Nguyen และคณะ (2002) รายงานว่าเชื้อ *S. iniae* เป็นสาเหตุการตายของปลาซีกเดียว (*Paralichthys olivaceus*) ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้เชื้อชนิดนี้ยังสามารถที่จะทำให้เกิดโรคในคนได้ (Dodson *et al.*,1999)

นอกจากนี้ยังพบว่าโรคสเตรพโตคอคโคซีส ยังมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับโรคแลคโตคอคโคซีส ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Lactococcus garvieae* ที่ทำให้เกิดโรคในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (Gil *et al.*, 2000 ; Di - Francesco *et al.*, 2001 ; Barnes *et al.*, 2002) ปลาหางเหลือง (Nakai *et al.*, 1999 ; Ghittino *et al.*, 2002)

Aoki และคณะ (2000) ทำการจำแนกเชื้อ *L. garvieae* โดยใช้วิธี PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งใช้ DNA primer ขนาด 709 คู่เบส (bp) ที่โคลนจากเชื้อ *L. garvieae* พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ เฉพาะเชื้อ *L. garvieae* แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ในเชื้อ *Lactococcus* sp. ชนิดอื่น

Yimin และคณะ (1999) ได้จำแนกและแยกเชื้อ lactic bacteria จากลำไส้ของปลาใน (*Cyprinus carpio*) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่เลี้ยงในจังหวัดนครปฐมของประเทศไทย โดยทำการเก็บเชื้อจากตัวอย่าง 54 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จะเป็น

แกรมบวกและให้ผล catalase เป็นลบ ไม่มีการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส แต่จะสร้างกรดจากน้ำตาลแลคโตส เชื้อที่แยกได้จะเจริญในอาหารเหลวที่ระดับความเป็นกรด - ด่าง 9.6 เจริญในอาหารที่มีเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และ 40 เปอร์เซ็นต์ น้ำดี เมื่อทำการแยกชนิดของเชื้อพบว่าเป็นเชื้อ *L. garvieae* ที่พบมากที่สุด โดยพบถึง 90.7 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อทั้งหมด

Ravelo และคณะ (2001) ทำการแยกเชื้อ *L. garvieae* จากปลา 23 ชนิด โดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการแยกชนิด โดยใช้ Rapid ID 32 Strep ในการทดสอบพบว่ามีการสลาย hippurate, beta – galactosidase, N – acetyl – beta - glucosaminidase, beta - mannosidase และสร้างกรดจาก melezitose และ pullulan

นอกจากนี้ยังมีเชื้อ *L. piscium* (Williams *et al.* 1990) *Vagococcus salmoninarum* (Schmidtke and Carson, 1994) และ *Enterococcus seriolicida* (Eldar *et al.*, 1996) ที่ทำให้เกิดโรคในปลา โดยเฉพาะปลาเรนโบว์เทร้าท์

2.5 การแพร่ระบาดของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในสัตว์น้ำ

การแพร่ระบาดของเชื้อ *Streptococcus* sp. เกิดขึ้นในปลาทะเล ปลาน้ำกร่อยและปลาน้ำจืด โดยทั่วไปแล้วการแพร่ระบาดของเชื้อจะมีความรุนแรงมากในปลาทะเล เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในระดับความเค็มกว้างๆ แต่ถ้าหากแยกเชื้อจากปลาน้ำกร่อยหรือปลาน้ำจืดจะไม่เจริญเติบโตในความเค็มมากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ (Kitao *et al.*,1981)

2.5.1 แหล่งที่มาของเชื้อ *Streptococcus* sp.

การแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถอยู่ในน้ำทะเลและดินโคลนในบริเวณที่มีการเลี้ยงปลาตลอดทั้งปี ในช่วงฤดูร้อนจะมีจำนวนของเชื้อสูงมาก ตรวจพบในน้ำทะเลและดินโคลน Kitao และคณะ (1979) ได้รายงานว่าตรวจพบเชื้อได้ง่ายจากดินโคลนในช่วงฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว ในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติสิ่งมีชีวิตส่วนมากจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการติดเชื้อในปลาได้ ซึ่งเป็นการยากที่จะให้ความเห็นว่าเชื้อที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมมีลักษณะเดียวกันกับลักษณะที่ทำให้เกิดโรคในปลา ดังนั้นการแยกเชื้อจากสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ จึงเป็นเพียงเครื่องชี้วัดความสะอาดของแหล่งน้ำ การเกิดโรคระบาดในปลาจะเกิดขึ้นเมื่อสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติที่มีการเปลี่ยนแปลง Plumb และคณะ (1974) สังเกตพบว่ามีปลาตายเป็นจำนวนมากในอ่าวเม็กซิโก ซึ่งเป็นอ่าวที่แคบและน้ำจะไหลลงสู่อ่าวเปิด น้ำจึงไหลรวมกับน้ำจืดที่มีอยู่ในอ่าวแล้วทำให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม

จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาเกิดความเครียดและมีการแพร่ระบาดของโรคสเตรพโตคอคโคซีส ซึ่งปรากฎการณ์นี้คล้ายกับการเกิดโรคระบาดในอ่าวเชคสเปียซ์ (chesapeake) ในสหรัฐอเมริกา (Baya *et al.*,1990)

นอกจากนี้ Minami (1979) อ้างโดย Inglis และคณะ (1993) ทำการแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. จากปลาที่นำมาเป็นอาหารปลาหางเหลือง ซึ่งประกอบด้วยปลาซาร์ดีน (sardine, *Sardinops melanosticta*) ปลากระตัก (anchovy, *Engraulis japonica*) และปลาเฮอร์ริง (herring, *Etrumeus micropus*) พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถอยู่ได้นานกว่า 6 เดือนในปลาแช่แข็ง ดังนั้นจึงเป็นแหล่งที่มาสำคัญของการติดเชื้อในน้ำ ดินโคลนและฟาร์มปลา ซึ่งปลาที่รอดจากการระบาดของโรคส่วนใหญ่จะเป็นพาหะที่จะนำไปสู่การติดเชื้อแก่ปลาตัวอื่นๆ ได้

2.5.2 **การถ่ายทอดของเชื้อ** *Streptococcus* sp.

การถ่ายทอดของโรคสเตรพโตคอคโคซีสในปลา เกิดจากการสัมผัสกับปลาที่ติดเชื้อ (carrier) หรือการปนเปื้อนเชื้อ *Streptococcus* sp.ในอาหารปลา โดยนำปลาที่ตายเนื่องจากโรคนี้มาใช้เป็นอาหาร ทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อ แต่จากการศึกษาของ Plumb และคณะ (1974) พบว่าการระบาดของเชื้อชนิดนี้จะเกิดขึ้น เมื่อปลาเกิดความเครียด (Stress) อันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมเช่นมีสารพิษตกค้างอยู่ในแหล่งน้ำ หรือปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำลง สอดคล้องกับการตายของปลาบู่ในกระชังที่จังหวัดอยุธยาและนครสวรรค์ อันมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยพบว่ามีสารพิษจำพวกยาฆ่าแมลงเจือปนอยู่ในน้ำและปริมาณออกซิเจนในน้ำอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เชื้อ *Streptococcus* sp. เจริญเติบโตและทำให้ปลาบู่เกิดโรคขึ้นได้ (จิราพร และคณะ, 2529)

Snieszko และ Axelrod (1971) ทดลองถ่ายทอดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยการปล่อยปลาที่เป็นโรคสเตรพโตคอคโคซีสลงในตู้ปลาที่มีปลาสุขภาพดีอยู่ จึงเป็นการเปิดโอกาสให้เชื้อโรคปนเปื้อนอยู่ในน้ำได้ ซึ่งในน้ำ 1 มิลลิลิตร อาจจะมีถึง 10^7 CFU (colony forming unit) โดยจะทำให้ปลาในตู้เกิดโรคได้ ส่วน Robinson และ Meyer (1966) อ้างโดย Inglis และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองการติดเชื้อในปลาโกลด์เดนไชเนอร์ โดยการแช่ปลาในสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml นาน 10 นาที และการทดลองการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องหรือกล้ามเนื้อพบว่าสามารถทำให้ปลาเกิดโรคได้ นอกจากนี้ Rasheed และ Plumb (1984) ได้ทดลองนำปลากัลฟ์คิลลิฟิช จุ่มลงในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง เช่น สารละลายของเกลือก่อนที่จะนำปลาไปจุ่มในสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. แล้วทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ

Streptococcus sp.ในตับและม้าม พบว่าค่า LD_{50} ของเชื้อ *Streptococcus* sp. มีค่าเท่ากับ 1.4 X 10^4 CFU/ml ที่ 96 ชั่วโมง และ 7.5 X 10^5 CFU/ml ที่ 168 ชั่วโมง และจำนวนของเชื้อในตับและไตจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ติดเชื้อ แต่ในการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อปลาเกิดความเครียดหรือบาดแผล สำหรับการติดเชื้อโดยวิธีการกินจะได้ผลก็ต่อเมื่อปลาที่นำมาใช้เป็นอาหารต้องผสมเชื้อแบคทีเรียลงไป Dodson และคณะ (1999) และ George (1999) ได้รายงานว่าเชื้อ *S. iniae* สามารถทำให้เกิดโรคกับคนที่กินปลาเป็นโรคเข้าไป ส่วนอาการที่เกิดขึ้นในคนจะมีลักษณะเซลล์เนื้อเยื่ออักเสบหรือไฟลามทุ่ง

ในประเทศญี่ปุ่นการเกิดโรคสเตรฟโตคอคโคซีสในปลาหางเหลือง เกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี แต่ส่วนมากจะเกิดการระบาดในช่วงเดือนสิงหาคมจนถึงเดือนพฤศจิกายน (Inglis *et al.*,1993)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

2.6.1 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการเกิดโรค พบว่าการระบาดของโรคจะสูงในช่วงฤดูร้อนและ ฤดูใบไม้ร่วง Ghittino และ Prearo (1992) รายงานว่ามีการเกิดโรคสเตรฟโตคอคโคซีสกับปลา เรนโบว์เทร้าท์ที่เลี้ยงทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี ในช่วงที่อุณหภูมิของน้ำ 21 – 22 องศาเซลเซียส แต่การระบาดของโรคในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ในประเทศสเปนเกิดที่อุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 17 องศาเซลเซียส (Palacios *et al.*, 1993)

Bunch และ Bejerano (1997) แยกเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลลูกผสม พบว่า alpha - hemolytic *Streptococcus* sp. ทำให้เกิดโรคในช่วงที่น้ำมีอุณหภูมิ 15 – 16 องศาเซลเซียส และ non - hemolytic *Streptococcus* sp. ทำให้เกิดโรคในช่วงที่น้ำมีอุณหภูมิ 26 - 28 องศาเซลเซียส ส่วน Choi และคณะ (1997) รายงานว่าการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาแบลครอคฟิช (black rockfish, *Sebastes schlegeli*) ในประเทศอิตาลี มีการระบาดของโรคในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม ที่อุณหภูมิของน้ำสูง การติดเชื้อมักเกิดขึ้นกับปลาที่มีขนาด 19 - 25 เซนติเมตร หนัก 120 - 200 กรัม

Perera และคณะ (1997) ได้ทำการทดลองผลของอุณหภูมิต่ออัตราการตายของปลานิลลูกผสมในมลรัฐเท็กซัส (texas) ที่ได้รับเชื้อ *S. iniae* โดยศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปลาไม่มีการตายในช่วง 4 วันแรก หลังจากนั้นมีการตายเล็กน้อยและไม่มีการตายของปลาอีกตลอด 2 สัปดาห์ ส่วนที่อุณหภูมิอื่นๆมีการตายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

Ghittino และคณะ (1998) รายงานว่ามีการติดเชื้อ *S. iniae* ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ในช่วงที่อุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เชื้อ *Streptococcus* sp. ยังทำให้เกิดโรคกับจระเข้น้ำเค็ม (*Crocodylus porosus*) ในช่วงที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำ (Roberts,1998)

2.6.2 **ความเป็นกรด - ด่าง** (pH)

Perera และคณะ (1997) ทำการทดลองผลของความเป็นกรด – ด่าง ต่อการตายของปลานิลลูกผสม ในเท็กซัส ที่ได้รับเชื้อ *S. iniae* โดยทำการศึกษาที่ระดับความเป็นกรด – ด่าง ต่างๆ คือ 6 , 8 และ 9 พบว่าน้ำที่มีค่าความเป็นกรด – ด่าง 9 จะทำให้ปลามีการตายสูงกว่าน้ำที่มีค่าความเป็นกรด – ด่าง ต่ำ เนื่องจากทำให้ปลาเกิดความเครียด ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลาลดลง จึงทำให้ปลาติดเชื้อได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความเป็นกรด – ด่าง 6 มีการตายน้อยที่สุด

2.6.3 **ความเค็ม** (Salinity)

Chang และ Plumb (1996) ศึกษาผลของความเค็มที่ระดับต่างๆ ต่อการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิล ร่วมกับอุณหภูมิที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าความเค็ม 0 และ 15 ส่วนในพันส่วน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การตายของปลาจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีความสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การตายของปลาที่ความเค็ม 0, 15 และ 30 ส่วนในพันส่วน มีความสำคัญทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเค็ม 0, 15 และ 30 ส่วนในพันส่วน การตายของปลาจะตายสูงกว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และปลาตายสูงที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ซึ่งสรุปได้ว่าปลาจะมีการตายสูงที่ความเค็มสูงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Perera และคณะ (1997) รายงานว่าปลาจะมีการตายสูงที่ความเค็มของน้ำสูง

2.6.4 **ความหนาแน่นของสัตว์น้ำและปริมาณเชื้อ**

Shoemaker และคณะ (2000) ศึกษาความหนาแน่นของปลานิลและปริมาณของเชื้อต่อการตายของปลานิล ที่ติดเชื้อ *S. iniae* โดยทดลองใช้ปลานิลขนาด 11.9 กรัม ที่ความหนาแน่นต่ำ (ปลา 25 ตัวหรือ 5.6 กรัมต่อลิตร) ความหนาแน่นปานกลาง (ปลา 50 ตัวหรือ 11.2 กรัมต่อลิตร) และความหนาแน่นสูง (ปลา 100 ตัวหรือ 22.4 กรัมต่อลิตร) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ในแต่ละความหนาแน่นจะใช้ปริมาณของเชื้อที่แตกต่างกันคือ 2.5×10^7, 5.0×10^7 และ 1.0×10^8

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

CFU/ml โดยแช่ปลาในสารละลายแบคทีเรียนาน 48 ชั่วโมง และนำไปเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน พบว่าที่ความหนาแน่นต่ำ ปานกลางและสูง มีการตายของปลาเฉลี่ย 4.8, 28.4 และ 25.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบว่าปริมาณเชื้อที่สูงจะทำให้การตายของปลาสูงตามไปด้วย โดยทั่วไปจะใช้ความหนาแน่นของปลาในการทดลอง 30 - 290 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยงปลาแบบพัฒนาเพื่อการค้า

2.7 ลักษณะอาการของปลาที่เป็นโรคสเตรพโตคอคโคซีส

อาการของโรคในปลาที่ปรากฏให้เห็นภายนอกจะเปลี่ยนแปลงตามชนิดของปลาที่ติดเชื้อ โดยส่วนใหญ่ปลาที่ป่วยเป็นโรคจะมีอาการว่ายน้ำแบบควงสว่าน เสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำ ตาโปนข้างเดียวหรือ 2 ข้าง ตาขุ่น ท้องบวม เกิดการอักเสบบริเวณ dorsol - lateral portion ของลำตัว พบการตกเลือดบริเวณตา กระพุ้งแก้ม โคนครีบ รอบบริเวณปาก บริเวณลำตัวและเกิดแผลบริเวณผิวของลำตัว (Austin and Austin ,1987; Plumb,1994)

ในกรณีที่เกิดบาดแผล แผลจะค่อยๆขยายกว้างออกไปเรื่อยๆ และเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผลจะตาย โดยรอบๆ บริเวณแผลมีสีคล้ำ ซึ่งจะเกิดบริเวณลำตัวและบริเวณโคนหาง นอกจากนี้เชื้อ *Streptcoccus* sp. ยังมีผลต่อตา ซึ่งสามารถพบได้บ่อยมาก การเกิดบาดแผลบริเวณตาเป็นผลมาจากการคั่งของเลือดบริเวณหลังลูกตาและการบวมน้ำ (edema) แต่จะมีการอักเสบมากขึ้นและเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณ optic nerve และ choroid ส่วนเบ้าตา (orbit) ขยายกว้างในตาที่เกิดเลือดคั่ง ซึ่งเกิดจากการตกเลือดบริเวณเนื้อเยื่อในลูกตา (retina) และส่วนของวุ้นใสที่อยู่ในเบ้าตา (vitreous humour) ต่อมาจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณกระจกตาและเกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อตา ทำให้เกิดแผลบริเวณแก้วตา (cornea) (Inglis *et al.*,1993)

จิราพร และคณะ (2529) ศึกษาโรคของปลาบู่ทรายที่เลี้ยงในกระชัง บริเวณจังหวัดนครสวรรค์ อยุธยาและชัยนาท พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในปลาบู่ทราย โดยปลาที่ป่วยจะมีอาการ ตาขุ่น ตาโปน มีของเหลวปนน้ำเลือดขังอยู่ภายในลูกตา

กมลพร (2539) ศึกษาโรคปลานิล ที่เลี้ยงในจังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่าปลาที่ป่วยเป็นโรคจะมีอาการ ตาขุ่นขาว ว่ายน้ำช้าๆ ว่ายเป็นวงกลมหรือลอยตัวนิ่งๆ รอบๆช่องขับถ่ายมีสีแดง ตาโปน ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวเหมือนกับรายงานของ Al - Harbi (1994) และ Perera และคณะ (1994) ในปลานิลลูกผสม

เยาวนิตย์ และคณะ (2543) ทำการแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. จากปลากะพงขาวที่เลี้ยงบริเวณจังหวัดปัตตานีและสงขลา โดยปลาที่ป่วยจะมีอาการเฉื่อย ลำตัวสีคล้ำ เหงือกซีด ลอยหัวที่ผิวน้ำ ตกเลือดบริเวณท้อง มีแผลแดงเป็นจุดเล็กๆ บนลำตัว ตาโปนหนึ่งข้าง

Doménech และคณะ (1996) ศึกษาโรคของปลาเทอร์บอท พบว่าปลาที่เป็นโรคจะมีการตกเลือดบริเวณช่องขับถ่ายและครีบอก มีการตกเลือดที่ตา ซึ่งอาการดังกล่าวมีลักษณะเหมือนกันกับอาการของปลาเรดดรัม (Eldar *et al.*,1999) และปลาแรบบิทฟิช (rabbitfish, *Siganus canaliculatus*) (Yuasa *et al.*,1999)

โดยส่วนใหญ่ปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. จะมีผลต่ออวัยวะภายในได้แก่ ตับ ไต ม้าม สมอง และอาจจะมีผลต่อหัวใจด้วย โดยตับมีสีซีดและเกิดการตายของเซลล์ตับ ตับมีอาการบวมผิดปกติ ซีดเหลืองตกเลือดเป็นแห่งๆ ส่วนม้ามมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างผิดปกติ เซลล์ม้ามบวม ม้ามมีสีแดงคล้ำ มีการสะสมของเหลวในช่องท้อง มีเลือดคั่งในระบบทางเดินอาหารและลำไส้มีการอักเสบ (Snieszko and Axelrod,1971 ; Austin and Austin,1987 ; Inglis *et al.*,1993 ; Al - Harbi,1994 ; Plumb,1994) โดยปลาที่ป่วยมีอาการข้างต้น ได้แก่ ปลานิล (กมลพร, 2539) ปลากะพงขาว (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543) ปลาหางเหลือง (Sano and Fukuda,1987) ปลาเรดดรัม (Eldar *et al.*,1999) และปลาแรบบิทฟิช (Yuasa *et al.*,1999) เป็นต้น

Baya และคณะ (1990) ทำการแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. จากปลาสตริปเปตแบสส์และปลาซีเทร้าท์ (seatrout, *Cynoscion regalis*) ที่ป่วยเป็นโรคบริเวณอ่าวเชคสเปียซ์ พบว่าปลาที่ป่วยเป็นโรคจะมีการสะสมของเหลวสีเหลืองถึงเหลือง - แดงในช่องท้อง กระเพาะและลำไส้จะว่างเปล่า แต่มีสารเหนียวสีเหลืองหรือเหลือง - เขียวที่บริเวณส่วนปลายของลำไส้ ตับมีสีเหลืองหรือแดง ม้ามมีขนาดใหญ่และมีสีแดงคล้ำ มีการอักเสบเรื้อรังที่บริเวณตา พบแมคโครฟาจ (macrophage) จำนวนมากในส่วนของสมอง เกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณไต

2.8 การควบคุมโรคสเตรพโตคอคโคซีส

การควบคุมโรคสามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การป้องกันและการรักษา

ในการป้องกันก่อนที่จะเกิดโรค เช่น ควรหลีกเลี่ยงคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม ลดการเลี้ยงที่หนาแน่น ไม่ให้อาหารมากเกินไป ทำลายปลาที่เป็นโรคโดยการฝังหรือเผา หรืออาจจะใช้วิธีการป้องกันวิธีอื่นๆ เช่น การใช้วัคซีน การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) เช่น Schizophyllan และ Scleroglucan

ในด้านของการรักษาโรคสเตรพโตคอคโคซีส จะใช้ยาปฏิชีวนะ โดยมีรายงานการใช้ erythromycin ในอัตรา 25 - 50 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ให้กินติดต่อกัน 4 - 7 วัน และยังมี

ยาปฏิชีวนะอื่นๆ อีกได้แก่ doxycyclin, oleandomycin และ lincomycin ที่ใช้ในการรักษาโรคสเตรพโตคอคโคซีสในปลาหางเหลืองที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น (Austin and Austin, 1987)

เยาวนิตย์ และคณะ (2543) รายงานว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกจากปลากระพงขาว มีความไวต่อยา penicillin, norfloxacine, tetracycline, ampicillin, trimethoprim, nitrofurantoin และ erythromycin ซึ่งความไวของเชื้อต่อปฏิชีวนะคล้ายกับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่รายงานการติดเชื้อในปลาสลิดในประเทศสิงคโปร์ (Foo *et al.*,1985) และปลานิลในประเทศไต้หวัน (Tung *et al.*, 1987)

Nakamura (1982) อ้างโดย Austin และ Austin (1987) ได้แนะนำให้ใช้ doxycyclin ในอัตรา 20 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ให้กินติดต่อกัน 3 - 4 วัน และ sodium nifurstyrenate ในอัตรา 50 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ให้กินติดต่อกัน 3 - 5 วัน

Kusuda และ Takemaru (1987) ศึกษาประสิทธิภาพของยา josamycin ในการรักษาปลาหางเหลืองที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยผสมลงในอาหารให้ปลากินในอัตรา 20 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 5 วัน และใช้ในอัตรา 30 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 3 วัน พบว่าสามารถรักษาการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาได้ ซึ่งทำให้ปลามีการรอดตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Aoki และคณะ (1989) ใช้ lincomycin และ tetracyclin ในปลาหางเหลืองที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

Ghittino และ Prearo (1992) ใช้ erythromycin โดยผสมอาหารให้กินในอัตรา 50 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 7 วัน ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ติดเชื้อ *S. faecalis* หรือ *S. faecium* ส่วน Robinson และ Meyer (1966) อ้างโดย Plumb (1994) ใช้ oxytetracyclin 12 มิลลิกรัมต่อลิตร แช่ปลาโกลด์เดนไชเนอร์ รักษาการติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

3. การใช้วัคซีนในปลา

3.1 วัคซีน (Vaccine)

วัคซีนเป็นสารที่มีจุลชีพที่ทำให้ตายแล้วหรือทำให้อ่อนแอลง เมื่อนำมาฉีดเข้าร่างกายจะทำหน้าที่เป็นแอนติเจนไปกระตุ้นร่างกายให้สร้างแอนติบอดี้ (antibody) ขึ้นมาเพื่อต้านทานเชื้อ โดยจะมีความจำเพาะกับชนิดของเชื้อโรค (กมลพร และคณะ, 2539 ; โพยม, 2532) สุทธิพันธ์ (2537) กล่าวว่าวัคซีนเป็นสารที่เมื่อเข้าไปในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะให้ผลกระตุ้นและชักนำ ให้ร่างกายสร้างภูมิต้านทานโรคที่เฉพาะต่อเชื้อนั้นๆ โดยวัคซีนอาจจะเตรียมมาจากจุลชีพหรือส่วนประกอบของเชื้อที่ได้รับการดัดแปลงหรือเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมา

ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่ติดเชื้อมาแล้วสามารถที่จะรอดตาย จากการติดเชื้อในครั้งแรกได้และจะมีความต้านทานต่อเชื้อนั้น ถ้าหากมีการติดเชื้อชนิดเดียวกันอีก ทำให้สามารถต้านทานเชื้อชนิดนั้นได้ ซึ่งจะทำให้เกิดภูมิต้านทานได้อย่างดีและเป็นระยะเวลานาน ซึ่งความต้านทานนี้เรียกว่า Adaptive immunity อันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ (Lymphocyte) ซึ่งเป็นผลมาจากการได้รับเชื้อในครั้งแรกและการทำให้ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น (โพยม, 2532)

ในครั้งแรกที่มีการให้วัคซีนที่จำเพาะกับเชื้อนั้นๆ ร่างกายของสัตว์จะมีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มมากขึ้น เซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะทำหน้าที่ต้านทานกับเชื้อ รวมทั้งการผลิตแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อนั้นๆ และจะเกิดการจดจำภายในเซลล์ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง เมื่อมีการให้วัคซีนจำเพาะเชื้อนั้นอีกจะทำให้การสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีปริมาณมากขึ้น รวมทั้งมีการผลิตแอนติบอดี้ ในครั้งที่ 2 สามารถที่จะสร้างให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็วและมากกว่าในครั้งแรก (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2525)

วัคซีนบางชนิดผลิตจากเชื้อที่ทำให้เกิดโรคนั้นโดยตรง แต่บางชนิดไม่ได้เตรียมจากเชื้อโรคชนิดนั้นๆ อาจจะใช้เชื้อที่มีลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงหรือสารที่ให้ผลในการเกิดภูมิต้านทานได้เช่นกัน ในการผลิตวัคซีนจากเชื้อที่ทำให้อ่อนกำลังหรือตาย โดยการใช้สารเคมีหรือความร้อน เมื่อสัตว์ได้รับวัคซีนที่มีเชื้ออยู่จะทำให้สัตว์ไม่เกิดโรคหรือผลกระทบข้างเคียงเหมือนกับสัตว์ได้รับเชื้อจริงๆ จึงทำให้วัคซีนมีประโยชน์ในการสร้างภูมิต้านทานต่อเชื้อโรคในสัตว์

การทำวัคซีนในปลาประสบความสำเร็จครั้งแรกโดย Duff ในปี ค.ศ. 1960 ได้ใช้วัคซีนในปลาเทร้าท์ (trout, *S. clarkii*) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ใช้ต่อต้านโรคฟูรันคูโลซีส (furunculosis) โดยใช้ chloroform killed *Aeromonas salmonicida* ทำการทดสอบความต้านทานของโรค โดยให้มีการติดเชื้อผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงพบว่า ปลาในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตาย 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตาย 75 เปอร์เซ็นต์ (Ellis, 1988)

ในปี ค.ศ. 1965 Ross และ Klontz ทำการผลิตวัคซีนต้านทานโรคแอนเทอร์ริคเรดเมาท์ (enteric red mouth) เป็นครั้งแรก ได้ทำการเตรียมวัคซีนโดยใช้ฟีนอล (phenol) เป็นตัวฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ในการทดลองจะผสมวัคซีนกับอาหารให้ปลาเรนโบว์เทร้าท์ กินติดต่อกัน 5 วัน ในสัปดาห์แรกและกินติดต่อกันอีกสัปดาห์ละ 2 ครั้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับการกระตุ้นจะมีการตอบสนองการสร้างภูมิต้านทาน ทำให้ปลากลุ่มทดลองมีการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (Ellis, 1988)

หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาการผลิตวัคซีนในเชิงการค้า โดยวัคซีนชนิดแรกที่ได้มีการผลิตในเชิงการค้า คือ วัคซีนจากเชื้อ *Yersinia ruckeri* ใช้ในการป้องกันโรคแอนเทอร์ริคเรดเมาท์ ซึ่งผลิตขึ้นในปี ค.ศ. 1976 ต่อมาในปี ค.ศ. 1980 ได้มีการผลิตวัคซีนป้องกันโรควิบริโอ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *V. anguillarum* และ *V. ordalii* ที่เป็นสาเหตุของโรคในปลาแซลมอน (Mowat and Rweyemamu, 1997)

ในส่วนของปลาในเขตร้อน มีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในปลาไม่มาก โดยมีการศึกษาในปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus punctatus*) พบว่าวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สามารถกระตุ้นให้ปลาเกิดการสร้างแอนติบอดี้ ไม่ว่าจะใช้วิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อรวมไปถึงวิธีการจุ่มและการผสมอาหาร ซึ่งสามารถทำให้ปลาสร้างภูมิต้านทานได้เช่นกัน (Thune and Plumb, 1984)

สำหรับประเทศไทย การผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อในปลาเพิ่งจะได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้ โดยมีการทดลองฉีดวัคซีนจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เข้าช่องท้องหรือกล้ามเนื้อของปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) พบว่าปลามีการตอบสนองและสามารถสร้างแอนติบอดี้ได้สูงสุดหลังจากการฉีดวัคซีนภายใน 9 วัน (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2525) ส่วนจิตต์เกษม และคณะ (2536) ได้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในปลาช่อน (*Channa striata*) โดยฉีดวัคซีนจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่า ปลาสามารถสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้อได้

3.2 ชนิดของวัคซีนที่ใช้ในปลา

วัคซีนโดยทั่วไป สามารถที่จะแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

3.2.1 วัคซีนเชื้อเป็น (live vaccine หรือ activated vaccine)

ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นแอนติเจน ที่ยังมีชีวิตอยู่แต่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยกระบวนการทางกายภาพและสารเคมี โดยไม่ทำให้เกิดโรครุนแรงเมื่อเข้าสู่ร่างกาย แต่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ เช่นวัคซีนจากเชื้อไวรัส (สุทธิพันธ์, 2537) และจะไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ เมื่อมีการฉีดกระตุ้นหลายๆ ครั้ง เป็นวัคซีนที่ค่อนข้างเก็บรักษายาก

3.2.2 วัคซีนเชื้อตาย (killed vaccine หรือ Inactivated vaccine)

เป็นวัคซีนที่ทำให้เซลล์เกิดการตายด้วยสารเคมีบางชนิด เช่น ฟอร์มาลิน (Lillehaug, 1989) **หรืออาจจะใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้รังสี x-ray หรือผ่านความร้อน** (Karunasagar *et al.*, 1991) **โดยเป็นส่วนประกอบของจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค แต่เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ เช่นวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อ**

ไวรัส โพลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สารพิษจากแบคทีเรียที่ทำให้อ่อนฤทธิ์ลงหรือจากโปรตีนสังเคราะห์ วัคซีนชนิดนี้จะมีความปลอดภัยสูง เกิดภูมิคุ้มกันโรคได้ดี แต่จำเป็นจะต้องได้รับการฉีดหลายๆ ครั้ง และมักจะมีอาการแพ้วัคซีน การเก็บรักษาทำได้ง่าย

3.2.3 วัคซีนที่ผลิตโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (DNA vaccine)

เป็นวัคซีนที่ได้จากการตัดต่อดีเอ็นเอของแบคทีเรียหรือพลาสมิด (plasmid) เพื่อใช้ในการผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือแอนติเจนจากเชื้อชนิดต่างๆ โดยใช้กระบวนการทางวิธีการจัดระเบียบใหม่ของดีเอ็นเอ (recombinant DNA technology) ส่วนใหญ่วัคซีนพวกนี้สร้างขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อไวรัส วัคซีนชนิดนี้จะมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง ทำให้สะดวกในการเก็บรักษา นอกจากนี้การใช้วัคซีนดีเอ็นเอเพียงปริมาณน้อยก็สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงและระยะเวลานานขึ้น (Corbeil *et al.*, 2000 อ้างโดย ชนกันต์, 2545)

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

มีปัจจัยหลายๆ อย่างที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งปัจจัยจากตัวปลา เช่น อายุ ความเครียด ความสมบูรณ์ของร่างกาย และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับวัคซีน เช่น วิธีการใช้วัคซีน สภาพแวดล้อม ความเข้มข้นของวัคซีน ระยะเวลาการให้สารกระตุ้นต่างๆ อุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้มีความสำคัญที่จะต้องนำมาพิจารณาเพื่อให้วัคซีนที่ใช้ประสบผลสำเร็จ

3.3.1 อายุของปลา (age)

อายุของปลาเป็นสิ่งสำคัญมากที่ต้องนำมาพิจารณาเมื่อมีการใช้วัคซีนกับปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่มีอายุน้อย เพราะอวัยวะหลักที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันยังเจริญและพัฒนา ไม่เต็มที่ จึงมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนที่ได้รับ ทำให้วัคซีนที่ให้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร

Bootland และคณะ (1990) ศึกษาอายุและขนาดของลูกปลาบรู๊คเทร้าท์ (brook trout, *Salvelinus fontinalis*) ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับวัคซีนโดยการแช่ต่อความต้านทานเชื้อไวรัส โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 9 กลุ่ม ตั้งแต่ลูกปลาอายุ 1 - 8 สัปดาห์ แล้วแช่ปลาในวัคซีน หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 4 สัปดาห์ ทำการให้เชื้อไวรัส พบว่าปลาที่มีความต้านทาน คือ อายุ 2, 3 และ 6 สัปดาห์โดยมีค่า RPS ที่ 60 วัน หลังจากได้รับเชื้อ มีค่าสูงสุดในลูกปลาที่มีอายุ 2 และ 3 สัปดาห์ (RPS : relative percent survival = 45 – 50 เปอร์เซ็นต์) และปลาจะมีความต้านทานลดลงในปลาที่มีอายุและขนาดเพิ่มขึ้น ส่วน Nakajima และคณะ (1997 ; 1999) ทดลองในปลาเรดซีบรีม ที่ระยะวัยรุ่น (juvenile) โดยศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนต่อ

ความต้านทาน Iridovirus โดยทำการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องของปลา หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 10 วัน ทำการฉีดเชื้อไวรัส พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับวัคซีนจะมีอัตราการรอดตายที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน

Shoemaker และคณะ (1999) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อเป็นที่ผลิตจากเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* ในปลากดอเมริกัน อายุ 7 วัน โดยใช้วิธีการแช่ แล้วให้เชื้อหลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 12,14,16 และ 31 วัน พบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนที่มีอายุ 7 วัน จะมีอัตราการรอดตายในช่วง 58.4 - 77.5 เปอร์เซ็นต์

3.3.2 **ความเครียด** (Stress)

ความเครียดมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำให้ระบบภูมิคุ้มกันลดลงความเครียดจะส่งผลต่อระบบทางสรีรวิทยาและพฤติกรรมที่สัตว์น้ำได้แสดงออก ซึ่งเป็นสิ่งที่จะช่วยให้สัตว์น้ำมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมแห่งใหม่ ถ้าความเครียดมีความรุนแรงและเป็นระยะเวลานานหรืออาจมีมากเกินไป จะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันและระบบอื่นๆ ของร่างกายลดลง ถ้าหากปลามีอาการจากการเกิดโรคหรือสุขภาพไม่สมบูรณ์เนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่ดี เช่น ปริมาณออกซิเจนต่ำ ปริมาณแอมโมเนียสูง จะทำให้ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนลดลง ฮอร์โมนบางชนิด เช่น คอร์ติโคสเตอร์รอยด์ (corticosteroide) มีผลต่อประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งฮอร์โมนชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นในช่วงของการสืบพันธุ์ โดยพบว่าในช่วงการสืบพันธุ์ของปลาแซลมอนเพศผู้ จะมีการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น โดยในช่วงนี้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันลดลงเป็นผลมาจากระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอร์รอยด์ในเลือดอยู่ในระดับสูง ส่วนเรื่องอื่นที่ทำให้เกิดความเครียด เช่น การขนส่ง การใช้ยาสลบ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากคือความหนาแน่นของสัตว์น้ำ ซึ่งจะไปมีผลต่อการลดประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันโดยตรง ความเครียดที่เกิดจากการเลี้ยงสัตว์น้ำหนาแน่น จะทำให้มีการหลั่งฮอร์โมนฟีโรโมน (pheromone hormone) และส่งผลให้สัตว์น้ำชนิดอื่นเกิดความเครียดเช่นเดียวกัน (Ellis, 1988)

ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดความเครียดขึ้น แต่เนื่องจากสภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์น้ำ ดังนั้นผู้เลี้ยงสัตว์น้ำต้องตรวจดูอาการของสัตว์น้ำว่าในช่วงใดที่สัตว์น้ำเกิดอาการผิดปกติหรือเกิดความเครียดจากการขนส่ง ก็ไม่ควรที่จะให้วัคซีนในช่วงนั้น เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร

3.3.3 อุณหภูมิ (temperatures)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลามีทั้งแบบเซลล์ (CMIR : cell mediated immune response) และสารน้ำ (HIR : humoral immune response) โดยระบบภูมิคุ้มกันของปลาจะมีประสิทธิภาพลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำ โดยทั่วไปการตอบสนองจะดีที่สุดในช่วงฤดูร้อนและชนิดของสัตว์น้ำว่าอยู่ในเขตหนาวหรือเขตร้อน ถ้าหากอุณหภูมิอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่าอุณหภูมิปกติที่ปลาจะทนได้ จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันปลาลดลง เมื่อปลาอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำกว่าปกติเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ กลไกจะเริ่มจากการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid : PUFA) ที่เป็นองค์ประกอบของฟอสโฟไลปิด (phospholipids) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งเป็นการปรับตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ จึงทำให้ปลามีความต้องการกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากขึ้น นอกจากนี้ฤดูกาลยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลา โดยมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาและอุณหภูมิต่ำ เนื่องจากการสร้างแอนติบอดี้จะถูกยับยั้งในฤดูหนาว ซึ่งการใช้วัคซีนในปลาจะต้องคำนึงถึงฤดูกาลเพราะการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Ellis, 1988)

Eggset และคณะ (1997) ทดลองการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการต้านทานเชื้อ *V. salmonicida* และ *Aeromonas salmonicida* ในปลาแอตแลนติกแซลมอน หลังจากได้รับวัคซีน จะนำปลามาเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงและต่ำ (2 และ 10 องศาเซลเซียส) และตรวจสอบที่ระยะเวลา 9, 18 และ 27 สัปดาห์ หลังจากได้รับวัคซีน ใช้วัคซีน 2 แบบ คือ aqueous vaccine และ oil emulsified vaccine จากการทดลองพบว่า การใช้ aqueous vaccine ในอุณหภูมิของน้ำ 2 องศาเซลเซียส มีการตอบสนองของแอนติบอดี้ช้าหรือทำให้เกิดการยับยั้ง แต่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จะเกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 18 สัปดาห์ ส่วนการใช้ oil emulsified vaccine จะมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ แต่ที่อุณหภูมิสูงจะไม่มีผลต่อการสร้างแอนติบอดี้

Yang และ Zuo (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของน้ำกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาเฉา (grass carp, *Ctenopheryngodon idellus*) ทำการตรวจสอบ antiserum neutralization titer (ANT) และ percent relative protection (PRP) ในปลาที่ได้รับวัคซีนในการป้องกัน Fish Reovirus (Vaccine FRV) จากการทดลอง พบว่าที่อุณหภูมิของน้ำ 10 องศาเซลเซียส มีการสร้างภูมิคุ้มกันของปลาเฉา หลังจากได้รับวัคซีนน้อยมากและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจะถูกยับยั้ง แต่จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 32 องศาเซลเซียส

Russell และคณะ (2000) ทำการศึกษาการตอบสนองของแอนติบอดี้ในปลาทอง (goldfish, *Carassius auratus* L.) ที่ได้รับ DNA วัคซีน ที่อุณหภูมิของน้ำแตกต่างกันพบว่า หลังจากฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อไปแล้ว 18 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าปลาจะมีค่าแอนติบอดี้สูงและค่าแอนติบอดี้ต่ำที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส

3.3.4 **ปริมาณของแอนติเจนและความเป็นแอนติเจน** (antigenicity)

ปริมาณแอนติบอดี้ที่เกิดขึ้นในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอนติเจนที่ได้รับ โดยปกติแล้วปริมาณแอนติเจน (dose) ที่ใช้ในปลาจะอยู่ในช่วงกว้างๆ โดยปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดความจำของระบบภูมิคุ้มกัน จะขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนและชนิดของปลาเป็นหลัก (Marsden *et al.*, 1996) นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับวิธีการใช้วัคซีนในปลาด้วย แอนติเจนที่จะนำมาใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้ดีจะต้องมีความเป็นแอนติเจนที่สูงและสามารถดูดซึมได้ดี (Kwang, 2000) นอกจากนี้รูปแบบของแอนติเจนที่จะให้แก่ปลายังมีความสำคัญมาก โดยทั่วไปแล้วมักจะอยู่ในรูปของสารละลายโปรตีนซึ่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโนมากมายหลายชนิดและมีโครงสร้างที่ซับซ้อน นอกจากนี้จะต้องมีการเติมสารกระตุ้น (adjuvant) ลงไปด้วย เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี้ได้ดียิ่งขึ้น

Corbeil และคณะ (2000) ได้ทดลองใช้ DNA วัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อ IHNV (Infectious Hematopietic Necrosis virus) ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ พบว่าปริมาณวัคซีนที่เหมาะสมคือ 100 นาโนกรัม และโดยทั่วไปจะใช้ DNA วัคซีนในปริมาณ 0.01 ไมโครกรัม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lorenzen และคณะ (2000) พบว่าปลาเรนโบว์เทร้าท์มีการตอบสนองต่อปริมาณแอนติเจนที่ฉีดในปริมาณ 0.01 ไมโครกรัม สามารถที่จะทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้

3.3.5 **แอดจูแวนท์** (Adjuvant)

เป็นสารที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายพร้อมกับแอนติเจนแล้วจะช่วยเสริมให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นได้ดียิ่งขึ้น โดยจะทำหน้าที่ปล่อยแอนติเจนออกมาช้าๆ ทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้นและเป็นการกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง (ฤทัย, 2539) และยังเป็นการเพิ่มขนาดของแอนติเจนให้ใหญ่ขึ้น หรือกระตุ้นให้แมคโครฟาจ (macrophage) มายังบริเวณที่มีแอนติเจนมากขึ้น ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมากขึ้น แอดจูแวนท์ที่นิยมใช้ได้แก่

1. Incomplete Freund's Adjuvant เป็น water in oil emulsion

2. Complete Freund's Adjuvant จะเป็น water in oil ที่มี *Mycobacterium tuberculosis* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนอยู่ในชั้นของน้ำมันด้วย (Anderson,1992) แอดจูแวนท์ชนิดนี้สามารถที่จะกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีได้ดีกว่า water in oil ธรรมดา แต่มีข้อเสียตรงที่เมื่อใช้กับสัตว์ทดลองอาจทำให้เกิดกรานูลโลมา (granuloma) และบ่อยครั้งที่เป็นฝีบริเวณที่ฉีดเข้าไป (Raa,1996)

CFA (complete freund's adjuvant) ที่มีส่วนประกอบของ *Mycobacterium* sp. สามารถที่จะกระตุ้นการทำงานของทีเซลล์ (T - cell) และกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ต่างๆได้ดี และยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้กับปลา (Cypriano and Pyle,1985 อ้างโดย Raa,1996) แม้ว่า CFA ส่วนใหญ่จะเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงข้อเสียแล้วไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะ CFA สามารถที่จะทำให้เกิดกรานูลและบาดแผลบริเวณที่ฉีด เป็นผลให้ปลาเกิดความอ่อนแอ จึงเป็นการเปิดโอกาสที่จะทำให้เกิดโรคได้ง่าย โดยส่วนมากวัคซีนที่ผสม CFA จะมีผลกับปลา โดยพบว่าน้ำมันที่บรรจุอยู่ใน CFA ทำให้การเจริญเติบโตของปลาลดลงอย่างรวดเร็ว (Blix *et al.*, 1993 อ้างโดย Raa, 1996)

Adams และคณะ (1988) รายงานว่าปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ฉีดด้วย CFA สามารถป้องกันการเกิดโรคฟูรังคูโลซีส วิบริโอซีส และ โรคเรดเมาท์ (Red mouth) สูงขึ้น นอกจากนี้ Kodama และคณะ (1989) ศึกษากลไกการป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* ของปลาเรนโบว์เทร้าท์ โดยทำการฉีด CFA ที่ผสมกับวัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* เข้าบริเวณช่องท้องของปลา พบว่ามีการไปกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ ซึ่งมีความสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นของเคมีลูมิเนสเซนค์ (chemiluminescence : CL) และกระตุ้นการจับกิน (phagocyte) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sakai และคณะ (1995b) โดยการใช้ CFA ผสมกับวัคซีนจากเชื้อ *Renibacterium salmoninarum* ฉีดให้กับปลาเรนโบว์เทร้าท์เข้าช่องท้อง พบว่าสามารถไปกระตุ้นการจับกินได้เช่นกัน นอกจากนี้จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์บริเวณไตเพิ่มมากขึ้น ในระยะเวลา 15 - 25 วัน หลังจากให้วัคซีน ส่วนในกลุ่มที่แช่ จะไม่มีผลต่อการป้องกันการติดเชื้อ

3.4 การให้วัคซีน

การให้วัคซีนในแต่ละพื้นที่จะมีความแตกต่างกันจึงได้มีวิธีการให้วัคซีนหลัก ๆ คือการฉีด (injection) การแช่ (immersion) และการกิน (oral) โดยการผสมกับอาหารให้ปลากิน

3.4.1 **การฉีด** (Injection)

เป็นวิธีที่ทำให้ปลาสร้างระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยจะทำการฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือฉีดเข้าช่องท้อง การให้วัคซีนโดยวิธีนี้อาจจะใช้แอดจูแวนท์หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมด้วย เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของวัคซีน ซึ่งปริมาณการฉีดโดยทั่วไปจะใช้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของปลา

Toranzo และคณะ (1995) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ *Enterococcus* sp. ในปลาเทอร์บอท โดยใช้วัคซีนที่ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน (formalin) 0.7 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ใช้วัคซีนที่มีความเข้มข้น 2×10^{10} CFU/ml ฉีดเข้าช่องท้องและการแช่ ในปลาขนาดต่างกัน หลังจากปลาได้รับวัคซีนไปแล้ว 4 สัปดาห์ ทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Enterococcus* sp. ที่ความเข้มข้น 3×10^{5} CFU/ml และ 3×10^{6} CFU/ml พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนจะมีค่า RPS ระหว่าง 89 –100 เปอร์เซ็นต์ (ปลาขนาด 45 กรัม) และค่า RPS ระหว่าง 67 – 86 เปอร์เซ็นต์ (ปลาขนาด 150 กรัม) และการให้วัคซีนโดยการฉีดสามารถป้องกันการติดเชื้อ *Enterococcus* sp. ได้นานถึง 1 ปี นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถที่จะกระตุ้นกระบวนการจับกินเพิ่มขึ้น

Buchmann และคณะ (1997) ศึกษาผลของวัคซีนต่ออัตราการรอดตายของปลาบอลติกแซลมอน (baltic salmon, *Salmo salar*) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ให้วัคซีนผสมกับแอดจูแวนท์โดยการฉีดเข้าช่องท้อง กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนโดยการแช่นาน 1 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน แล้วศึกษาการตายและค่า RPS พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมีการตาย 0.02 เปอร์เซ็นต์ และค่า RPS 99.8 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการแช่มีการตาย 2.51 เปอร์เซ็นต์ และค่า RPS 75.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่มควบคุมมีการตาย 10.13 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังพบว่าการให้วัคซีนที่ผสมแอดจูแวนท์ โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นผลให้บริเวณดังกล่าวเกิดบาดแผลแต่ความรุนแรงของบาดแผลจะค่อยๆ หายไปทีละน้อย (Lillehaug *et al.* 1992; Ronsholdt and Mclean, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Midtlyng (1996) ว่าในจำนวนปลาที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่ผสมกับแอดจูแวนท์สามารถเห็นบาดแผลได้ชัดเจน ซึ่งจากผลการฉีดพบว่าปลาจะเกิดบาดแผลประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ของปลาที่ฉีดทั้งหมด

3.4.2 **การแช่** (Immersion)

การแช่เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ใช้เวลาเพียงไม่กี่นาที โดยการแช่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาได้ สามารถแช่ปลาขนาดเล็กได้ครั้งละมากๆ และในการแช่จะต้องมีความเข้มข้นของวัคซีนและเวลาแช่ที่แน่นอน

Johnson และ Amend (1984) ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการแช่วัคซีนจากเชื้อ *A. salmonicida* ในปลาชินุคแซลมอน (chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*) โดยเจือจางให้วัคซีนมีอัตราส่วน 1:2 และ 1:4 แช่นาน 5 นาที หลังจากได้รับวัคซีนแล้ว 28 วัน ทำการแช่ปลาลงในเชื้อ *A. salmonicida* ที่ความเข้มข้น 5 x 10^3 CFU/ml พบว่า ที่อัตราส่วน 1:2 และ 1:4 มีการตาย 24 เปอร์เซ็นต์ และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้แช่ปลาในวัคซีน 2 ครั้ง โดยในครั้งที่ 1 และ 2 ใช้ที่อัตราส่วน 1 : 2 กับ 1 : 4 ระยะห่างของการแช่ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ห่างกัน 14 วัน หลังจากแช่วัคซีนในครั้งที่ 2 ไปแล้ว 32 วัน ทำการแช่ปลาลงในเชื้อที่มีความเข้มข้น 7.6 x 10^3 CFU/ml พบว่าการแช่ครั้งที่ 1 ที่อัตราส่วน 1 : 4 และแช่ครั้งที่ 2 ที่อัตราส่วน 1 : 2 ทำให้มีการตายต่ำที่สุด

Areechon และ Plaimast (1999) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากเชื้อ *A. hydrophila* โดยการแช่และให้กินในปลาดุกลูกผสม โดยศึกษาในปลาขนาด 1.74 กรัม ซึ่งใช้วิธีแช่แบบ hyperosmotic โดยจุ่มปลาลงในน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ก่อน 2 นาที แล้วจึงแช่ลงในวัคซีนนาน 60 นาที หลังจากเลี้ยงไปได้ 3 เดือน ทำการทดสอบความต้านทานโรค พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่ แบบ hyperosmotic มีการตาย 75 เปอร์เซ็นต์ และค่า RPS 53.03 เปอร์เซ็นต์

3.4.3 **การกิน** (Oral)

เป็นวิธีการให้วัคซีนที่มีความเหมาะสมที่จะใช้กับปลาจำนวนมากๆ เป็นวิธีการที่ง่ายที่สุดโดยใช้ผสมกับอาหารให้ปลากิน ทำให้ปลาเกิดความเครียดน้อยและสามารถใช้กับปลาขนาดใดก็ได้ แต่วิธีการนี้ไม่ค่อยจะได้ผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจึงทำให้มีระดับการป้องกันโรคได้ต่ำกว่าการฉีด แช่และสเปรย์ (Evelyn,1984 อ้างโดย Lillehaug,1989) เนื่องจากแอนติเจนที่อยู่ในวัคซีนจะถูกทำลายในระบบทางเดินอาหารก่อนที่จะถูกดูดซึมเพื่อใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Ellis, 1988)

Plumb และ Vinitnantharat (1994) ศึกษาผลของวัคซีนจากเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* ในปลากดอเมริกัน ใช้วัคซีนแบบฆ่าด้วยฟอร์มาลิน แล้วผสมในอาหารในระดับต่างๆ กัน คือ 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ และผสมน้ำมันตับปลาคอด (cod liver oil)

ลงไปด้วย 5.0 เปอร์เซ็นต์ ให้อาหารปลา 4 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน ให้กินติดต่อกัน 5 วัน หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 3 เดือน ทำการแช่ปลาลงในเชื้อ *E. ictaluri* ที่ความเข้มข้น 2.9×10^7 CFU/ml นาน 1 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มควบคุมมีการรอดตายเพียง 23.3 เปอร์เซ็นต์ และในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนพบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีน 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดตายสูงสุดคือ 76.7 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า RPS 69.6 เปอร์เซ็นต์

Graviningen และคณะ (1998) ใช้วัคซีนจากเชื้อ *Yersinia ruckeri* ซึ่งทำให้เกิดโรคแอนเทอร์ริคเรดเมาท์ ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ให้ปลากินอาหารที่ผสมวัคซีน เป็นเวลา 3 - 6 วัน หลังจากเลี้ยงไปได้ 50 วัน ทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Y. ruckeri* โดยการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนมีการตาย 52 – 86 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับวัคซีนมีค่า RPS 52 – 67 เปอร์เซ็นต์

การแก้ไขปัญหาการถูกทำลายของวัคซีนในระบบการย่อย Kawai และคณะ (1999) ทำการศึกษาพัฒนาวัคซีนหุ้มด้วยแคปซูล (encapsulated vaccine) ให้เป็นแอนติเจนที่สามารถป้องกันการถูกทำลายในระบบย่อยอาหาร ซึ่งเป็นวัคซีนชนิดใหม่ที่นำไปใช้โดยการกิน

3.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการใช้วัคซีน

3.5.1 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (Relative percent survival : RPS)

วิธีการนี้จะต้องมีการบันทึกจำนวนการตายของปลา 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน และปริมาณของเชื้อที่นำมาใช้ในการทดสอบต้องเป็นปริมาณที่ทำให้เกิดการตายของปลาปกติไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลาที่กำหนด โดยเวลาต้องกำหนดให้มีความใกล้เคียงกับการติดเชื้อตามธรรมชาติ และคำนวณตามสูตร

$$\text{RPS } (\%) = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

3.5.2 LD_{50}

วิธีการนี้จะดูถึงปริมาณของเชื้อที่มีความรุนแรงทำให้ปลาตายทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน เป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ ถ้าหากค่า LD_{50} เพิ่มมากขึ้น แสดงว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพดี จึงทำให้ปลาที่ได้รับวัคซีนที่ความสามารถในการต้านทานเชื้อที่มี

ปริมาณมากได้ ถ้าค่า LD_{50} ของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพิ่มขึ้น 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ถือว่าวัคซีนนั้นเป็นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูงสุด (Ellis, 1988)

3.5.3 การหาปริมาณแอนติบอดี้ไตเตอร์ (Antibody titer)

เป็นวิธีการตรวจสอบการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปลา หลังจากให้วัคซีนไปแล้ว ตามระยะเวลาที่กำหนด ถ้าหากปริมาณของแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงแสดงว่าวัคซีนนั้นมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้ดี

จิตต์เกษม และคณะ (2536) ศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในปลาช่อน (*Channa striata*) โดยใช้วัคซีนจากเชื้อ *A. hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน ให้วัคซีนโดยวิธีการต่าง ๆ คือ การฉีดวัคซีนที่ไม่ได้ผสมแอดจูแวนท์เข้าช่องท้อง การฉีดวัคซีนผสมแอดจูแวนท์เข้าช่องท้อง การแช่ และการฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม มีการหาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ ทุก 10 วัน พบว่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงสุด หลังการให้วัคซีนครั้งที่ 1 คือ กลุ่มที่ฉีดวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ มีค่า 130 $\pm$ 111.12 แต่เมื่อมีการฉีดในครั้งที่ 2 ปริมาณของแอนติบอดี้จะลดลง

4. การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune Response)

ระบบภูมิคุ้มกันมีวิวัฒนาการตั้งแต่สัตว์ชั้นต่ำจนถึงสัตว์ชั้นสูง โดยระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ชั้นต่ำ มีเพียงขบวนการจับกิน (phagocytosis) และการอักเสบ (inflammation) เมื่อมีการวิวัฒนาการเพิ่มมากขึ้นจนเป็นสัตว์ชั้นสูง จะมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น คือมีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) และระบบคอมพลีเมนต์ (complement) สำหรับในปลาแฮกฟิช (hagfish) ซึ่งเป็นปลาที่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำสุด จะมีเพียงระบบน้ำเหลือง (Good and Parermaster, 1964 อ้างโดย Corbel, 1975) ส่วนในปลาแลมเพร (lamprey, *Petromyzon marinus*) ซึ่งเป็นปลาที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูงขึ้นมาอีก มีต่อมธัยมัส โดยมีการสร้างลิมโฟซัยท์ (lymphocytes) กรานูลโลซัยท์ (granulocytes) และ แมคโครฟาจ ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell – mediated immunity : CMI) (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537 ; Snieszko and Axelrod, 1974) โดยทั่วไปแล้วระบบภูมิคุ้มกันในปลาจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) (Ellis, 1989)

4.1 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non - specific immune response)

เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมได้มากมายหลายชนิด ส่วนใหญ่มีอยู่แล้วในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะมีบทบาทสำคัญกว่า ซึ่งประกอบด้วยสิ่งกีดขวางบริเวณผิว (surface barrier) ได้แก่ เยื่อเมือก เกล็ด ผิวหนัง และสิ่งกีดขวางในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์และสารน้ำ (Ellis, 1989)

4.1.1 **สิ่งกีดขวางบริเวณผิว** (surface barriers)

เป็นส่วนแรกที่ทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้ามาในร่างกาย ได้แก่ เยื่อเมือก เกล็ด ผิวหนัง และระบบทางเดินอาหาร

4.1.1.1 เมือก

เป็นเครื่องป้องกันภายนอกของตัวปลา เช่น ผิวหนัง เหงือกและทางเดินอาหาร จะถูกปกคลุมไปด้วยเมือก ซึ่งเมือกถูกสร้างจากเซลล์สร้างเมือกที่อยู่บริเวณชั้นอีพิเดอมิส (epidermis) โดยไลโซไซม์ทำหน้าที่ขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ซึ่งสามารถดักจับจุลชีพแล้วกำจัดออก ไป นอกจากนี้ขัดขวางการสร้างโคโลนีของจุลชีพบนผิวหนังปลาอีกด้วย

4.1.1.2 ผิวหนัง

ผิวหนังชั้นอิพิเดอมิสของปลา จะประกอบด้วยเซลล์ที่ไม่มีเคราติโนซัยท์ (non - keratinicyte) เป็นองค์ประกอบ ความสมบูรณ์ของผิวหนังชั้นอิพิเดอมิส จะมีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลย์ของของเหลวและป้องกันการติดเชื้อการรักษาหรือการสมานชั้นอิพิเดอมิสของปลาจะเกิดอย่างรวดเร็ว ถ้าอุณหภูมิของน้ำต่ำ กระบวนการสมานแผลจะมีการเคลื่อนที่ของเซลล์มัลพิเกียน (malpighian) จากผิวหนังบริเวณรอบบาดแผล แล้วเกิดการปิดบาดแผลขึ้นอย่างรวดเร็ว ผิวหนังชั้นนอกของปลาจะมีการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ โดยการสร้างผิวหนังชั้นนอกให้หนาขึ้นหรือการเพิ่มจำนวน (hyperplasia) ของเซลล์มัลพิเกียน ดังนั้นโอกาสที่ผิวหนังชั้นนอกถูกทำลายจากเชื้อโรคก็จะมีน้อยลง

4.1.1.3 เหงือก

เหงือกของปลาประกอบด้วยอีพิทีเลียลเซลล์ (epithelial cell) ที่อ่อนบาง จึงเป็นการเปิดโอกาสให้เชื้อผ่านเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย ดังนั้นเหงือกจึงต้องมีการป้องกัน โดยการสร้างเมือกและการตอบสนองของอิพิทีเลียลเซลล์ โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นมา นอกจากนี้เหงือกยังมีเซลล์ฟาโกซัยท์ (phagocytic cell) ซึ่งอยู่ในชั้นบรานเชี่ยลแคปพิลลารี (branchial capillaries) จะทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ

4.1.1.4 ระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract)

ในระบบทางเดินอาหารจะถูกปกคลุมไปด้วยเมือก ซึ่งสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ นอกจากนี้ยังมีสภาพเป็นกรด โดยมีการสร้างน้ำย่อยทำให้มีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรค จึงสามารถป้องกันการเกิดโรคได้

4.1.2 **ปัจจัยทางด้านสารน้ำ** (non - specific humoral factors)

ของเหลวในร่างกายเช่น เมือก สามารถป้องกันการติดเชื้อ โดยการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ซึ่งของเหลวในร่างกายสามารถจำแนกตามหน้าที่ได้ดังนี้ คือ สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (growth inhibitors) สารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitors) ไลซิน (lysin) และสารที่ก่อให้เกิดการตกตะกอนและเกาะกลุ่ม (precipitins and agglutinins)

4.1.2.1 สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

จะมีผลต่อจุลินทรีย์โดยเป็นสารที่ไปแย่งสารอาหารกับจุลินทรีย์หรือโดยการรบกวนกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แบ่งได้ 2 ชนิด คือ

ก. ทรานสเฟอร์ริน (transferrin)

พบได้ในซีรั่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมทั้งปลาด้วย ทรานสเฟอร์รินเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับเหล็ก ซึ่งเหล็กจะมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลชีพ ทรานสเฟอร์รินเป็นตัวขัดขวางไม่ให้จุลชีพได้รับเหล็ก แต่ก็มีจุลชีพหลายชนิดที่สามารถสร้างไซเดอร์โรฟอร์ (siderophores; iron binding protein) เพื่อแย่งจับเหล็กกับทรานสเฟอร์ริน ซึ่งทรานสเฟอร์รินจะมีอยู่ด้วยกันหลายรูปแบบ (polymophic) จึงทำให้มีความได้เปรียบในการแย่งจับกับจุลชีพ โดยเฉพาะแบคทีเรียและเชื้อรา

ข. อินเตอร์ฟีรอน (interferon)

จะถูกสร้างขึ้นหลังจากเซลล์ติดเชื้อไวรัส แล้วส่งไปให้เซลล์อื่นๆ ทำให้เซลล์อื่นที่ยังไม่ติดเชื้อไวรัสสามารถต้านทานเชื้อไวรัสได้ อินเตอร์ฟีรอนเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นเพื่อต่อต้านไวรัส (antiviral) ใช้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสในปลา นอกจากตัวปลาสร้างขึ้นมาแล้วยังมีการป้องกัน โดยการนำอินเตอร์ฟีรอนจากปลาที่เคยได้รับเชื้อไวรัส มาฉีดให้แก่ปลาที่ไม่เคยได้รับเชื้อไวรัส (passive transfer) ทำให้ปลาที่ได้รับอินเตอร์ฟีรอนมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส อินเตอร์ฟีรอนจะมีน้ำหนักโมเลกุล 26,000 กิโลดาลตัน (kilodalton : KD) และ ไอโซอิเลคตริคพ้อยท์ (isoelectric point) 5.3 (Kinkelin, *et al.*,1982 อ้างโดย Ellis,1989)

4.1.2.2 สารยับยั้งเอนไซม์ของเชื้อโรค

เชื้อโรคเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะสร้างเอนไซม์ เพื่อย่อยสลายเซลล์ของเจ้าบ้าน (host) และนำสารอาหารจากเซลล์มาใช้ ของเหลวในเนื้อเยื่อและซีรั่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังมีเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถต่อต้านการทำลายของเอนไซม์จากเชื้อโรค ซึ่งจะมีบทบาทเป็นนิวทรอไลซิ่งเอนไซม์และแอนติโปรติเอส (antiprotease; α - 2 - macroglobulin)

4.1.2.3 ไลซิน (lysin)

เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ด้วยตนเองหรือร่วมกับสารชนิดอื่น โดยทำให้เซลล์ของเชื้อโรคแตก ได้แก่

ก. คอมพลีเมนท์ (complement)

มีความสำคัญในการป้องกันโรค เนื่องจากมีหลายบทบาทหน้าที่ รวมทั้งการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยเป็นตัวกลางทำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory vasodilation) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการต่อต้านเชื้อโรค นอกจากนี้ยังมีการชักนำลิวโคซัยท์ (chemotactic to leucocytes) และส่งเสริมให้มีการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมโดยฟาโกซัยท์เพิ่มขึ้น

คอมพลีเมนท์เป็นการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นระบบ มีอยู่ในซีรั่มและของเหลวในเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 12 ชนิด คอมพลีเมนท์ในปลามีความคล้ายคลึงกับคอมพลีเมนท์ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทนต่อความร้อน 45 องศาเซลเซียส (Sakai, 1981 อ้างโดย Ellis, 1989) คอมพลีเมนท์ปกติจะอยู่ในสภาพไม่ว่องไว ไม่สามารถทำงานได้ ต้องมีการกระตุ้นจึงจะทำงานได้ การกระตุ้นมีอยู่ 2 ทาง คือ ทางตรง (classical pathway) จะต้องมีสิ่งแปลกปลอมที่จับอยู่กับแอนติบอดี้ (Ag - Ab complex) และทางอ้อม (alternative pathway) จะถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซิน (endotoxin) ของแบคทีเรีย โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ไซโมแซน (zymosan) และอินซูลิน (insulin) ซึ่งไปกระตุ้นโพรเพอดิน (properdin) และไปกระตุ้นคอมพลีเมนท์ต่อไป นอกจากนี้คอมพลีเมนท์ยังถูกกระตุ้นด้วย C - reactive protein เมื่อคอมพลีเมนท์ถูกกระตุ้น จะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบทำให้เซลล์แตก (lysis)

ในปลาอาจพบคอมพลีเมนท์ได้ในซีรั่มและเมือก (Harrell, *et al.* 1976 อ้างโดย Ellis, 1989) ในการกระตุ้นคอมพลีเมนท์โดยทางตรงต้องการอิมมูโนโกลบูลิน (Ig) จากปลาชนิดเดียวกัน ดังนั้นการรวมกันของคอมพลีเมนท์กับอิมมูโนโกลบูลินของปลากับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเกาะจับกันไม่ได้

ข. ไลโซไซม์ (lysozyme)

ไลโซไซม์สามารถจับกับเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียบางชนิดสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยไลโซไซม์ แต่ส่วนมากเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียจะถูกทำลายด้วยคอมพลีเมนท์ก่อน ต่อมาไลโซไซม์จึงเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรีย ไลโซไซม์มีอยู่ทั่วไปทั้งในเซลล์ฟาโกซัยท์ ซีรั่มและเมือกของปลา

4.1.2.4 สารที่ก่อให้เกิดการตกตะกอนและการเกาะกลุ่ม

ก. C - reactive protein (CRP)

CRP เชื่อมติดกับกลุ่มฟอสโฟริลเอสเทอร์ (phosphoryl ester groups) ที่มีอยู่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียและสามารถพบในซีรั่มและในไข่ของปลากระดูกแข็ง ในการตรวจหา CRP จะใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation reaction) กับสารสกัดจากแบคทีเรีย เชื้อรา และพยาธิตัวกลม การทำให้ตกตะกอนต้องการทองแดงอิออน (Cu^{2+}) ในการสร้างพันธะ CRP ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถกระตุ้นคอมพลีเมนท์ในระบบทางตรงได้ สำหรับในปลา ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด อาจมีส่วนเป็นตัวกลางในปฏิกิริยาภาวะภูมิไวเกิน (immediate hypersensitivity reaction)

ข. Natural antibodies

พบในซีรั่มและไข่ปลาหลายชนิด ซึ่งสามารถเกิดการเกาะกลุ่มและการตกตะกอนในเซลล์เม็ดเลือดแดง แบคทีเรียและโพลีแซคคาไรด์ แต่ยังไม่ทราบลักษณะและหน้าที่แน่ชัด แต่คาดว่าอาจเป็นอิมมูโนโกลบูลินหรือเลคติน (lectin) แบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้แอนติเจนนิคดีเทอร์มิแนนซ์ (antigenic determinance) ร่วมกับเม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เมื่อสัตว์ได้รับเชื้อแบคทีเรียจึงมีการสร้างแอนติบอดี้ โดยการเกิดปฏิกิริยา cross reaction กับเม็ดเลือดแดง ส่วนเลคตินเป็นโปรตีนที่จำเพาะกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อโดยเป็นสารออพโซนิน (opsonin) (Renwrantz, 1983 อ้างโดย Ellis,1989)

4.1.3 ปัจจัยด้านเซลล์ (non - specific cellular factors)

เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันกระจายอยู่ทั่วไปในร่างกายตามระบบไหลเวียนโลหิต ระบบน้ำเหลืองและเนื้อเยื่อบางชนิด เช่น เม็ดเลือดขาว เซลล์บุผนังด้านในหลอดเลือด

(endothelial cell) เซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytotic cells ; macrophage, histocyte ; fixed macrophage) โดยเซลล์แต่ละประเภทจะมีหน้าที่แตกต่างกัน

4.1.3.1 ฟาโกซัยท์ (phagocyte)

ก. แมคโครฟาจ (macrophages)

แมคโครฟาจ จะมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ ฟิกซ์แมคโครฟาจ (fixed macrophage : histocyte) และว็อนเดอริงแมคโครฟาจ (wandering macrophage) ฟิกซ์แมคโครฟาจอาจจะเปลี่ยนเป็นว็อนเดอริงแมคโครฟาจ ในทางกลับกันว็อนเดอริงแมคโครฟาจก็สามารถที่จะเปลี่ยนเป็นฟิกซ์แมคโครฟาจได้ด้วย เมื่อพบสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ แมคโครฟาจหลาย ๆ เซลล์ จะรวมกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่เรียกว่า ฟอเรนบอดี้ไจแอนท์เซลล์ (foreign body giant cell) หรือมัลตินิวเคลียสไจแอนท์เซลล์ (multinucleated giant cell) แมคโครฟาจมีความสามารถในการจับกินสูงและเกิด Antibody Dependent Cell - mediated Cytotoxicity (ADCC) : การทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยมีแอนติบอดี้จับกับสิ่งแปลกปลอมก่อนแล้วจึงเกิดการจับกิน นอกจากนี้ยังช่วยเตรียมและส่งแอนติเจน (APC : antigen processing and presentation) ให้ลิมโฟซัยท์ต่อไป (สุทธิพันธ์, 2537)

ในปลากระดูกแข็งสามารถพบแมคโครฟาจจำนวนมากกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ และบริเวณเหงือก แต่พบมากในเรคติคิวโรเอนโดทีเลียลเซลล์ (reticuroendothelial cells) ในไต ม้าม และในปลาบางชนิดอาจพบในหัวใจ (Ellis, *et al.*1976 อ้างโดย Ellis,1989) แมคโครฟาจจะมีขนาดของนิวเคลียสและรูปร่างแตกต่างกัน โดยมีขนาด 15-80 ไมครอน และแมคโครฟาจที่พบบริเวณม้ามจะมีขนาดประมาณ 20 - 30 ไมครอน (Zapata and Cooper, 1990)

โมโนซัยท์ (monocyte) พบได้ที่บริเวณไตและมีจำนวนน้อยในกระแสเลือด และสามารถเคลื่อนที่ไปตามกระแสเลือดไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบ แล้วพัฒนาเป็นแมคโครฟาจ โมโนซัยท์มีขนาด 10 -13 ไมครอน รูปร่างค่อนข้างกลม (สุปราณี และคณะ, 2536) ทั้งโมโนซัยท์และแมคโครฟาจจะจับกินเซลล์หลายชนิด เช่น แบคทีเรียและยีสต์ แมคโครฟาจของปลาจะมีเมลาโนโซม (melanosomes) ซึ่งเรียกว่า เมลาโนแมคโครฟาจ (melanomacrophages) ซึ่งเมลานินมีบทบาทในการกำจัดแบคทีเรียหรือการชักนำให้เกิดกระบวนการทำลายแบคทีเรียรวมทั้งการสร้างอนุมูลอิสระโดยเซลล์ฟาโกซัยท์

ข. เซลล์เม็ดเลือดขาว

เซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ นิวโทรฟิล (neutrophil) ลิมโฟซัยท์ (lymphocyte) เบโซฟิล (basophil) และอีโอสิโนฟิล (eosinophil) เป็นกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดขาว

ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดยการจับกินสิ่งแปลกปลอมและทำลายสิ่งแปลกปลอมด้วยวิธี ADCC

นิวโทรฟิลของปลามีคุณสมบัติเหมือนกับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีขนาด 8 -10 ไมครอน เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีกรานูลในไซโตพลาสซึม (granulocytes) มีนิวเคลียสเป็น lobes มักจะพบ 1 - 5 lobes จะพบนิวโทรฟิลในไต ม้าม เลือดและบริเวณบาดแผลที่เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ความสามารถในการจับกินของฟาโกซัยท์ในกระแสเลือดจะขึ้นอยู่กับการกระตุ้นการจับกิน โดยอาศัยสาร 2 ชนิด คือ สารออพโซนินและลิมโฟไคน์ (lymphokines)

ออพโซนินเป็นสารที่มีอยู่ในซีรั่ม อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือโดยการกระตุ้น ซึ่งสามารถช่วยให้ฟาโกซัยท์จับกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น (สุทธิพันธ์, 2537) ออพโซนินมีส่วนช่วยในการเสริมการทำงานของคอมพลีเมนท์โดยไม่จำเพาะ แต่จะมีความจำเพาะในกรณีของการเสริมการทำงานของแอนติบอดี้ ออพโซนินสามารถเพิ่มการจับกินสิ่งแปลกปลอมของนิวโทรฟิลในปลาบราวน์เทร้าท์ (O'Neill,1985 อ้างโดย Ellis,1989) แต่มีผลเล็กน้อยต่อเชื้อ *A. salamonicida* โดยแมคโครฟาจและนิวโทรฟิลของปลาแซลมอน (Sakai, 1984 อ้างโดย Ellis, 1989)

ลิมโฟไคน์ เป็นโปรตีนที่สร้างและหลั่งจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ แมคโครฟาจและลิมโฟซัยท์ การศึกษาการกระตุ้นแมคโครฟาจในปลาได้รับความสนใจน้อยมาก จึงได้มีการเลี้ยงลิวโคซัยท์ (leucocyte) ด้วย concanavalin A (Con A) สามารถกระตุ้นแมคโครฟาจของปลาแอตแลนติคแซลมอนได้ โดยทำงานร่วมกันในการกระตุ้นฟาโกซัยท์ โดยใช้ลิมโฟไคน์ 3 ชนิด คือ

1. สารดึงดูดโมโนซัยท์ (monocyte chemotactive factor) จะชักนำโมโนซัยท์จำนวนมากเข้ามาในบริเวณที่มีแอนติเจนกับลิมโฟซัยท์อยู่และโมโนซัยท์จะเปลี่ยนไปเป็นแมคโครฟาจ

2. สารยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migratory inhibitory factor) ทำให้แมคโครฟาจอยู่บริเวณที่มีแอนติเจนกับลิมโฟซัยท์อยู่ โดยจะไม่เคลื่อนที่ไปที่อื่น

3. สารกระตุ้นแมคโครฟาจ (macrophage activating factor : MAF) ทำให้แมคโครฟาจมีความสามารถในการกำจัดจุลชีพได้ดีขึ้น (โพยม, 2532)

เมื่อมีการติดเชื้อจะมีการหลั่งสารลิมโฟไคน์ในเนื้อเยื่อ โดยที่แมคโครฟาจจะเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่เพื่อสามารถกลืนกินสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ได้

4.1.3.2 เนเชอรอลไซโตทอกซิคเซลล์ (natural cytotoxic cells : NCC)

เนเชอรอลไซโตทอกซิคเซลล์ มีคุณสมบัติคล้ายกับเนเชอรอลคิลเลอร์เซลล์ (Natural Killer cells : NK cell) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบได้ในปลาทั่วไปมีรูปร่างคล้าย โมโนซัยท์ มีความสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส ปรสิตและโรคนีโอพลาสติค (neoplastic disease) (Robert, 1989)

4.2 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immune response)

กระบวนการต่อต้านโรคแบบจำเพาะที่มีลิมโฟซัยท์เป็นศูนย์รวมอาจเรียกว่าอิมมูโนคอมพีแทนท์เซลล์ (immunocompetent cell) การตอบสนองมี 2 แบบ คือ (สุทธิพันธ์, 2537)

1. Humoral Immune Response (HIR) หรือ immediate hypersensitivity เป็นการตอบสนองแอนติบอดี้อย่างรวดเร็วประมาณไม่กี่นาทีถึงชั่วโมง หลังจากได้รับสิ่งแปลกปลอมเป็นการทำหน้าที่ของแอนติบอดี้ ซึ่งมีอยู่ในซีรั่มและจะถูกหลั่งออกมาจากสัตว์ที่ได้รับสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้สามารถได้รับแอนติบอดี้จากซีรั่มของสัตว์ตัวอื่นได้ (passive transferred)

2. Cell Mediated Immune Response (CMIR) หรือ delayed hypersensitivity เป็นการทำงานของเซลล์ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid cell) จึงต้องใช้เวลามากกว่า 1 ชั่วโมง

ภูมิคุ้มกันของร่างกายที่จำเพาะต่อจุลชีพ เกิดขึ้นเมื่อระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพนั้น ๆ ซึ่งร่างกายสามารถผลิตแอนติบอดี้ออกมากำจัดจุลชีพและภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ ซึ่งเซลล์ที่มีหน้าที่รับผิดชอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ คือ ลิมโฟซัยท์ การตอบสนองของลิมโฟซัยท์มี 2 ส่วน คือ การตอบสนองโดยสารน้ำ (humoral immunity) เป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยการใช้แอนติบอดี้ ซึ่งถูกสร้างโดยบีลิมโฟซัยท์ (B lymphocyte) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมและการตอบสนองโดยเซลล์ (cellular immunity) เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการทำหน้าที่ของทีลิมโฟซัยท์ (T lymphocyte) เซลล์ที่ใช้กำจัดสิ่งแปลกปลอมได้แก่ ไซโตทอกซิคทีลิมโฟซัยท์ (cytotoxic T lymphocyte) ฟาโกซัยท์และ NCC

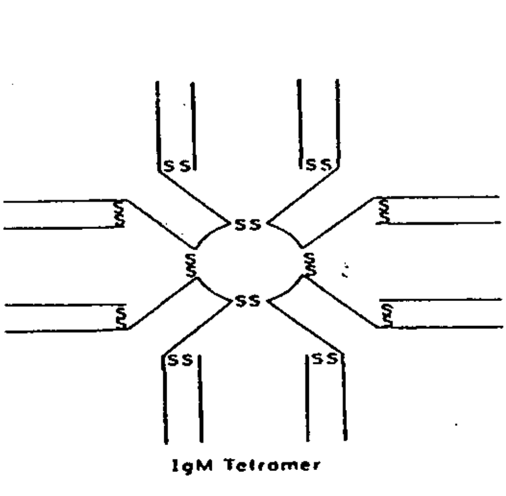
4.2.1 **ลิมโฟซัยท์**

ลิมโฟซัยท์พบในระบบน้ำเหลือง (lymphoid organ) และเนื้อเยื่อโดยเฉพาะเกิดการอักเสบ สัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง จะมีลิมโฟซัยท์ 2 ชนิด คือ ทีลิมโฟซัยท์ (T lymphocyte) และบีลิมโฟซัยท์ (B lymphocyte) ทีลิมโฟซัยท์มีหน้าที่ในด้านการตอบสนองผ่านเซลล์และช่วยบีลิมโฟซัยท์ในการสร้างแอนติบอดี้ ซึ่งมีชื่อเรียกว่าเฮวเปอร์ทีเซลล์

(helper T cells) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถแยกทีลิมโฟซัยท์และบีลิมโฟซัยท์ จากความแตกต่างของโมเลกุลแอนติบอดี้ ที่ปรากฏบนผิวเซลล์ เช่น ปลาบลูกิล (bluegill) มีเครื่องหมายบนผิวของทีลิมโฟซัยท์ (T lymphocyte marker) ที่มีแอนติเจนเกาะจับกับเนื้อเยื่อสมอง แต่จะพบลิมโฟซัยท์จากไต (kidney lymphocyte) เพียง 75 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเครื่องหมายบนผิวเซลล์ ที่สามารถเกิดการเกาะจับกับเนื้อเยื่อสมองได้ และทีลิมโฟซัยท์สามารถตอบสนองต่อไฟโตฮีมแอกกลูตินิน (phytohaemag glutinin : PHA) และ Con A ซึ่งเป็นสารกระตุ้นทีลิมโฟซัยท์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนบีลิมโฟซัยท์มีเครื่องหมายบนเนื้อเยื่อสมอง (brain tissue marker) น้อย แต่สามารถตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) และปฏิกิริยาโรเซตต์ (rosettes) ต่อเม็ดเลือดแดงแกะ แต่จะไม่ตอบสนองต่อไฟโตฮีมาเอกกลูตินิน (Cuchens และ Clem,1977 อ้างโดย Ellis, 1989) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลามีทั้งทีลิมโฟซัยท์และบีลิมโฟซัยท์

4.2.2 **อิมมูโนโกลบูลิน** (Immunoglobulin : Ig)

เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่รับรู้และทำปฏิกิริยากับแอนติเจน มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งบีลิมโฟซัยท์และพลาสมาเซลล์ (plasma cell) สร้างขึ้นมา เพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นของแอนติเจน (ประพันธ์ และคณะ, 2527) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี Ig อยู่ 5 ชนิด แต่ในปลากระดูกแข็งจะมีเพียงชนิดเดียว คือ IgM ซึ่งโครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สาย และ light (L) chain 2 สาย (สุทธิพันธ์, 2537) (ภาพที่ 2) IgM มีหลายรูปแบบ คือ โมโนเมอริค (monomeric) และ เตตระเมอริค (tetrameric)



ภาพที่ 2 โมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลิน (IgM) ของปลาแซลมอน

ที่มา : Anderson (1974)

Ig สามารถพบได้ในซีรั่ม เมือก ผิวหนังและทางเดินอาหารรวมทั้งน้ำดี นอกจากนี้สามารถพบ Ig ในไข่ปลาบางชนิด เช่น ปลาลิ้นหมา (*Pleurocetes platessa*) และปลาคาร์พ (Ellis, 1989)

<u>หน้าที่ของอิมมูโนโกลบูลิน</u>

1. การลบล้างพิษแบคทีเรีย แอนติบอดี้สามารถลบล้างไวรัส รวมถึงปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น สารพิษหรือสารแอดฮีซิน (adhesins)

2. กระตุ้นคอมพลีเมนท์ จะกระตุ้นคอมพลีเมนท์แบบทางตรงที่ต้องการทองแดงอิออน แอนติบอดี้ในซีรั่มของปลาเรนโบว์เทร้าท์ มีทั้ง IgM_1 และ IgM_4 (ซึ่งมี L chain เหมือนกัน ต่างกันที่ H chain ที่มี peptide maps และน้ำหนักโมเลกุล) IgM_4 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นคอมพลีเมนท์ได้ดีกว่า IgM_1 เนื่องจากกระบวนการกระตุ้นต่างกัน โดยที่ IgM_1 จะกระตุ้นคอมพลีเมนท์แบบทางอ้อม ส่วน IgM_4 จะกระตุ้นคอมพลีเมนท์ทั้งแบบทางตรงและทางอ้อม นอกจากนี้ในฤดูหนาว ปลาจะสร้าง IgM_1 ได้น้อย

3. ออพโซไนเซชัน (opsonization) พบได้ในปลาบางชนิด เช่น ปลาลิ้นหมา (Wrathmell and Parish, 1980 อ้างโดย Ellis, 1989) ส่วนปลาเรนโบว์เทร้าท์จะมีแอนติบอดี้ที่จำเพาะเจาะจง สามารถเพิ่มการกลืนกินเชื้อ *Yersinia ruckeri* เป็น 10 เท่า (Griffin,1983 อ้างโดย Ellis, 1989) การกลืนกินจะเพิ่มขึ้นหากมีคอมพลีเมนท์อยู่ด้วย ดังนั้นในปลาจะมี IgM จึงเป็นออพโซนินได้

5. การศึกษาวัคซีนต่อความต้านทานโรคสเตรพโตคอคโคซีส

Sakai และคณะ (1987) ศึกษาผลของวัคซีนในการต้านทานโรคสเตรพโตคอคโคซีสในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*Salmo gairdneri*) ทำการให้วัคซีนชนิด formalin killed beta - haemolytic *Streptococcus* sp. ด้วยวิธีแช่ในวัคซีนนาน 3 นาที และฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อนำปลาที่ได้รับวัคซีนมาทดสอบความต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่มีค่า RPS 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องมีค่า RPS สูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่รอดตายจากการทดสอบความต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. จะไม่พบเชื้อ *Streptococcus* sp. ในเลือดและไต ในการตรวจแอนติบอดี้ไตเตอร์ โดยวิธี agglutination พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนจากการฉีดจะมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์อยู่ในระดับต่ำ แต่จะไม่พบแอนติบอดี้ในปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่

Sakai และคณะ (1989) ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของปลาเรนโบว์เทร้าท์ในการป้องกันโรคสเตรพโตคอคโคซีส โดยให้วัคซีนด้วยการแช่และฉีดเข้าช่องท้อง ใช้วัคซีนชนิด formalin - killed bacterin พบว่าไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดี้ในซีรั่มของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีแช่ แต่สามารถตรวจพบได้ในซีรั่มของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีฉีด และความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) ของปลาที่ได้รับวัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่เพิ่มขึ้น แต่การกระตุ้นขบวนการจับกินของไตจะเพิ่มขึ้นในปลาที่ได้รับวัคซีน เมื่อมีการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ให้กับปลาที่ได้รับวัคซีนพบว่าจำนวนเซลล์ของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในตับ ม้าม ไต และเลือด จะค่อยๆ ลดลงและถูกกำจัดหมดภายในเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ

Sakai และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาขบวนการจับกินและผลของสารออพโซนินรวมทั้งเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ ในระบบภูมิคุ้มกันของปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ได้รับวัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus* sp. กลุ่มเบต้า พบว่าการเกิดการจับกินในเซลล์ไตจะเพิ่มสูงขึ้น ในปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการฉีดและการแช่ ส่วนการจับกินของเม็ดเลือดขาวในปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการฉีดจะสูงกว่าปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการแช่

Palacios และคณะ (1993) ทดลองใช้วัคซีนในการต้านทานเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยได้ทำการทดลองในลูกปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่มีน้ำหนัก 30 - 50 กรัม ซึ่งวัคซีนที่ผลิตขึ้นเป็นวัคซีนชนิด formalin - killed *Streptococcus* spp. จากนั้นทำการทดลองในห้องปฏิบัติการและทดลองในพื้นที่เพาะเลี้ยง พบว่า ระดับการป้องกันจะสูงหรือต่ำจะขึ้นอยู่กับวิธีการให้วัคซีน

Eldar และคณะ (1995) ศึกษาการให้วัคซีนในการต้านทานเชื้อ *S. difficile* ทั้งแบบ ทั้งเซลล์ (whole - cell) และแบบที่สกัดโปรตีนจากเชื้อ *S. difficile* โดยใช้วัคซีนชนิด formalin - killed *S. difficile* ฉีดเข้าช่องท้องของปลานิล จากนั้นทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อที่ LD_{50} พบว่าการป้องกันโรคไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของวัคซีน ส่วนวัคซีนที่ได้จากการสกัดจากเชื้อ *S. difficile* จะมีส่วนประกอบของโปรตีน 50 เปอร์เซ็นต์ โดยจะใช้วัคซีนที่สกัดร่วมกับอลัม (alum) พบว่าให้ผลในการป้องกันโรคอย่างจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเชื้อที่ใช้ ซึ่งวัคซีนทั้ง 2 แบบมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจากเชื้อ *S. difficile* ได้เป็นอย่างดี

Sakai และคณะ (1995a) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนรวมระหว่างเชื้อ *V. anguillarum* กับเชื้อ *Streptococcus* sp. (V - S vaccine) ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ปลาที่ได้รับวัคซีนชนิด V - S vaccine มีความต้านทานต่อเชื้อเพิ่มขึ้น พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนสามารถต้านทานต่อเชื้อ *V. anguillarum* ได้ 406 วัน และเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ 102 วัน นอกจากนี้ได้ทำการทดลองให้วัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus* sp. แก่ปลาเรนโบว์เทร้าท์โดยการแช่ พบว่าปลามีประสิทธิภาพ

ต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. แต่ไม่มีความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. anguillarum* ในทำนองเดียวกันปลาที่ได้รับวัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* พบว่าปลามีประสิทธิภาพต่อความต้านทานเชื้อ *V. anguillarum* แต่ไม่มีความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

Akhlaghi และคณะ (1996) ทำการเปรียบเทียบการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งแบบ passive และ active immunization ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ต่อความต้านทานโรคสเตรฟโตคอคโคซีส ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ passive ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ซึ่งจะใช้ anti - *Streptococcus* sp. antibody (ASA) ที่ได้จากแกะ กระต่าย และปลาเรนโบว์เทร้าท์ ในการเปรียบเทียบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ passive และ active โดยการแช่และฉีดเข้าช่องท้อง ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ active ใช้วัคซีนชนิด formalin-killed cell ระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะนำซีรั่ม (serum) มาใช้จะต้องมีระยะเวลา 3 เดือน หลังจากได้รับการกระตุ้น ซึ่งสามารถใช้เป็น passive immunization ได้ ในการทดลองการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ passive ทำการฉีดซีรั่มจากแกะ กระต่าย และปลา หลังจากได้รับการกระตุ้นภูมิตุ้นกันเป็นเวลา 60 วัน ทำการตรวจสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะใช้วิธี enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าปลามีการตอบสนองต่อ ASA ของแกะ กระต่าย และปลา โดยจะเกิดขึ้นภายใน 2 เดือน หลังจากได้รับ ASA ของแกะ กระต่าย และปลา นอกจากนี้ได้ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยฉีดเชื้อเข้าช่องท้อง 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม พบว่า ค่า RPS ของปลาที่ได้รับ ASA ของแกะ กระต่าย และปลา มีค่าเท่ากับ 88.8, 50 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากได้รับ ASA เป็นเวลา 1 เดือน และมีค่า RPS เท่ากับ 33.3, 6.8 และ 6.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากได้รับ ASA เป็นเวลา 2 เดือน ส่วนในเดือนที่ 3 จะมีค่า RPS เท่ากับ 13.3, 0 และ 6.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในปลาที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ active immunization โดยวิธีการฉีดและการแช่วัคซีน พบว่าค่า RPS เท่ากับ 88.8 และ 11.1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 1 เดือน และ 38.1 และ 4.7 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 2 และ 36 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 3 ตามลำดับ

Eldar และคณะ (1997) ทดลองการใช้วัคซีนชนิด formalin-killed ในการต้านทานเชื้อ *S. iniae* ที่ติดเชื้อในฟาร์มปลาเรนโบว์เทร้าท์ โดยทำการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง พบว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. iniae* ได้นานถึง 6 เดือน นอกจากนี้ได้ทดลองให้วัคซีนแก่ปลาเรนโบว์เทร้าท์ขนาด 50 กรัม หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 4 เดือน ทำการทดสอบความต้านทานเชื้อ *S. iniae* พบว่าปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ไม่ได้รับวัคซีนมีการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาที่ได้รับวัคซีนมีการตายน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับวัคซีน

Hurvitz และคณะ (1997) ศึกษาผลของแอมโมเนียต่อการรอดตาย การตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปลาเรนโบว์เทร้าท์ ที่ได้รับวัคซีนต่อเชื้อ *S. iniae* โดยทำการศึกษาการรอดตายของปลาที่ได้รับวัคซีนที่เลี้ยงในระดับของแอมโมเนียต่างๆ กัน คือ ระดับต่ำ (NH_3 - N ที่ 7 ไมโครกรัมต่อลิตร) ระดับกลาง (NH_3 - N ที่ 50 - 80 ไมโครกรัมต่อลิตร) และระดับสูง (NH_3 - N ที่ 180 - 230 ไมโครกรัมต่อลิตร) แล้วทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *S. iniae* พบว่าค่า RPS ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับของแอมโมเนีย (NH_3) ต่ำและปานกลาง แต่ค่า RPS มีค่าต่ำมากที่ระดับของแอมโมเนียสูง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อทดลองเลี้ยงปลาที่ระดับของแอมโมเนียปานกลางให้นานขึ้น พบว่า ค่า RPS มีค่าต่ำกว่าค่า RPS ของปลาที่ได้รับวัคซีนและยังพบอีกว่าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ ไม่มีความสัมพันธ์กับการป้องกันในสภาวะที่มีแอมโมเนีย โดยที่ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์มีค่าลดลงในสภาวะที่มีแอมโมเนีย เนื่องจากแอมโมเนียจะไปมีผลต่อสภาวะปกติของปลา

Ceschia และคณะ (1998) รายงานการศึกษาการใช้วัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ใช้วัคซีนชนิด formalin - killed vaccine โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ซึ่งได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ช่วง ในช่วงแรกระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงตุลาคม ทำการทดลองกับปลาน้ำหนักเฉลี่ย 1.360 กิโลกรัม พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีการตายน้อยกว่า 16.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนซึ่งมีการตาย 40.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในช่วงที่ 2 ทำการศึกษาระหว่างเดือนเมษายน ถึงกันยายน โดยใช้ปลาน้ำหนักเฉลี่ย 6.370 กิโลกรัม พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีการตายเพียง 18.6 เปอร์เซ็นต์

Kawai และคณะ (1999) รายงานการศึกษาวัคซีนโดยการกินวัคซีนในการต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาหางเหลือง ซึ่งได้มีการพัฒนาการผลิตวัคซีนเป็น encapsulate vaccine เพื่อป้องกันการทำลายในกระเพาะอาหาร โดยเลี้ยงเชื้อ *L. garvieae* (S - 2433) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI broth) ตรวจหาคุณสมบัติการเป็นแอนติเจน (antigenicity) โดยวิธี agglutination (การตกตะกอน) จะใช้แอนติซีรั่มต่อเชื้อ *L. garvieae* ซึ่งการหาค่าคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนจะทำหลังจากฆ่าเชื้อ *L. garvieae* ด้วยฟอร์มาลินและความร้อน encapsulate vaccine ที่ได้นำมาผสมกับอะซีโตน (acetone) และแยกแอนติเจน โดยใช้วิธี cellulose acetate phthalate พบว่าการตกตะกอน (agglutination) จะสูง สามารถตรวจพบได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อไปได้ 9 - 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนสูง เมื่อมีการทำลายเชื้อโดยการเติมฟอร์มาลิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Romalde และคณะ (1999) ได้รายงานการใช้วัคซีนในการป้องกันโรคสเตรฟโตคอคโคซีส ในปลาเทอร์บอท (turbot, *Scophthalmus maximus*) โดยการใช้ toxoid – whole - cell เป็นวัคซีน (ET - 2) ซึ่งได้มีการพัฒนาเป็นวัคซีนที่ผลิตขึ้นเพื่อการค้า และใช้มินเนอรอลออย (mineral oil) เป็นแอดจูแวนท์ ในการทดลองจะฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง โดยพบว่าค่า RPS มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้รับวัคซีน 1 สัปดาห์ และมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้รับวัคซีน 6 – 12 เดือน แต่เมื่อได้รับวัคซีนผ่านไปแล้ว 24 เดือน พบว่าค่า RPS ลดลงเพียงเล็กน้อย (70 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบว่าวัคซีนที่ผสมน้ำกับผสมมินเนอรอลออย ให้ผลในการป้องกันไม่แตกต่างกัน แต่ในปลาที่ได้รับวัคซีนที่ผสมมินเนอรอลออย ทำให้การเจริญเติบโตลดลง ดังนั้นจึงใช้กลูแคน (glucans) เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน ET - 2 นอกจากนี้ยังไม่มีการยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแอนติบอดี้กับระดับการป้องกัน แต่มีผลในการเพิ่มอัตราการจับกิน (phagocytosis) หลังจากได้รับวัคซีนผ่านไป 4 วัน โดยแสดงให้เห็นว่ามีการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ (non - specific response) อาจจะสรุปได้ว่าวัคซีน ET - 2 มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันโรคสเตรฟโตคอคโคซีส ในปลาเทอร์บอท

Klesius และคณะ (2000) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดเดียว (single) และวัคซีนชนิดรวมกัน (combined) ในปลานิล (*O. niloticus*) โดยเตรียมวัคซีนจากเชื้อ *S. iniae* และใช้ formalin killed สำหรับวัคซีนชนิดเดียว (ARS - 10 เป็นเชื้อ *S. iniae* ที่แยกมาจากปลานิล) ส่วนวัคซีนชนิดรวมกัน (ARS - 10 + ARS 60 : โดยที่ ARS - 60 เป็นเชื้อ *S. iniae* ที่แยกมาจากปลาสทริพแบสส์ลูกผสม) โดยฉีดเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อที่ความเข้มข้นของวัคซีน 4 x 10^9 CFU/ml (OD = 1.9 ที่ 540 นาโนเมตร) ฉีดให้กับปลานิลตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และในกลุ่มควบคุมจะฉีดด้วย TSB หลังจากได้รับวัคซีนผ่านไป 30 วัน ทำการฉีดเชื้อ *S. iniae* ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 1 x 10^8 CFU/ml โดยพบว่าปลานิลที่ฉีดด้วยวัคซีน ARS - 10 เข้าช่องท้อง แล้วฉีดเชื้อ ARS - 10 มีค่า RPS 45.6 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ฉีดเชื้อ ARS - 60 มีค่า RPS 93.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ปลานิลที่ฉีดด้วยวัคซีน ARS - 10 เข้ากล้ามเนื้อ แล้วฉีดเชื้อ ARS - 10 มีค่า 17.7 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ฉีดเชื้อ ARS - 60 มีค่า RPS 59.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้วัคซีน ARS - 10 + ARS - 60 เข้ากล้ามเนื้อ แล้วฉีดเชื้อ ARS - 10 มีค่า RPS 63.1 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ฉีดเชื้อ ARS - 60 มีค่า RPS 87.3 เปอร์เซ็นต์

Shelby และคณะ (2002) ทดลองการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ passive immunization ในปลานิล (*O. niloticus* L.) โดยใช้ anti - *S. iniae* whole sera (ASI), heat inactivated anti - *S. iniae* whole sera (HIASI) และ normal whole sera (NWS) ฉีดเข้าช่องท้องให้กับปลานิล โดยที่

ASI เตรียมมาจากการฉีดเชื้อ *S. iniae* เข้าช่องท้องปลานิล แล้วให้ปลานิลสร้างแอนติบอดี้ จึงนำซีรั่มของปลานิลที่ได้รับการกระตุ้นมาใช้ การตอบสนองของแอนติบอดี้ในการต้านทานเชื้อ *S. iniae* ทำการตรวจสอบด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และพบว่าปลานิลที่ได้รับซีรั่มจะมีการตาย 18 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการฉีดเชื้อ *S. iniae* การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ active immunization ทำการฉีดเชื้อ *S. iniae* ให้ปลาสร้างภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ปลาที่ได้รับการกระตุ้นแบบ active immunization มีการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการกระตุ้นด้วย ASI จะมีการตาย 40 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ passive immunization จะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง คือ ในการกระตุ้นครั้งแรกใช้ ASI, HIASI, NWS และ PBS (ชุดควบคุม) หลังจากนั้น 14 วัน ทำการฉีดเชื้อ *S. iniae* ที่มีความเข้มข้น $5x10^7$ CFU/ml พบว่าปลานิลมีการตาย 0,3.3,33.33 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อมีการกระตุ้นในครั้งที่ 2 พบว่าปลานิลมีการตาย 10,6.7,53.3 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสรุปได้ว่า การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการใช้ ASI และ HIASI สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิลให้มีความต้านทานต่อเชื้อ *S. iniae* ได้ดี

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้วัคซีนในการต้านทานโรคแลคโตคอคโคซีสในปลา ซึ่งเป็นโรคที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับโรคสเตรพโตคอคโคซีส ที่เกิดขึ้นในปลาหลายชนิด

Ooyama และคณะ (1999) ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในปลาหางเหลือง โดยการใช้วัคซีน 2 แบบ คือ formalin - killed KG^- (capsulated) และ formalin - killed KG^+ (uncapsulated) ทำการฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้ปลาน้ำหนักประมาณ 105 กรัม หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 14, 65, 135 และ 295 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อหาระดับของแอนติบอดี้ไตเตอร์ โดยใช้วิธี agglutination พบว่าการให้วัคซีน KG+ มีระดับของแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงกว่า วัคซีน KG^- (ระหว่าง 14 – 135 วัน) แต่เมื่อระยะเวลานานขึ้น (296 วัน) ระดับของแอนติบอดี้ไตเตอร์จะลดลง ทั้งการให้วัคซีน KG^+ และ KG^- ซึ่งการให้วัคซีน KG^- จะมีระดับของแอนติบอดี้ไตเตอร์ต่ำสุด (น้อยกว่า 1:4) และการให้วัคซีน KG^+ มีระดับของการจับกิน (phagocytosis) สูงกว่าการให้วัคซีน KG^- ซึ่งมีค่าเท่ากับ23.33 และ 11.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ghittino และคณะ (2002) ได้ศึกษาการใช้วัคซีนในการต้านทานโรคแลคโตคอคโคซีสในปลาแซลมอน ซึ่งเกิดจากเชื้อ *L. garvieae* โดยมีการใช้วัคซีน 2 แบบ คือ การแช่ร่วมกับการฉีดเข้าช่องท้อง ในการทดลองจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ให้วัคซีนแก่ลูกปลาที่มีน้ำหนักประมาณ 5 กรัม โดยแช่ลูกปลาในวัคซีนนาน 30 นาที แล้วเลี้ยงจนได้น้ำหนักประมาณ 75 กรัม จากนั้นฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องให้กับปลาตัวละ 0.2 มิลลิลิตร ในการตรวจหาระดับการ

ป้องกัน จะหาเปอร์เซ็นต์การรอดตายและระดับแอนติบอดี้ไตเตอร์ ซึ่งจะใช้วิธี microagglutination โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกเดือน พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 94 เปอร์เซ็นต์ และระดับแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 1:64 และปลาที่ได้รับวัคซีนที่ผสมแอดจูแวนท์ จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 89 เปอร์เซ็นต์ และระดับแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 1:32 สรุปได้ว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าทางช่องท้องจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคแลคโตคอคโคซีสได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ก่อโรคในปลากะพงขาวและความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีต่อปลากะพงขาว
2. เพื่อศึกษาผลของเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อในปลากะพงขาว
3. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตและวิธีการใช้วัคซีนเชื้อตายในปลากะพงขาวรวมถึงศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากการให้ด้วยวิธีต่างๆ ในปลากะพงขาว
4. เพื่อศึกษาผลของวัคซีนต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อในปลากะพงขาว