บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. พันธุ์ปลากะพงขาว

ลูกปลากะพงขาว ขนาด 3 – 4 นิ้ว จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จังหวัดสงขลา

2. อาหารสำหรับลูกปลากะพงขาว

การเตรียมอาหารลูกปลากะพงขาว ตามสูตรของ ดร.มะลิ บุณยรัตผลิน กรมประมง (ภาคผนวก ก)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเชื้อแบคทีเรีย

1.1 อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ จานเพาะเชื้อ (plate) ลูปเขี่ยเชื้อ ชุดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Blood Agar (BA) , Tryptic Soy Agar (TSA) และ Tryptic Soy Broth (TSB)

1.2 อุปกรณ์สำหรับแยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมี (API 20 STREP)

1.3 อุปกรณ์ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar หลอดทดลอง แผ่นยาชนิดต่างๆ และไม้พันสำลี (swab)

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง

ประกอบด้วย ถังไฟเบอร์กลาสสี่เหลี่ยม ปริมาตร 300 ลิตร ตู้ทดลองใช้ตู้กระจกขนาด 44 x 19 x 20 นิ้ว ปิดด้วยพลาสติกสีทึบทางด้านข้างและด้านหลัง อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยางและหัวทราย

3. **อุปกรณ์สำหรับทดสอบความรุนแรงของเชื้อ**

ประกอบด้วย ไซริงก์พร้อมเข็มฉีดยา เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer รุ่น UV -1201) ตู้ทดลอง ใช้ตู้กระจกขนาด 44 x 19 x 20 นิ้ว ปิดด้วยพลาสติกสีทึบทางด้านข้างและด้านหลัง อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยางและหัวทราย

4. **อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือดปลา**

4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริต ได้แก่ เครื่องฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (haematocrit centrifuge) หลอดแคพปิลลารี (capillary tube) และดินน้ำมัน

4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบิน ได้แก่ หลอดทดลอง ไมโครปิเปตและเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าพลาสมาโปรตีนได้แก่ หลอดทดลอง ไมโครปิเปต เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์และเครื่องเขย่าตะกอน (vortex mixer)

4.4 อุปกรณ์นับปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ได้แก่ ไดลูทติงปิเปต (RBC diluting pipette) สไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์

5. **อุปกรณ์การศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ**

ประกอบด้วย ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) เครื่องตัดเนื้อเยื่อ อ่างน้ำร้อน ชุดย้อมเนื้อเยื่อ สไลด์ และกล้องจุลทรรศน์

6. **อุปกรณ์การเตรียมวัคซีน**

ประกอบด้วย ขวดรูปชมพู่ (flash) ปิเปต เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti ™ 30 centrifuge) หม้อนึ่งความดัน (Tomy Seiko Co.,Ltd, SS-325) และตู้เย็น

วิธีการทดลอง

1. **ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของเชื้อ** *Streptococcus* sp.

1.1 **แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลากะพงขาว**

แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลาและจังหวัดสตูล โดยคัดเลือกปลาที่มีอาการลำตัวสีคล้ำและตกเลือดที่บริเวณลำตัวมาผ่าท้องปลาด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากตับ ไต และสมอง นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร สุ่มเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ มาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อไปทดสอบ catalase เพื่อที่จะแยกว่า เป็นเชื้อ *Streptococcus* sp. หรือไม่ จากนั้นนำมาเลี้ยงบน Tryptic soy agar (TSA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บใน Tryptic soy broth (TSB) ที่มีกลีเซอริน (glycerin) ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

1.2 **ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค**

นำเชื้อจากที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส ของแต่ละครั้งที่แยกได้ (isolate) มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับหลอดมาตรฐาน McFarland No. 0.5 นำเชื้อดังกล่าวไปฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใช้ปลาขนาดความยาว 3 - 4 นิ้ว โดยปลาจะต้องมีความแข็งแรง ไม่แสดงอาการของโรค ทดลองใช้ปลาจำนวน 5 ตัวต่อครั้งที่แยกได้ มีชุดควบคุมเป็นปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ แทนการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. หลังฉีดเชื้อจะเลี้ยงไว้จนแสดงอาการของโรค แล้วทำการแยกเชื้อตามวิธีในข้อที่1.1 โดยเก็บตัวอย่างของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีความรุนแรงของเชื้อสูงๆ ไว้ทดสอบต่อไป

1.3 **ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ** *Streptococcus* sp. **ที่ใช้ในการทดลอง**

นำเชื้อที่แยกได้และมีความบริสุทธิ์ มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic) บน blood agar การทนต่อความเป็นกรด - ด่างที่ 9.6 อาหารที่มีเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิต่ำที่ 10 องศาเซลเซียส และสูงที่ 45 องศาเซลเซียส การทดสอบการย่อยเจลาติน แป้ง sodium hippurate esculin และ arginine การทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ คือ

arabinose, glucose, lactose, maltose, mannitol, sucrose, trehalose และ saccharose โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 STREP (bioMérieux, France)

1.4 **ทดสอบความไวของเชื้อ** *Streptococcus* **sp.ต่อยาปฏิชีวนะ**

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. โคโลนีเดี่ยว ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับหลอดมาตรฐาน McFarland No. 0.5 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. แล้วนำไปเกลี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำแผ่นยา (disc) ชนิดต่างๆ วางลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น จากนั้นแปลผลโดยใช้ตารางมาตรฐานในการแปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะ

1.5 **ศึกษาการเจริญของเชื้อ** *Streptococcus* sp.

1.5.1 **ศึกษาการเจริญของเชื้อ** *Streptococcus* sp.**ที่ระดับ** pH **ต่างๆ กัน**

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่บริสุทธิ์ ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีระดับ pH ต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยให้มีปริมาตรของเชื้อเท่ากันทุกๆหลอด โดยใช้เชื้อที่มีปริมาณเชื้อ 4.43 x 10^3 CFU/ml นำหลอดทดลองที่เติมเชื้อแล้วทุกหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วทิ้งไว้ให้เวลาผ่านไป 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

การนับจำนวนเซลล์ ทำการเจือจางโดยใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ครั้งละ 10 เท่า แล้วคำนวณเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยวิธี drop plating method (Collins and Lyne, 1976) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับ pH ที่เวลาต่างๆ กัน

1.5.2 **ศึกษาการเจริญของเชื้อ** *Streptococcus* sp.**ที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน**

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่บริสุทธิ์ ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีระดับความเค็มต่างกัน คือ 0, 10, 20, 30, 40, และ 50 ส่วนในพันส่วน โดยให้มีปริมาตรของเชื้อเท่ากันทุกๆหลอด โดยใช้เชื้อที่ปริมาณเชื้อ 4.43 x 10^3 CFU/ml นำหลอดทดลองที่เติมเชื้อแล้วทุกหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วทิ้งไว้ให้เวลาผ่านไป 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

การนับจำนวนเซลล์ ทำการเจือจางโดยใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ครั้งละ 10 เท่า แล้วคำนวณเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยวิธี drop plating method (Collins and Lyne, 1976) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับความเค็ม ที่เวลาต่างๆ กัน

2. ศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp.ที่ทำให้ปลากะพงขาวตายครึ่งหนึ่งในเวลา 14 วัน (LD_{50} ที่ 14 วัน)

2.1 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลากะพงขาวขนาดความยาว 3 – 4 นิ้ว น้ำหนักเฉลี่ย 4.97 $\pm$ 1.24 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาส โดยใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพัน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและให้อากาศตลอดเวลา ให้อาหารผสมอัดเม็ดชนิดจมน้ำ ทุกวันๆ ละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น) ระบบน้ำจะใช้ระบบกรองน้ำหมุนเวียน เพื่อปรับสภาพให้ปลาชินกับสภาพการทดลองประมาณ 1 สัปดาห์ งดอาหาร 1 วัน ก่อนการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง

2.2 การเตรียมเชื้อ *Streptococcus* sp.

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง แล้วนำมาฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาว ทิ้งไว้จนมีอาการลำตัวสีคล้ำและว่ายน้ำควงสว่าน จึงแยกเชื้อจากปลานำมาเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน แล้วฉีดกลับเข้าสู่ตัวปลาใหม่ 2 – 3 ครั้ง เพื่อเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ เมื่อได้เชื้อครั้งสุดท้ายนำมาเจือจางด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงต่างกัน ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำแต่ละระดับความเข้มข้นมาเจือจางครั้งละ 10 เท่า แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยวิธี drop plating method (Collins and Lyne, 1976)

2.3 การทดลองความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp.

เป็นการทดลองหาปริมาณของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในช่วงระหว่างปริมาณระดับต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสูงสุดที่ไม่ทำให้ปลาตายในช่วงเวลา 14 วัน ในแต่ระดับที่ฉีดเชื้อเข้าไปในปลากะพงขาว 10 ตัว โดยจะใช้เข็มฉีดยาขนาด 26G x 1 นิ้ว ฉีดเข้าช่องท้องในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ร่วมทั้งการทดลองหาปริมาณของเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยจัดระดับให้ปริมาณเชื้อเป็น 5 ระดับ ซึ่งอยู่ในระดับปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์

และปริมาณเชื้อสูงสุดที่ไม่ทำให้ปลาตาย แต่ละระดับจะใช้ปลากะพงขาว 10 ตัว รวมทั้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำมาเลี้ยงในตู้ขนาด 44x 19 x 20 นิ้ว ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ปริมาตรน้ำ 100 ลิตร บันทึกการตายในแต่ละวันหลังฉีดเชื้อและนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ LD_{50} ที่14 วัน ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

3. **ศึกษาผลของการติดเชื้อ** *Streptococcus* sp. **ในปลากะพงขาว**

3.1 **ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ** *Streptococcus* sp. **ในเนื้อเยื่อปลากะพงขาว**

เตรียมเชื้อ *Streptococcus* sp.ที่ 4.80 x 10^7 CFU/ml ฉีดเข้าช่องท้องปลากะพงขาว ขนาด 7 - 10 นิ้ว ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 45 ตัว รวมทั้งกลุ่มควบคุม 45 ตัว ซึ่งใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยลงในตู้ทดลอง ให้อากาศตลอดเวลา

เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน โดยใช้อวัยวะต่างๆ คือ ตับ ไต ม้าม สมอง และ เลือด จากปลาครั้งละ 5 ตัว และกลุ่มควบคุม 5 ตัว นำมาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS,pH 7.2) ในอัตรา 1 : 10 (ดัดแปลงจาก Rasheed and Plume, 1984) เจือจางครั้งละ 10 เท่า แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อ 1 กรัม โดยวิธี drop plating method (Rasheed and Plume, 1984)

การคำนวณจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อ

จำนวนแบคทีเรียต่อกรัมเนื้อเยื่อ = $N \times 10^{D+2}$

N = จำนวนแบคทีเรียต่อ100 ไมโครลิตร

D = การเจือจาง (dilution)

3.2 **ศึกษาองค์ประกอบของเลือดปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ** *Streptococcus* sp.

ฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเข้มข้นของ LD_{50} ที่ 14 วัน จำนวน 70 ตัว รวมทั้งกลุ่มควบคุม 70 ตัว ซึ่งใช้น้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยฉีดเข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปล่อยลงในตู้ทดลอง ให้อากาศตลอดเวลา

สังเกตอาการและทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลากะพงขาวที่เวลา 1, 3, 5, 7,10 และ14 วัน หลังจากที่ฉีดเชื้อ จะใช้ปลาชุดละ 10 ตัวต่อครั้ง

ทำให้ปลาสลบด้วย Quinaldin 1 – 2 หยดต่อลิตร ปลาจะสลบภายใน 30 – 60 วินาที ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหาง (caudal vein) โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 25G x 1 นิ้ว ที่เคลือบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ EDTA เป็นตัวป้องกันเลือดแข็งตัว

(anticoagulant) ตัวอย่างเลือดที่เจาะได้นำมาหาค่าองค์ประกอบต่างๆ ภายใน 3 – 6 ชั่วโมง (กิจการ, 2530) นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต (Larsen and Sneizsko, 1961) ค่าปริมาณฮีโมโกลบินรวม ค่าโปรตีนในพลาสมา (Lowry *et al.*, 1951) ปริมาณเม็ดเลือดแดงและปริมาณเม็ดเลือดขาว

3.3 **ศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ** *Streptococcus* sp.

นำตัวอย่างปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. มาเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ โดยการเปิดช่องท้อง ตัดอวัยวะส่วนต่างๆ คือ เหงือกและอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ไต ม้าม หัวใจ และ สมอง ดองในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ นำอวัยวะทั้งหมดผ่านขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่อง Automatic Tissue Processor โดยผ่านระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ จาก 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ แล้วผ่านลงในไอโซโพรพิลและไซลีน แล้วฝังในพาราพลาส นำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตม หนา 3 – 4 ไมครอน ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน ตามวิธีของ Humason (1979) เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวร นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

4. ศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมในปลากะพงขาว

4.1 **การเตรียมวัคซีนจากเชื้อ** *Streptococcus* **sp.** (ดัดแปลงจาก จิตต์เกษม และคณะ, 2536)

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่บริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร TSB เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการเขี่ยสารละลายแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อเจริญให้นำสารละลายมาเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญทำการปั่นล้างเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียตกตะกอน เทส่วนสารละลายทิ้งและล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง จากนั้นทดสอบการปลอดเชื้อ (sterile) ของวัคซีน โดยนำวัคซีนที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร เพื่อทดสอบว่าเชื้อที่นำมาเป็นวัคซีนไม่สามารถเจริญได้ ถ้าหากเชื้อไม่เจริญก็สามารถ

นำมาเป็นวัคซีนได้ โดยจะทำการเติมฟอร์มาลินให้ได้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เก็บวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมา ใช้

4.2 การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน

นำวัคซีนที่เตรียมจากข้อ 4.1 มาใช้กับปลากะพงขาว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. ได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร มีแบคทีเรียอยู่ 2.5 x 10^{10} CFU/ml

2. ได้รับวัคซีนโดยวิธีการแช่โดยตรง เป็นเวลา 30 วินาที มีแบคทีเรียอยู่ 2.5 x 10^{10} CFU/ml

3. ได้รับวัคซีนโดยวิธีการกินอาหารผสมวัคซีน จะผสมวัคซีนในอาหารให้มีปริมาณเซลล์วัคซีน 2.5 x 10^{10} CFU/ml

4. กลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

ทำการเลี้ยงปลากะพงขาวทั้ง 4 กลุ่ม ไว้นาน 7 วัน หลังจากได้รับวัคซีน ทำการหาอัตราการรอดตาย เพื่อนำมาหาค่าความปลอดภัยในการใช้วัคซีน (Cardella and Eimers, 1990)

4.3 การทดสอบการตอบสนองของปริมาณวัคซีนที่ใช้ในปลากะพงขาว

นำวัคซีนจากข้อ 4.1 มาให้ปลากะพงขาว โดยวิธีการฉีดเข้าท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม โดยใช้ปลากะพงขาวกลุ่มละ 50 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้อง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร
2. ฉีดวัคซีนที่มีความเข้มข้น 2.50 x 10^{8} CFU/ml
3. ฉีดวัคซีนที่มีความเข้มข้น 2.50 x 10^{9} CFU/ml
4. ฉีดวัคซีนที่มีความเข้มข้น 2.50 x 10^{10} CFU/ml (Dec *et al.*, 1990)

นำปลากะพงขาวแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 45x90x46 เซนติเมตร ที่มีปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ในระหว่างการเลี้ยงให้อาหารผสมอัดเม็ดชนิดจมน้ำ โดยให้กินจนอิ่มทุกวัน วันละ 2 ครั้ง (เช้า – เย็น) มีการให้อากาศตลอดเวลา

หลังจากให้วัคซีนไปแล้ว 10, 20 และ 30 วัน จึงฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ความเข้มข้น 1.937 x 10^{3} CFU/ml (LD_{50} ที่ 14 วัน) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายและความสัมพันธ์ของ

เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ จะใช้วิธี agglutination (Roberson,1990)

4.4 การศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว

การทดสอบวิธีการให้วัคซีนจะใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD : Completely Randomized Design) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง (treatment) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (replication) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

1.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml

1.2 การให้วัคซีนผสม CFA (Complete Freund 's Adjuvent) ที่อัตรา 1 : 1 โดยฉีดเข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

1.3 ชุดควบคุม ฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่

2.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่โดยตรงเป็นเวลา 30 วินาที ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml

2.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic โดยแช่ปลาในน้ำทะเลที่ความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่วัคซีนที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml เป็นเวลา 30 วินาที

2.3 ชุดควบคุม แช่น้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที

ชุดการทดลองที่ 3 การให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน

3.1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการกินอาหารผสมวัคซีน ผสมวัคซีนในอาหารให้มีปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml

3.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่วัคซีนโดยตรงร่วมกับการกินอาหารที่ผสมวัคซีน โดยแช่ปลาในวัคซีนเป็นเวลา 30 วินาที ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml กับการกินอาหารที่ผสมวัคซีน

3.3 ชุดควบคุม กินอาหารไม่ผสมวัคซีน

นำปลาของแต่ชุดการทดลอง มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ถังละ 200 ตัวต่อชุดการทดลอง ในระหว่างการเลี้ยงให้อาหารผสมอัดเม็ดชนิดจมน้ำ โดยให้กินจนอิ่มทุกวัน วันละ 2 ครั้ง เช้า – เย็น (ทุกชุดการทดลอง) ระบบน้ำใช้ระบบการกรอง มีการให้อากาศตลอดเวลา

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าต่างๆ โดยวิธี Duncan 's Multiple Range Test (Duncan,1955)

4.5 **การทดสอบความต้านทานโรค**

เตรียมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ LD_{50} ที่ 14 วัน ฉีดปลาในชุดการทดลอง ๆละ 3 ซ้ำ จำนวนปลา 20 ตัวต่อซ้ำ หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 10, 20 และ 30 วัน โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp.เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ตรวจผลโดยพิจารณาจากจำนวนปลาตายภายในระยะเวลา 14 วัน นำเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลาในแต่ละชุดการทดลอง หลังจากทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus* sp.ไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (Ellis, 1988)

การคำนวณค่า Relative Percent Survival : RPS

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

5. ศึกษาองค์ประกอบของเลือดปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน

เก็บตัวอย่างเลือดปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน ที่เวลา 1, 2, 4, 7,14 และ 21 วัน หลังจากได้รับวัคซีน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลากะพงขาว ครั้งละ 5 ตัว และกลุ่มควบคุม 5 ตัว

ทำให้ปลาสลบด้วย Quinaldin 1 – 2 หยดต่อลิตร ปลาจะสลบภายใน 30 – 60 วินาที จึงเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหาง (caudal vein) โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 25G x 1 นิ้ว ที่เคลือบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ EDTA เป็นตัวป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) ตัวอย่างเลือดที่เจาะได้นำมาหาค่าองค์ประกอบต่างๆ ภายใน 3 – 6 ชั่วโมง (กิจการ, 2530) นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต (Larsen and Sneizsko, 1961) ค่าปริมาณฮีโมโกลบินรวม ค่าโปรตีนในพลาสมา (Lowry *et al.*, 1951) ปริมาณเม็ดเลือดแดงและปริมาณเม็ดเลือดขาว

6. **ศึกษาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน** (ตามวิธีของ Roberson, 1990)

ทำการสลบปลาด้วย Quinaldin 1 – 2 หยดต่อลิตร ปลาจะสลบภายใน 30 – 60 วินาที ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหาง (caudal vein) โดยใช้ไซริงก์ขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 25 G x 1 นิ้ว เลือดที่เจาะได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเลือดมาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่งโมง ดูดซีรั่มใส่หลอดเล็กๆ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส กรณีที่ยังไม่ทำการทดสอบ ในการทดสอบใช้วิธีเจือจางเป็น 2 เท่า (two - fold dilution) โดยเริ่มเจือจาง 1:2 มีน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลิน เป็นตัวเจือจางซีรั่ม (diluent) ให้มีปริมาตรในแต่ละหลุม (well) เท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติเจนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ลงไป 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูตะกอนที่เกิดขึ้น

7. **ศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีน**

นำตัวอย่างปลากะพงขาวที่ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด (ข้อ 5) มาเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ โดยการเปิดช่องท้อง แล้วทำการตัดอวัยวะส่วนต่างๆ คือ เหงือก และอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ไต ม้าม หัวใจ และ สมอง ดองในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ วิธีการเช่นเดียวกับ ข้อ 3.3