ประสิทธิภาพของวัคซีนแบบฉีดที่ผลิตจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินในปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*)

Efficacy of Injectable Formalin-Killed *Aeromonas hydrophila* Vaccine in Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*)

เอกพล วังคะฮาต[1*] และ ปวีณา รัตนเสนา[2]

[1]ภาควิชาประมง คณะสัตวแพทยศาสตร์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44000

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคามจ.มหาสารคาม 44000

Corresponding author: eakapol.w@msu.ac.th

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila*ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินถูกทดสอบในปลาดุกลูกผสมน้ำหนักเฉลี่ย 75±5 กรัม โดยปลากลุ่มทดลองได้รับการฉีดวัคซีน ($5x10^7$ cfu ต่อตัว) เข้าทางช่องท้องหรือกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.5% เมื่อทำการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรัมทุก 7 วัน นาน 9 สัปดาห์ หลังจากการให้วัคซีนพบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยจากการฉีดทั้ง 2 วิธี มีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 24.89±3.08 และ 41.78±56.21 ตามลำดับ หลังจากนั้นค่าแอนติบอดีไตเตอร์มีแนวโน้มลดลงในสัปดาห์ที่ 5 จึงให้วัคซีนซ้ำเป็นครั้งที่ 2 โดยให้วัคซีนในปริมาณและด้วยวิธีการเดียวกันกับวัคซีนเข็มแรกจากการศึกษาพบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยจากการฉีดทั้ง 2 วิธี มีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 881.78±246.34 และ 568.89±98.54 ตามลำดับ เมื่อประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนโดยการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อ *A. hydrophila*พบว่า ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับวัคซีนจากการฉีดเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังสามารถต้านทานโรคได้ โดยให้ค่า Relative percent survival เท่ากับ 100 และ 90.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการฉีดวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *A. hydrophila*สามารถกระตุ้นให้ปลาดุกลูกผสมมีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อ *A. hydrophila*ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: วัคซีน, *Aeromonas hydrophila*, ภูมิคุ้มกัน, ปลาดุกลูกผสม

Abstract

The efficacy of formalin-killed *Aeromonas hydrophila* vaccine was evaluated using hybrid catfish with an average weight of 75±5 grams. The experimental fish were injected with the vaccine ($5x10^7$ cfuper fish) via intraperitoneal (i.p.) or intramuscular (i.m.) route and were compared with the control fish that were injected with 0.5% NaCl. Fish sera were examined for antibody titer values every 7 days for 9 weeks. Four weeks post vaccination, all fish immunized with the vaccine via i.p.

and i.m. were shown to have the highest antibody titers, accounting for 24.89±3.08 and 41.78±56.21, respectively; however, their titers were found to decline thereafter. Hence, five weeks after initial vaccination, all i.p.- and i.m.- immunized fish were given boost injection with the same vaccine and regimen as their initial injection and their antibody titers were found to reach maximum at week 7 resulting in 881.78±246.34 and 568.89±98.54, respectively. The challenge test showed that i.p.- and i.m.- vaccinated hybrid catfish were protected from *A. hydrophila* infectionas determined by relative percent survival values of 100 and 90.10%, respectively. This study showed that injections of hybrid catfish with formalin-killed *A. hydrophila* vaccine could effectively enhance the specific humoral immune responses against *A. hydrophila* infection.

Key words: Vaccine, *Aeromonas hydrophila*, Immune responses, Hybrid catfish

บทนำ

ปลาดุก จัดเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกรวมทั้งประเทศไทย โดยเป็นปลาที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงเพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลาย มีผลผลิตภายในประเทศต่อปีสูงถึง 146,000 ตันในปี 2006 คิดเป็นมูลค่าผลผลิตโดยประมาณ 300 ล้านบาท (FAO, 2011)ซึ่งนับว่าสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตของปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในอดีตที่ผ่านมาได้มีการนำปลาดุกที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกามายังประเทศไทยโดยผ่านทางประเทศลาวหรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า ปลาดุกยักษ์หรือปลาดุกรัสเซีย ซึ่งเป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วมาก ทั้งยังทนทานต่อโรค แต่มีข้อเสียคือเรื่องของรสชาติที่ยังคงด้อยกว่าปลาดุกอุยพื้นเมืองของไทย ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคของคนไทยมาช้านาน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการริเริ่มทดลองผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกทั้ง 2 ชนิดนี้ เพื่อผลิตปลาลูกผสมให้มีลักษณะที่ดีขึ้นและเอื้อประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงและสามารถผลิตเป็นปลาดุกลูกผสมหรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า “ปลาดุกบิ๊กอุย” ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างแม่พันธุ์ปลาดุกอุยและพ่อพันธุ์ปลาดุกยักษ์

การเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในปัจจุบันมักพบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ มีรูปร่างลักษณะเป็นแท่งตรงสั้น ไม่มีการสร้างแคปซูล ลักษณะโคโลนีโดยทั่วไปจะมีรูปร่างกลม ผิวเรียบ มีสีขาวนวล มักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ หรือในบางครั้งพบต่อกันเป็นสายสั้น ๆ จัดเป็นเชื้อแบบฉวยโอกาส(Aguilera-Arreola *et al*., 2005) ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมากต่อการประมงน้ำจืดทั่วโลก (Austin and Austin, 1999) รวมทั้งการเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในประเทศไทย โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในปลาดุกที่เรียกว่า “โรคกกหูบวม” หรือ “Motile aeromonas disease” ซึ่งเกิดได้กับสัตว์น้ำจืดหลายชนิด แบคทีเรียชนิดนี้จะทำให้ปลาเกิดอาการตกเลือด มีบาดแผลตามลำตัว ปลาที่ติดเชื้อจะแสดงอาการรุนแรงแบบเฉียบพลัน โดยมีลักษณะท้องมาน บวมน้ำ และเป็นแผลตื้นเรื้อรังหรือตายภายในระยะเวลา 3-5 วัน (Angka *et al*., 1995) การ

ผลิตและการพัฒนาวัคซีนเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ในการควบคุมการระบาดของโรคและแก้ปัญหาของการใช้ยาและสารเคมีที่อาจตกค้างในสัตว์น้ำหลายชนิด รวมทั้งในปลาเศรษฐกิจที่สำคัญ ซึ่งวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *A. hydrophila*นั้น มีการศึกษาและพัฒนามาอย่างต่อเนื่องเช่นกัน ทั้งในส่วนของรูปแบบและวิธีการให้วัคซีน รวมถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน โดยส่วนใหญ่มุ่งเน้นเพื่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันให้มีต่อเชื้อก่อโรคนั่นเอง

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงรูปแบบวิธีการให้วัคซีนเชื้อตายของแบคทีเรีย *A. hydrophila* และผลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาดุกลูกผสม ทั้งนี้เพื่อทำให้ทราบถึงความเป็นไปได้ของประสิทธิภาพวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *A. hydrophila*โดยการฉีดเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาดุกลูกผสม และสามารถลดปัญหาของการใช้ยาปฏิชีวนะที่ให้ผลการรักษาที่ไม่ดีเท่าที่ควรและอาจก่อให้เกิดการดื้อยาอีกด้วย ทั้งนี้เพื่อช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาดุกลูกผสมให้มีความต้านทานโรคเพิ่มสูงขึ้นและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคระหว่างการเพาะเลี้ยงหลังจากการให้วัคซีนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากปลาดุกลูกผสมที่แสดงอาการของโรคกกหูบวม (Motile aeromonas disease) ในบริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในเขตพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique) จากอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ม้าม ไตส่วนหลัง และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy agar (TSA)จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวและถ่ายเชื้อลงในอาหาร TSA ใหม่อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น จำแนกกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ได้โดยเทคนิคการย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่างของเซลล์และคุณสมบัติของผนังเซลล์ พร้อมทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้โดยการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase พร้อมทั้งยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปชนิด API 20E

2. การเตรียมวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

วัคซีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นวัคซีนประเภทเชื้อตายโดยการใช้ฟอร์มาลิน (Formalin-killedvaccine) ตามวิธีการของ Roberson (1990) ดังนี้ เขี่ยโคโลนีของเชื้อ *A. hydrophila*ที่แยกได้ลงเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB)เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นล้างอาหารเลี้ยงเชื้อและตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมฟอร์มาลิน 1% ลงในสารละลายแบคทีเรียเพื่อฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจยืนยันการตายของแบคทีเรียโดยการเขี่ยสารละลายแบคทีเรียบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร ล้าง

ฟอร์มาลินออกด้วยน้ำเกลือ 0.85% และปรับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นเป็น 10^8 Colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) โดยการวัดค่า O.D. เท่ากับ 0.15 ที่ความยาวช่วงคลื่น 560 นาโนเมตร (Karoon and Areechon, 1993)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโดยการตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์

วางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) โดยใช้ปลาดุกลูกผสมน้ำหนักเฉลี่ย 75±5 กรัม แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ปลาทดลอง 10 ตัว เลี้ยงในตู้กระจกขนาด 30×60×40 เซนติเมตร ให้อาหาร 2 เวลาเช้าและเย็นในปริมาณที่เท่ากัน รวมระยะเวลาทดลองทั้งสิ้น 9 สัปดาห์ ในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน 2553 โดยฉีดวัคซีนเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อตัว ($5X10^7$ cfu ต่อตัว) เข้าช่องท้อง (Intraperitoneal; i.p.) และกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง (Intramuscular; i.m.) โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ถูกฉีดน้ำเกลือ 0.5% เข้าช่องท้อง (ควบคุม, i.p.) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองที่ถูกฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง (ทดลอง, i.p.) กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุมที่ถูกฉีดน้ำเกลือ 0.5% เข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง (ควบคุม, i.m.) และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มทดลองที่ถูกฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง (ทดลอง, i.m.)

ก่อนให้วัคซีน ปลาดุกลูกผสมทุกกลุ่มจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างเลือด กลุ่มละ 3 ตัว เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมปกติ และหลังจากการให้วัคซีนผ่านไป 1 สัปดาห์ จึงสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลาอีกครั้ง กลุ่มละ 3 ตัว เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อตรวจหาระดับของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila*ด้วยวิธี Direct agglutination ตามวิธีการของ Roberson (1990) โดยการตรวจสอบใน Microtiter plate แบบ 96 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ ทำการกระตุ้นซ้ำอีกครั้ง (Boosting) โดยการให้วัคซีนเข็มที่สองในสัปดาห์ที่ 5 ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์เริ่มลดลง ด้วยความเข้มข้น ปริมาตรของวัคซีนและวิธีการฉีดวัคซีนเหมือนกันกับการให้วัคซีนในเข็มแรก (Figure1)

4. การทดสอบความต้านทานโรค (Challenge test)ของปลาที่ได้รับวัคซีน

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *A. hydrophila*สายพันธุ์เดิมที่ใช้เตรียมวัคซีนเพื่อทดสอบความต้านทานโรคโดยการฉีดเชื้อในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเข้าช่องท้องปลาดุกลูกผสมที่มีขนาดเดียวกันกับปลาที่ใช้ทดลอง เลือกใช้ระดับความเข้มข้นที่สามารถทำให้ปลาที่ทดสอบตาย 50% ที่ 96 ชั่วโมง (Lethal dose 50 หรือ LD_{50}) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 7 ระดับ ซึ่งอยู่ระหว่างระดับต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และระดับสูงที่สุดที่ไม่ทำให้ปลาตาย แต่ละระดับใช้ปลา 10 ตัว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ฉีดเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม ส่วนกลุ่มควบคุมจะฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.5% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในปริมาณเดียวกัน นำปลาที่ถูกฉีดด้วยเชื้อแต่ละระดับและกลุ่มควบคุมใส่ตู้กระจก สังเกตอาการและบันทึกปลาตายในเวลา 24, 48 72 และ 96 ชั่วโมง (Karoon and Areechon, 1993)

ภายหลังการฉีดวัคซีนเข็มที่สองเป็นเวลา 5 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 10) สุ่มปลาดุกลูกผสมจำนวน 10 ตัว จากแต่ละกลุ่มทดลองมาพักไว้ในตู้กระจก แล้วฉีดเชื้อที่ความเข้มข้น 10^{12} cfu/ml ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ต่อ

น้ำหนักตัวปลา 100 กรัม ในระดับความเข้มข้นที่หาไว้ข้างต้น (LD_{50}) สังเกตอาการของโรคเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยสุ่มเก็บปลาที่ตาย ตรวจอาการภายนอกหรือปลาที่แสดงอาการของโรค (Motile aeromonas disease) เพื่อตรวจยืนยันสาเหตุของการเกิดโรค และเจาะเลือดปลาที่ไม่แสดงอาการของโรคเพื่อดูค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรัมชั่งน้ำหนักปลาดุกลูกผสมเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละกลุ่มการทดลอง ตรวจนับจำนวนปลาที่ตายระหว่างการทดลองที่เลี้ยงในตู้กระจกเพื่อหาอัตราการรอดตาย (%) ในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนโดยสามารถประเมินได้จากอัตราการตายเฉลี่ยสะสม (%) และค่า Relative percent survival (RPS) (Amend, 1981) จากสูตร ดังนี้

$$\text{Relative percent survival (RPS)} = 1 - \frac{\text{\%การตายของปลาที่ได้รับวัคซีน}}{\text{\%การตายของปลาในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

โดยแผนการทดลอง สามารถสรุปเป็นแผนภาพได้ ดังนี้

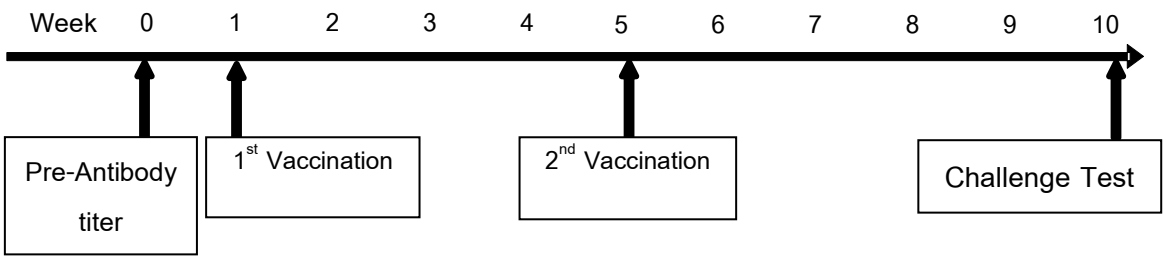

Figure1 Study plan for vaccination and challenge test of hybrid catfish

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังในแต่ละสัปดาห์ นำไปทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของ 2 กลุ่มตัวอย่าง ด้วยวิธี Independent *t-test* และอัตราการเจริญเติบโตหลังสิ้นสุดการให้วัคซีน 9 สัปดาห์ นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS 11.5

ผลการศึกษา

1. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน โดยการตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์

จากการศึกษาพบว่า ปลาดุกลูกผสมในแต่ละกลุ่มทดลองก่อนที่จะได้รับวัคซีน 1 สัปดาห์ ไม่พบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* สายพันธุ์ที่ใช้เตรียมเป็นวัคซีน ซึ่งให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์เป็น 0 (เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนทุกหลุม Microtiter plate) แต่หลังจากมีการให้วัคซีน ($5x10^7$cfu ต่อตัว) ผ่านไป 1 สัปดาห์ พบว่าสามารถตรวจพบค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับวัคซีน (Table1)โดยในกลุ่มที่ 2 ซึ่งให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ 2.22$\pm$3.85 สูงกว่ากลุ่มที่ 4 ที่ให้วัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.33$\pm$1.34 โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และเมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าค่าเฉลี่ยแอนติบอดีไตเตอร์ในแต่ละสัปดาห์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 5 ในขณะที่กลุ่มการทดลองที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังพบว่ามีค่าลดลงหลังจากสัปดาห์ที่ 4 จึงทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกครั้งโดยให้วัคซีน ($5x10^7$cfu ต่อตัว) ในสัปดาห์ที่ 5 และเมื่อเวลาผ่านไปพบว่าค่าเฉลี่ยแอนติบอดีไตเตอร์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ อย่างเห็นได้ชัดและเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากกว่าระยะแรก ๆ ของการให้วัคซีน โดยในสัปดาห์ที่ 7 พบค่าเฉลี่ยแอนติบอดีไตเตอร์สูงที่สุด คือ 881.78$\pm$246.34 และ 568.89$\pm$98.54 จากการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิตินัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) หลังจากนั้นค่าเฉลี่ยของแอนติบอดีไตเตอร์มีแนวโน้มลดต่ำลง โดยในสัปดาห์ที่ 9 มีค่าเฉลี่ยแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 16.00$\pm$0.00 และ 21.33$\pm$9.23 จะเห็นได้ว่าในแต่ละสัปดาห์ระหว่างการฉีดวัคซีนทั้ง 2 วิธี มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยเป็นไปในทิศทางเดียวกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (Table1) ส่วนกลุ่มที่ 1 และ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (ฉีดน้ำเกลือ 0.5%) ของการฉีดทั้ง 2 วิธีนั้น ไม่พบแอนติบอดีไตเตอร์เช่นกัน (เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนทุกหลุม Microtiter plate)

2. ผลของวัคซีนต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตรารอดของปลาดุกลูกผสมหลังให้วัคซีน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของปลาทดลองหลังให้วัคซีน (น้ำหนักเฉลี่ยของปลาดุกลูกผสมหลังให้วัคซีน หักลบด้วยน้ำหนักก่อนให้วัคซีน) มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยปลาดุกลูกผสมที่ได้รับวัคซีนเข้าช่องท้อง (กลุ่มที่ 2) มีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุด คือ 22.17$\pm$7.02 กรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มของปลาดุกลูกผสมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.5% เข้าช่องท้อง (กลุ่มที่ 1; ควบคุม, i.p.) ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 10.33$\pm$6.80กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มของปลาดุกลูกผสมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.5% เข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง (กลุ่มที่ 3; ควบคุม, i.m.) และกลุ่มของปลาดุกที่ได้รับวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง (กลุ่มที่ 4;ทดลอง, i.m.) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนกลุ่มของปลาดุกลูกผสมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.5% เข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง (กลุ่มที่ 3; ควบคุม, i.m.) และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง (กลุ่มที่ 4;ทดลอง, i.m.) มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) (Table 2)

Table 1 Mean antibody titer in serum of hybrid catfish vaccinated with formalin-killed *A. hydrophila* vaccine administered by intraperitoneal (i.p.) and intramuscular (i.m.) injection.

Week	Experiment			
	1 (control, i.p.)	**2** (treatment, i.p.)	**3** (control, i.m.)	**4** (treatment, i.m.)
Pre-immune	0	0	0	0
1	0	2.22±3.85[a]	0	1.33±1.34[a]
2	0	10.22±9.82[a]	0	16.00±2.67[a]
3	0	20.44±6.71[a]	0	16.89±4.07[a]
4	0	23.11±4.07[a]	0	41.78±56.21[a]
5	0	24.89±3.08[a]	0	16.89±5.55[a]
6	0	128.00±21.33[a]	0	125.78±79.74[a]
7	0	881.78±246.34[a]	0	568.89±98.54[a]
8	0	13.33±4.62[a]	0	29.78±21.60[a]
9	0	16.00±0.00[a]	0	21.33±9.23[a]

Note: Averages±SD with same letter within the same column are not significantly different at $p<0.05$

3. ผลการทดสอบความต้านทานโรค (Challenge test) ของปลาที่ได้รับวัคซีน

ตัวอย่างปลาดุกลูกผสมทุกกลุ่มการทดลองถูกนำมาทดสอบความต้านทานโรคโดยการฉีดเชื้อเป็นของแบคทีเรีย *A. hydrophila* เข้าช่องท้อง เพื่อหาค่าอัตราการตายเฉลี่ยสะสม (%) และประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนโดยอาศัยค่า Relative percent survival (RPS) จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อความต้านทานโรคจากการฉีดวัคซีนทั้ง 2 วิธี พบว่า กลุ่มที่ 1 (ควบคุม, i.p.) และกลุ่มที่ 3 (ควบคุม, i.m.) คือกลุ่มปลาดุกลูกผสมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.5% เข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังมีอัตราการตายเฉลี่ยสะสมเท่ากับ 56.67 และ 33.3% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มทดลองซึ่งเป็นปลาดุกลูกผสมที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องนั้นมีอัตราการตายเฉลี่ยสะสมเท่ากับ 0% และมีค่า RPS สูงถึง 100% และส่วนปลากลุ่มทดลองที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังมีอัตราการตายเฉลี่ยสะสม 3.33% และมีค่า RPS เท่ากับ 90.10%(Table2) นอกจากนี้ หลังจากการทดสอบความต้านทานโรค ปลาทดลองที่ไม่ตาย สามารถตรวจพบค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรัมได้ นอกจากนี้ปลายังมีลักษณะอาการลำตัวตั้งฉากกับผิวน้ำ ตกเลือดบริเวณโคนครีบหู และมีอาการท้องบวมรวมทั้งพบของเหลวในช่วงท้อง และเมื่อนำปลาที่ตายมาเขี่ยเชื้อและตรวจคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเบื้องต้นในส่วนของตับสามารถพบเชื้อ *A. hydrophila* เพียงชนิดเดียวที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

Table2 Effect of formalin-killed *A. hydrophila* vaccine on growth, survival rate, dead/surviving fish, mortality and Relative Percent Survival (RPS) of hybrid catfish after challenged with virulent *A. hydrophila*.

Mode of vaccination	No. of fish	Growth (g)	Survival rate (%)	Injection dose (cfu/fish)	Dead/surviving fish	Mortality (%)	RPS (%)
Control i.p.	30	10.33 ± 6.80^{b}	100	$1X10^{12}$	17/13	56.67	-
Treatment i.p.	30	22.17 ± 7.02^{a}	100	$1X10^{12}$	0/30	0	100
Control i.m.	30	18.00 ± 1.80^{ab}	100	$1X10^{12}$	10/20	33.33	-
Treatment i.m	30	21.00 ± 4.50^{ab}	100	$1X10^{12}$	1/29	3.33	90.10

Note: Average values with different superscripts in the same column are statistically significantly difference ($p<0.05$)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การใช้วัคซีนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *A.hydrophila* ด้วยวิธี formalin-killed แล้วนำไปฉีดให้แก่ปลาดุกลูกผสมบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังเพื่อใช้ในการป้องกันโรคกกหูบวมที่เกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* จากการทดสอบความต้านทานโรคซึ่งเป็นการประเมินประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลาทดลอง พบว่าอัตราการตายสะสมของปลาดุกลูกผสมของกลุ่มควบคุมทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายสูงกว่ากลุ่มการทดลองที่ได้รับวัคซีนอย่างเห็นได้ชัด โดยเมื่อทำการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนโดยดูจากค่า Relative percent survival (RPS) พบว่ามีค่าเท่ากับ 100 และ 90.10% ในกลุ่มของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ค่อนข้างดีมาก เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันการเกิดโรคควรจะให้ค่า RPS มากกว่า 60% ขึ้นไป (Eillis, 1988) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pridgeon and Klesius (2011) ที่ได้ทำการพัฒนาวัคซีนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *A.hydrophila* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะโนโวไบโอซินและไรแฟมพิคซินในปลาดุกอเมริกันและปลานิล โดยฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อที่ความเข้มข้น $1X10^{7}$ cfu ต่อตัวซึ่งจากการศึกษาพบว่า ปลาทั้ง 2 ชนิด สามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้โดยให้ค่า RPS สูงถึง 80-100% ดังนั้นการให้วัคซีนทั้ง 2 วิธีนี้ จึงถือได้ว่ามีประสิทธิภาพสูงสามารถทำให้ปลาดุกลูกผสมต้านทานต่อโรคได้เป็นอย่างดี

โดยทั่วไปแล้ว ลักษณะของการเกิดโรคกกหูบวมในปลาดุกลูกผสมส่วนใหญ่จะมีความรุนแรงของโรคค่อนข้างเฉียบพลันหรือเป็นแบบเรื้อรังซึ่งจะค่อย ๆ แสดงอาการของโรคอย่างช้า ๆ ดังนั้นการตรวจดูลักษณะการเกิดโรคจึงอาจต้องใช้ระยะเวลาในการติดตามอาการนานมากกว่า 14 วัน จึงจะพบความแตกต่างของจำนวนปลาที่เกิดโรคในแต่ละกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจวัดระหว่างการทดสอบความต้านทานโรคจะเห็นได้ว่า ระดับค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับวัคซีนมีค่าเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าปลาในกลุ่มควบคุม ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิกันในปลาดุกลูกผสมกลุ่มที่มีการให้วัคซีนที่เพิ่มสูงขึ้นนั่นเอง นอกจากนี้ มีการศึกษาพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนที่มีความเข้มข้นมากจะสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น (Kitancharoen, 1991; Pridgeon and Klesius, 2011) ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้ได้ให้วัคซีนที่มีความเข้มข้น 10^7cfu ต่อตัว โดยให้ประสิทธิภาพความต้านโรคมากกว่าร้อยละ 60 ซึ่งถือว่าเป็นระดับที่วัคซีนสามารถมีผลในการป้องกันโรคได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังส่งผลช่วยยืดระยะเวลาการตายของปลาทดลองยาวนานกว่ากลุ่มควบคุมอีกด้วย อนึ่ง ในการให้วัคซีนแก่ปลาโดยวิธีการฉีดนั้นอาจเกิดปัญหาความยุ่งยากในการให้วัคซีน ทั้งการสิ้นเปลืองแรงงาน และปลาจะเกิดความเครียดหรือบอบช้ำได้ในระหว่างการให้วัคซีน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยส่วนใหญ่จึงมีความพยายามที่จะหาวิธีการให้วัคซีนแก่ปลาด้วยวิธีการต่าง ๆ ให้มีความสะดวกมากยิ่งขึ้นและให้ผลเป็นไปในระดับที่น่าพอใจ เช่น การแช่ปลาในวัคซีน (Chamanon and Areechon, 1995)การแช่ร่วมกับการให้โดยการผสมลงในอาหาร (Plaimast, 1998) หรือการให้โดยวิธีการป้อนเข้าปากโดยตรง (oral vaccination) (Rodrigues *et al*., 2006) เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองให้วัคซีนแก่ปลาดุกลูกผสมโดยวิธีการฉีดเป็นหลัก ทั้งนี้วัตถุประสงค์หนึ่งของการให้ด้วยวิธีการฉีดนี้ ทางคณะผู้วิจัยพยายามที่จะหาแนวทางในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่ปลาดุกลูกผสมให้มีความต้านทานต่อเชื้อมากขึ้นเพื่อหาตำแหน่งของอวัยวะที่จะฉีดวัคซีนโดยตรงให้มีความสะดวกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น การฉีดวัคซีนในปลาโดยทั่วไปนั้น ส่วนใหญ่จะให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องเป็นหลักซึ่งให้ประสิทธิภาพซึ่งวัดได้จากค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรัมที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการให้วัคซีนด้วยวิธีการอื่น ๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากบริเวณช้องท้องของปลากระดูกแข็งนั้นเป็นตำแหน่งที่อยู่ของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันสำคัญหลายชนิด เช่น ม้าม ตับและไตส่วนหน้า ซึ่งอวัยวะเหล่านี้ทำหน้าที่หลักในการสร้างกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อทำหน้าที่ในกระบวนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น หากมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องโดยตรงจึงอาจส่งผลทำให้ร่างกายของปลามีการตอบสนองได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าตำแหน่งอื่น (Wangkahart, 2008) อย่างไรก็ตาม การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องนั้นสามารถส่งผลกระทบหลายอย่างต่อปลาได้เช่นกัน หากผู้ปฏิบัติขาดทักษะ ความรู้ความชำนาญในการฉีดที่ไม่ถูกวิธี อาจจะส่งผลทำให้ปลาเกิดอาการเครียดและอาจส่งผลทำให้ปลาตายได้ โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้รูปแบบการฉีดเข้ากล้ามเนื้อร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความสะดวกมากขึ้นและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด และจากผลการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนซึ่งวัดจากค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรัมเมื่อนำปลาดุกลูกผสมทดลองไปทดสอบกับเชื้อก่อโรคจากการฉีดทั้ง 2 วิธี ก็ให้ผลที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน

นอกจากนี้ รูปแบบของแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการเตรียมเป็นวัคซีนยังมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนด้วยเช่นกัน โดยมีการทดลองใช้ส่วนประกอบของผนังเซลล์มาใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อให้เกิดความต้านทานโรค เช่น Lipopolysaccharide (LPS)ของแบคทีเรียและ □-glucan ของผนังเซลล์ยีสต์มาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าการใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ (Gudmundo'ttir *et al*., 1997) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ในการผลิตเป็นวัคซีน ยังให้ผลในระดับที่น่าพอใจเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากแบคทีเรีย *A. hydrophila*จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ผนังเซลล์มีส่วนประกอบของ LPS จึงส่งผลทำให้วัคซีนที่เตรียมขึ้นมีประสิทธิภาพดีและสามารถกระตุ้นให้ปลาเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้นได้ (Selvaraj *et al*., 2006)

ในการทดลองครั้งนี้ใช้เวลาทั้งสิ้น 9 สัปดาห์หรือประมาณ 2 เดือนซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นเกินไปในการประเมินประสิทธิภาพของรูปแบบวิธีการให้วัคซีนและโดยทั่วไปนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมเลี้ยงปลาดุกลูกผสมเป็นเวลา 3-4 เดือนก่อนการจำหน่าย ดังนั้น การฉีดวัคซีนครั้งแรกจะให้ผลในการป้องกันโรคได้ยาวนานประมาณ 2-3 เดือน ซึ่งระยะเวลาเพียง 5 สัปดาห์หรือประมาณ 1 เดือนของการให้วัคซีนในเข็มแรกยังคงอยู่ในช่วงระยะดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถครอบคลุมและประเมินผลของการให้วัคซีนได้หรือวัคซีนอาจมีประสิทธิภาพต่ำ (Chu, 2006)ดังนั้นในการกระตุ้นซ้ำโดยการฉีดวัคซีนในเข็มที่ 2 จึงช่วยเพิ่มระยะเวลาในการป้องกันการเกิดโรคและเพื่อให้วัคซีนที่ใช้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สำหรับแนวทางการผลิตวัคซีนของเชื้อแบคทีเรีย *Ahydrophila* ทางการค้านั้นยังมีปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ความหลากหลายทางด้านสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดนี้ เนื่องจากพบว่าแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในสายพันธุ์ต่าง ๆ นั้น จะมีความรุนแรงในการเกิดโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียบางสายพันธุ์พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำยังสามารถก่อให้เกิดโรคได้เนื่องจากจะมีการสร้างสารพิษ (พิษวิทยา) ที่แตกต่างกันอีกด้วย (Angka *et al*., 1995) ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เกิดโรค ควรมีการศึกษาถึงความรุนแรงของเชื้อและการสร้างสารพิษของเชื้อซึ่งอาจช่วยให้สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ผลิตเป็นวัคซีนนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น หรืออาจมีการคัดเลือกสายพันธุ์ของปลาร่วมด้วยโดยอาศัยรูปแบบการตอบการสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อก่อโรคเพื่อช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ปลาที่สามารถทนต่อโรคในการเพาะเลี้ยงต่อไป (Sahoo *et al*., 2011)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการสร้างองค์ความรู้ใหม่ของอาจารย์/นักวิจัย กองส่งเสริมการวิจัยและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ 2553 ขอบคุณนางสาวสุจิตตา เชียงนางามและนางสาวอนงค์ลักษณ์ พระพงษ์ นิสิตผู้ช่วยวิจัยและห้องปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอำนวยความสะดวกตลอดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Aguilera-Arreola, M. G., C. Hernndez-RodrIguez, G. Zúñiga, M. J. Figueras and G. Castro-Escarpulli. 2005. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. FEMS Microbiology Letters 242(2): 231-240

Amend D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines.Developments in biological standardization. 49(2): 447-454.

Angka, S.L., T.J Lam and Y.M. Sin. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 130(10): 102-112.

Austin B. and D.A. Austin. 1999. Bacterial fish pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish (3rd Edition), Springer Praxis, Chichester, England.552 p.

Boonkwang Karoon and Nontawith Areechon. 1993. Study on resistance to experimental infection of *Aeromonas hydrophila* in hybrid catfish. Proceeding of the 32th Kasetsart University Annual Conference. Thailand, February 3-5, 1993. 475-487. [in Thai]

Chalida Chamanon and Nontawith Areechon. 1995. Stydy on optimum size of a hybrid catfish for the application of Aeromonas hydrophila vaccine by immersion method. Proceeding of the 33th Kasetsart University Annual Conference.Thailand, January 30-Febuary 1, 1995. 32-38. [in Thai]

Eakapol Wangkahart. 2008. Gene expression analyses in head kidney and spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus agalactiae* by Expressed Sequence Tags (ESTs) technique. Master thesis (Genetic engineering) Kasetsart University Bangkok.339 p.[in Thai]

Ellis, A. E. 1982. Difference between the immune mechanism of fish and higher vertebrate, pp. 1-30. In R. J. Roberts (ed.). Microbial Disease of Fish. Academic Press, London.

FAO. 2011. Fishstat Plus Verion 2.30. Available Source:Http://www.fao.rog/fi/statist/FISOFT/FISHPLU .asp, August 1, 2011.

Gudmundsdo'ttir, B. K. and B. Magnado'ttir. 1997. Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against and experimental infection of *Aeromonas salmonicida* ssp. *Aschomogenes*. Fish and Shellfish Immunology. 7(6): 55-59.

Julia W. Pridgeon and Phillip H. Klesius. 2011. Development and efficacy of novobiocin and rifapicin-resistant *Aeromonas hydrophila* as novel vaccines in channel catfish and Nile tilapia. Vaccine, in press

Krongkaew Plaimast. 1998. Efficacy study of *Aeromonas hydrophila* vaccine by immersion and oral adminstration in hybrid catfish. Master thesis (Aquaculture) Kasetsart University Bangkok. 76 p. [in Thai]

Nilubol Kitancharoen. 1991. Study on the efficiency of vaccination on immune response and disease resistance in walking catfish, *Clarias macrocephalus* Gunther. Master thesis (Fisheries science) Kasetsart University Bangkok. 76 p. [in Thai]

Roberson, B.S. 1990. Bacterial agglutination. In: J.S. Stolen, G.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel, Editors, Techniques in fish immunology, SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, pp. 137–154.

Rodrigues, A.P., Daniela Hirsch, H.C.P. Figueiredo, P.V.R. Logato and Â.M. Moraes. 2006. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonashydrophila* designed for fish oral vaccination. Process Biochemistry 41(3): 638-643.

Sahoo, P.K., P.R. Rauta, B.R. Mohanty, K.D. Mahapatra, J.N. Saha, M. Rye and A.E. Eknath. 2011.Selection for improved resistance to *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp *Labeo rohita*: Survival and innate immune responses in first generation of resistant and susceptible lines. Fish and Shellfish Immunology 31(3): 432-438

Selvaraj, V., K. Sampath and Vaithilingam Sekar. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of -glucan administration in combination with lipopolysaccharideenhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 114(2): 15-24.

Wei-Hua Chu. 2006.Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish and Shellfish Immunology 21(1): 113-117.