ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาว (ตามสูตรของ ดร. มะลิ บุณยรัตผลิน)

ประกอบด้วย (อาหาร 1 กิโลกรัม)

ปลาป่นเกรดกุ้ง	450.00	กรัม
กากถั่วเหลือง	150.00	กรัม
หัวกุ้งป่น	100.00	กรัม
แอลฟ่าสตาช	80.00	กรัม
แป้งสาลี	142.50	กรัม
น้ำมันปลาหมึก	30.00	มิลลิลิตร
น้ำมันปาล์ม	30.00	มิลลิลิตร
วิตามินรวมและแร่ธาตุรวม (BP)	10.00	กรัม
วิตามินซี	5.00	กรัม
NaH_2PO_4	2.50	กรัม

หมายเหตุ : จะต้องเติมน้ำลงไปในอาหาร 35 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS, pH 7.2)

สารเคมี

1. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 . 2H_2O$)	0.62	กรัม
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแฮบตะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 . 7H_2O$)	1.61	กรัม
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	15.00	กรัม
4. น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารแยกกันแล้ว นำสารที่ละลายมาผสมรวมกันปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH 7.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดปลา

2.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (ตามวิธีของ Larsen and Sneizsko,1961)

วิธีการ

นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ ใส่ในหลอดเล็กๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต (microhaematocrit capillary tube) ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน แล้วนำไปปั่นด้วยฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (haematocrit centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำมาวัดหาอัตราส่วนของปริมาณเม็ดเลือดกับปริมาณเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต ดังสูตร

สูตรคำนวณ

$$\% \text{ HAEMATOCRIT} = \frac{\text{PACKED CELL VOLUME (mm.)}}{\text{TOTAL BLOOD VOLUME (mm.)}} \times 100$$

2.2 **การหาค่าปริมาณฮีโมโกลบิน**

2.2.1 **การเตรียม** Drabkin's solution

สารเคมี

1. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	1.00	กรัม
2. โปแตสเซียมไซยาไนด์ (KCN)	0.05	กรัม
3. โปแตสเซียมเฟอริคไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$)	0.20	กรัม
4. น้ำกลั่น (2 ครั้ง) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารแยกกัน และนำมาผสมรวมกัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตร ดูดเลือดที่เจาะใหม่ๆ มาผสมรวมกับ Drabkin solution 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้ว ทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ เพื่อขจัดเศษเซลล์เม็ดเลือด และ fibrin ต่างๆ นำส่วนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตราฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้ Drabkin solution เป็น blank

2.3 **การหาค่าโปรตีนรวมในพลาสมา** (ตามวิธีการของ Lowry *et al.*,1951)

2.3.1 **การเตรียม** Alkaline copper solution

สารเคมี

1. 0.5 % คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 . 5H_2O$)	1	ส่วน
2. 1 % โซเดียมโปแตสตาเตรด (Sodium potassium tatrate)	1	ส่วน
3. 1 % โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ใน 0.5 M โซเดียมไฮดรอคไซด์(NaOH)	50	ส่วน
4. น้ำกลั่น (2 ครั้ง) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว		

การเตรียมสารเคมี

1. 0.5 % $CuSO_4 . 5H_2O$ โดยชั่ง $CuSO_4 . 5H_2O$ มา 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 มิลลิลิตร

2. 1 % Sodium tatrate โดยชั่ง Sodium potassium tatrate มา 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 มิลลิลิตร

3. 1 % Na_2CO_3 ใน 0.5 M NaOH โดยชั่ง NaOH มา 2.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร (รอให้เย็นสนิท) จึงเติม Na_2CO_3 ลงไป 1.00 กรัม คนให้ละลายจนหมด

ผสมสารละลายทั้ง 3 รวมกันตามลำดับสัดส่วน เก็บไว้ในขวดสีทึบ

2.3.2 **การเตรียม** Folin reagent 1 : 10

สารเคมี

1. โฟลินคิโอเคลตัสฟีนอลรีเอเจน (Folin Ciocalteus phenol reagent) 1 ส่วน
2. น้ำกลั่น (2 ครั้ง) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 ส่วน

สารละลายที่ผสมแล้วจะต้องเก็บไว้ในขวดสีชา

วิธีการ

ดูดซีรั่ม มา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร แล้วเติม alkaline copper solution 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากับแล้วทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงเติม folin reagent 1 : 10 ลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมินมาตราฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้ blank ที่เตรียมขึ้นตามขั้นตอนนี้แต่ไม่เติมซีรั่ม

2.4 การนับปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

การเตรียม Yokoyama's solution

สารเคมี

สารละลาย A

1.	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.00	กรัม
2.	เดกโตส (Dextrose)	1.25	มิลลิกรัม
3.	โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	200.00	มิลลิลิตร
4.	โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	250.00	มิลลิกรัม
5.	ฟอร์มาลิน (Formalin : 40 %)	50.00	มิลลิลิตร
6.	น้ำกลั่น	200.00	มิลลิลิตร

สารละลาย B

1.	เมทธิลไวโอเลต (Methyl violet)	75.00	มิลลิกรัม
2.	ไพโรนิน บี (Pyronin B)	75.00	มิลลิกรัม
3.	น้ำกลั่น	250.00	มิลลิลิตร

Working solution ให้เตรียมก่อนใช้ โดยการผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 1:1 นำมาผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ก่อนจะนำไปใช้

วิธีการ

ใช้ RBC diluting pipette ดูดเลือดที่เจาะใหม่ๆ ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกินขีด 0.5 ให้ปรับโดยใช้กระดาษทิชชู แล้วใช้ปิเปตอันเดิมดูด diluting fluid (Yokoyama 's fluid) จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต แล้วเขย่าไปมาในแนวนอน 2 – 3 นาที นำไปนับจำนวนเม็ดเลือด โดยการหยดของเหลวลงในร่องของ haemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่เรียบร้อยแล้ว วาง haemacytometer ลงบนพื้นโต๊ะ 2 – 3 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดลงไปเรียงบนพื้นสไลด์ นับจำนวนเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 X

3. **สารเคมีและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อ** (ตามวิธีของ Humason, 1979)

3.1 **การเตรียมสารละลายคงสภาพ** (Fixative) **(ฟอร์มาลินความเข้มข้น** 10 **เปอร์เซ็นต์)**

สารเคมี

1. ฟอร์มาลิน (Formalin)	10.00	มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น	90.00	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

3.2 **การดึงน้ำออกจากเซลล์** (Dehydration)

ทำการตัดแต่งตัวอย่างให้มีขนาดพอเหมาะนำมาบรรจุในบล๊อคพลาสติกและรวบรวมใส่ในตะกร้าโลหะเพื่อที่จะนำไปสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	เอทธิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	2
2	เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
3	เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
4	เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
5	เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
6	แอบโซลูทแอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	2
7	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylin)	1
10	ไซลีน	1

11	พาราพลาส (paraplast)	1
12	พาราพลาส	1

หลังจากตัวอย่างผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ นำตัวอย่างเข้าสู่ขั้นตอนการฝัง (embedding) ในพาราพลาส ตกแต่งตัวอย่างให้สวยงามและนำไปผ่านขั้นตอนการตัด (sectionning) และการย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอิโอซิน

3.3 การย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอิโอซิน

3.3.1 การเตรียมสีฮีมาทอกไซลิน

สารเคมี

1. ฮีมาทอกไซลิน	4.00	กรัม
2. โซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)	0.80	กรัม
3. อลัม (potassium aluminium sulfate, alum)	100.00	กรัม
4. กรดซิตริก (citric acid)	4.00	กรัม
5. คลอรัลไฮเดท (choral hydrate)	200.00	กรัม
6. น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมสีฮีมาทอกไซลิน ผสมจนกระทั่งละลายหมด แล้วจึงเติมโซเดียมไอโอเดท หลังจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดทเข้าด้วยกัน ผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำเก็บบรรจุในขวดสีชาหรือขวดพลาสติกทึบแสง ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

3.3.2 การเตรียมสีอิโอซิน

สารเคมี

1. อิโอซิน (eosin Y. Cl 45380)	1.00	กรัม
2. เอทธิลแอลกอฮอล์	1,000	มิลลิลิตร
3. กรดอะซิติกเข้มข้น	5.00	มิลลิลิตร

ละลายสีอิโอซินลงในเอทธิลแอลกอฮอล์จนกระทั่งละลายหมด แล้วจึงเติมกรดอะซิติกผสมให้เข้ากัน นำเก็บบรรจุในขวดสีชาหรือขวดพลาสติกทึบแสง

วิธีการ

นำสไลด์ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 12 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอิโอซิน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์	1
6	แอบโซลูทแอลกอฮอล์	1
7	เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
8	เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
9	เอทธิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
10	น้ำกลั่น	1
11	สีฮีมาทอกไซลิน	15 - 20
12	น้ำประปา	3
13	น้ำกลั่น	1
14	เอทธิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
15	สีอิโอซิน	3 - 5
16	เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
17	เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
18	แอบโซลูทแอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์	2
20	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2
23	ไซลีน	2
24	ไซลีน	2

หลังจากนำสไลด์ตัวอย่างผ่านขั้นตอนสุดท้าย คือแช่ในไซลีน แล้วจึงทำการเคลือบด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค1 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 14 วัน ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

conc	ln y D	n	nDd	nAl	acc Dd	acc Al	t	Per M
1.500×10^{5}	11.918	10	9	1	25	25	50	90
2.275×10^{4}	10.032	10	8	2	16	24	40	80
2.500×10^{3}	7.824	10	5	5	8	22	30	50
3.750×10^{2}	5.927	10	3	7	3	17	20	30
5.000×10^{1}	1.609	10	0	10	0	10	10	0

conc. = concentration of *Streptococcus* sp. (cell/ml/fish)

lny D = lny dose

n = number of test fish per concentration

nDd = number of dead fish

nAl = number of living fish

acc Dd = accumulated of dead fish

acc Al = accumulated of living fish

t = total of accumulated dead amd living fish

Per M = cumulative percentage mortality

การคำนวณค่า LD_{50} ที่ 14 วัน

จากสูตร

LD_{50} = In y concentration below 50 % mortality + (50 – mortality below 50 % / mortality above 50 % - mortality below 50 %) x (In y concentration above 50 % - In y concentration above 50 %)

$$= 5.927 + \frac{(50 - 30)}{80 - 30} \times (10.032 - 5.927)$$

$$= 5.927 + \frac{(20)}{50} \times (4.105)$$

$$= 5.927 + 1.642$$

$$= 7.569$$

get anti lny 7.569 = 1.937×10^3 CFU/ml

การคำนวณหาค่า absorbance

จากสูตร

$$\ln y = 329.95x + 4.8155$$

เมื่อ y = จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

x = absorbance ที่ 540 นาโนเมตร

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) = 0.981

แทนค่าในสูตร

$$7.569 = 329.95x + 4.8155$$

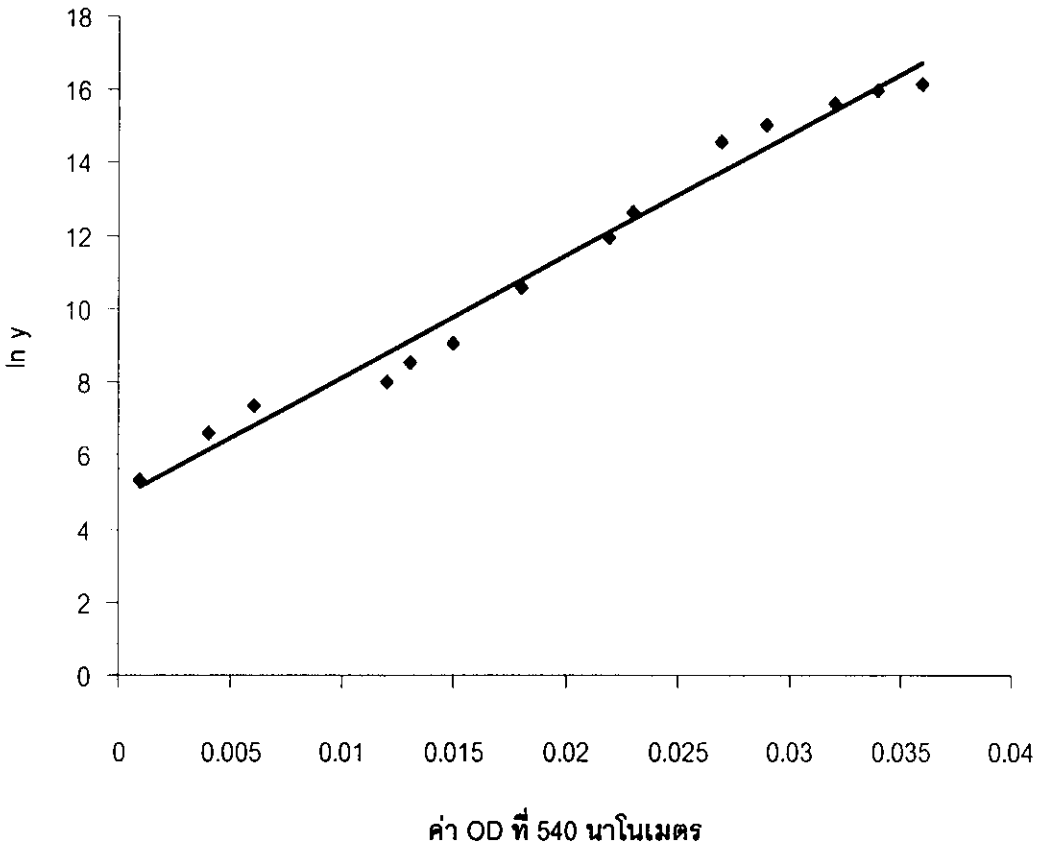
$$329.95x = 7.569 - 4.8155$$

$$x = \frac{2.7535}{329.95}$$

= 0.00835 ที่ 540 นาโนเมตร

ดังนั้นค่า absorbance ที่ 540 นาโนเมตร คือ 0.008

ภาพผนวกที่ ค1 standard curve **ระหว่างค่า** absorbance **และ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร** (ln y)



$\ln y = 329.95 X + 4.8155$

เมื่อ y = **จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร**

x = absorbance **ที่** 540 นาโนเมตร

R^2 = **ค่าสหสัมพันธ์** (corelation) = 0.981

ตารางผนวกที่ ค2 การหา standard curve ระหว่างค่า absorbance และจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (ln y)

absorbance	lny
0.001	5.298
0.004	6.620
0.006	7.346
0.012	7.990
0.013	8.549
0.015	9.040
0.018	10.558
0.022	11.918
0.023	12.612
0.027	14.532
0.029	15.020
0.032	15.607
0.034	15.956
0.036	16.118

ตารางผนวกที่ ค3 การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเป็นกรด - ด่าง ต่างๆ กัน

pH	ปริมาณของเชื้อ (cell/ml)					
	0	24	48	72	96	120
5.0	$4.43x10^{3}$	0	0	0	0	0
6.0	$4.43x10^{3}$	$2.30x10^{8}$	$3.25x10^{6}$	$2.34x10^{4}$	$1.23x10^{3}$	$8.35x10^{2}$
7.0	$4.43x10^{3}$	$2.25x10^{10}$	$3.15x10^{8}$	$7.31x10^{6}$	$5.21x10^{4}$	$5.15x10^{3}$
8.0	$4.43x10^{3}$	$2.35x10^{10}$	$4.00x10^{8}$	$5.00x10^{6}$	$8.00x10^{5}$	$4.50x10^{4}$
9.0	$4.43x10^{3}$	$4.50x10^{11}$	$1.82x10^{10}$	$1.17x10^{8}$	$1.02x10^{7}$	$3.65x10^{6}$
10.0	$4.43x10^{3}$	$4.50x10^{5}$	$3.75x10^{4}$	$7.50x10^{2}$	$1.32x10^{2}$	0

ตารางผนวกที่ ค4 การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ความเค็มต่างๆ กัน

ความเค็ม	ปริมาณของเชื้อ (cell/ml)					
	0	24	48	72	96	120
0 ppt	$4.43x10^{3}$	$2.30x10^{11}$	$5.02x10^{9}$	$1.44x10^{8}$	$1.99x10^{6}$	$1.75x10^{4}$
10 ppt	$4.43x10^{3}$	$1.35x10^{11}$	$2.38x10^{9}$	$2.38x10^{7}$	$1.34x10^{5}$	$3.02x10^{3}$
20 ppt	$4.43x10^{3}$	$1.75x10^{10}$	$2.38x10^{8}$	$1.50x10^{7}$	$1.02x10^{5}$	$3.02x10^{3}$
30 ppt	$4.43x10^{3}$	$3.30x10^{9}$	$5.00x10^{7}$	$1.34x10^{5}$	$8.02x10^{3}$	$3.21x10^{2}$
40 ppt	$4.43x10^{3}$	$1.96x10^{6}$	$3.15x10^{5}$	$1.02x10^{3}$	$1.22x10^{2}$	0
50 ppt	$4.43x10^{3}$	$1.72x10^{4}$	$8.00x10^{3}$	$135x10^{2}$	0	0

ตารางผนวกที่ ค5 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของปลากะพงขาวที่ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน หลังจากได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน เป็นเวลา 7 วัน

การใช้วัคซีน	จำนวนซ้ำ	จำนวนปลา	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่อวัน						
		ตัว	1	2	3	4	5	6	7
ฉีดวัคซีน	1	20	0	0	0	0	0	0	0
	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0
แช่วัคซีน	1	20	0	0	0	0	0	0	0
	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0
กินอาหารผสมวัคซีน	1	20	0	0	0	0	0	0	0
	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค6 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของการทดสอบความคุ้มโรค โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าทางช่องท้องปลากะพงขาว หลังจากได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน

ปริมาณเซลล์วัคซีน (cell/ml)	จำนวนซ้ำ	จำนวนปลา ตัว	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่อวัน						
			1	2	3	4	5	6	7
0	1	20	0	20	55	60	75	80	80
	2	20	0	15	20	35	65	80	90
	3	20	0	20	35	65	70	80	80
$2.50X10^{8}$	1	20	0	15	30	35	40	40	40
	2	20	0	10	25	30	30	30	30
	3	20	0	10	35	35	40	40	40
$2.50X10^{9}$	1	20	0	10	15	30	30	30	30
	2	20	0	5	10	25	30	40	40
	3	20	0	10	15	20	30	40	40
$2.50X10^{10}$	1	20	0	10	15	20	20	20	20
	2	20	0	5	10	10	10	10	10
	3	20	0	5	15	20	20	20	20

ตารางผนวกที่ ค7 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของการทดสอบความคุ้มโรค โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าทางช่องท้องปลากะพงขาว หลังจากได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน

ปริมาณเซลล์วัคซีน (cell/ml)	จำนวนซ้ำ	จำนวนปลา ตัว	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่อวัน						
			1	2	3	4	5	6	7
0	1	20	0	25	45	60	70	75	80
	2	20	0	30	55	65	70	80	90
	3	20	0	30	45	55	65	80	80
$2.50X10^{8}$	1	20	0	10	15	20	30	35	40
	2	20	0	10	20	20	25	35	40
	3	20	0	15	20	35	40	50	50
$2.50X10^{9}$	1	20	0	10	15	20	30	30	30
	2	20	0	10	10	20	25	30	30
	3	20	0	5	10	10	20	25	30
$2.50X10^{10}$	1	20	0	0	10	20	30	30	30
	2	20	0	0	10	15	20	20	20
	3	20	0	5	15	20	20	20	20

ตารางผนวกที่ ค8 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของการทดสอบความคุ้มโรค โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าทางช่องท้องปลากะพงขาว หลังจากได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

ปริมาณเซลล์วัคซีน (cell/ml)	จำนวนซ้ำ	จำนวนปลา ตัว	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่อวัน						
			1	2	3	4	5	6	7
0	1	20	0	30	50	65	70	80	90
	2	20	0	40	50	60	80	100	100
	3	20	0	40	50	60	70	85	90
$2.50X10^{8}$	1	20	0	30	50	60	75	80	80
	2	20	0	40	50	70	75	80	80
	3	20	0	30	45	65	80	80	80
$2.50X10^{9}$	1	20	0	20	40	50	60	70	70
	2	20	0	30	45	55	60	60	60
	3	20	0	20	35	45	65	70	70
$2.50X10^{10}$	1	20	0	20	30	35	40	40	40
	2	20	0	20	30	40	40	40	40
	3	20	0	10	25	30	35	40	40

ตารางผนวก ค9 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของการทดสอบความคุ้มโรค โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าทางช่องท้องปลากะพงขาว หลังจากได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน

การใช้วัคซีน	จำนวนซ้ำ	จำนวนปลา	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่อวัน						
		ตัว	1	2	3	4	5	6	7-14
ฉีดวัคซีนไม่	1	20	0	0	0	0	0	0	0
ผสม CFA	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0
ฉีดวัคซีน	1	20	0	0	0	0	0	0	0
ผสม CFA	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0
แช่วัคซีนโดยตรง	1	20	0	10	30	40	45	45	45
	2	20	0	15	25	35	45	45	45
	3	20	0	5	20	35	45	45	45
แช่วัคซีนแบบ	1	20	0	0	10	10	15	15	15
hyperosmotic	2	20	0	10	20	20	20	20	20
	3	20	0	0	5	5	20	20	20
กินอาหารผสม	1	20	0	0	0	0	0	0	0
วัคซีน	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0
แช่ร่วมกับการกิน	1	20	0	0	0	0	0	0	0
อาหารผสมวัคซีน	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค10 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของการทดสอบความคุ้มโรค โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าทางช่องท้องปลากะพงขาว หลังจากได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน

การใช้วัคซีน	จำนวนซ้ำ	จำนวนปลา	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่อวัน						
		ตัว	1	2	3	4	5	6	7-14
ฉีดวัคซีนไม่	1	20	0	5	15	30	30	30	30
ผสม CFA	2	20	0	5	10	25	25	25	25
	3	20	0	0	10	30	30	30	30
ฉีดวัคซีน	1	20	0	0	0	0	0	0	0
ผสม CFA	2	20	0	5	5	5	5	5	5
	3	20	0	0	0	0	0	0	0
แช่วัคซีนโดยตรง	1	20	0	20	20	35	50	60	60
	2	20	0	20	30	55	60	65	65
	3	20	0	20	40	55	60	60	60
แช่วัคซีนแบบ	1	20	0	0	0	0	10	10	10
hyperosmotic	2	20	0	10	10	10	20	20	20
	3	20	0	10	30	30	30	30	30
กินอาหารผสม	1	20	0	0	0	0	0	0	0
วัคซีน	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0
แช่ร่วมกับการกิน	1	20	0	0	0	0	0	0	0
อาหารผสมวัคซีน	2	20	0	0	0	0	0	0	0
	3	20	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค11 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของการทดสอบความคุ้มโรค โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าทางช่องท้องปลากะพงขาว หลังจากได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

การใช้วัคซีน	จำนวนซ้ำ	จำนวนปลา	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่อวัน						
		ตัว	1	2	3	4	5	6	7-14
ฉีดวัคซีนไม่	1	20	0	20	30	30	40	40	40
ผสม CFA	2	20	0	20	40	40	50	50	50
	3	20	0	15	20	30	35	35	40
ฉีดวัคซีน	1	20	0	10	20	20	20	20	20
ผสม CFA	2	20	0	10	10	20	20	20	20
	3	20	0	5	10	10	10	10	10
แช่วัคซีนโดยตรง	1	20	0	20	20	50	60	60	60
	2	20	0	20	30	50	60	65	65
	3	20	0	20	40	55	65	70	70
แช่วัคซีนแบบ	1	20	0	20	30	40	50	50	50
hyperosmotic	2	20	0	20	40	55	60	60	60
	3	20	0	30	50	60	65	65	65
กินอาหารผสม	1	20	0	10	10	20	20	20	20
วัคซีน	2	20	0	20	20	25	30	30	30
	3	20	0	10	20	30	40	40	40
แช่ร่วมกับการกิน	1	20	0	10	20	25	25	25	25
อาหารผสมวัคซีน	2	20	0	10	10	20	20	20	20
	3	20	0	10	20	25	30	30	30