บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของเชื้อ *Streptococcus* sp.

1.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีขอบเรียบ สีขาวขุ่น โคโลนีกลมนูน มีขนาดประมาณ 0.5 – 1.0 มิลลิเมตร เซลล์มีรูปร่างกลมต่อกันเป็นสาย ติดสีแกรมบวก เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar (BA) จะไม่มีการย่อยเม็ดเลือดแดง ทำให้แยกชนิดของเชื้ออยู่ในกลุ่ม non – haemolytic *Streptococcus* sp.

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงขาวที่ป่วยทุกตัว สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากส่วนของสมองปลากะพงขาวที่ป่วยมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคได้สูงกว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากส่วนอื่นๆของปลาป่วยและผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงไว้ในตารางที่ 2

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อนำเชื้อ *Streptococcus* sp. มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้ยา 12 ชนิด พบว่า เชื้อจะดื้อต่อยาออกโซลินิค แอซิดและนาลิดิอิคแอซิด แต่มีความไวต่อยาคลอแรมเฟนนิคัล ซัลฟาเมธ็อกซาโซล+ไตรเมธโธพริม นอร์ฟล็อกซาซินออกซี่เตตร้าซัยคลิน ซาราฟล็อกซาซิน เพนนิซิลิน ไตรเมธโธพริม ไนโตรฟูแรนโทอิน เออริโทรมัยซิน และแอมพิซิลลิน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

1.2 การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับ pH ต่างๆ กัน

เชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด - ด่าง (pH) กว้างๆ คือ 6 – 10 โดยปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (เวลาที่ 0) จำนวน 4.43×10^3 CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเป็นกรด - ด่างต่างๆ จะเจริญเพิ่มขึ้น ซึ่งที่ความเป็นกรด - ด่าง 9 เจริญได้ดีที่สุด (4.50×10^{11} CFU/ml) รองลงมาคือ 8 และ 7 (2.35×10^{10} และ 2.25×10^{10} CFU/ml) ตามลำดับ แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อลดลงเรื่อยๆ ปริมาณของเชื้อที่ระดับความเป็นกรด - ด่าง 9, 8, 7 และ 6 จะเป็น 3.65×10^6, 4.50×10^4, 5.15×10^3 และ 8.35×10^2 CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางผนวกที่ ค3

1.3 **การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน**

พบว่า เชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถที่จะเจริญได้ในระดับความเค็ม ในช่วง 0 – 50 ส่วนในพันส่วน โดยปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (เวลาที่ 0) จำนวน 4.43 x 10^3 CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. จะเจริญเพิ่มขึ้นในทุกระดับความเค็ม โดยที่ระดับความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน เจริญได้ดีที่สุด (2.30 x 10^{11} CFU/ml) รองลงมาคือระดับความเค็ม 10 และ 20 ส่วนในพันส่วน (1.35 x 10^{11} และ 1.75 x 10^{10} CFU/ml) ตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อเริ่มลดลงเรื่อยๆ จนถึงเวลา 120 ชั่วโมง ปริมาณของเชื้อที่ระดับความเค็ม 0, 10, 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน จะเป็น 1.75 x 10^3, 3.02 x 10^3, 3.02 x 10^3 และ 3.20 x 10^2 CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางผนวกที่ ค4

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ในการทดลอง โดยแยกได้จากปลากะพงขาวป่วย จังหวัดสงขลา เปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น

การทดสอบทางชีวเคมี	เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ทดลอง	เยาวนิตย์ และคณะ (2543) Seabass	Perera และคณะ (1994) Hybrid tilapia
Gram 's stain	+	+	+
Haemolysis	γ	β	β
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Mortality	-	-	-
Growth in NaCl 6.5 %	-	-	-
Tolerance of			
pH 9.6	+	-	-
temp 10 ^{0}C	+	-	+
temp 45 ^{0}C	-	-	+
Indole	-	NT	NT
Pyruvate	-	-	-
OF – medium	-	NT	NT

ตารางที่ 2 (ต่อ)

การทดสอบทางชีวเคมี	เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ทดลอง	เยาวนิตย์ และคณะ (2543) Seabass	Perera และคณะ (1994) Hybrid tilapia
MR test	-	-	NT
Hippurate	-	NT	-
Esculin	+	+	NT
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	+	NT	NT
α-D-galactopyranoside	-	NT	NT
β-D-glucuronate	-	NT	NT
β-D-galactopyranoside	-	NT	NT
2-naphthyl phosphate	-	NT	NT
L-leucine-2-naphthylamide	-	NT	NT
Arginine	+	+	+
Glycogen	-	NT	NT
Acid from			
Glucose	+	+	+
Sucrose	-	+	+
Saccharose	-	NT	NT
Lactose	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Maltose	+		
Dextrose	-	NT	NT
Sorbitol	-	NT	-
Ribose	+	NT	NT
L-Arabinose	-	-	-
Trehalose	+	-	-
Inulin	-	NT	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

การทดสอบทางชีวเคมี	เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ทดลอง	เยาวนิตย์ และคณะ (2543) Seabass	Perera และคณะ (1994) Hybrid tilapia
Raffinose	-	NT	-
Xylose	-	-	-
Hydrolysis			
Starch	+	+	+
Gelatin	-	NT	-

+ = positive - = negative NT = not test

ตารางที่ 3 ความไวของเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่อยาปฏิชีวนะ

ชนิด ยา	วงใส (มิลลิเมตร)	แปลผล
คลอแรมเฟนนิคัล (C ; 30 μg)	33	S
นอร์ฟล๊อกซาซิน (NOR ; 10 μg)	29	S
ออกโซลินิค แอซิด (OA ; 2 μg)	0	R
ออกซี่เตตร้าซัยคลิน (OT ; 30 μg)	30	S
ซาราฟล๊อกซาซิน (SRF ; 5 μg)	28	S
ซัลฟาเมธท๊อกซาโซล+ไตรเมธโธพริม (SXT ; 25 μg)	35	S
นาลิดิอิค แอซิด (NA ; 30 μg)	0	R
เพนนิซิลิน (P ; 10 μg)	32	S
ไตรเมธโธพริม (W ; 5 μg)	30	S
ไนโตรฟูแรนโทอิน (F ; 300 μg)	32	S
เออริโทรมัยซิน (E ; 15 μg)	30	S
แอมพิซิลลิน (AMP ; 10 μg)	40	S

R = resistance S = susceptible

2. **ผลการศึกษาปริมาณของเชื้อ** *Streptococcus* sp. **ที่ทำให้ปลากะพงขาวตายครึ่งหนึ่งภายใน** 14 **วัน** (LD_{50} **ที่** 14 **วัน**)

ทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยทำการฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ให้แก่ปลากะพงขาวขนาด 3.0 – 4.0 นิ้ว น้ำหนักเฉลี่ย 4.97 $\pm$ 1.24 กรัม โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง แล้วบันทึกเวลาและจำนวนปลากะพงขาวที่ตาย นำผลที่ได้มาคำนวณค่า LD_{50} พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.937 x 10^3 CFU/ml หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.008 โดยพบว่าอาการของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. มีสีลำตัวเป็นสีคล้ำ เสียการทรงตัว เคลื่อนที่ช้า แต่เมื่อได้รับเชื้อเป็นเวลานาน เกิดอาการตาขุ่น ตาโปนข้างเดียวหรือ 2 ข้าง มีของเหลวในช่องท้อง ตับมีสีซีด ไตและม้ามบวม สมองเป็นสีชมพู

3. **ผลของเชื้อ** *Streptococcus* sp. **ต่อปลากะพงขาว**

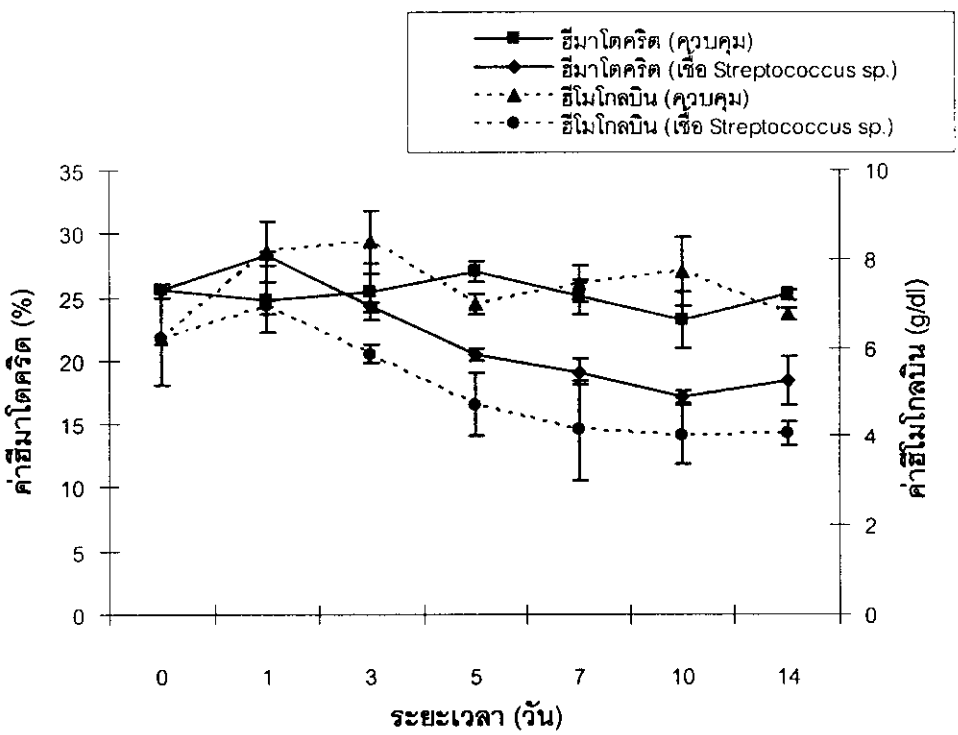
3.1 **การเจริญเติบโตของเชื้อ** *Streptococcus* sp. **ในอวัยวะปลากะพงขาว**

การเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในตัวปลาหลังจากได้รับเชื้อโดยการฉีดเข้าช่องท้อง ที่ปริมาณเชื้อ 4.80 x 10^7 CFU/ml แล้วตรวจปริมาณของเชื้อจากอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ ไต ม้าม สมอง และเลือด พบว่าเมื่อได้รับเชื้อไปแล้ว 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นในทุกอวัยวะ โดยพบว่าไตมีปริมาณของเชื้อสูงที่สุด (6.91 x 10^{11} CFU/ml) แต่เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน ปริมาณของเชื้อจะเริ่มลดลงในทุกอวัยวะ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของเชื้อในเลือดจะลดลงอย่างรวดเร็วและไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในวันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4

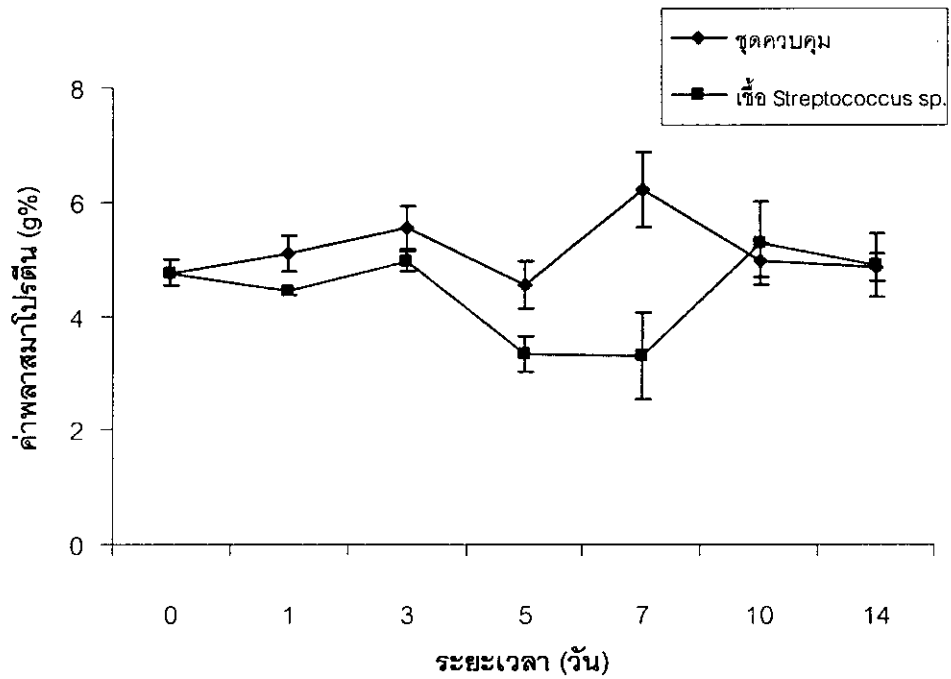
3.2 **การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ** *Streptococcus* sp.

การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เวลา 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน พบว่าหลังจากปลาได้รับเชื้อ 1 วัน มีค่าฮีมาโตคริตมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม แต่หลังจากนั้นจะลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยมีค่าต่ำสุดในวันที่ 10 หลังจากได้รับเชื้อ หลังจากนั้นค่าจะเริ่มเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มที่กลับเข้าสู่สภาพปกติ ค่าฮีโมโกลบินมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งค่าจะลดต่ำลงตามระยะเวลาของการได้รับเชื้อ เมื่อเปรียบกับชุดควบคุม ดังภาพที่ 3 ส่วนค่าพลาสมาโปรตีนมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งค่าจะลดลงต่ำมากในวันที่ 5 และ 7 หลังจากได้รับเชื้อ แต่หลังจากนั้นค่าจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและกลับเข้าสู่สภาวะปกติ ดังภาพที่ 4 สำหรับจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกและลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการได้รับเชื้อ โดยมีจำนวนเม็ดเลือดต่ำในช่วงวันที่ 7 – 14 วัน หลังจากได้รับเชื้อ นอกจากนี้ยัง

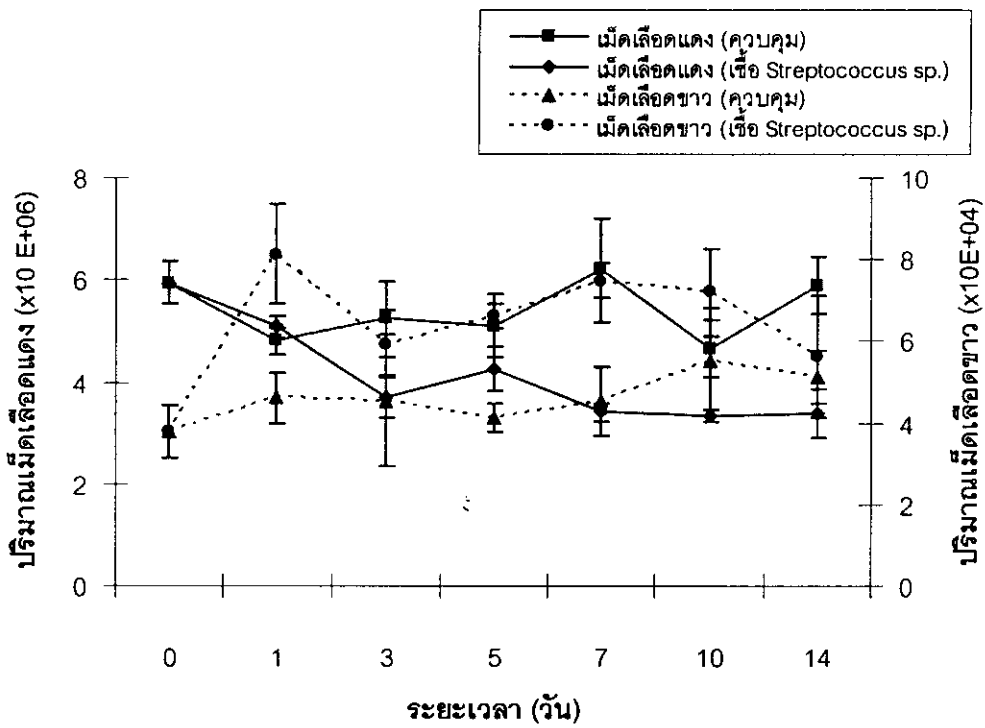
พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการได้รับเชื้อและลดลงในวันที่ 3 แต่หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและมีจำนวนที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมในวันที่ 14 ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบค่าฮีมาโตคริตและค่าฮีโมโกลบินของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบค่าพลาสมาโปรตีนของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม

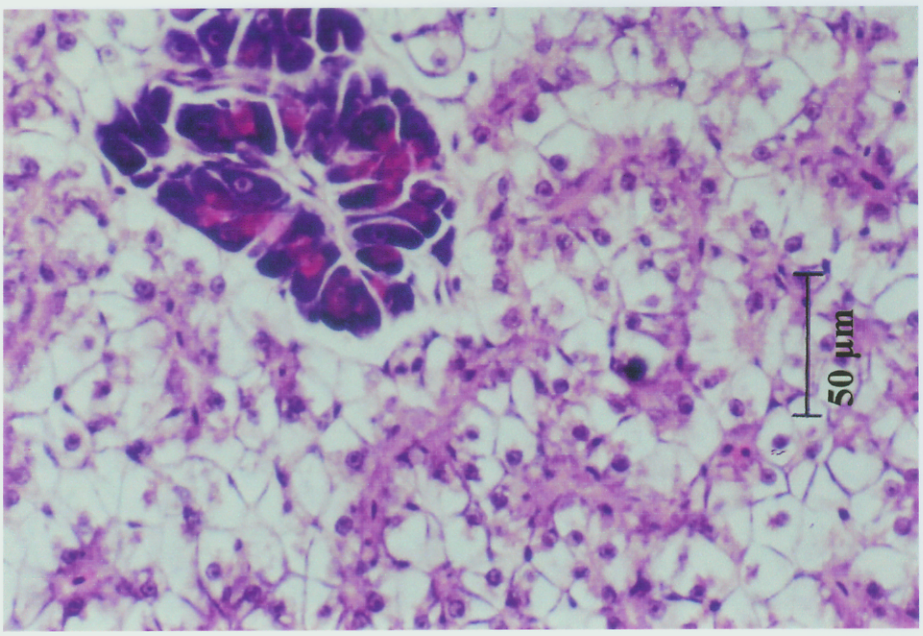
ตารางที่ 4 ปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ในอวัยวะต่างๆ ของปลากะพงขาว

อวัยวะ	ระยะเวลา (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
เลือด	$2.44\pm3.44\times10^{11}$	$9.45\pm1.16\times10^{8}$	$4.54\pm1.97\times10^{7}$	$1.89\pm2.16\times10^{6}$	$5.28\pm1.72\times10^{3}$	0	0
ตับ	$5.14\pm0.72\times10^{11}$	$5.39\pm0.82\times10^{11}$	$9.41\pm2.92\times10^{10}$	$1.78\pm2.47\times10^{10}$	$1.39\pm2.88\times10^{9}$	$1.81\pm0.59\times10^{8}$	$2.45\pm3.07\times10^{7}$
ไต	$6.91\pm2.79\times10^{11}$	$3.60\pm2.46\times10^{10}$	$2.89\pm2.41\times10^{9}$	$1.75\pm2.55\times10^{9}$	$1.13\pm1.60\times10^{9}$	$6.94\pm2.17\times10^{8}$	$2.83\pm2.32\times10^{7}$
ม้าม	$1.75\pm0.33\times10^{11}$	$1.10\pm4.26\times10^{10}$	$5.34\pm2.68\times10^{9}$	$1.25\pm2.73\times10^{9}$	$3.99\pm1.26\times10^{8}$	$2.03\pm0.96\times10^{8}$	$1.32\pm2.89\times10^{7}$
สมอง	$6.66\pm2.12\times10^{10}$	$6.49\pm1.41\times10^{9}$	$7.48\pm3.94\times10^{9}$	$2.43\pm1.40\times10^{8}$	$1.88\pm1.15\times10^{8}$	$1.32\pm2.71\times10^{8}$	$2.66\pm2.04\times10^{6}$

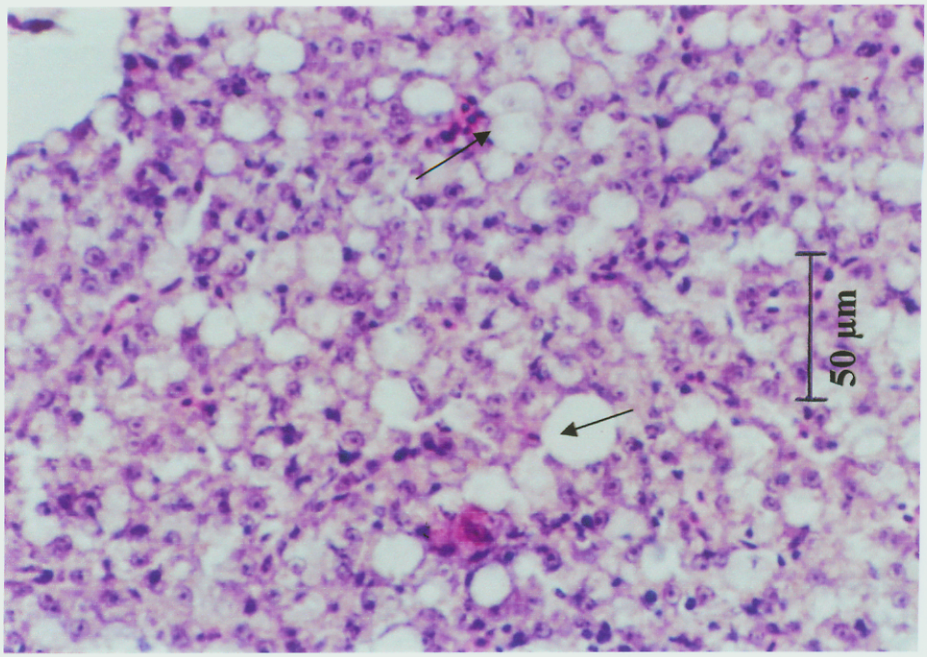
ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน จากปลาจำนวน 10 ตัว

3.3 **การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ** *Streptococcus* sp.

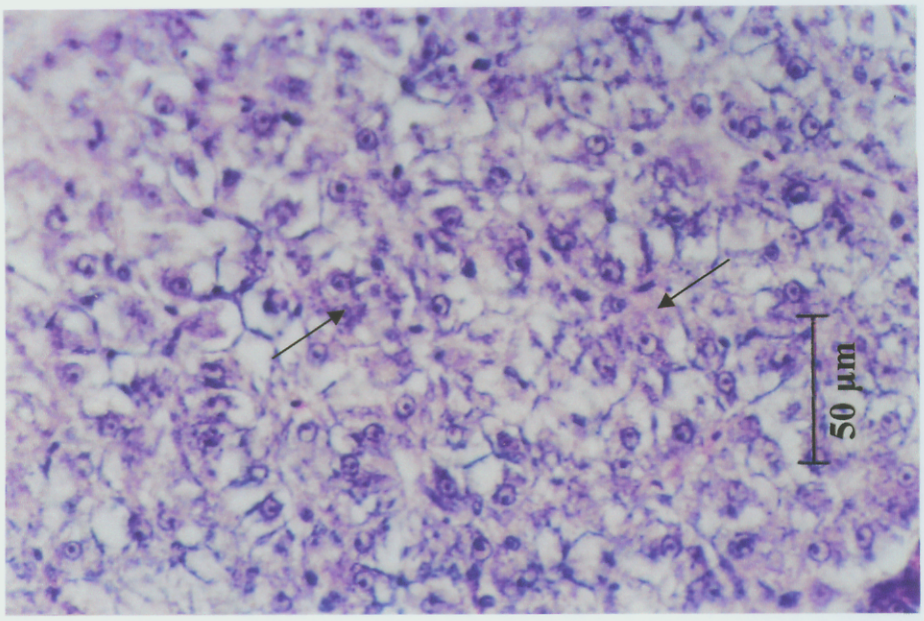
จากการศึกษาพยาธิสภาพของปลากะพงขาวปกติและที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่าในเนื้อเยื่อตับปลาปกติ เซลล์ตับและนิวเคลียสปกติ (ภาพที่ 6) ปลาที่ติดเชื้อเกิดช่องว่างอยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการเสื่อมสลายของเซลล์ตับ (ภาพที่ 7 และ 8) รวมทั้งการเกิดกรานูล ซึ่งภายในมีแมคโครฟาจจำนวนมากแทรกอยู่ (ภาพที่ 9) ในเนื้อเยื่อไต พบว่าเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าและไตส่วนหลังมีเมลาโนแมคโครฟาจจำนวนมากแทรกอยู่ ซึ่งไม่พบลักษณะดังกล่าวในเนื้อเยื่อปกติ (ภาพที่ 10, 11, 12 และ 13) นอกจากนี้ยัง พบว่ามีการหดตัวของโกลเมอรูลัสในเนื้อเยื่อไตส่วนหลัง (ภาพที่ 14) และเกิดไฮยาลินดร๊อปเพลทในส่วนของท่อไต (ภาพที่ 15) ในเนื้อเยื้อม้าม พบว่ามีเมลาโนแมคโครฟาจจำนวนมากแทรกอยู่และเกิดการเสื่อมสลายในส่วนของไวท์พัล เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อม้ามปกติ (ภาพที่ 16 และ 17) ในเนื้อเยื่อหัวใจ พบว่าเกิดการอักเสบและเกิดกรานูลของกล้ามเนื้อหัวใจ เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อหัวใจปกติ (ภาพที่ 18 และ 19) ในเนื้อเยื่อสมอง พบว่าเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์สมอง เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อสมองปกติ (ภาพที่ 20 และ 21) ในส่วนของเนื้อเยื่อเหงือก พบว่าเกิดการเชื่อมต่อกันของซี่เหงือกเป็นรูปทรงกระบอง มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติและการขยายตัวของเส้นเลือดบริเวณซี่เหงือก เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (ภาพที่ 22, 23, 24 และ 25) นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อตาเกิดการเสื่อมสภาพของเลนส์ตาโดยจะพบช่องว่างและแคปซูลซึ่งมีเชื้อ *Streptococcus* sp. อยู่ภายใน เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตาปกติ (ภาพที่ 26, 27 และ 28)



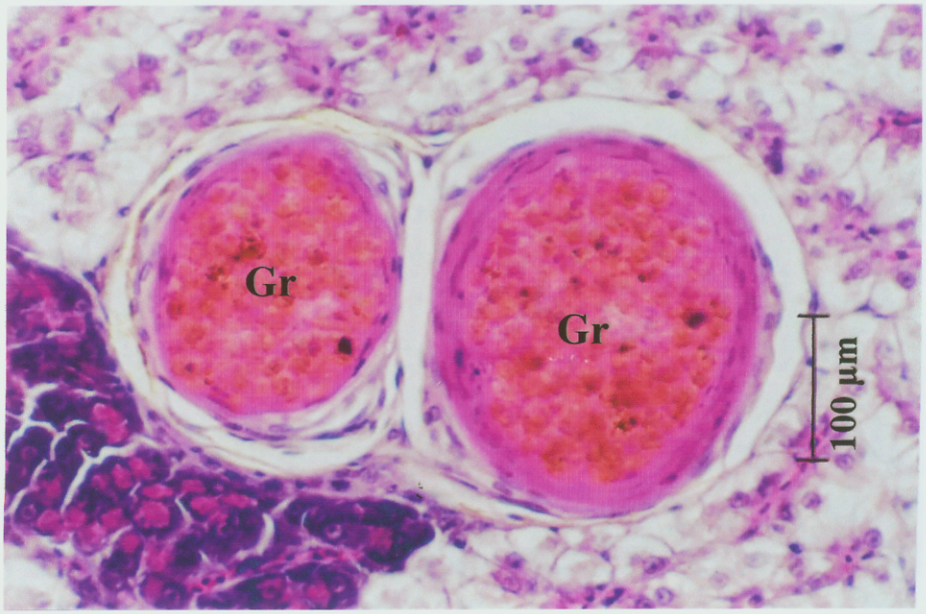
ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวปกติ เซลล์ตับปกติ และนิวเคลียสปกติ (H&E, Bar = 50 µm)



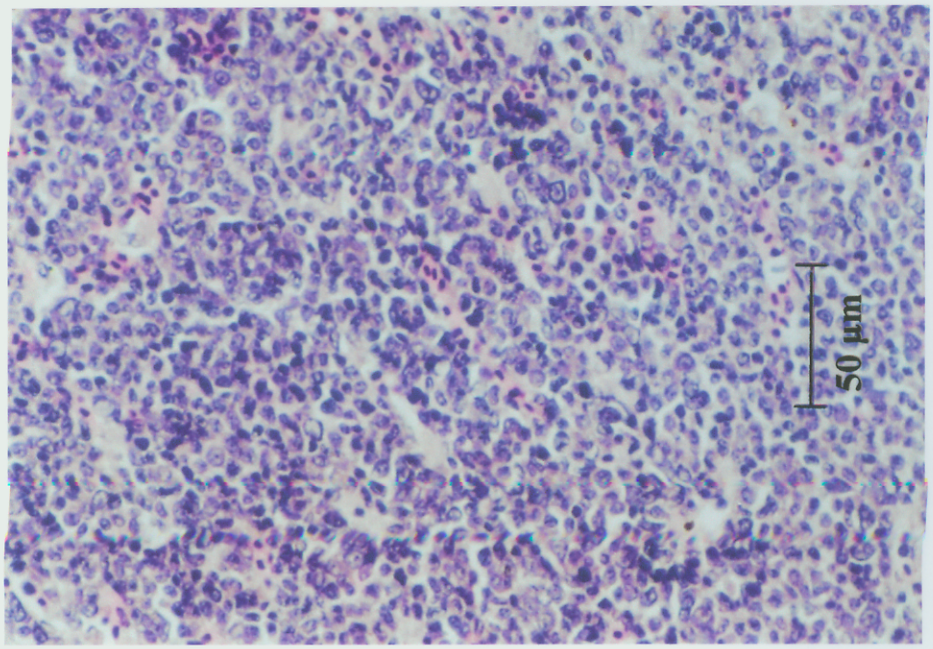
ภาพที่ 7 เกิดช่องว่าง (vacuoles) (ศรชี้) และเซลล์ตับเรียงตัวไม่เป็นระเบียบในปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



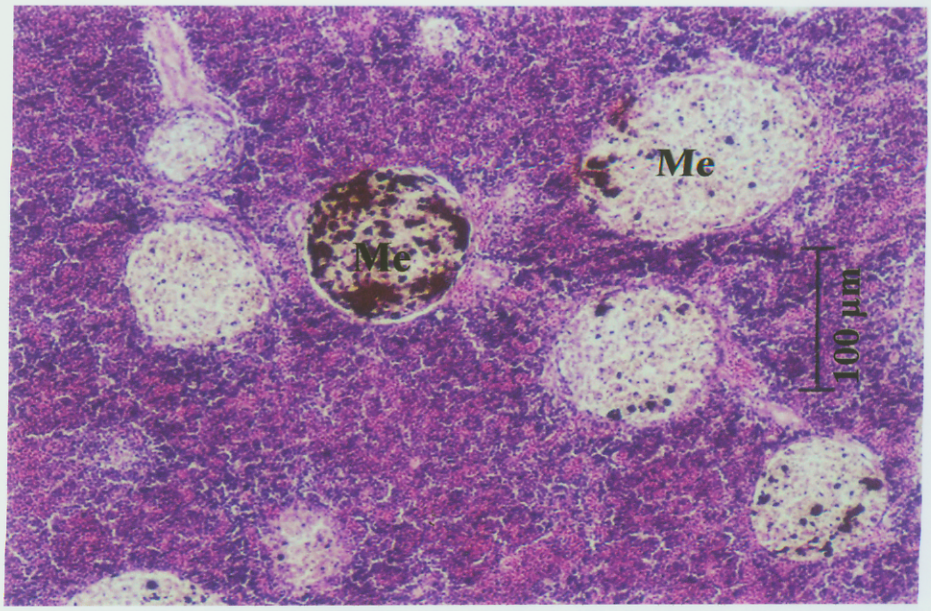
ภาพที่ 8 เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ตับ (degeneration) (ศรชี้) ปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



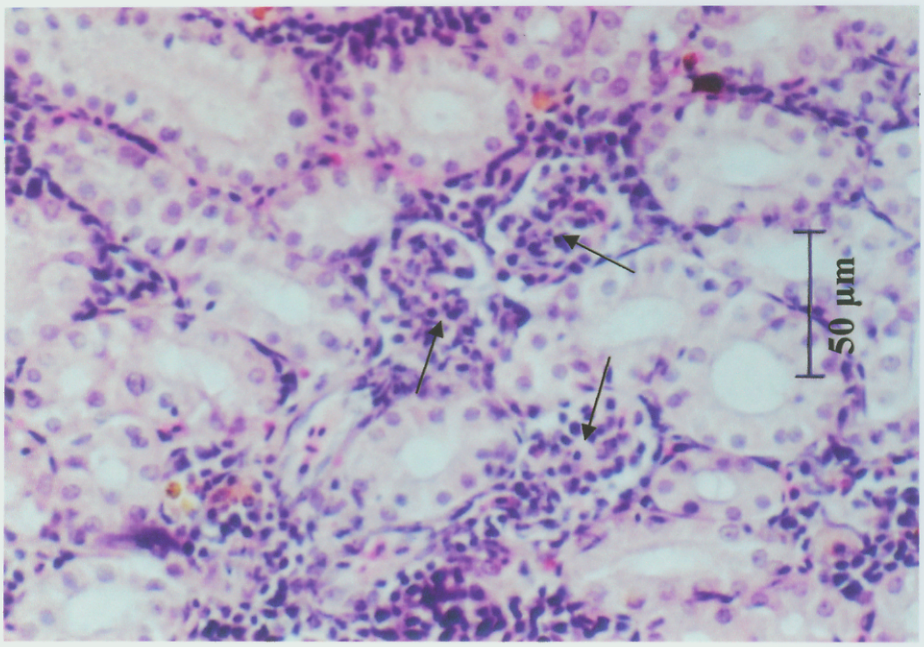
ภาพที่ 9 เกิดกรานูล (granule) (Gr) ซึ่งภายในมีแมคโครฟาจจำนวนมากในเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 100 µm)



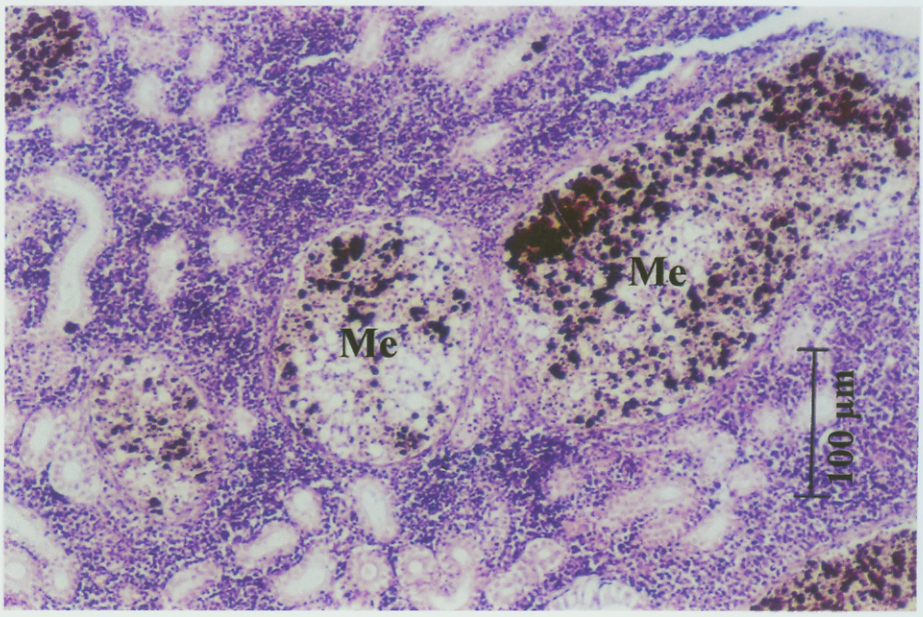
ภาพที่ 10 เนื้อเยื่อไตส่วนหน้า (head kidney) ของปลากะพงขาวปกติ เซลล์ปกติ (H&E, Bar = 50 µm)



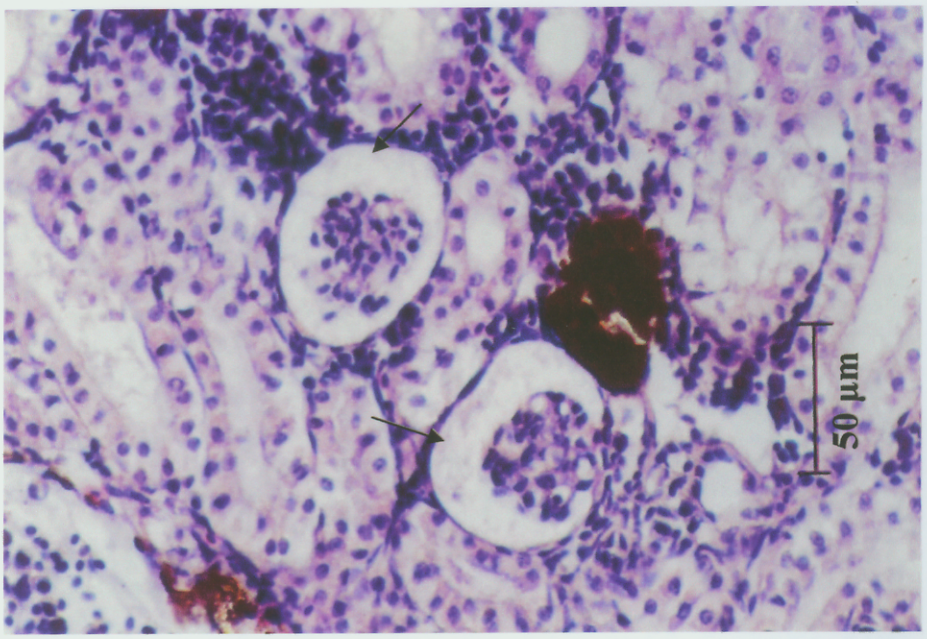
ภาพที่ 11 เกิดเมลาโนแมคโครฟาจ (Me) จำนวนมากในเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 100 µm)



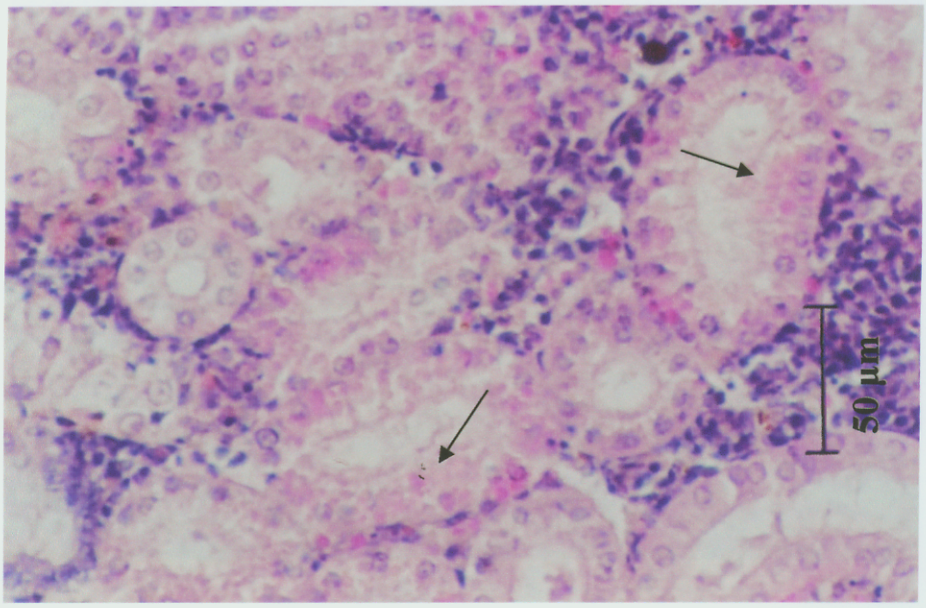
ภาพที่ 12 เนื้อเยื่อไตส่วนหลัง (trunk kidney) ท่อไตปกติและโกลเมอรูลัส (glomerulus) ปกติ (ศรชี้) ของปลากะพงขาวปกติ (H&E, Bar = 50 µm)



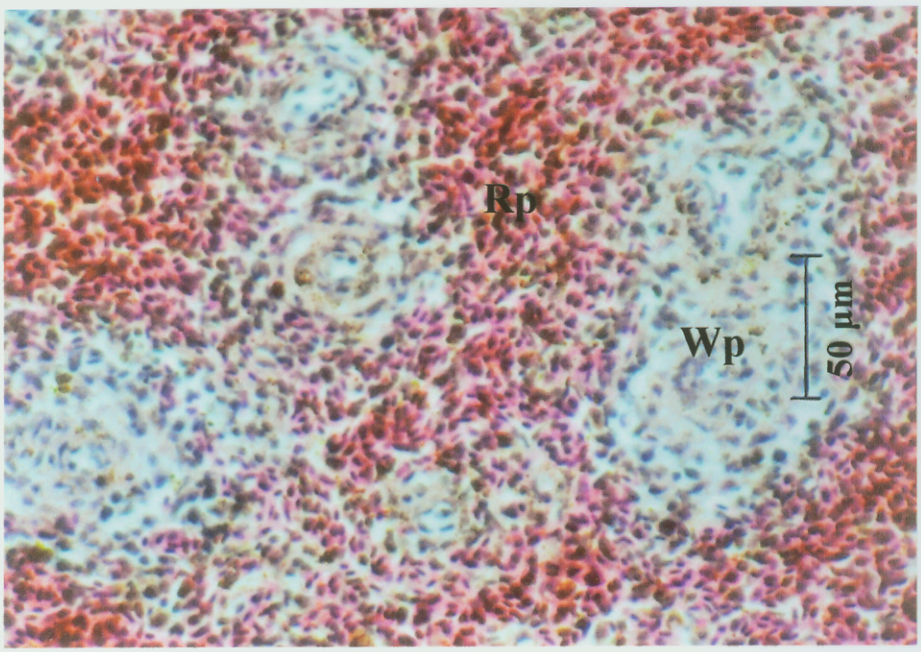
ภาพที่ 13 เกิดเมลาโนแมคโครฟาจ (Me) จำนวนมากในเนื้อเยื่อไตส่วนหลังของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 100 µm)



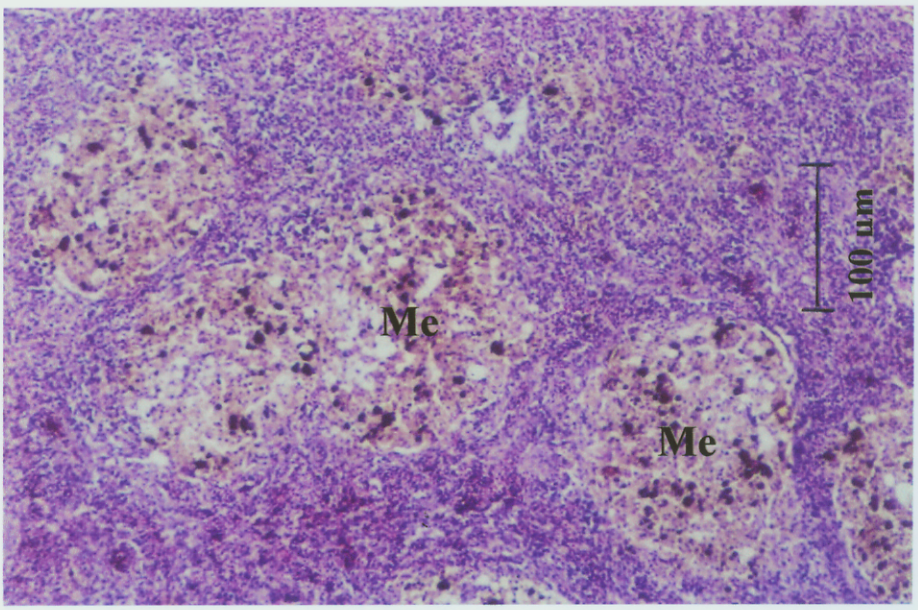
ภาพที่ 14 เกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส (ศรชี้) และเมลาโนแมคโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อไตส่วนหลังของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



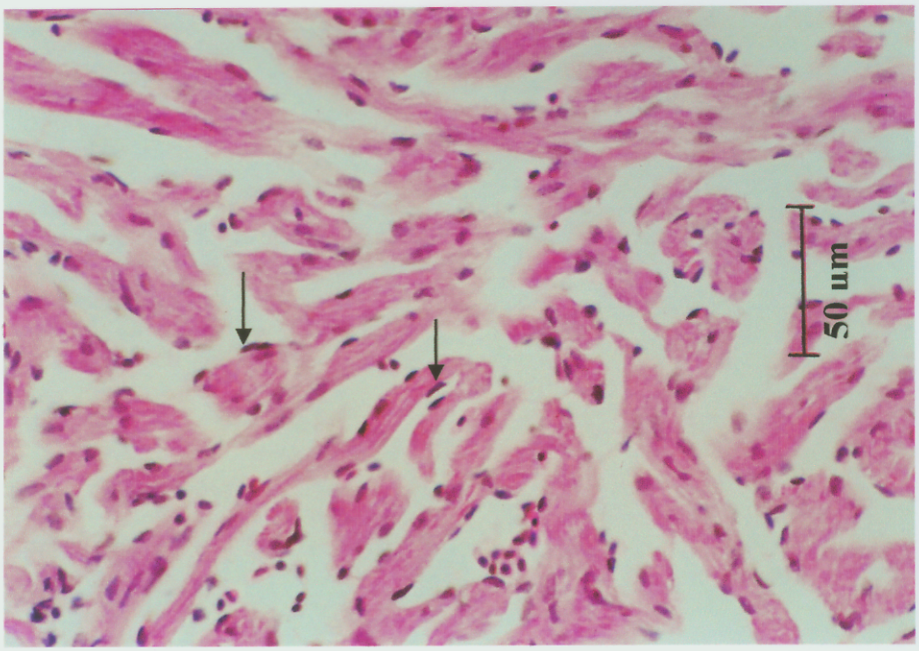
ภาพที่ 15 เกิดไฮยาลินดรๅอปเพลท (hyaline droplet degeneration) (ศรชี้) ในท่อไต (renal tubule) ของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



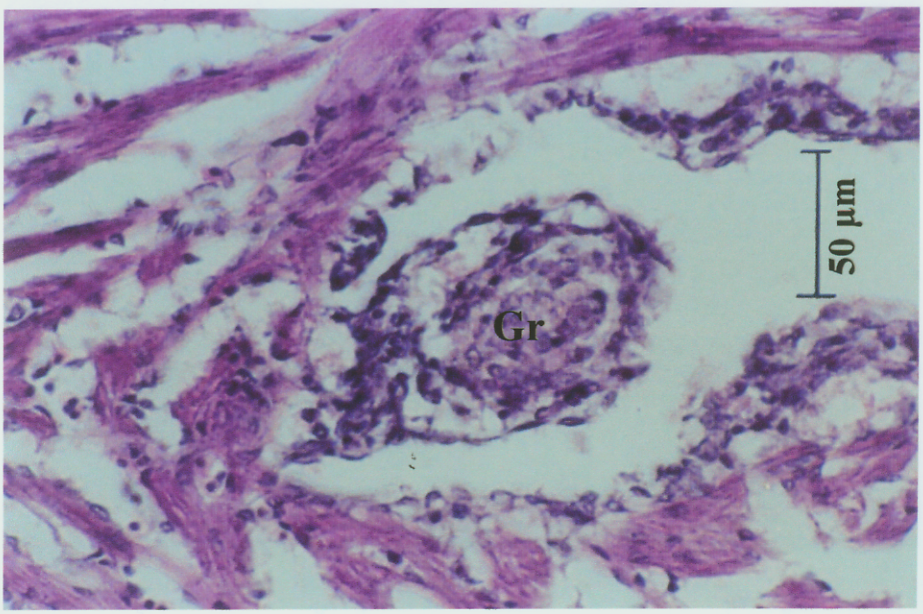
ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อม้ามของปลากะพงขาวปกติ ส่วนของเรดพัล (red pulp) (Rp) และไวท์พัล (white pulp) (Wp) ปกติ (H&E, Bar = 50 µm)



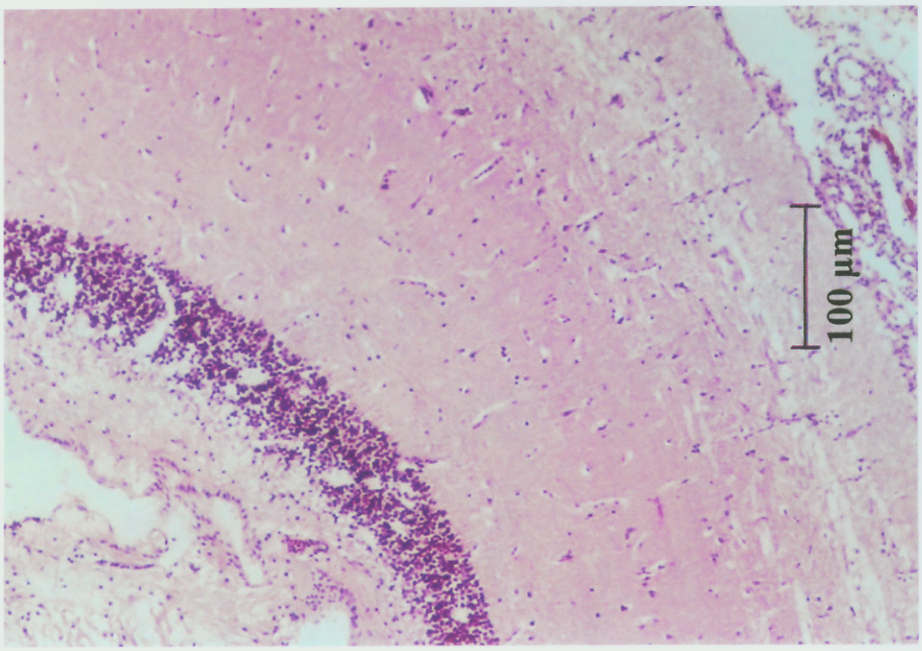
ภาพที่ 17 เกิดเมลาโนแมคโครฟาจ (Me) จำนวนมากในเนื้อเยื่อม้ามของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 100 µm)



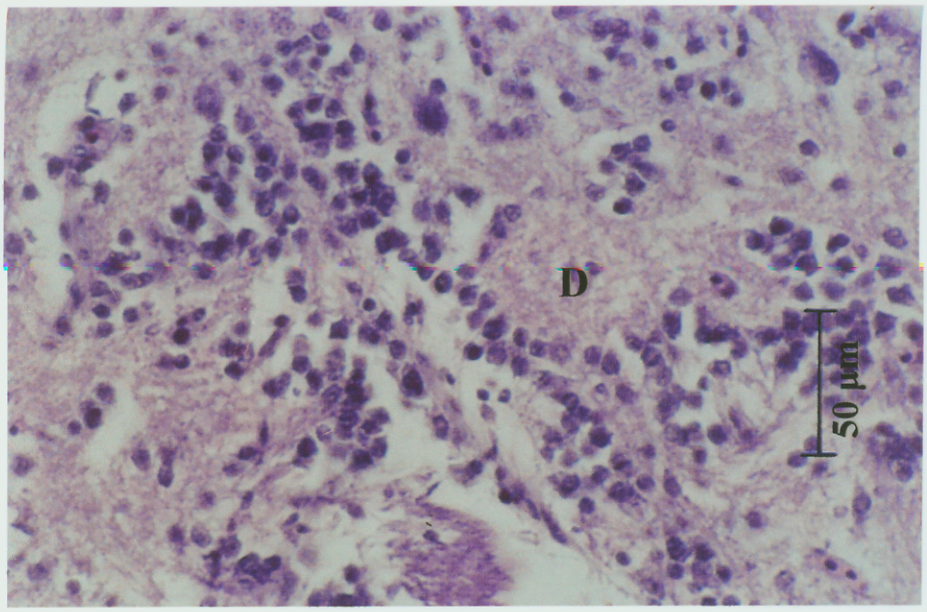
ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อหัวใจของปลากะพงขาวปกติ เซลล์กล้ามเนื้อปกติและนิวเคลียสเป็นรูปยาวรีติดสีเข้ม (ศรชี้) (H&E, Bar = 50 µm)



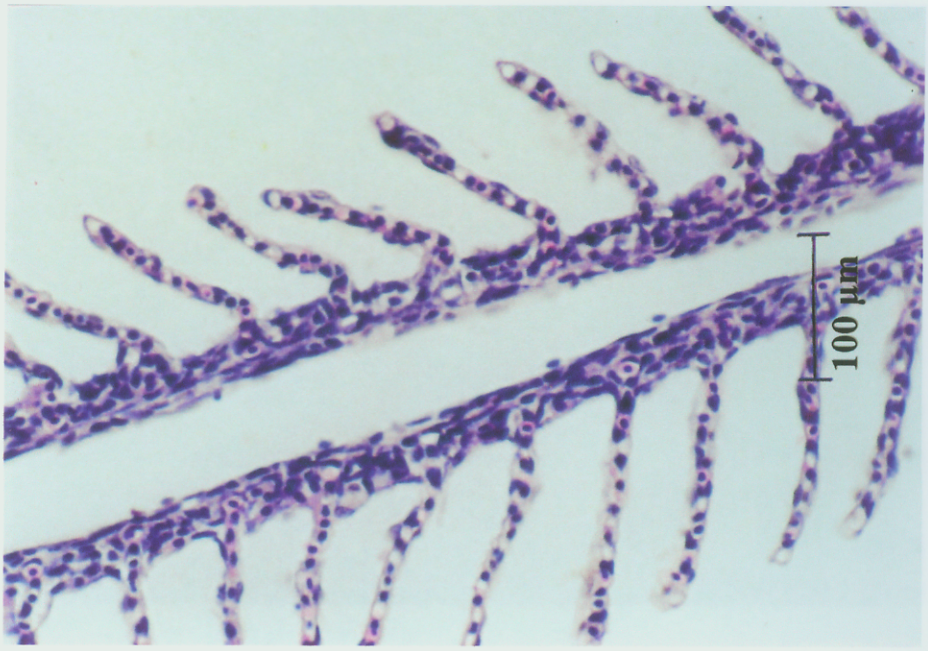
ภาพที่ 19 เกิดการอักเสบ (inflammation) และเกิดกรานูล (Gr) ในเนื้อเยื่อหัวใจของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



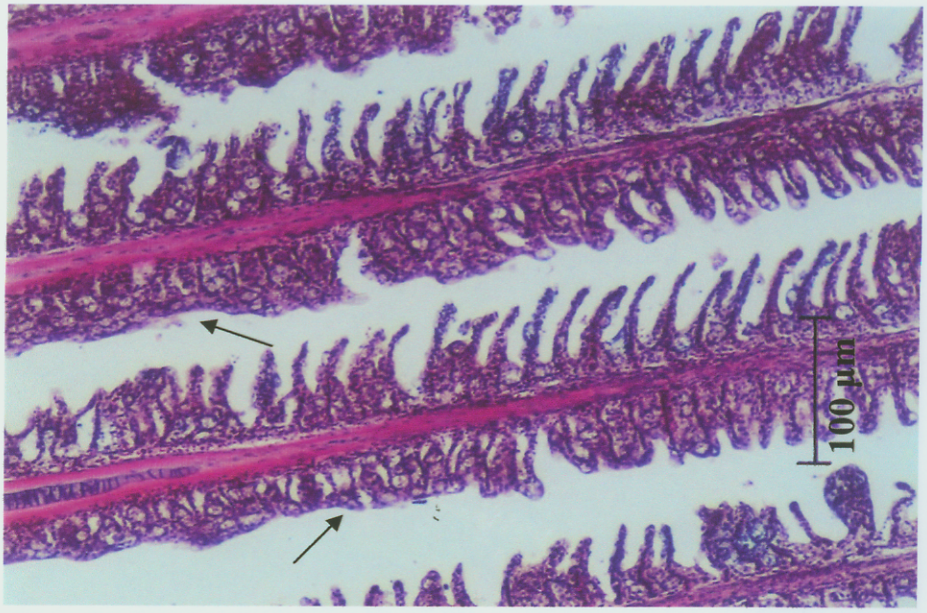
ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อสมองของปลากะพงขาวปกติ (H&E, Bar = 100 µm)



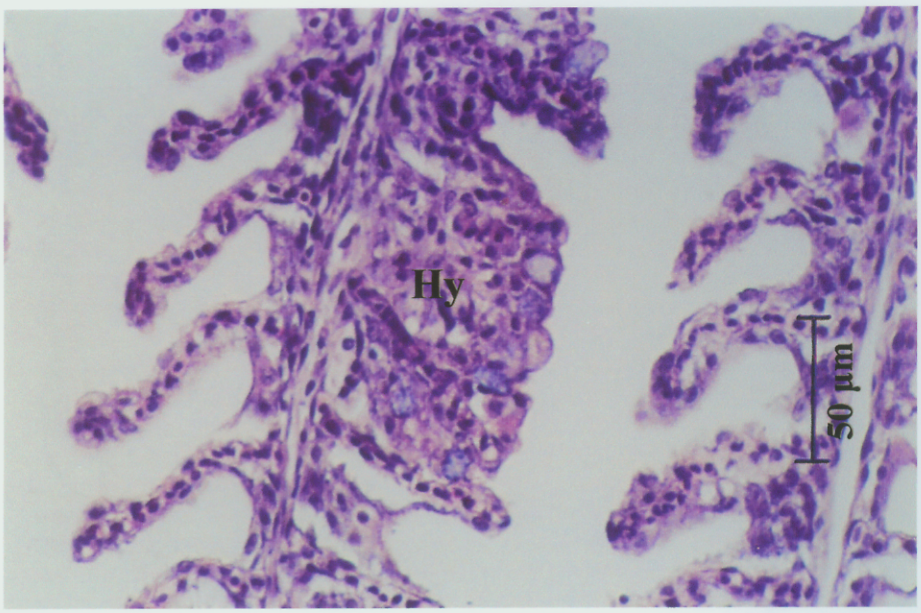
ภาพที่ 21 เกิดการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อสมอง (D) ของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



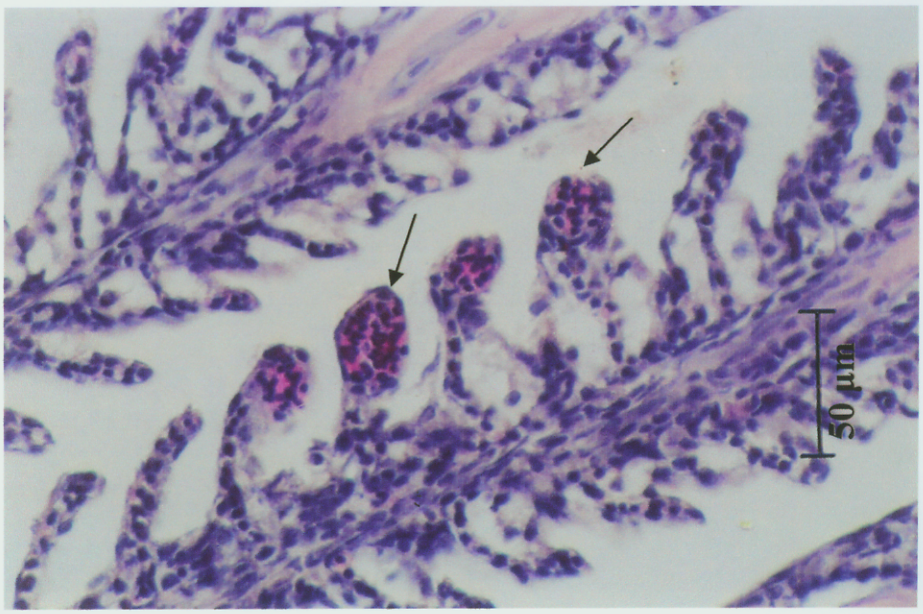
ภาพที่ 22 เนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวปกติ (H&E, Bar = 100 µm)



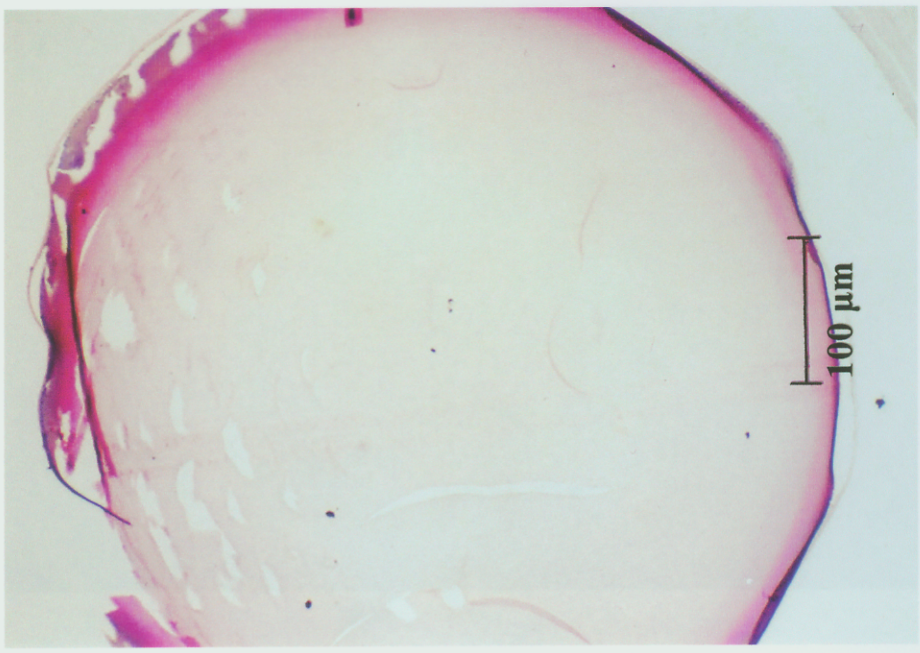
ภาพที่ 23 เซลล์บุผิวของ secondary lamellae เกิดการเชื่อมต่อกันเป็นรูปทรงกระบอง (club shaped) (ศรชี้) ในปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 100 µm)



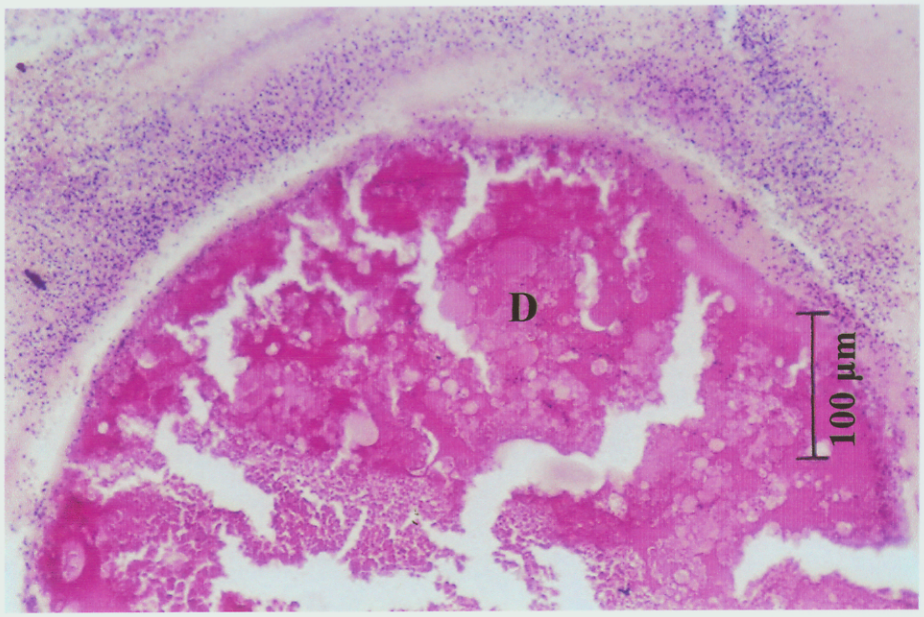
ภาพที่ 24 เซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการเพิ่มจำนวนมากผิดปกติ (hyperplasia) (Hy) ในปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



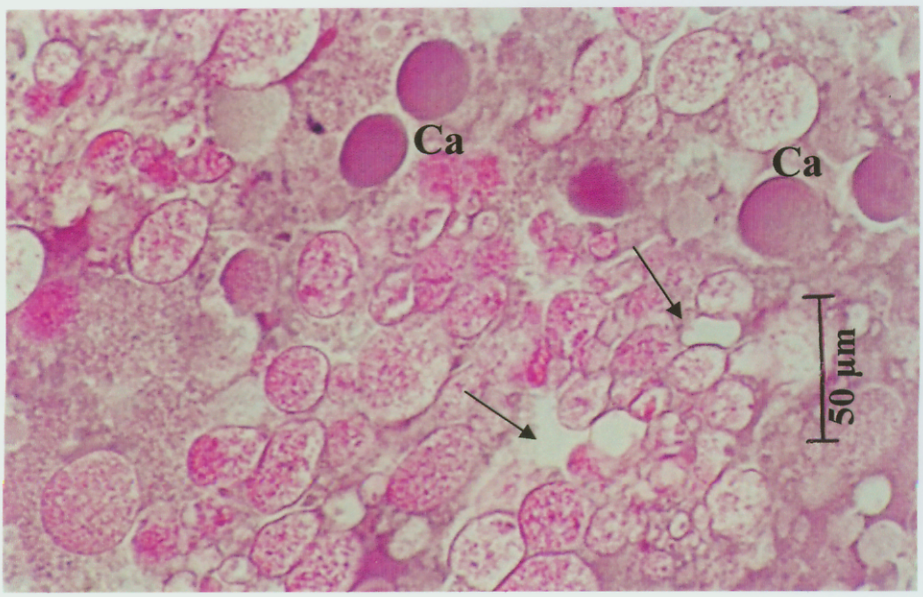
ภาพที่ 25 เกิดการขยายของเส้นเลือด (telangiectatic) (ศรชี้) บริเวณซี่เหงือกของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 26 เนื้อเยื่อตาของปลากะพงขาวปกติ เลนส์ตาปกติ (H&E, Bar = 100 µm)



ภาพที่ 27 เกิดการเสื่อมสภาพของเลนส์ตา (D) ในปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 100 µm)



ภาพที่ 28 เกิดการเสื่อมสภาพของเลนส์ตา โดยพบช่องว่าง (ศรชี้) และแคปซูล (capsule) (Ca) ซึ่งภายในแคปซูลมีเชื้อ *Streptococcus* sp. แทรกอยู่ ในปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. (H&E, Bar = 50 µm)

4. ผลการศึกษาการใช้วัคซีนในปลากะพงขาว

4.1 การผลิตวัคซีน

หลังจากที่นำเชื้อ *Streptococcus* sp. มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปปั่นล้างเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ก็จะได้ตะกอนของเชื้อ *Streptococcus* sp.นำไปทดสอบการปลอดเชื้อของวัคซีน ถ้าเชื้อยังเจริญให้เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญก็จะนำมาใช้เป็นวัคซีน

4.2 ความปลอดภัยของวัคซีน

จากการให้วัคซีนทั้ง 3 แบบ คือการฉีดเข้าช่องท้อง แช่ และกิน พบว่าไม่มีผลต่อปลากะพงขาวในทุกกลุ่มของการทดลอง เมื่อเลี้ยงไว้นาน 7 วัน หลังจากที่ได้รับวัคซีน (ตารางผนวกที่ ค5)ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นมามีความปลอดภัยในการใช้ในปลากะพงขาว

4.3 การตอบสนองของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณที่แตกต่างกัน

การทดสอบการตอบสนองต่อปริมาณเซลล์วัคซีนในปลากะพงขาว ในปลาชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดทดลองจะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ ฉีดวัคซีนที่ปริมาณเซลล์ของวัคซีนเท่ากับ 2.50×10^8, 2.50×10^9 และ 2.50×10^{10} CFU/ml หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 10, 20 และ 30 วัน จึงฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ค่า LD_{50} จากนั้นวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่อัตราการตาย ความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ พบว่าอัตราการตายของปลากะพงขาว ที่ 10 วันหลังจากได้รับวัคซีน ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^8 และ 2.50×10^9 CFU/ml ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 36.67 และ 36.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ 20 วัน ที่ปริมาณเซลล์ของวัคซีน 2.50×10^9 และ 2.50×10^{10} CFU/ml ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 64 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับที่ 30 วัน อัตราการตายของปลากะพงขาว มีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ในแต่ละปริมาณเซลล์วัคซีน มีค่าเท่ากับ 80.00, 66.67 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ส่วนความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) พบว่าที่ 10 วัน ค่า RPS ไม่มีความแตกต่างกันที่ปริมาณเซลล์ของวัคซีน 2.50×10^8 และ 2.50×10^9 CFU/ml (RPS = 55.99 เปอร์เซ็นต์) แต่มีความแตกต่างกับชุดที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml ที่มีค่า RPS

เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และที่ 20 วัน ค่า RPS ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^9 และ 2.50 x 10^{10} CFU/ml (RPS = 64 และ 72 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกับชุดปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^8 CFU/ml ที่มีค่า RPS เท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 30 วัน พบว่าค่า RPS ทั้ง 3 มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่า RPS เท่ากับ 14.28, 28.57 และ 57.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 29)

นอกจากนี้ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในชุดที่ได้รับวัคซีนและในชุดที่ไม่ได้รับวัคซีน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่าชุดควบคุมมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 0 ส่วนชุดที่ได้รับวัคซีนปริมาณเซลล์วัคซีนแตกต่างกัน จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ ที่ 10 วัน พบว่าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในแต่ละปริมาณเซลล์วัคซีนมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^{10} CFU/ml มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงสุด เท่ากับ 1:64 ส่วนที่ 20 วัน ในชุดควบคุมและปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^8 CFU/ml (1:32) ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x10^9 CFU/ml มีค่า 1:64 และที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^{10} CFU/ml เท่ากับ 1:128 และที่ 30 วัน ในชุดควบคุมและปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^8 CFU/ml (1:4) ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^9 CFU/ml (1:8) และที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^{10} CFU/ml เท่ากับ 1:16 (ตารางที่ 6 และภาพที่ 30)

ดังนั้นปริมาณเซลล์วัคซีนที่ระดับ 2.50 x 10^{10} CFU/ml จะให้ความคุ้มโรค (RPS) และแอนติบอดี้ดีที่สุด

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณเซลล์ของวัคซีนต่างกัน

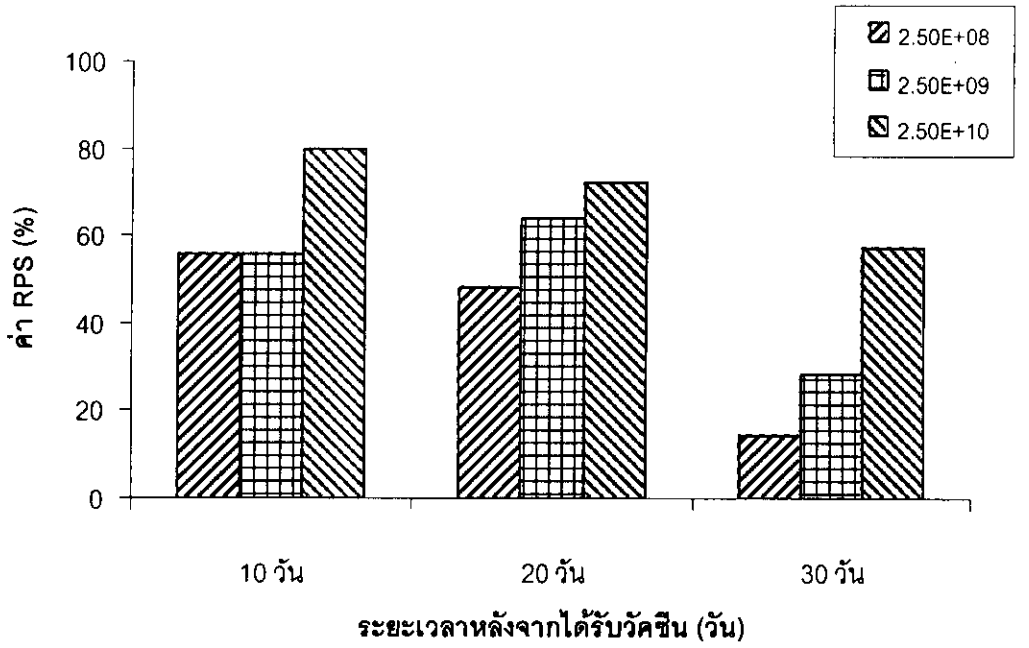
ปริมาณเซลล์ของวัคซีน (CFU)	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	83.33 [a]	-	83.33 [a]	-	93.33 [a]	-
$2.5x10^8$	36.67 [b]	55.99 [a]	43.33 [b]	48.00 [a]	80.00 [b]	14.28 [a]
$2.5x10^9$	36.67 [b]	55.99 [a]	30.00 [c]	64.00 [b]	66.67 [c]	28.57 [b]
$2.5x10^{10}$	16.67 [c]	80.00 [b]	23.33 [c]	72.00 [b]	40.00 [d]	57.14 [c]

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

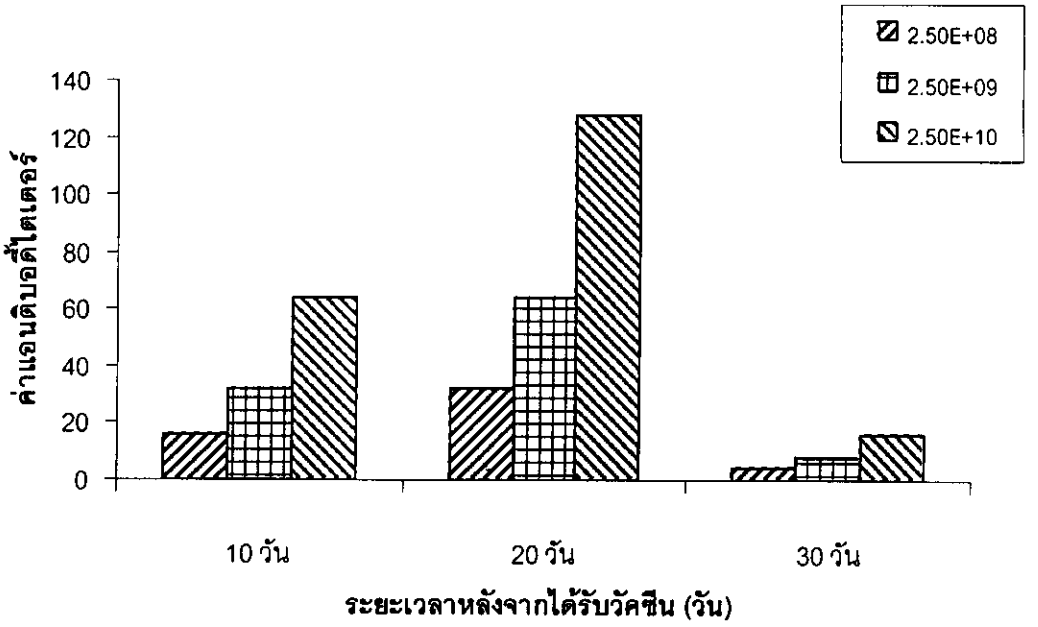
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณเซลล์วัคซีนต่างๆ

จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน	ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์			
	ชุดควบคุม	$2.50x10^8$	$2.50x10^9$	$2.50x10^{10}$
10 วัน	0 [a]	1:16 [b]	1:32 [c]	1:64 [d]
20 วัน	0 [a]	1:32 [ab]	1:64 [b]	1:128 [c]
30 วัน	0 [a]	1:4 [ab]	1:8 [b]	1:16 [c]

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)



ภาพที่ 29 เปรียบเทียบค่า RPS ของวัคซีนในปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 2.50 x 10^8, 2.50 x 10^9 และ 2.50 x 10^{10} CFU/ml โดยทำการวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มให้วัคซีน



ภาพที่ 30 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 2.50 x 10^8, 2.50 x 10^9 และ 2.50 x 10^{10} CFU/ml โดยทำการวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มให้วัคซีน

4.4 ผลการศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว

4.4.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

ในการทดลองจะให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด 2 แบบ คือ การฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA (Complete Freund's Adjuvant) และการฉีดวัคซีนผสม CFA ที่อัตรา 1:1 จากนั้นเก็บข้อมูลมาวิเคราะห์อัตราการตาย ค่า RPS และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ ในวันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มฉีดวัคซีน

4.4.1.1 อัตราการตาย

หลังจากฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ให้แก่ปลาที่ได้รับวัคซีน แล้วคำนวณค่าอัตราการตายของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA กับการฉีดวัคซีนผสม CFA ที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากฉีดวัคซีน พบว่าที่ 10 วัน การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดทั้ง 2 แบบ ทำให้ปลามีการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีอัตราการตาย 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 20 และ 30 วัน พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการฉีดวัคซีนผสม CFA มีอัตราการตาย 1.67 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA ที่มีค่าเท่ากับ 28.33 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

4.4.1.2 ค่า RPS

จากการทดลองพบว่าค่า RPS ที่ 10 วันแรกของการให้วัคซีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า RPS เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 20 วัน พบว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA และการฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่า RPS ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 54.06 และ 97.29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 30 วัน มีค่า RPS เท่ากับ 31.58 และ 73.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 7 และภาพที่ 31)

4.4.1.3 ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์

ผลการทดลองพบว่าในชุดควบคุมมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 0 และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากฉีดวัคซีน โดยการฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ1:64, 1:128 และ 1:128 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA อย่างมีนัยสำคัญ ที่มีค่าเท่ากับ 1:32, 1:32 และ 1:32 ตามลำดับ (ตารางที่ 8 และภาพที่ 32)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง

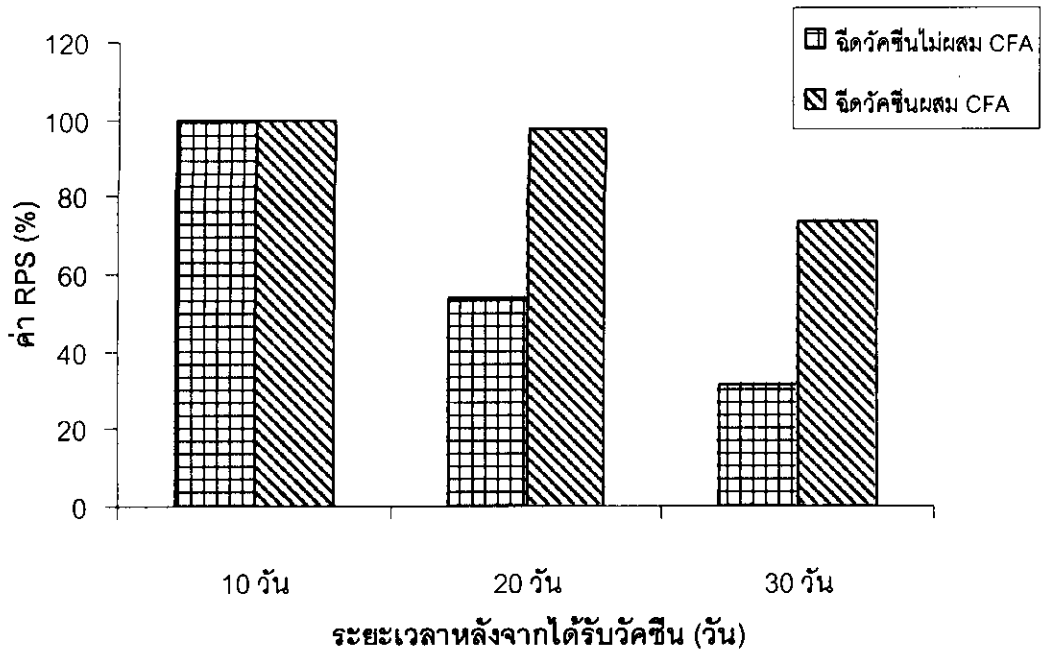
การให้วัคซีน	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	60.00 [a]	-	61.67 [a]	-	63.33 [a]	-
วัคซีนไม่ผสม CFA	0.00 [b]	100 [a]	28.33 [b]	54.06 [a]	43.33 [b]	31.58 [a]
วัคซีนที่ผสม CFA	0.00 [b]	100 [a]	1.67 [c]	97.29 [b]	16.67 [c]	73.68 [b]

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

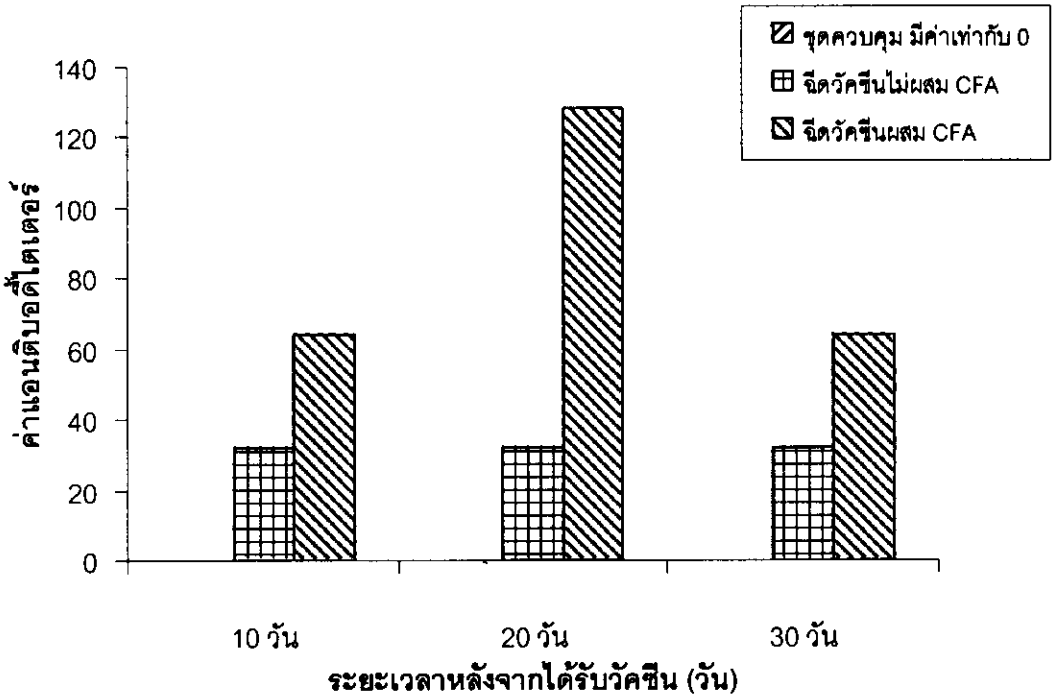
ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง

จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน	ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์		
	ชุดควบคุม	วัคซีนไม่ผสม CFA	วัคซีนผสม CFA
10 วัน	0 [a]	1:32 [b]	1:64 [c]
20 วัน	0 [a]	1:32 [b]	1:128 [c]
30 วัน	0 [a]	1:32 [b]	1:64 [c]

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)



ภาพที่ 31 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง



ภาพที่ 32 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง

4.4.2 **การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่**

ในการทดลองให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่ 2 แบบ คือ การแช่วัคซีนโดยตรงเป็นเวลา 30 วินาที และการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic โดยแช่ในน้ำเกลือที่มีความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปแช่วัคซีนอีก 30 วินาที จากนั้นเก็บข้อมูลมาวิเคราะห์อัตราการตาย ค่า RPS และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ ในวันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มแช่วัคซีน

4.4.2.1 **อัตราการตาย**

หลังจากฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ให้แก่ปลาที่ได้รับวัคซีน แล้วคำนวณค่าอัตราการตายของปลากะพงขาว พบว่าที่ 10 วัน อัตราการตายของปลากะพงขาว จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยค่าของชุดควบคุมมีอัตราการตาย 65 เปอร์เซ็นต์ ที่ 20 วัน พบว่าอัตราการตายของชุดควบคุมและชุดที่แช่วัคซีนโดยตรง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 68.33 และ 61.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะมีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดที่แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ที่มีค่าเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 30 วัน พบว่าอัตราการตายของชุดควบคุมและชุดที่แช่วัคซีนโดยตรง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 70 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดที่แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ที่มีค่าเท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

4.4.2.2 **ค่า RPS**

ผลการทดลองพบว่าที่ 10 วัน หลังจากได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 30.77 และ 71.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดลองที่ 20 วัน พบว่าการแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 9.75 และ 70.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ 30 วัน พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 7.14 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 33)

4.4.2.3 **ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์**

พบว่าที่ 10 วัน ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 1:8 และ 1:16 ตามลำดับ แต่จะมีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 0 สำหรับการทดลองที่ 20 วัน พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1:8 และ 1:64 ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ 30 วัน พบว่าชุดควบคุมและชุดที่แช่วัคซีนโดยตรงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่มีค่าเท่ากับ 0 และ 1:4 ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ

ชุดที่แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ซึ่งมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงสุด เท่ากับ 1:16 (ตารางที่ 10 และภาพที่ 34)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่

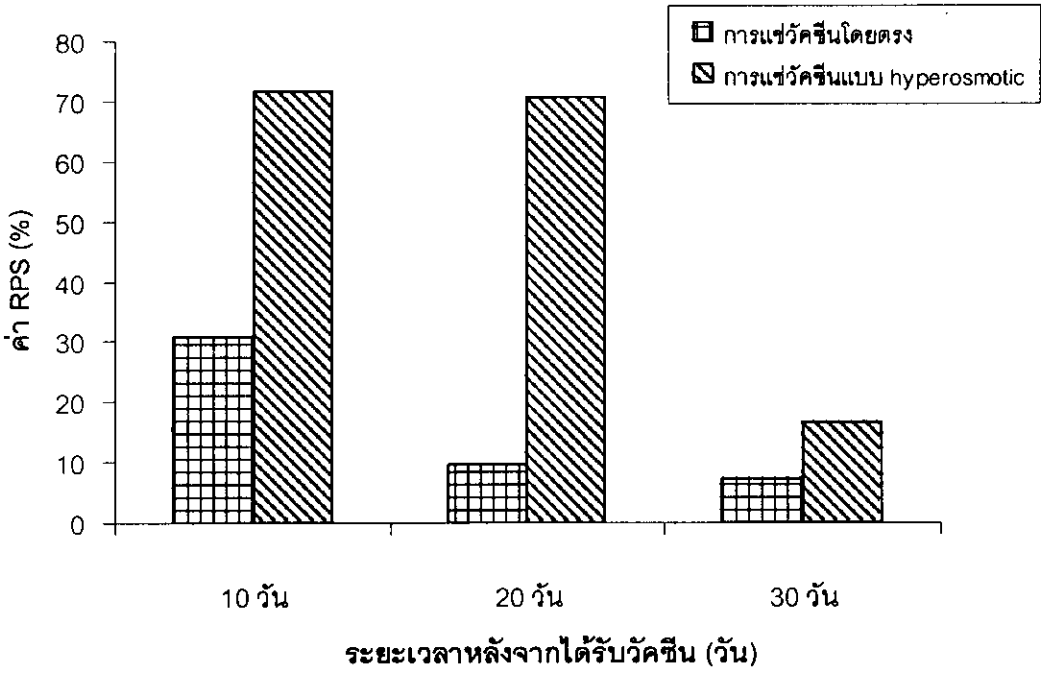
การให้วัคซีน	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	65.00[a]	-	68.33[a]	-	70.00[a]	-
แช่วัคซีนโดยตรง	45.00[b]	30.77[a]	61.67[a]	9.75[a]	65.00[a]	7.14[a]
แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic	18.33[c]	71.80[a]	20.00[b]	70.73[b]	58.33[b]	16.67[a]

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

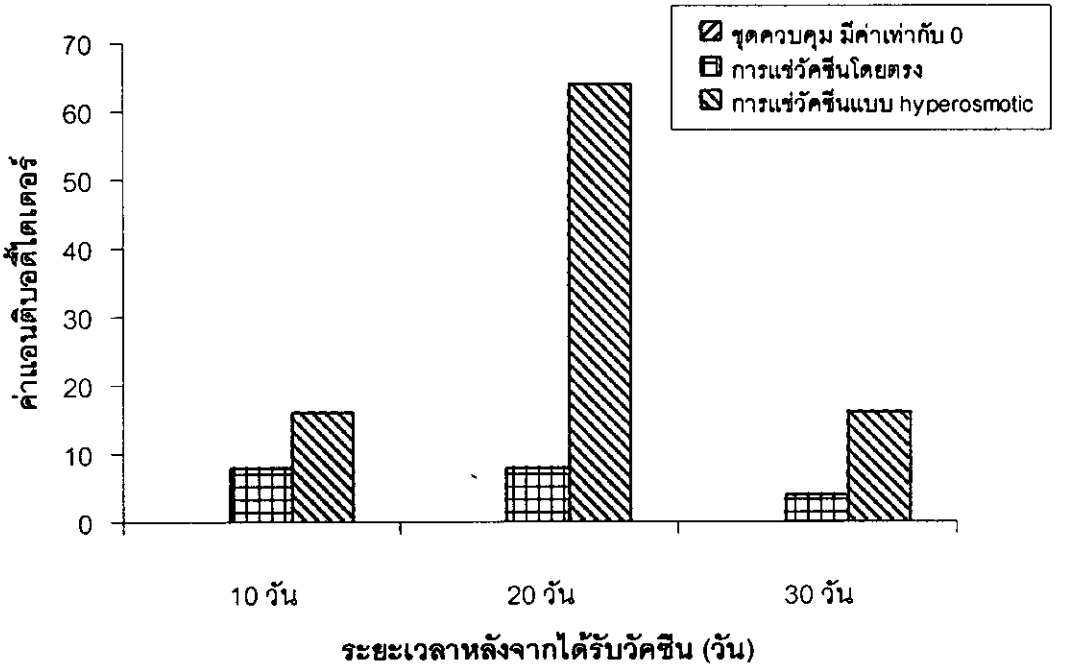
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่

จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน	ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์		
	ชุดควบคุม	แช่วัคซีนโดยตรง	แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic
10 วัน	0[a]	1:8[b]	1:16[b]
20 วัน	0[a]	1:8[b]	1:64[c]
30 วัน	0[a]	1:4[a]	1:16[b]

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)



ภาพที่ 33 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่



ภาพที่ 34 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่

4.4.3 **การให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน**

การทดลองให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน 2 แบบ คือ การกินอาหารผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน จากนั้นเก็บข้อมูลมาวิเคราะห์อัตราการตาย ค่า RPS และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ ในวันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มกินวัคซีน

4.4.3.1 **อัตราการตาย**

หลังจากฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ให้แก่ปลาที่ได้รับวัคซีน แล้วคำนวณค่าอัตราการตายของปลากะพงขาว พบว่าอัตราการตายของปลากะพงขาวที่ 10 และ 20 วัน การให้วัคซีนด้วยวิธีการให้ทั้ง 2 แบบ ปลาจะมีอัตราการรอดตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีอัตราการตาย 66.67 และ 66.67เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ 30 วัน พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีอัตราการตายเท่ากับ 33.33 และ 26.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีอัตราการตาย 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

4.4.3.2 **ค่า RPS**

จากการทดลองพบว่าค่า RPS ของการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติตลอดการทดลอง ที่ 10 และ 20 วัน โดยมีค่า RPS เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองที่ 30 วัน มีค่า RPS เท่ากับ 52.39 และ 61.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 35)

4.4.3.3 **ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์**

จากการทดลองพบว่าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ที่ 10 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดกินอาหารผสมวัคซีนกับชุดที่แช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1:32 และ 1:64 ตามลำดับ การทดลองที่ 20 วัน พบว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการกินจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 1:64 และ 1:128 ส่วนการทดลองที่ 30 วัน พบว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการกินจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 1:16 และ 1:32 แต่จะมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีค่าเท่ากับ 0 (ตารางที่ 12 และภาพที่ 36)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน

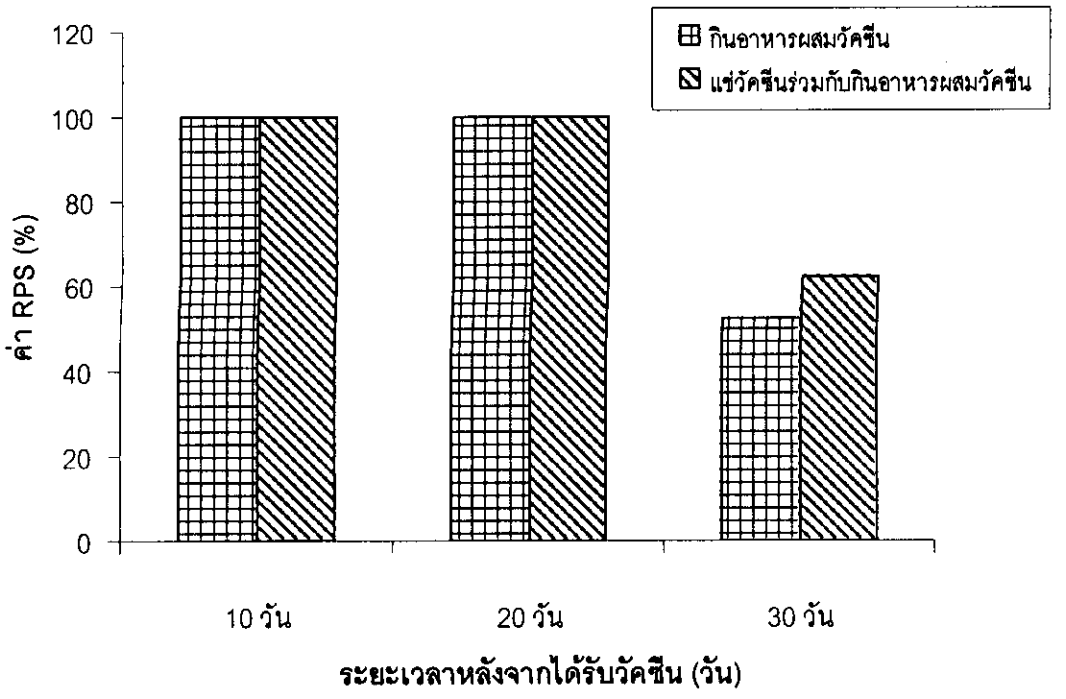
การให้วัคซีน	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	66.67 [a]	-	66.67 [a]	-	70.00 [a]	-
กินอาหารผสมวัคซีน	0.00 [b]	100 [a]	0.00 [b]	100 [a]	33.33 [b]	52.39 [a]
แช่วัคซีนร่วมกับกินอาหารผสมวัคซีน	0.00 [b]	100 [a]	0.00 [b]	100 [a]	26.67 [b]	61.90 [a]

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

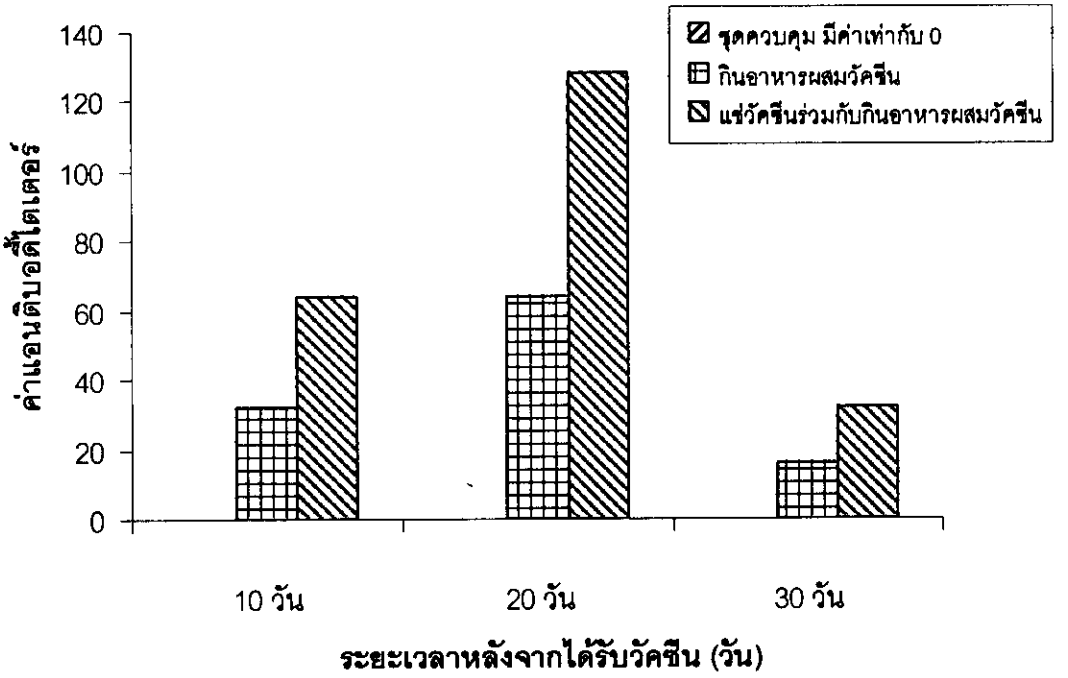
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน

จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน	ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์		
	ชุดควบคุม	กินอาหารผสมวัคซีน	แช่วัคซีนร่วมกับกินอาหารผสมวัคซีน
10 วัน	0 [a]	1:32 [b]	1:64 [b]
20 วัน	0 [a]	1:64 [b]	1:128 [b]
30 วัน	0 [a]	1:16 [b]	1:32 [b]

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)



ภาพที่ 35 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน



ภาพที่ 36 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เฉลี่ยของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า RPS โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าช่องท้องปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ การทดลองที่ 10 วันหลังจากได้รับวัคซีน พบว่าการแช่วัคซีน การแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic และการให้วัคซีนด้วยวิธีการอื่นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 30.77, 71.80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA การฉีดวัคซีนผสม CFA การกินอาหารผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่า RPS เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการทดลองที่ 20 วัน พบว่าการแช่วัคซีน การฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA และการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 9.75, 54.06 และ 70.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการฉีดวัคซีนผสม CFA การกินอาหารผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งมีค่า RPS เท่ากับ 97.29, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการทดลองที่ 30 วัน พบว่าการแช่วัคซีนและการฉีดวัคซีน มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 7.14 และ 31.58 เปอร์เซ็นต์ แต่การแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic มีค่า RPS เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการแช่วัคซีนและการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA ส่วนการกินอาหารผสมวัคซีนและการฉีดวัคซีนผสม CFA มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 52.39 และ 73.68 เปอร์เซ็นต์ แต่การแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่าเท่ากับ 61.90 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ การกินอาหารผสมวัคซีนและการฉีดวัคซีนผสม CFA (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน

วิธีให้วัคซีน	ค่า RPS (%)		
	10 วัน	20 วัน	30 วัน
การฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA	100.00 ^{c}	54.06 ^{b}	31.58 ^{b}
การฉีดวัคซีนผสม CFA	100.00 ^{c}	97.29 ^{d}	73.68 ^{d}
การแช่วัคซีน	30.77 ^{a}	9.75 ^{a}	7.14 ^{a}
การแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic	71.80 ^{b}	70.73 ^{c}	16.67 ^{ab}
การกินอาหารผสมวัคซีน	100.00 ^{c}	100.00 ^{d}	52.39 ^{c}
การแช่ร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน	100.00 ^{c}	100.00 ^{d}	61.90 ^{cd}

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

5. ผลการศึกษาองค์ประกอบเลือดปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน

5.1 ค่าฮีมาโตคริต

ค่าฮีมาโตคริตของปลากะพงขาวปกติมีค่าเท่ากับ 25.79 $\pm$ 0.58 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าฮีมาโตคริตของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA การฉีดวัคซีนผสม CFA การแช่วัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่าสูงในช่วง 1 วันแรกหลังจากได้รับวัคซีน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 33.38 $\pm$ 2.45 – 28.43 $\pm$ 2.20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นค่าฮีมาโตคริตลดลงเรื่อยๆ โดยที่การฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA มีค่าต่ำสุดในวันที่ 21 (23.14 $\pm$ 4.49 เปอร์เซ็นต์) การฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่าต่ำสุดในวันที่ 14 มีค่า 20.24 $\pm$ 4.79 เปอร์เซ็นต์ การแช่วัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่าต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 23.53 $\pm$ 1.43 และ 23.14 $\pm$ 4.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การแช่แบบ hyperosmotic มีค่าสูงสุดในวันที่ 2 เท่ากับ 29.53 $\pm$ 1.43เปอร์เซ็นต์ และมีค่าต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 24.35 $\pm$ 0.90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่าต่ำสุดในวันที่ 14 เท่ากับ 21.84 $\pm$ 3.70 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 เท่ากับ 28.69 $\pm$ 3.87 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 37)

5.2 **ค่าฮีโมโกลบิน**

ค่าฮีโมโกลบินของปลากะพงขาวปกติมีค่าเท่ากับ 6.36 ± 1.06 กรัม/เดซิลิตร ส่วนค่าฮีโมโกลบินของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน พบว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากได้รับวัคซีน โดยมีค่าเท่ากับ 7.12 ± 0.70 กรัม/เดซิลิตร และค่าฮีโมโกลบินลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดในวันที่ 21 เท่ากับ 4.19 ± 1.69 กรัม/เดซิลิตร การฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่าสูงสุดในวันที่ 1 หลังจากได้รับวัคซีน โดยมีค่าเท่ากับ 6.88 ± 0.71 กรัม/เดซิลิตร และมีค่าต่ำสุดในวันที่ 21 เท่ากับ 4.63 ± 1.02 กรัม/เดซิลิตร การแช่วัคซีนมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 มีค่าเท่ากับ 7.36 ± 0.93 กรัม/เดซิลิตร การแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic พบว่ามีค่าฮีโมโกลบินสูงสุดในวันที่ 2 มีค่าเท่ากับ 7.85 ± 0.63 กรัม/เดซิลิตร หลังจากนั้นค่าเริ่มลดลงและต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 5.93 ± 0.54 กรัม/เดซิลิตร และเริ่มสูงขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 14 และ 21 การกินอาหารผสมวัคซีนพบว่าในช่วงแรกของการให้วัคซีนจะมีค่าค่าฮีโมโกลบินต่ำ โดยมีค่าต่ำสุดในวันที่ 4 เท่า กับ 4.60 ± 0.63 กรัม/เดซิลิตร แต่หลังจากนั้นค่าเริ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 เท่ากับ 7.18 ± 0.48 กรัม/เดซิลิตร ส่วนการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน พบว่าในช่วง 4 วันแรกของการให้วัคซีนมีค่าฮีโมโกลบินสูง แต่มีค่าต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 5.06 ± 0.81 กรัม/เดซิลิตร หลังจากนั้นค่าจะเริ่มสูงขึ้น โดยสูงสุดในวันที่ 21 เท่ากับ 7.26 ± 0.89 กรัม/เดซิลิตร (ตารางที่ 15 และภาพที่ 38)

5.3 **ค่าพลาสมาโปรตีน**

ค่าพลาสมาโปรตีนของปลากะพงขาวปกติมีค่าเท่ากับ 4.54 ± 0.23 กรัมเปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าพลาสมาโปรตีนของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน พบว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA ในช่วง 4 วันแรก หลังจากได้รับวัคซีนมีค่าสูงและมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 5.18 ± 0.55 กรัมเปอร์เซ็นต์ การฉีดวัคซีนผสม CFA พบว่ามีค่าสูงสุดในช่วงวันแรกหลังจากได้รับวัคซีน โดยมีค่าเท่ากับ 4.81 ± 0.54 กรัมเปอร์เซ็นต์ และค่าต่ำสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 3.22 ± 1.08 กรัมเปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นค่าจะเริ่มสูงขึ้น การแช่วัคซีนและการแช่แบบ hyperosmotic พบว่าในช่วง 14 วันหลังจากได้รับวัคซีนมีค่าพลาสมาโปรตีนต่ำ โดยมีค่าต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 4.16 ± 0.44 และ 4.13 ± 0.22 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 เท่ากับ 5.81 ± 0.54 และ 5.76 ± 0.68 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการกินอาหารผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน พบ ว่ามีค่าสูงสุดในวันแรกหลังจากได้รับวัคซีน โดยมีค่าเท่ากับ 5.36 ± 0.23 และ 6.01 ± 0.45 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นค่าเริ่มลดลงจน

ต่ำสุดในวันที่ 14 เท่ากับ 4.47 $\pm$ 0.93 กรัมเปอร์เซ็นต์ ส่วนการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่าต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 4.42 $\pm$ 0.18 กรัมเปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16 และภาพที่ 39)

5.4 ปริมาณเม็ดเลือดแดง

ปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาวปกติมีค่าเท่ากับ 5.76 $\pm$ 0.42 x10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ส่วนปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนไม่ผสม CFA มีค่าสูงสุดในวันแรก หลังจากได้รับวัคซีน มีค่าเท่ากับ 7.24 $\pm$ 0.55 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร หลังจากนั้นค่าจะลดลงเรื่อยๆ จนต่ำสุดในวันที่ 21 เท่ากับ 5.11 $\pm$ 0.52 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร การฉีดวัคซีนผสม CFA พบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 6.18 $\pm$ 0.44 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร และค่าลดลงต่ำสุดในวันที่ 14 เท่ากับ 4.87 $\pm$ 0.26 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร การแช่วัคซีนพบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 และลดลงจนต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 6.44 $\pm$ 0.86 และ 5.36 $\pm$ 0.44 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ตามลำดับ การแช่แบบ hyperosmotic พบว่ามีค่าสูงสุดในช่วงวันแรกของการให้วัคซีน มีค่าเท่ากับ 6.74 $\pm$ 0.25 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดแดงมีแนวโน้มลดลง จนต่ำสุดในวันที่ 14 มีค่าเท่ากับ 5.77 $\pm$ 0.16 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ส่วนการกินอาหารผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน พบว่ามีค่าสูงสุดในวันแรกหลังจากได้รับวัคซีน โดยมีค่าเท่ากับ 6.43 $\pm$ 0.36 และ 6.42 $\pm$ 0.55 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีแนวโน้มลดลง จนต่ำสุดในวันที่ 14 คือมีค่าเท่ากับ 5.26 $\pm$ 0.14 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ส่วนการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีนมีค่าต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 5.21 $\pm$ 0.48 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร (ตารางที่ 17 และภาพที่ 40)

5.5 ปริมาณเม็ดเลือดขาว

ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวปกติมีค่าเท่ากับ 2.93 $\pm$ 0.66 x10^4 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ส่วนปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน พบว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA และการฉีดวัคซีนที่ผสม CFA มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากได้รับวัคซีน มีค่าเท่ากับ 12.92 $\pm$ 1.94 และ 13.09 $\pm$ 0.61 x 10^4 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นค่าปริมาณเม็ดเลือดขาวมีแนวโน้มลดลงจนต่ำสุดในวันที่ 21 มีค่าเท่ากับ 4.50 $\pm$ 1.63 และ 5.80 $\pm$ 0.52 x 10^4 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร การแช่วัคซีนพบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 2 และมีค่าต่ำสุดในวันที่ 21 มีค่าเท่ากับ 9.72 $\pm$ 3.03 และ 5.22 $\pm$ 0.76 x 10^4

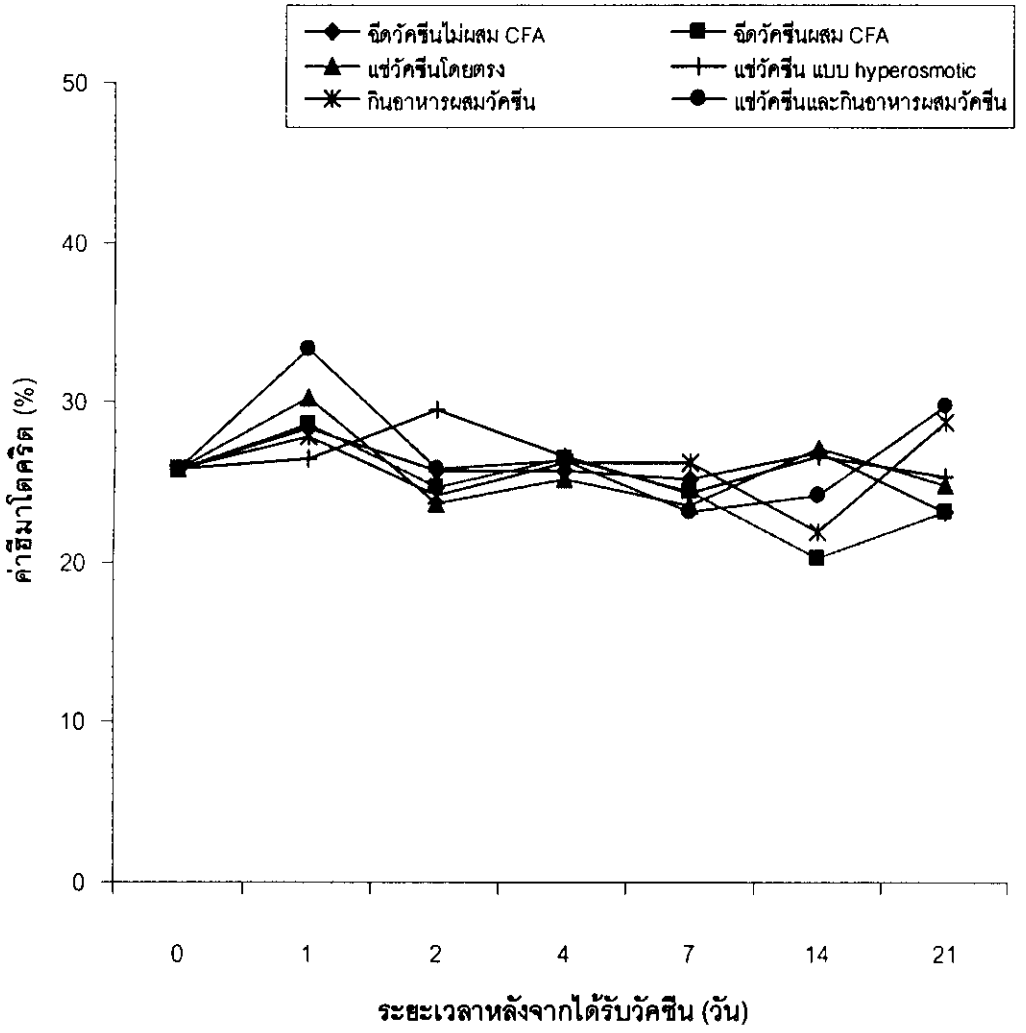
เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ตามลำดับ การแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic พบว่ามีค่าสูงสุดในวันแรกหลังจากได้รับวัคซีน มีค่าเท่ากับ $9.51 \pm 0.63 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดขาวมีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อยและมีค่าต่ำสุดในวันที่ 21 หลังจากได้รับวัคซีนมีค่าเท่ากับ $5.65 \pm 0.99 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร การกินอาหารผสมวัคซีน พบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 14 และมีค่าต่ำสุดในวันที่ 21 มีค่าเท่ากับ 6.82 ± 0.75 และ $5.51 \pm 2.38 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ส่วนการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน พบว่าในวันที่ 1 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ $9.23 \pm 0.68 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร และมีค่าต่ำสุดในวันที่ 2 มีค่าเท่ากับ $4.71 \pm 0.84 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร (ตารางที่ 18 และภาพที่ 41)

ตารางที่ 14 ค่าฮีมาโตคริต (haematocrite : %) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการต่างๆ กัน

การให้วัคซีน	ฮีมาโตคริต (เปอร์เซ็นต์)					
	1 วัน	2 วัน	4 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ฉีดวัคซีนที่ไม่ผสม CFA	28.43 ± 2.20	25.67 ± 2.07	25.70 ± 1.51	25.14 ± 2.17	26.88 ± 1.55	23.14 ± 4.49
ฉีดวัคซีนที่ผสม CFA	28.61 ± 3.89	24.70 ± 1.74	26.50 ± 0.93	24.45 ± 1.75	20.24 ± 4.79	23.17 ± 4.39
แช่วัคซีนโดยตรง	30.34 ± 1.26	23.72 ± 2.94	25.23 ± 1.99	23.53 ± 0.73	27.05 ± 1.39	24.81 ± 1.44
แช่วัคซีน แบบ hyperosmotic	26.46 ± 1.47	29.53 ± 1.43	26.64 ± 1.75	24.35 ± 0.90	26.63 ± 1.25	25.30 ± 0.63
กินอาหารที่ผสมวัคซีน	27.89 ± 2.34	24.18 ± 2.65	26.27 ± 2.53	26.26 ± 2.60	21.84 ± 3.70	28.69 ± 3.87
แช่วัคซีนและกินอาหารที่ผสมวัคซีน	33.38 ± 2.45	25.81 ± 1.09	26.38 ± 3.89	23.14 ± 4.64	24.23 ± 3.61	29.79 ± 2.69

หมายเหตุ : ค่าฮีมาโตคริตของปลากะพงขาวปกติ 25.79 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน



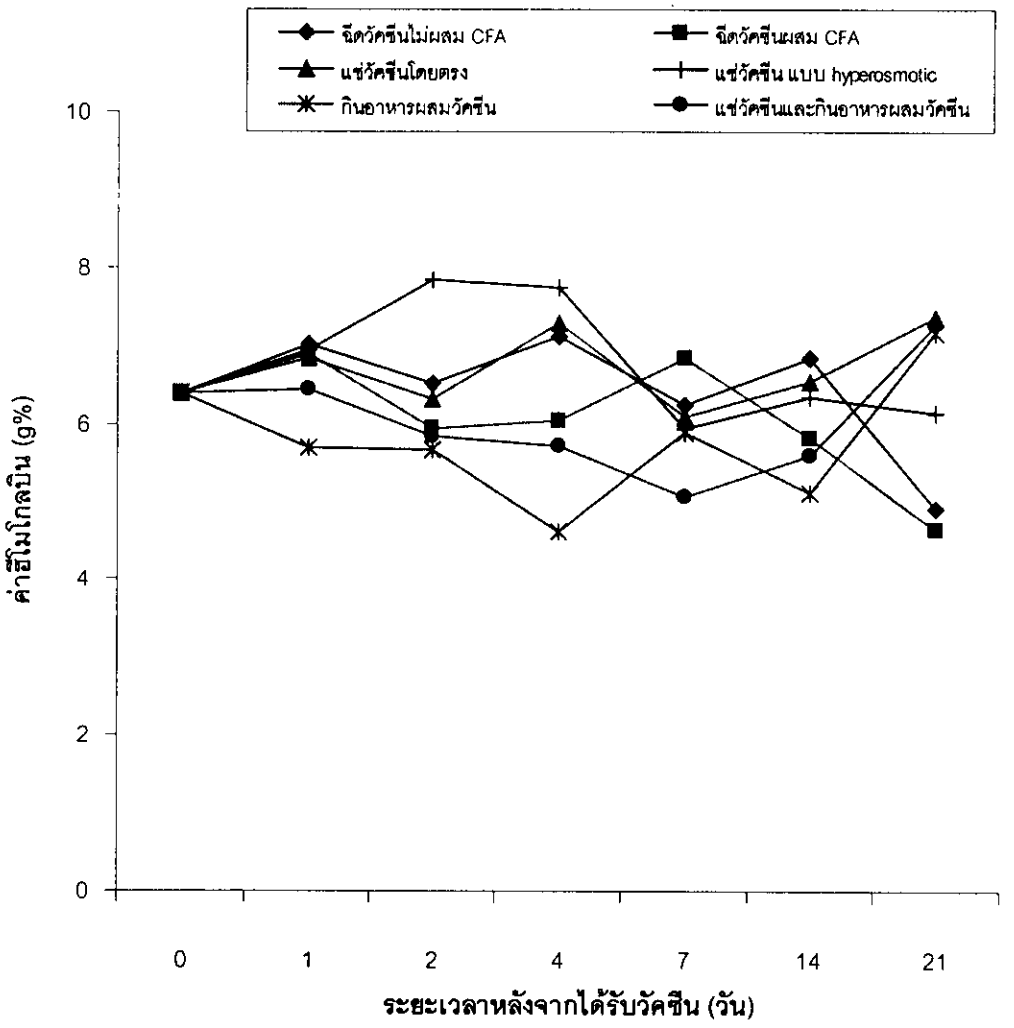
ภาพที่ 37 ค่าฮีมาโตคริตของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ

ตารางที่ 15 ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin : g/dl) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการต่างๆ กัน

การให้วัคซีน	ฮีโมโกลบิน (กรัม/เดซิลิตร)					
	1 วัน	2 วัน	4 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ฉีดวัคซีนที่ไม่ผสม CFA	7.01 ± 0.39	6.52 ± 0.66	7.12 ± 0.70	6.23 ± 0.39	6.83 ± 0.72	4.91 ± 1.69
ฉีดวัคซีนที่ผสม CFA	6.88 ± 0.71	5.92 ± 0.66	6.04 ± 1.08	6.83 ± 0.66	5.81 ± 0.31	4.63 ± 1.02
แช่วัคซีนโดยตรง	6.83 ± 0.11	6.32 ± 0.64	7.29 ± 0.22	6.08 ± 0.45	6.55 ± 0.35	7.36 ± 0.93
แช่วัคซีน แบบ hyperosmotic	6.95 ± 0.37	7.85 ± 0.67	7.74 ± 0.57	5.93 ± 0.54	6.34 ± 0.35	6.15 ± 0.32
กินอาหารที่ผสมวัคซีน	5.70 ± 1.48	5.67 ± 1.33	4.60 ± 0.63	5.88 ± 0.36	5.11 ± 0.57	7.18 ± 0.48
แช่วัคซีนและกินอาหารที่ผสมวัคซีน	6.44 ± 0.91	5.85 ± 1.30	5.72 ± 0.81	5.06 ± 0.81	5.59 ± 1.30	7.26 ± 0.89

หมายเหตุ : ค่าฮีโมโกลบินของปลากะพงขาวปกติ 6.39 ± 1.06 กรัม/เดซิลิตร

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน



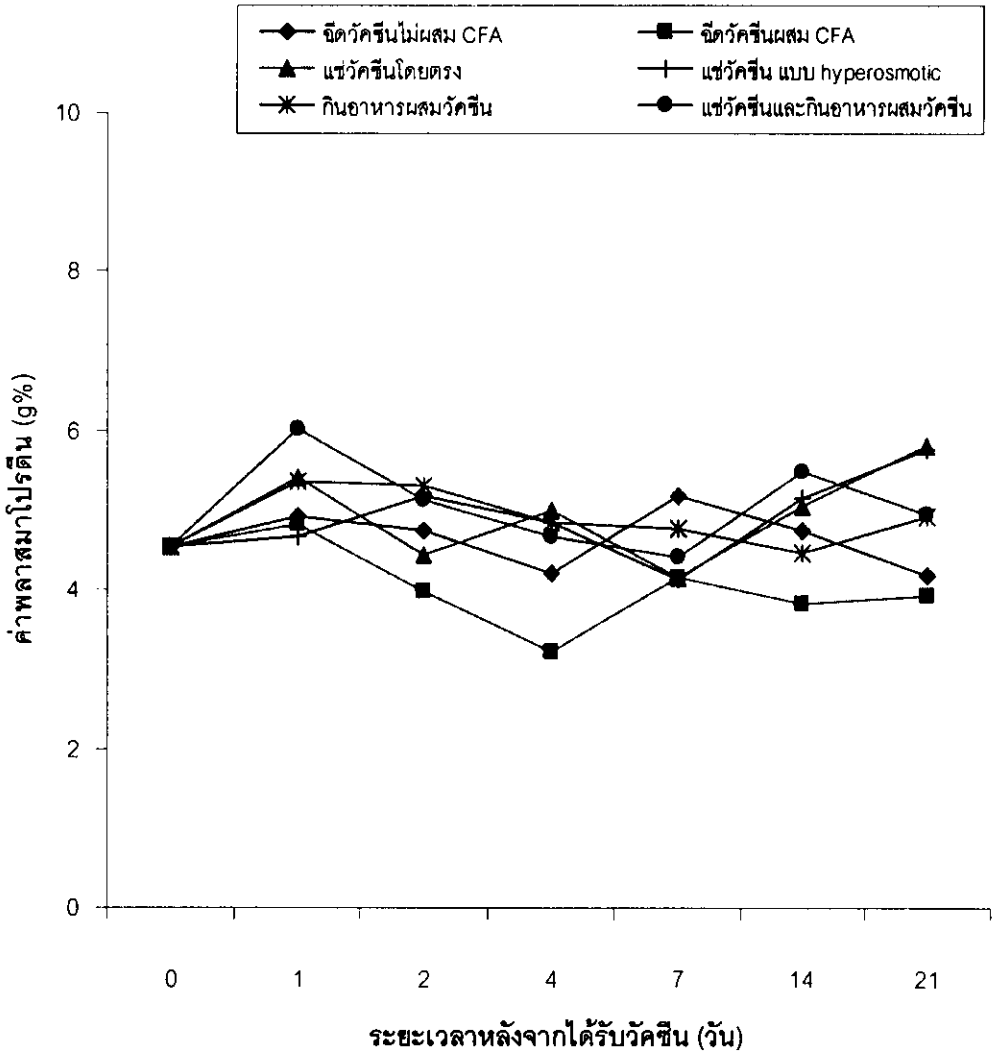
ภาพที่ 38 ค่าฮีโมโกลบินของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ

ตารางที่ 16 ค่าพลาสมาโปรตีน (plasma protein : g%) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการต่างๆ กัน

การให้วัคซีน	พลาสมาโปรตีน (กรัมเปอร์เซ็นต์)					
	1 วัน	2 วัน	4 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ฉีดวัคซีนที่ไม่ผสม CFA	4.93 ± 0.46	4.75 ± 0.41	4.20 ± 0.82	5.18 ± 0.55	4.75 ± 0.37	4.18 ± 0.43
ฉีดวัคซีนที่ผสม CFA	4.81 ± 0.54	3.99 ± 0.35	3.22 ± 1.08	4.17 ± 0.75	3.82 ± 0.76	3.92 ± 0.29
แช่วัคซีนโดยตรง	5.42 ± 0.18	4.43 ± 0.74	5.00 ± 0.53	4.16 ± 0.44	5.04 ± 0.44	5.81 ± 0.54
แช่วัคซีน แบบ hyperosmotic	4.68 ± 0.66	5.17 ± 0.38	4.84 ± 0.51	4.13 ± 0.22	5.15 ± 0.71	5.76 ± 0.68
กินอาหารที่ผสมวัคซีน	5.36 ± 0.23	5.31 ± 0.33	4.85 ± 0.51	4.78 ± 0.42	4.47 ± 0.93	4.92 ± 0.57
แช่วัคซีนและกินอาหารที่ผสมวัคซีน	6.01 ± 0.45	5.14 ± 0.48	4.67 ± 0.66	4.42 ± 0.18	5.48 ± 0.43	5.15 ± 0.29

หมายเหตุ : ค่าพลาสมาโปรตีนของปลากะพงขาวปกติ 4.54 ± 0.23 กรัมเปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน



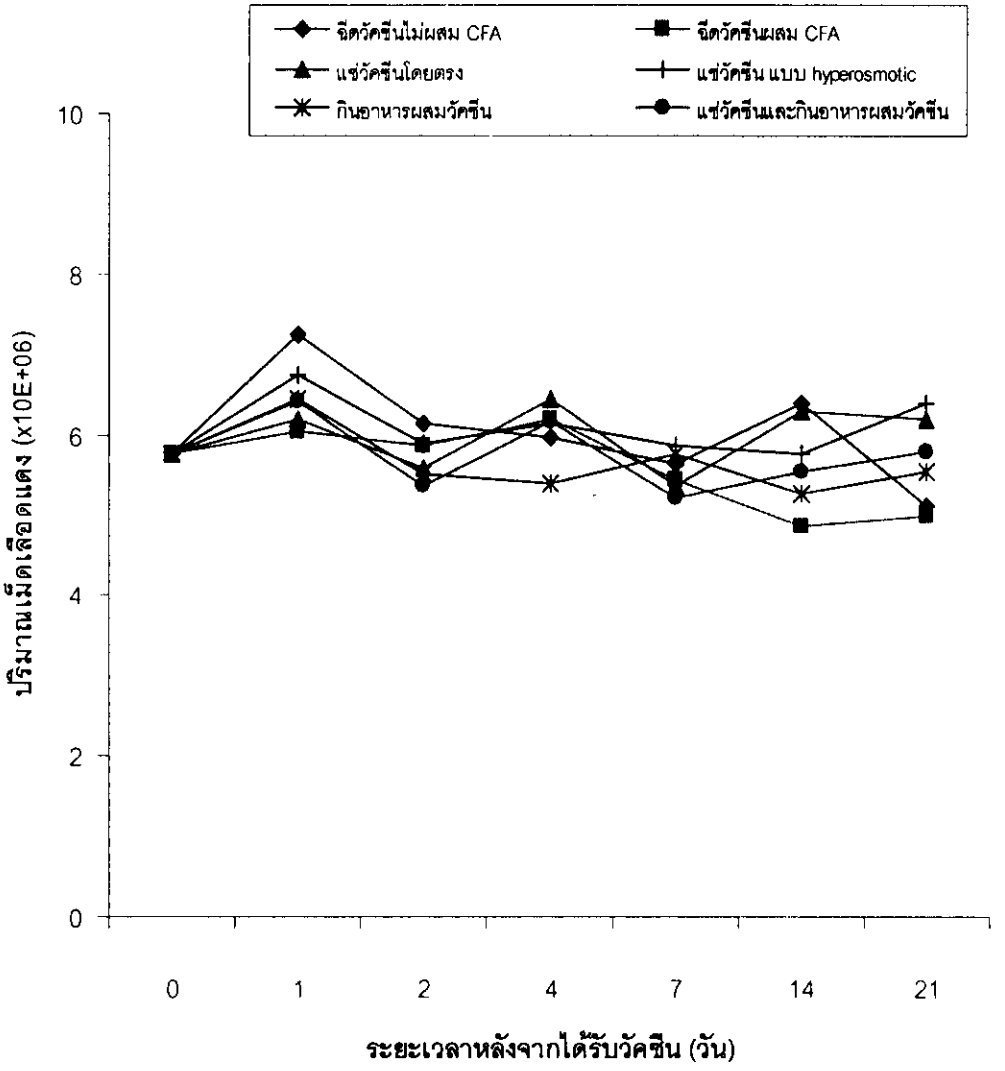
ภาพที่ 39 ค่าพลาสมาโปรตีนของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ

ตารางที่ 17 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cell : x 10^6 cell/mm^3) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการต่างๆ กัน

การให้วัคซีน	ปริมาณเม็ดเลือดแดง (x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร)					
	1 วัน	2 วัน	4 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ฉีดวัคซีนที่ไม่ผสม CFA	7.24 $\pm$ 0.55	6.15 $\pm$ 0.91	5.96 $\pm$ 0.71	5.65 $\pm$ 0.16	6.40 $\pm$ 0.10	5.11 $\pm$ 0.52
ฉีดวัคซีนที่ผสม CFA	6.03 $\pm$ 0.60	5.87 $\pm$ 0.20	6.18 $\pm$ 0.44	5.43 $\pm$ 0.28	4.87 $\pm$ 0.26	4.99 $\pm$ 0.63
แช่วัคซีนโดยตรง	6.20 $\pm$ 0.38	5.59 $\pm$ 0.46	6.44 $\pm$ 0.86	5.36 $\pm$ 0.44	6.30 $\pm$ 0.39	6.18 $\pm$ 0.45
แช่วัคซีน แบบ hyperosmotic	6.74 $\pm$ 0.25	5.89 $\pm$ 0.47	6.14 $\pm$ 0.67	5.87 $\pm$ 0.77	5.77 $\pm$ 0.16	6.40 $\pm$ 0.18
กินอาหารที่ผสมวัคซีน	6.43 $\pm$ 0.36	5.52 $\pm$ 0.26	5.40 $\pm$ 0.27	5.76 $\pm$ 0.29	5.26 $\pm$ 0.14	5.55 $\pm$ 0.27
แช่วัคซีนและกินอาหารที่ผสมวัคซีน	6.42 $\pm$ 0.55	5.37 $\pm$ 0.28	6.17 $\pm$ 0.76	5.21 $\pm$ 0.48	5.53 $\pm$ 0.35	5.78 $\pm$ 0.28

หมายเหตุ : ปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาวปกติ 5.76 $\pm$ 0.42 x 10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร

ค่าเฉลี่ย$\pm$ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน



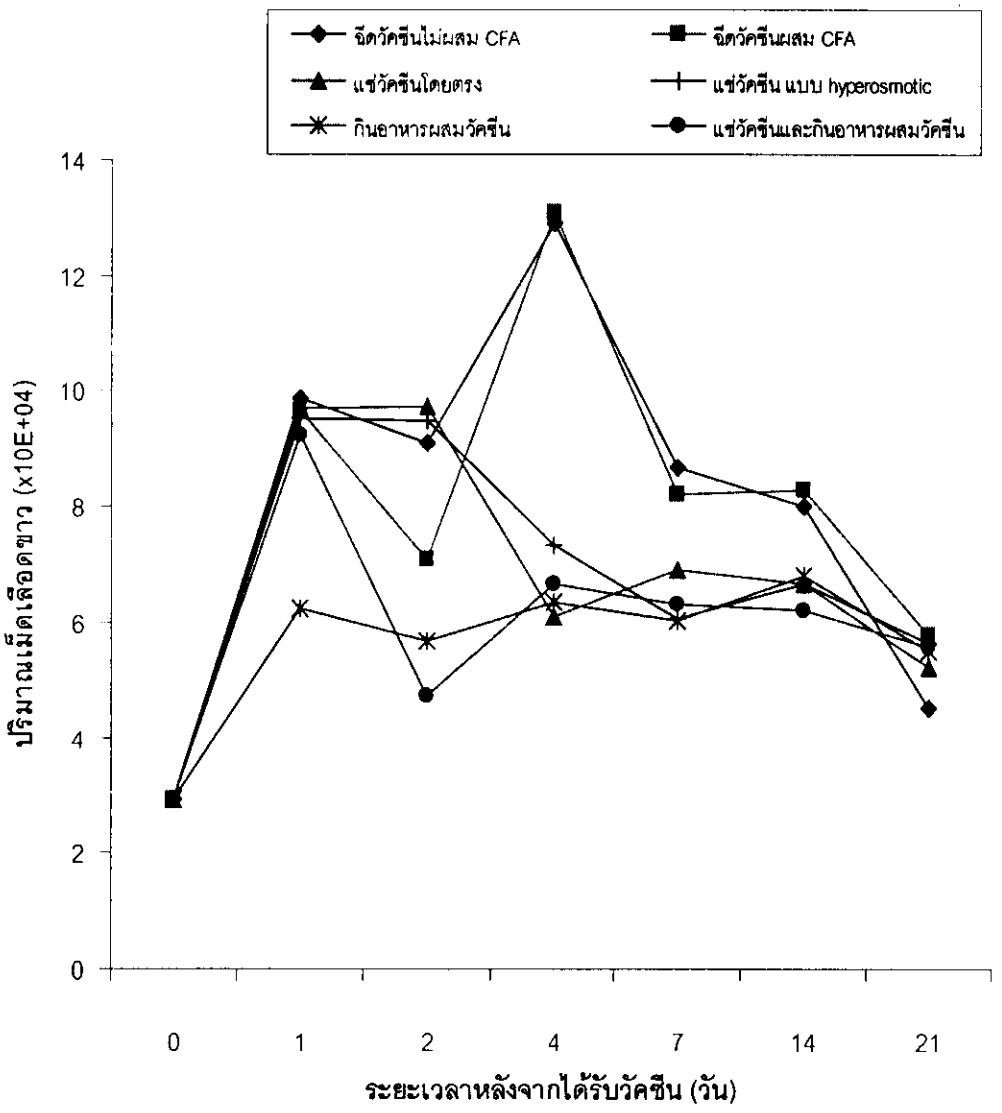
ภาพที่ 40 ปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ

ตารางที่ 18 ปริมาณเม็ดเลือดขาว (white blood cell : x 10^4 cell/mm^3) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการต่างๆ กัน

การให้วัคซีน	ปริมาณเม็ดเลือดขาว (x 10^4 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร)					
	1 วัน	2 วัน	4 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ฉีดวัคซีนที่ไม่ผสม CFA	9.86 ± 2.36	9.11 ± 2.21	12.92 ± 1.94	8.67 ± 1.11	8.02 ± 0.81	4.50 ± 1.63
ฉีดวัคซีนที่ผสม CFA	9.65 ± 1.55	7.09 ± 0.79	13.09 ± 0.61	8.23 ± 1.60	8.27 ± 0.32	5.80 ± 0.52
แช่วัคซีนโดยตรง	9.71 ± 1.70	9.72 ± 3.03	6.09 ± 4.86	6.90 ± 1.07	6.67 ± 1.14	5.22 ± 0.76
แช่วัคซีน แบบ hyperosmotic	9.51 ± 0.63	9.48 ± 2.37	7.34 ± 1.49	6.07 ± 2.00	6.66 ± 2.27	5.65 ± 0.99
กินอาหารที่ผสมวัคซีน	6.23 ± 0.78	5.67 ± 0.85	6.33 ± 0.90	6.07 ± 1.25	6.82 ± 0.75	5.51 ± 2.38
แช่วัคซีนและกินอาหารที่ผสมวัคซีน	9.23 ± 0.68	4.71 ± 0.84	6.67 ± 1.36	6.31 ± 0.88	6.22 ± 1.19	5.58 ± 1.98

หมายเหตุ : ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวปกติ 2.93 ± 0.66 x 10^4 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน

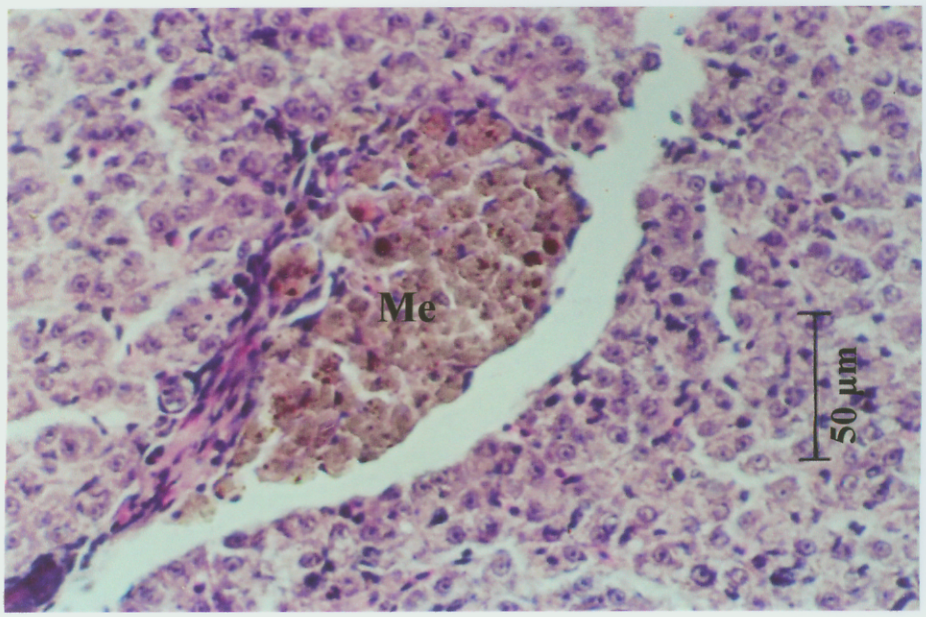


ภาพที่ 41 ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ

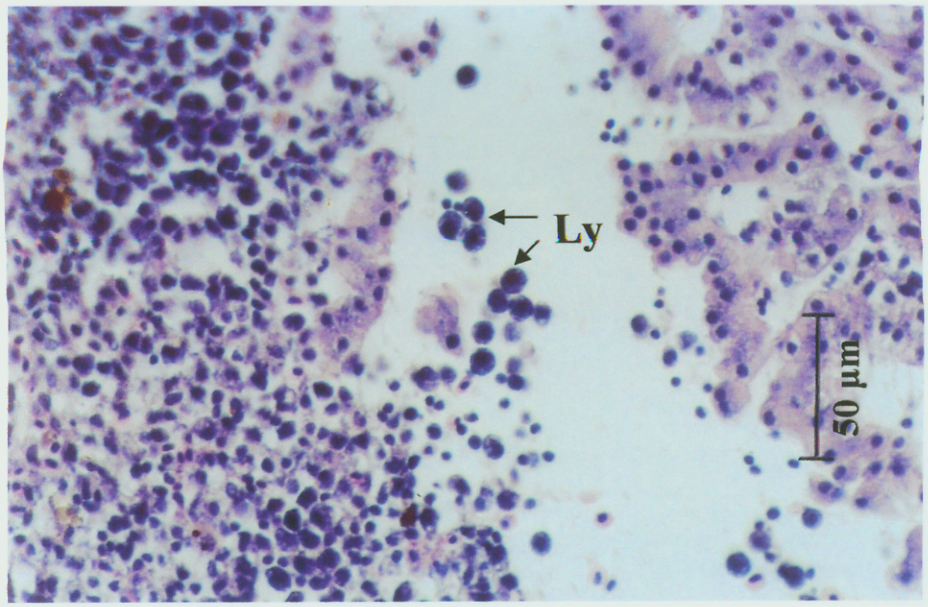
6. ผลการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน

6.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

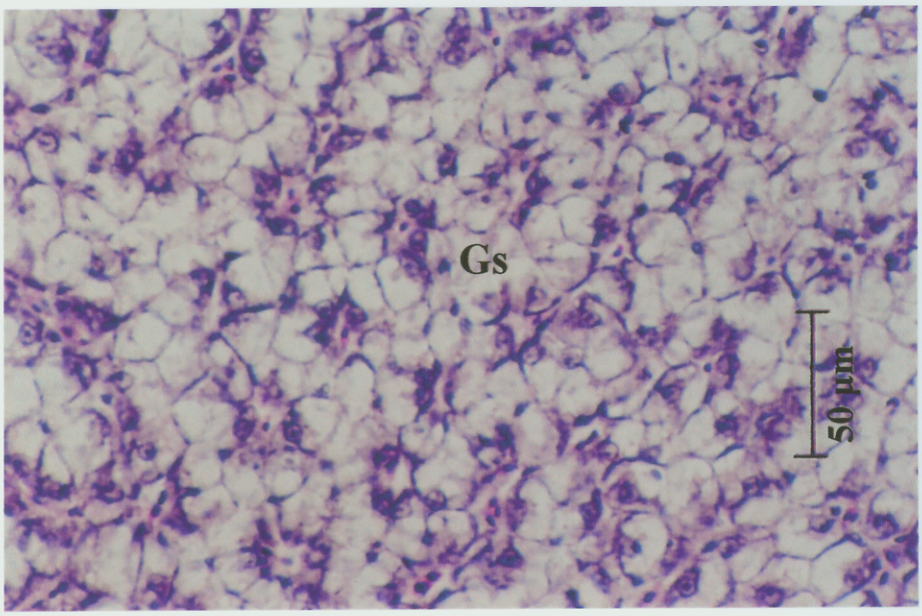
จากการศึกษาพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนทั้งวิธีการฉีดวัคซีนผสม CFA และฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อดังนี้ หลังจากฉีดวัคซีนผ่านไปแล้ว 1 วัน พบว่ามีเมลาโนแมคโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับของปลาที่ฉีดวัคซีนผสม CFA เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 42) แต่หลังจากนั้นมีการเพิ่มจำนวนของลิมโฟซัยท์ในเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าหลังจากฉีดวัคซีน 2 วัน (ภาพที่ 43) ส่วนในวันที่ 4 หลังจากฉีดวัคซีนผสม CFA พบว่าเกิดการสะสมไกลโคเจนในเนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 44) การหดตัวของโกลเมอรูลัสในเนื้อเยื่อไตส่วนหลัง (ภาพที่ 45) รวมทั้งเกิดการบวมน้ำ ซึ่งเป็นการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณขี่เหงือก (ภาพที่ 46)



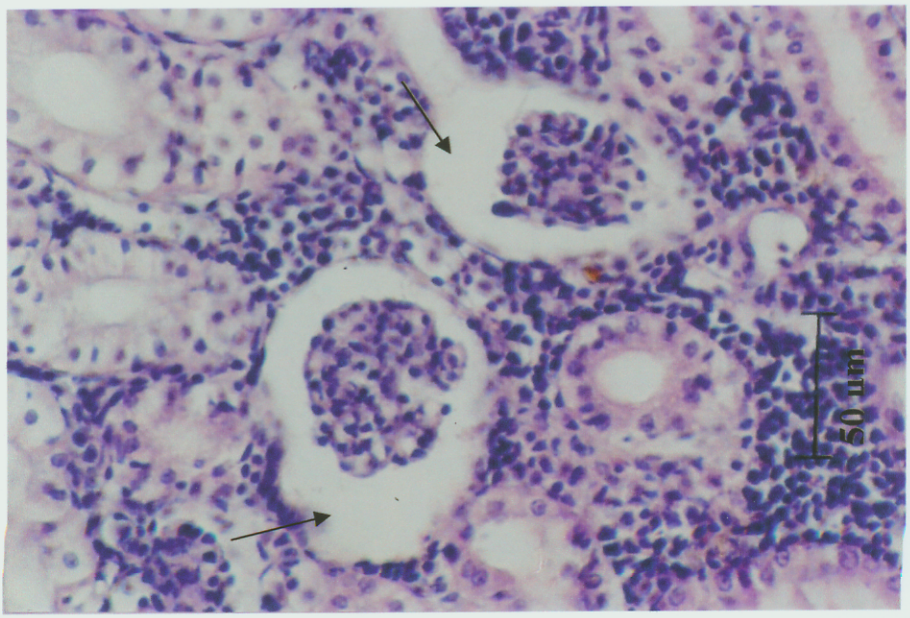
ภาพที่ 42 เมลาโนแมคโครฟาจ (Me) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ฉีดวัคซีนผสม CFA ที่เวลา 1 วัน (H&E, Bar = 50 µm)



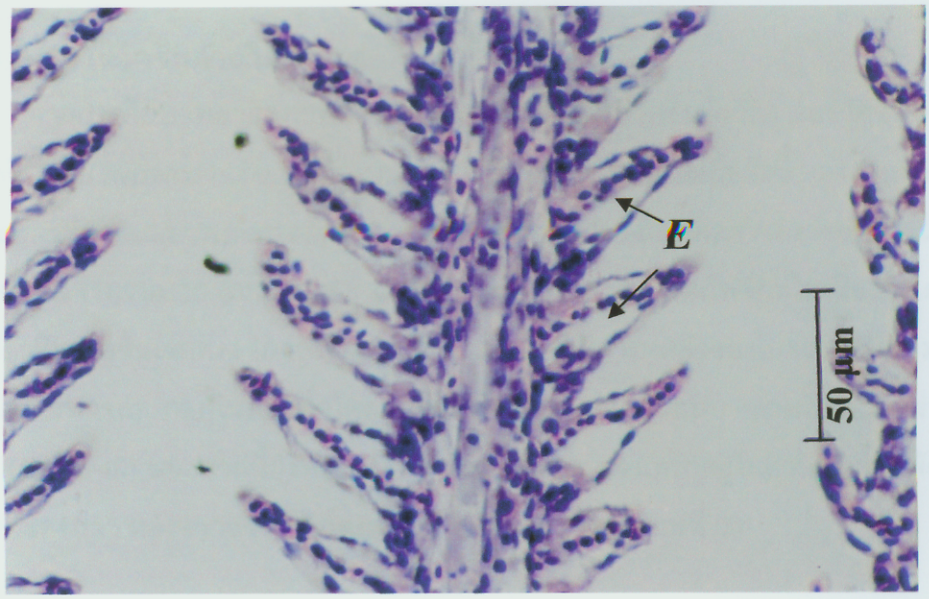
ภาพที่ 43 การเพิ่มจำนวนของลิมโฟซัยท์ (lymphocytes) (Ly) ในเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวที่ฉีดวัคซีนผสม CFA ที่เวลา 2 วัน (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 44 เกิดการสะสมของไกลโคเจน (glycogen storage) (Gs) ในเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ฉีดวัคซีนผสม CFA ที่เวลา 4 วัน (H&E, Bar = 50 µm)



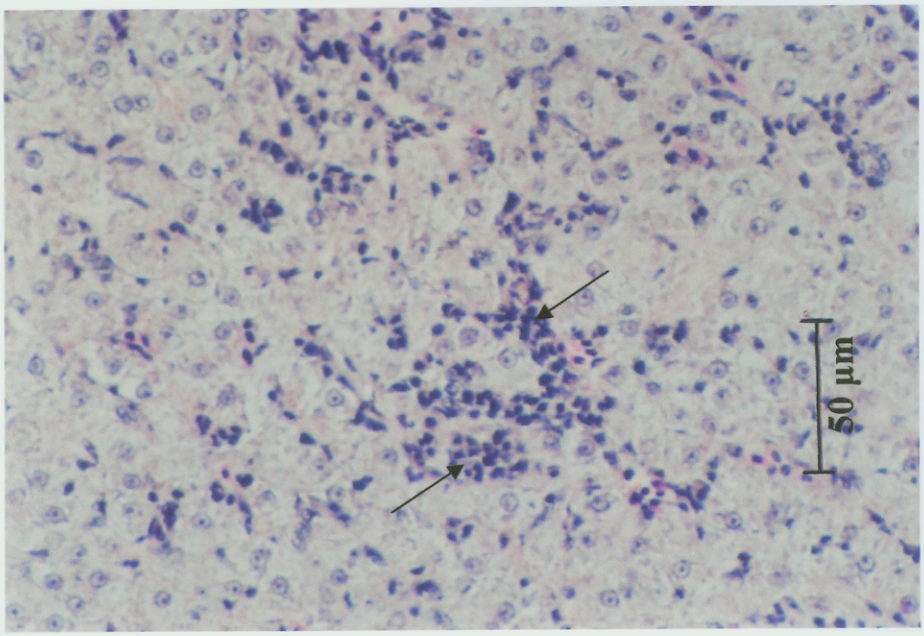
ภาพที่ 45 เกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส (ศรชี้) ในเนื้อเยื่อไตส่วนหลังของปลากะพงขาวที่ฉีดวัคซีนผสม CFA ที่เวลา 4 วัน (H&E, Bar=50 µm)



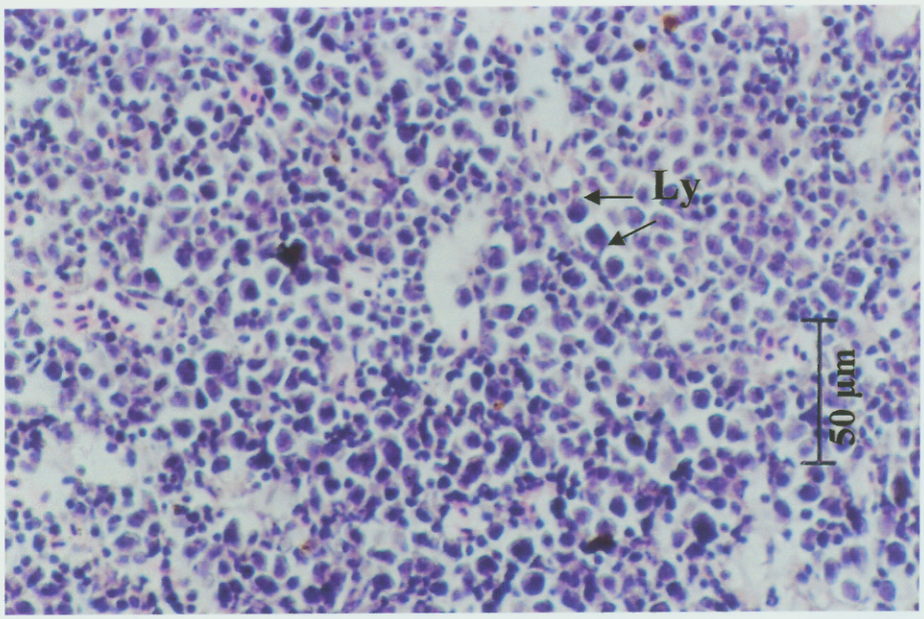
ภาพที่ 46 เกิดการบวมน้ำ (edema) (E) ซึ่งเป็นการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ฉีดวัคซีนผสม CFA ที่เวลา 4 วัน (H&E, Bar = 50 µm)

6.2 **การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่**

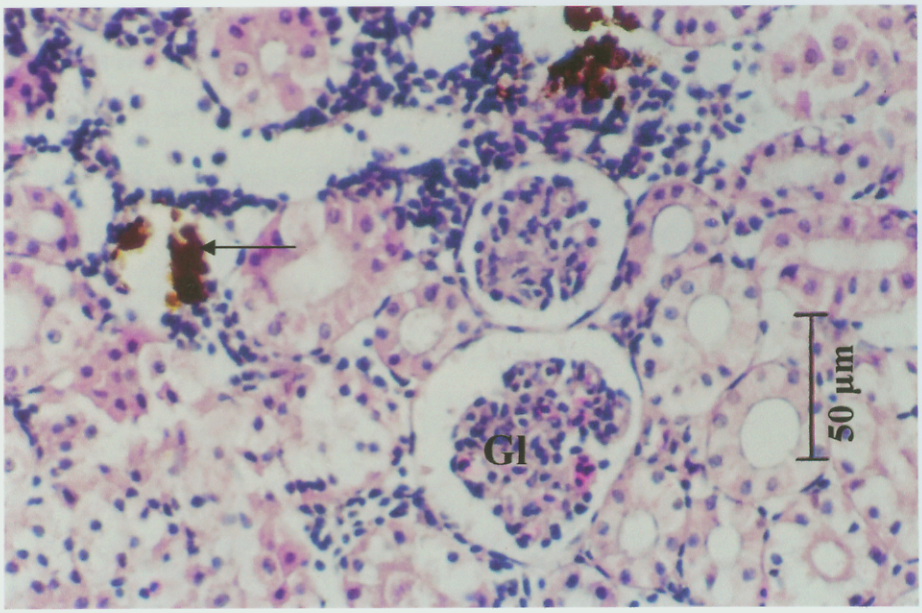
จากการศึกษาพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนทั้งวิธีการแช่วัคซีนโดยตรงและแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อดังนี้ หลังจากแช่วัคซีนโดยตรงและแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ผ่านไป 1 วัน พบว่ามีแมคโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับของปลาเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 47) และมีการเพิ่มจำนวนของลิมโฟซัยท์ในเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลาที่แช่วัคซีนโดยตรง (ภาพที่ 48) ในวันที่ 4 พบว่ามีการหดตัวของโกลเมอรูลัสรวมทั้งมีเมลาโนแมคโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อไตส่วนหลัง หลังจากแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ผ่านไปแล้ว 4 วัน (ภาพที่ 49) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเมลาโนแมคโครฟาจ แทรกอยู่ในส่วนของไวท์พัลปของเนื้อเยื่อม้ามของปลา หลังจากแช่วัคซีนโดยตรง ผ่านไปแล้ว 7 วัน (ภาพที่ 50)



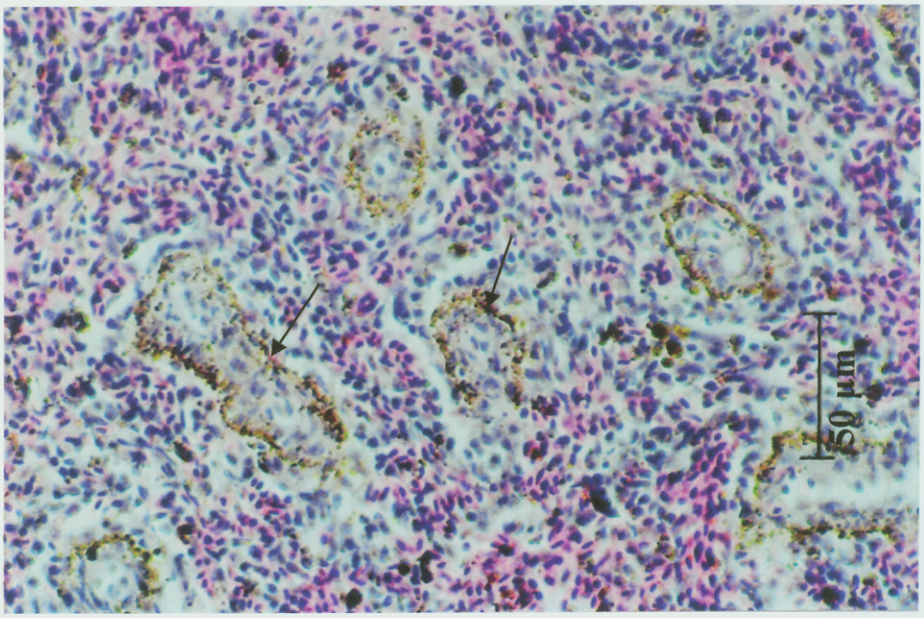
ภาพที่ 47 แมคโครฟาจ (ศรชี้) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่แช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ที่เวลา 1 วัน (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 48 การเพิ่มจำนวนของลิมโฟซัยท์ (Ly) ในเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวที่แช่วัคซีนโดยตรง ที่เวลา 1 วัน (H&E, Bar = 50 µm)



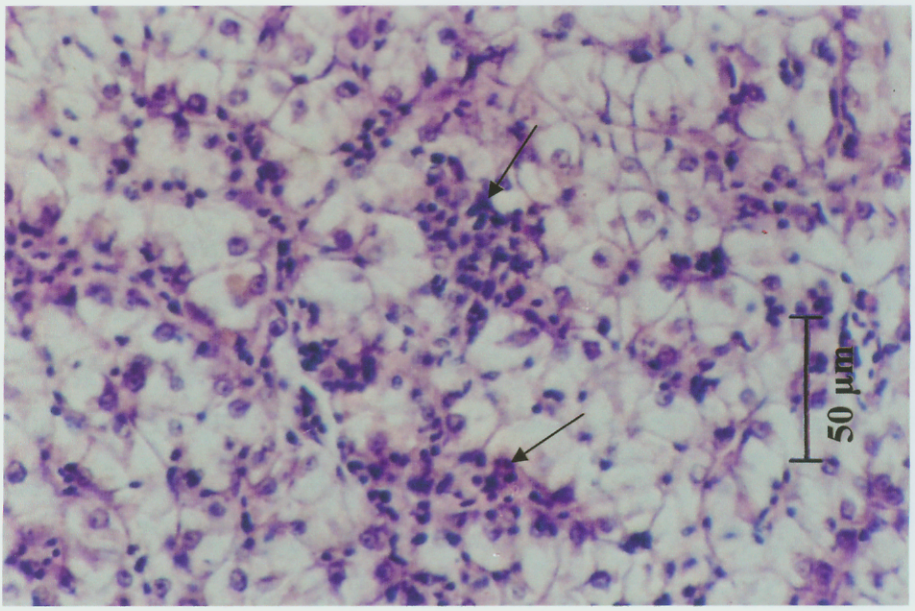
ภาพที่ 49 เกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส (Gl) และมีเมลาโนแมคโครฟาจ (ศรชี้) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อไตส่วนหลังของปลากะพงขาวที่แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ที่เวลา 4 วัน (H&E, Bar = 50 µm)



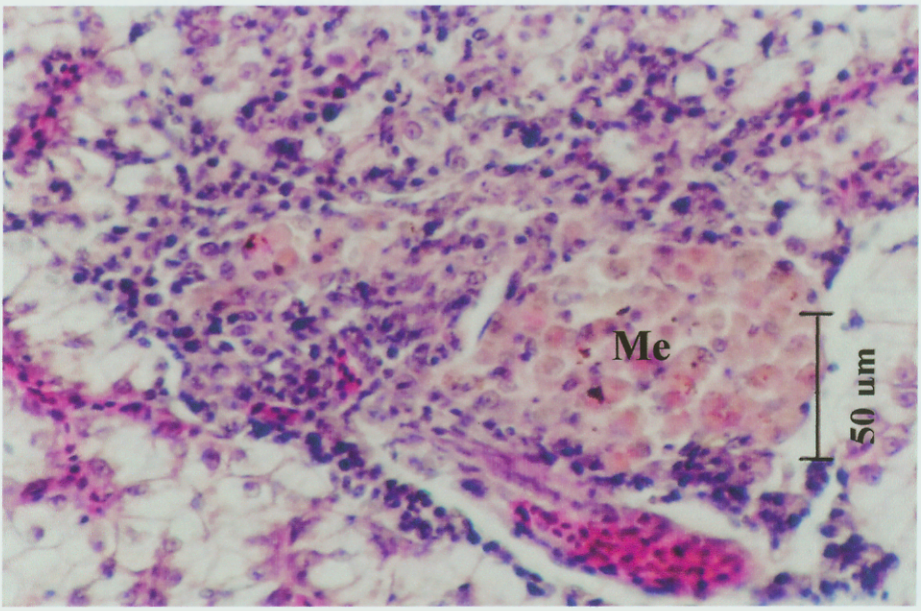
ภาพที่ 50 เมลาโนแมคโครฟาจ (ศรชี้) แทรกอยู่ในส่วนของไวท์พัลพของเนื้อเยื่อม้ามปลากะพงขาวที่แช่วัคซีนโดยตรง ที่เวลา 7 วัน (H&E, Bar = 50 µm)

6.3 **การให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน**

จากการศึกษาพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนทั้งวิธีการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีนและกินอาหารที่ผสมวัคซีน พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อดังนี้ หลังจากให้ปลากินอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 1 วัน พบว่ามีแมคโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับของปลาเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 51) เมื่อให้ปลากินอาหารผสมวัคซีนเป็นเวลา 4 - 7 วัน พบว่ามีเมลาโนแมคโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 52)



ภาพที่ 51 แมคโครฟาจ (ศรชี้) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่แช่ร่วมกับการกินอาหารผสม ที่เวลา 1 วัน (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 52 เมลาโนแมคโครฟาจ (Me) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่กินอาหารผสมวัคซีน ที่เวลา 4 - 7 วัน (H&E, Bar = 50 µm)