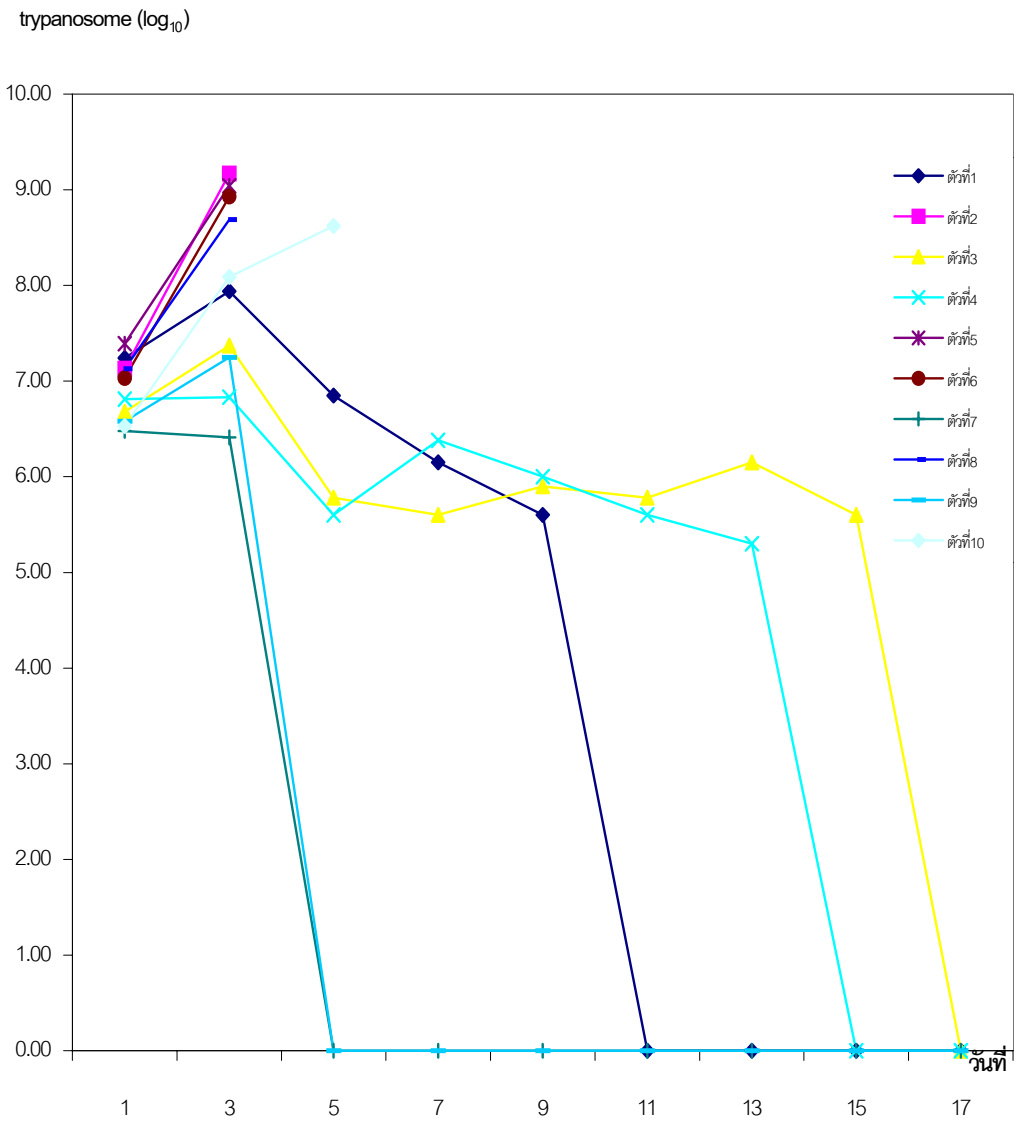
บทที่ 3

ผลการทดลอง

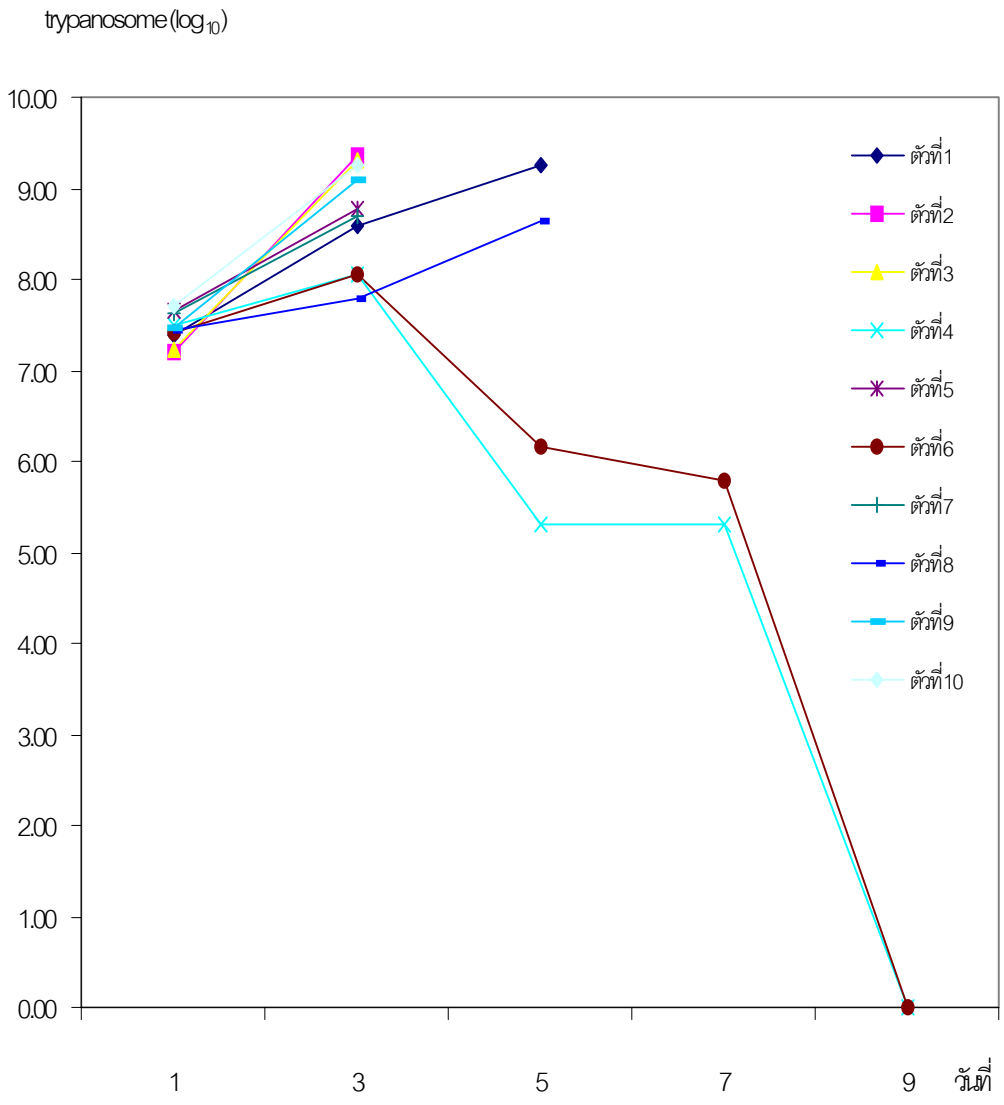
1. ปริมาณปรสิต trypanosome ในกระแสเลือด

จากการทดลองฉีด trypanosome ให้กับปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว โดยฉีด trypanosome ให้กับปลาตัวละ $1x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร 2 กลุ่ม และ $1x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร 1 กลุ่ม สามารถพบปรสิต trypanosome ครั้งแรกในกระแสเลือดเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง ปรสิตมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนถึงจุดหนึ่ง หลังจากนั้นปรสิตจะเริ่มลดลงเรื่อยๆ จนไม่พบในกระแสเลือด จากการนับจำนวน trypanosome ทุกๆ 2 วัน เพื่อศึกษาจำนวนปรสิตในกระแสเลือด พบว่าปรสิตเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ ถึงประมาณ 10^7-10^8 ตัว/มิลลิลิตร ใช้เวลาประมาณ 3-5 วันหลังจากฉีดปรสิต จากนั้นปรสิตจะเริ่มลดจำนวนลง กระทั่งไม่สามารถพบปรสิตในกระแสเลือดของตัวปลา โดยใช้เวลาตั้งแต่ 3-9 วัน ขึ้นกับตัวปลา มีเพียง 1 ตัวเท่านั้นที่ใช้เวลาถึง 17 วัน แสดงดังรูปที่ 8, 9 และ 10 และถ้าจำนวน trypanosome สูงกว่า 10^8 ตัว/มิลลิลิตร ปลาจะตาย

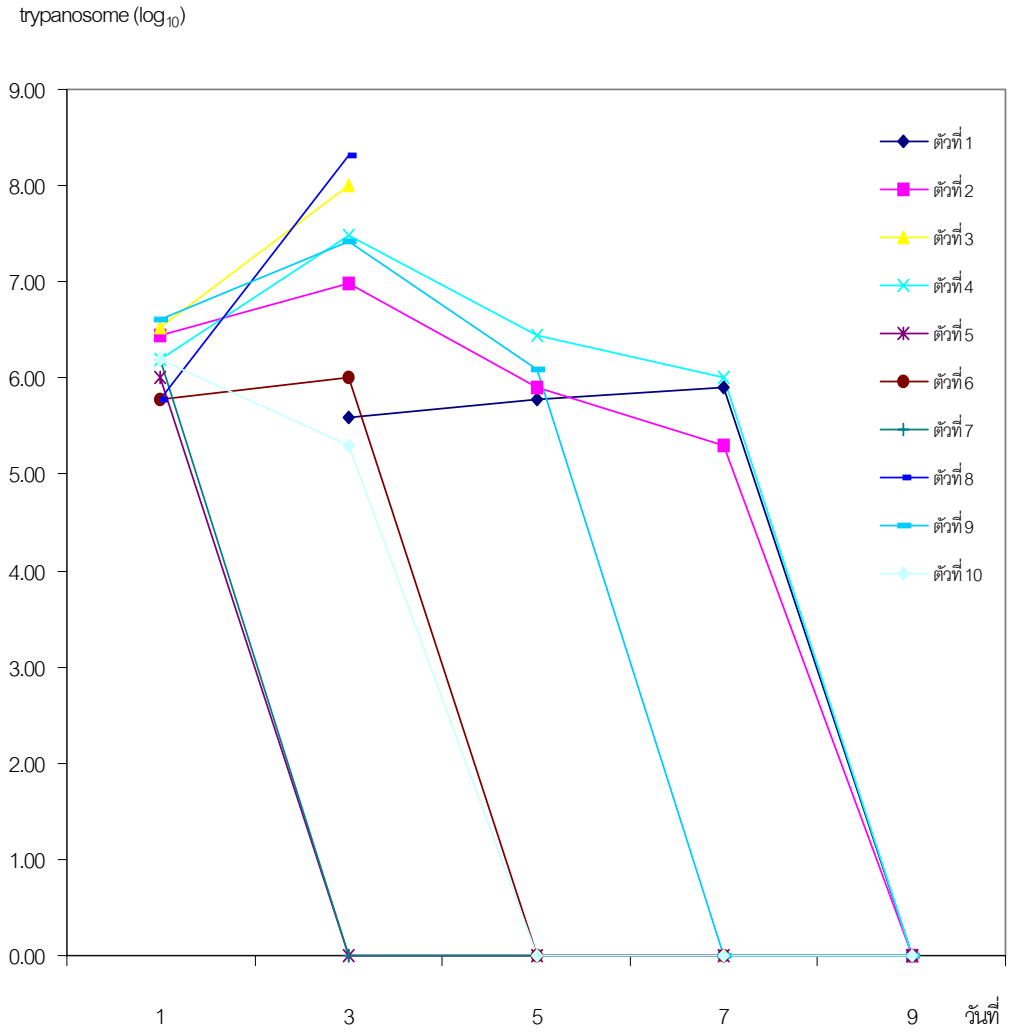
จากการฉีด trypanosome จำนวน $1x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร 2 กลุ่ม ทำให้ปลาตาย 5 และ 8 ตัว (ร้อยละ 50 และ 80) แต่สำหรับชุดการทดลองที่ฉีด trypanosome จำนวน $1x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร มีปลาตายเพียง 2 ตัวเท่านั้น (20 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงเลือก trypanosome จำนวน $1x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการทดลองในหัวข้อเรื่อง ความสามารถในการกำจัดเชื้อปรสิต



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของปรสิต trypanosome ในเลือดปลาดุกพันธุ์ผสม หลังจากฉีด trypanosome 1x10^7 ตัว/มิลลิลิตร (ปลาตัวที่ 2, 5, 6, 8 และ 10 ตาย)



รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของปรสิต trypanosome ในเลือดปลาดุกพันธุ์ผสม หลังจากฉีด trypanosome $1x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร (ปลาตัวที่ 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 และ 10 ตาย)



รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของปรสิต trypanosome ในเลือดปลาดุกพันธุ์ผสม หลังจากฉีด trypanosome $1x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร (ปลาตัวที่ 3 และ 8 ตาย)

2. ผลการศึกษาลักษณะและปริมาณของเม็ดเลือดขาว

จากการศึกษาเลือดของปลาดุกพันธุ์ผสมโดยการทำ blood smear พบเม็ดเลือดขาว 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ ทรอมโบซัยท์ ลิมโฟซัยท์ นิวโตรฟิล และโมโนซัยท์ ในทุกกลุ่มทดลอง แต่ไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิล และ อีโอซิโนฟิล

ทรอมโบซัยท์ มีรูปร่างยาวรี และเป็นรูปกระสวย โดยชนิดที่มีรูปร่างยาวรี พบบ่อยที่สุด นิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม ไซโตพลาสซึมมีเพียงเล็กน้อยติดสีน้ำเงินอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 11

ลิมโฟซัยท์ ไม่มีแกรนูลในไซโตพลาสซึม มีรูปร่างค่อนข้างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ติดสีน้ำเงินเข้ม ไซโตพลาสซึมมีน้อยมากบางครั้งแทบมองไม่เห็นติดสีน้ำเงินอ่อน บางครั้งมีลักษณะคล้ายเท้าเทียมยื่นออกมา แสดงดังรูปที่ 12

นิวโตรฟิล เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูลในไซโตพลาสซึมซึ่งจะเห็นแกรนูลไม่ชัดเจน มีรูปร่างค่อนข้างกลม นิวเคลียสค่อนข้างกลมติดสีม่วงหรือน้ำเงินเข้ม ถ้าเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่นิวเคลียสจะเป็นรูปคล้ายเกือกม้าเห็นได้ชัดเจน ซึ่งนิวเคลียสจะอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ แสดงดังรูปที่ 13

โมโนซัยท์ นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน ติดสีม่วง เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ ไซโตพลาสซึมมีจำนวนมากติดสีน้ำเงินจางๆ ภายในมีแวคคิวโอล สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 14

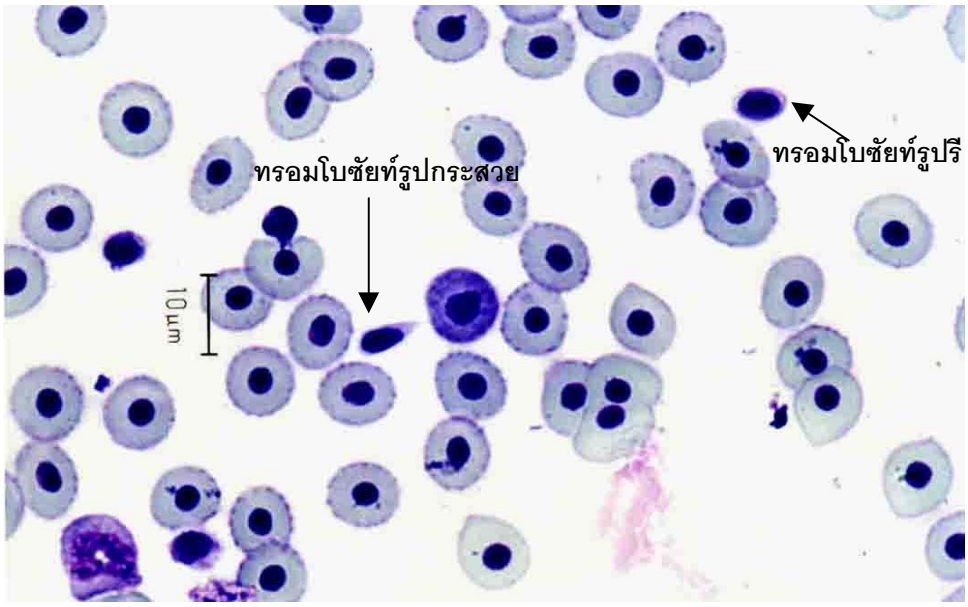
ผลการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาวในเลือดปลาดุกพันธุ์ผสมหลังจากได้รับ sonicated antigen ครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ได้แสดงในตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเม็ดเลือดขาวก่อนและหลังทดลองในแต่ละชุดการทดลอง ให้ผลดังนี้ ในชุดควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ มีจำนวนโมโนซัยท์หลังทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen แต่ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ ขณะที่กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ มีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนนิวโตรฟิล มีแนวโน้มเช่นเดียวกับโมโนซัยท์ ปริมาณทรอมโบซัยท์ นิวโตรฟิล และลิมโฟซัยท์ ระหว่างก่อนและหลังได้รับสารทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดขาวในระหว่างกลุ่มทดลองทั้งก่อนและหลังฉีด sonicated antigen พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวของปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างก่อนและหลังได้รับ sonicated antigen [1]

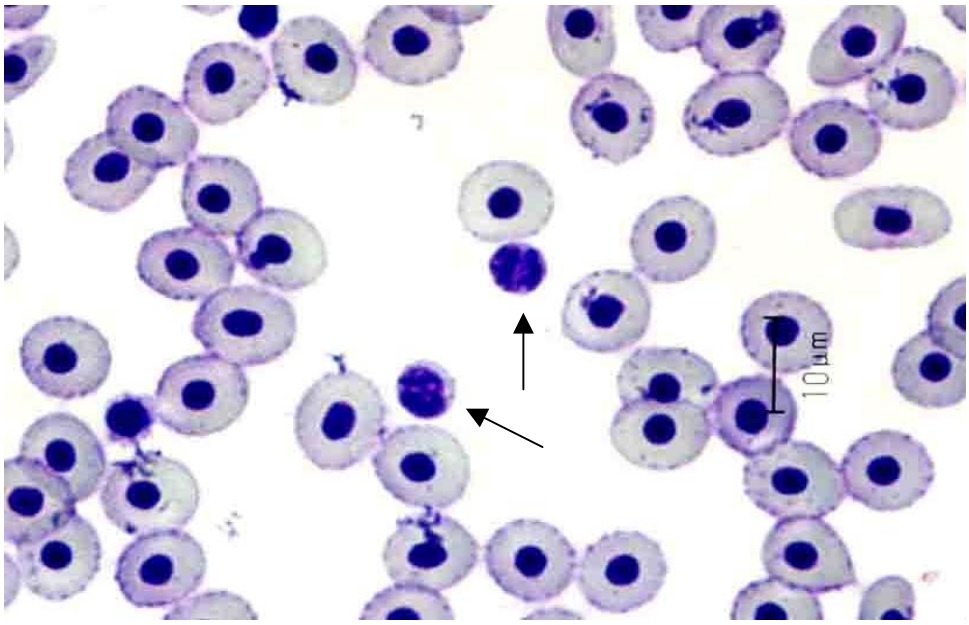
	Control [2]		Sonicated antigen		Freund's adjuvant [3]		Sonicated antigen + Freund's adjuvant	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
Thrombocyte	55.60±13.57	50.70±14.70	38.60±20.37	39.80±12.55	36.00±14.88	39.70±15.35	29.80±11.19	35.90±18.43
Lymphocyte	27.30±13.17	37.90±10.35	44.50±16.63	43.30±8.72	46.00±16.12	48.30±17.91	55.20±14.06	43.50±12.65
Neutrophil	10.90±4.46	8.60±7.92	13.40±11.37	13.40±13.34	13.40±6.50	11.00±8.33	12.50±8.83	17.00±14.76
Monocyte	5.20±2.35 [a]	2.80±2.10 [b]	3.70±2.98	3.20±3.77	3.40±2.32 [a]	0.70±0.67 [b]	2.40±2.46	3.30±2.36

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปลา 10 ตัว จากการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

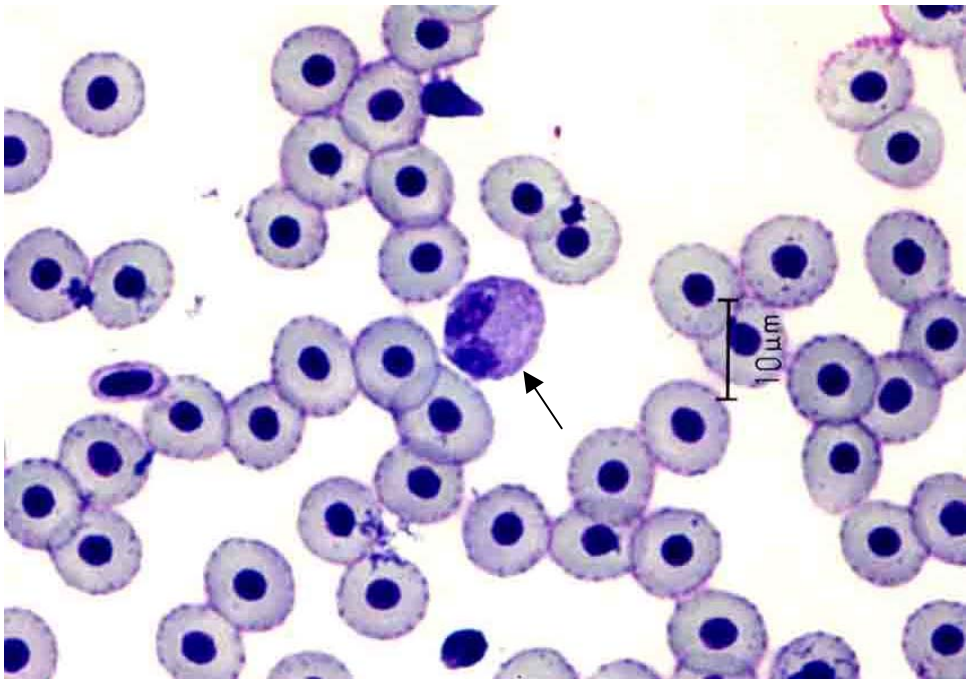
[2]ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)



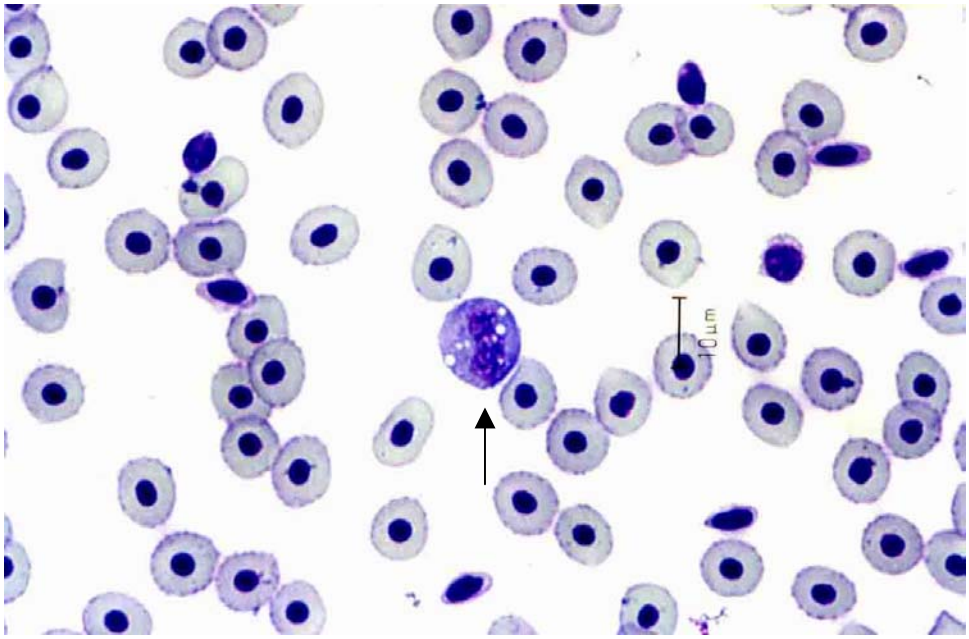
รูปที่ 11 ลักษณะของเม็ดเลือดขาวชนิดทรอมโบซัยท์ที่พบในปลาดุกพันธุ์ผสม



รูปที่ 12 ลักษณะของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ (ลูกศร)ที่พบในปลาดุกพันธุ์ผสม



รูปที่ 13 ลักษณะของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล (ลูกศร) ที่พบในปลาดุกพันธุ์ผสม



รูปที่ 14 ลักษณะของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ (ลูกศร) ที่พบในปลาดุกพันธุ์ผสม

3. การศึกษาความสามารถในการจับกิน (phagocytosis) ของเม็ดเลือดขาว

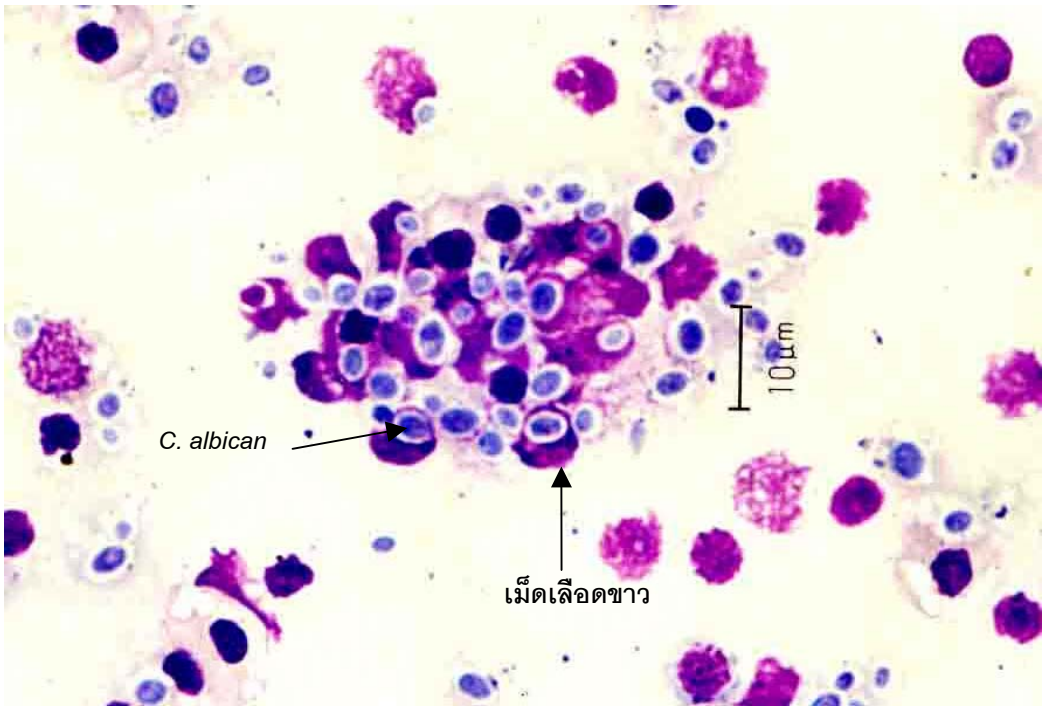
จากการศึกษาความสามารถในการจับกิน ของเม็ดเลือดขาวกับเชื้อ *Candida albicans* โดยนับเซลล์ที่มีการจับกินจากเซลล์ทั้งหมด 200 เซลล์ แสดงในตารางที่ 4 พบว่า ในปลากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์มีค่ามากที่สุดคือ 28.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ปลากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen ปลากลุ่มควบคุม และปลากลุ่มที่กระตุ้นด้วย Freund's แอดจูแวนด์ มีค่า 15.13 12.38 และ 9.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแตกต่าง พบว่ากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์มีความแตกต่างจากปลากลุ่มควบคุม ปลากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen และปลากลุ่มที่กระตุ้นด้วย Freund's แอดจูแวนด์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ปลาทั้ง 3 กลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่มีการจับกินในปริมาตร 10 ไมโครลิตรพบว่า ให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ ปลากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์มีค่ามากที่สุด เท่ากับ 174,500 เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือ ปลากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่กระตุ้นด้วย Freund's แอดจูแวนด์ มีค่า 103,250 55,300.00 8,500 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ และกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4 ความสามารถในการจับกิน *Candida albicans* ของเม็ดเลือดขาวปลาดุกพันธุ์ผสมหลังจากฉีดสารทดสอบ

กลุ่มทดลอง	% phagocytosis	เซลล์/มิลลิลิตร
กลุ่มควบคุม	12.38 [a]	55,300.00 [ab]
sonicated antigen (SA)	15.13 [a]	103,250 [a]
Freund's	9.63 [a]	8,500 [b]
SA + Freund's	28.00 [b]	174,500 [c]

ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)



รูปที่ 15 การจับกิน *Candida albicans* ของเม็ดเลือดขาวปลาดุกพันธุ์ผสม

4. ความสามารถในการกำจัดเชื้อปรสิต

ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดปรสิต trypanosome ได้ทำการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้ปรสิตที่ได้รับความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และใช้เบต้า-กลูแคน (β-glucan) เป็นแอดจูแวนท์ ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 ใช้ sonicated antigen และใช้ Freund's เป็นแอดจูแวนท์

การทดลองครั้งที่ 1 หลังจากทดลองฉีดปรสิต trypanosome $1.0x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร ให้กับปลากลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen (HA) กลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน และกลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen ผสมเบต้า-กลูแคน เป็นเวลา 1 วัน ได้นับจำนวนปรสิตในกระแสเลือด พบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนปรสิตมากกว่าจำนวนปรสิตที่ฉีดเข้าไป โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการเพิ่มร้อยละ 91.07 กลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen มีค่าร้อยละ 89.66 กลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน มีค่าร้อยละ 97.02 และกลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen ผสมเบต้า-กลูแคนมีค่าร้อยละ 95.24 จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen มีอัตราการเพิ่มของปรสิตในวันแรกต่ำสุด จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ในวันที่ 1 กลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน และ heat-killed antigen ผสมเบต้า-กลูแคนมีปริมาณ trypanosome มากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในช่วงระหว่างวันที่ 3 ถึงวันที่ 17 จำนวนปรสิตในกระแสเลือดเฉลี่ยของทุกกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ตารางที่ 5) และพบว่ากลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen และ กลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนเพียงอย่างเดียว จำนวนปรสิตจะขึ้นสูงสุดภายหลังได้รับปรสิต 5 วัน โดยมีจำนวน $1.26x10^8 \pm 1.01x10^8$ $3.20x10^8 \pm 1.92x10^8$ และ $4.05x10^8 \pm 1.70x10^8$ ตัว/มิลลิลิตร ตามลำดับ และปรสิตจะเริ่มลดจำนวนลงในวันที่ 7 ส่วนกลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen ผสมเบต้า-กลูแคน มีจำนวน trypanosome ในกระแสเลือดเฉลี่ยขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 คือ $1.69x10^8 \pm 5.38x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร และปรสิตจะเริ่มลดจำนวนลงในวันที่ 5 (รูปที่ 16) จากการสังเกตจะเห็นว่าโดยเฉลี่ยปรสิตจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 พบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นจากจำนวนปรสิตที่ฉีด ($1.0x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร) ดังนี้ กลุ่มควบคุมมีค่าร้อยละ 99.92 กลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen มีค่าร้อยละ 99.97 และกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนมีค่าร้อยละ 99.98 แต่ในกลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen ผสมเบต้า-กลูแคนปรสิตกลับมีจำนวนลดลงคิดเป็นร้อยละ 97.95 ระยะเวลาในการกำจัดปรสิตจนไม่สามารถตรวจพบได้ในแต่ละกลุ่มทดลองมีค่าใกล้เคียงกันมากคือ อยู่ในช่วง 15-17 วัน

การทดลองที่ 2 ทำการแบ่งกลุ่มทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ไม่มีกลุ่มที่ได้รับแอดจูแวนท์ และใช้ Freund's แอดจูแวนท์แทนเบต้า-กลูแคน ให้ผลการทดลองดังนี้ จำนวนปรสิตในวันที่ 1 ของกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และกลุ่มควบคุมมากกว่าจำนวนปรสิตที่ฉีดเข้าไป ($1.0x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร) มีค่าร้อยละ 66.10 และ 94.76 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ มีจำนวนปรสิตน้อยกว่าปรสิตที่ฉีดเข้าไป คือ $1.64x10^4$ ตัว/มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.3 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ มีจำนวนปรสิตในกระแสเลือดน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ในวันที่ 3, 5, 7,.....,23 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 6) และจะเห็นได้ว่า กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ มีจำนวนปรสิตเฉลี่ยในทุกๆ วันน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่น และกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen โดยเฉลี่ยมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ปรสิต trypanosome ในปลากลุ่มควบคุมจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มอื่นคือ $1.19x10^8 \pm 1.19x10^8$ ตัว/มิลลิลิตร จากจำนวนปรสิตที่ฉีด ขณะที่กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen เพียงอย่างเดียวมีจำนวนปรสิต $4.63x10^6 \pm 4.34x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร โดยสูงสุดในวันที่ 5 และปรสิตจะเริ่มลดลงในวันที่ 7 ส่วนกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ มีจำนวนปรสิตเฉลี่ยสูงสุดเพียง $3.50x10^5 \pm 3.31x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร โดยขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 และจำนวนปรสิตจะเริ่มลดลงในวันที่ 5 (รูปที่ 17)

ปลาสามารถกำจัด trypanosome ออกจากกระแสเลือดได้เร็วที่สุด ในเวลา 11 วัน ซึ่งพบในกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ ส่วนปลาที่ได้รับ sonicated antigen เพียงอย่างเดียวใช้เวลา 15 วัน ขณะที่ปลากลุ่มควบคุมใช้เวลาถึง 23 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 17) ในกลุ่มควบคุม พบปลาตายเนื่องจากจำนวนปรสิตขึ้นสูง 2 ตัว ส่วนกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ไม่พบการตายของปลา นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสมแอดจูแวนท์มีปลาติดปรสิต trypanosome เพียง 4 ตัวจาก 10 ตัว ส่วนชุดการทดลองอื่นๆ พบว่ามีการติดเชื้อปรสิต trypanosome ในปลาทั้ง 10 ตัว

การทดลองครั้งที่ 3 แบ่งกลุ่มทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 แต่เพิ่มกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ ให้ผลการทดลองดังนี้ ทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนปรสิตในกระแสเลือดหลังจากได้รับปรสิต 1 วันมากกว่าจำนวนปรสิตที่ฉีดเข้าไป ซึ่งกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ มีอัตราการเพิ่มของปรสิตเมื่อเทียบกับจำนวนที่ฉีดคือร้อยละ 95.80 รองลง

มาคือ กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen (ร้อยละ 96.09) กลุ่มควบคุม (ร้อยละ 98.54) และกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ (ร้อยละ 99.42) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า หลังจากได้รับปรสิต 1 วัน กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ ($2.38x10^6 \pm 9.20x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร) มีจำนวนปรสิตน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($6.86x10^6 \pm 2.37x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร) และกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ ($1.72x10^7 \pm 3.88x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ($2.56x10^6 \pm 3.94x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร) ก็มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเช่นกันแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จำนวนปรสิตเฉลี่ยในวันที่ 5, 7, 9...,27 หลังจากได้รับปรสิตพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ปลากลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 มีจำนวนปรสิตเท่ากับ $3.60x10^7 \pm 3.50x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 99.72 จากจำนวนที่ฉีด และปรสิตเริ่มลดลงในวันที่ 7 ขณะที่กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen Freund's แอดจูแวนท์ และ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ ขึ้นสูงในวันที่ 3 และเริ่มลดในวันที่ 5 ซึ่งมีค่า $4.60x10^7 \pm 3.10x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร (ร้อยละ 99.78) $1.40x10^8 \pm 6.10x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร (ร้อยละ 99.93) และ $4.5x10^7 \pm 4.2x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร (ร้อยละ 99.78) ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และ รูปที่ 18)

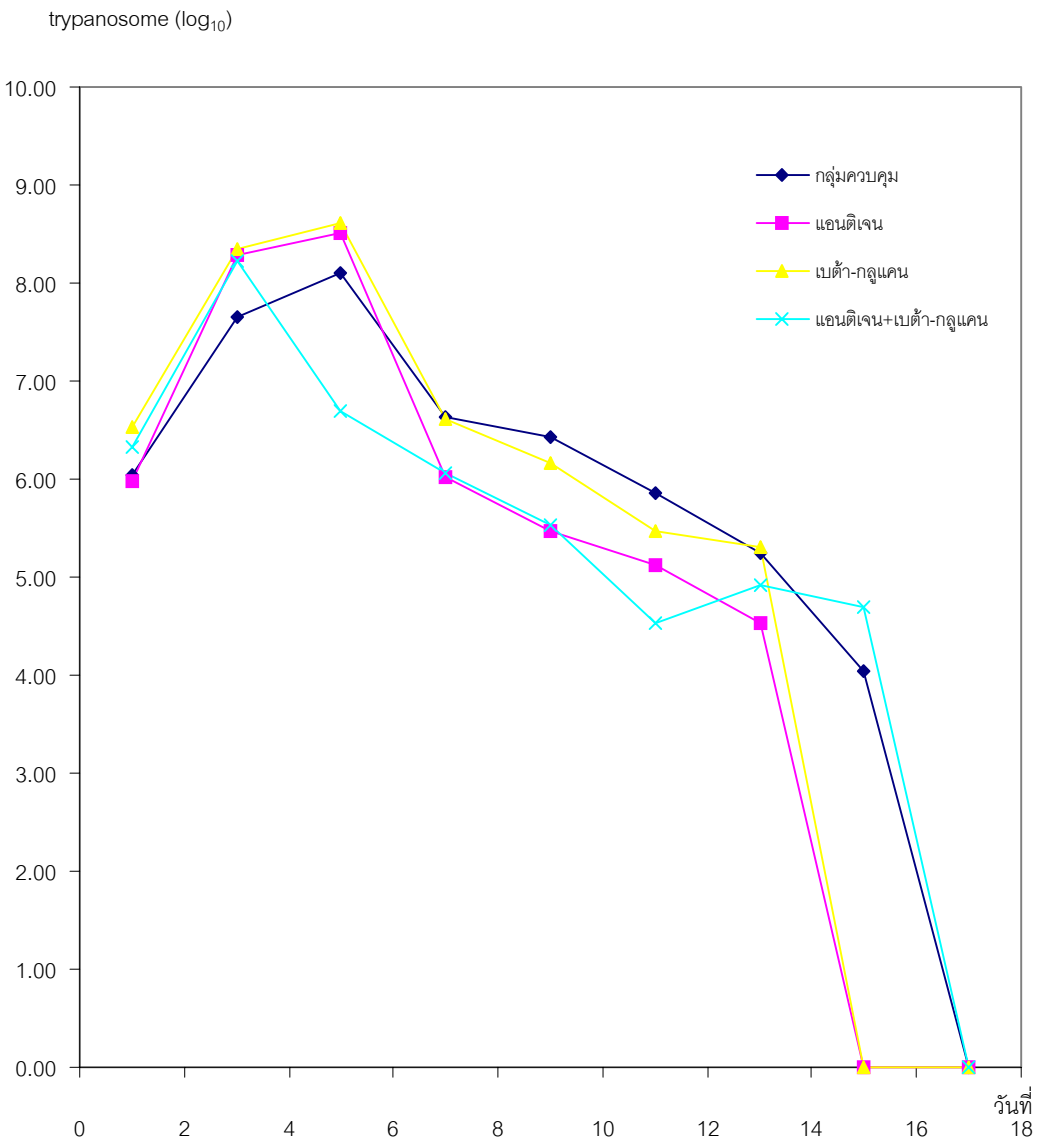
จากการนับจำนวนปรสิตหลังฉีดเชื้อปรสิต 1 วัน พบปลาที่ติดเชื้อปรสิตเฉพาะวันแรกเท่านั้นจำนวน 1 ตัว ในกลุ่มควบคุม จำนวน 2 ตัวในกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen จำนวน 1 ตัว ในกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ และ 6 ตัวในปลากลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์

ตารางที่ 5 ความสามารถในการกำจัดปรสิต trypanosome ของปลาดุกพันธุ์ผสมหลังจากฉีด heat-killed antigen (HA) และใช้เบต้า-กลูแคน เป็นแอดจูแวนท์

วันที่	กลุ่มควบคุม (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	HA (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	เบต้า-กลูแคน (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	HA + เบต้า-กลูแคน (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)
1	1.12±0.24 [a1]	0.96±0.21 [a]	3.36±0.76 [b]	2.10±0.48 [b]
3	45.90±19.00 [a]	196.00±41.10 [a]	224.00±90.70 [a]	169.00±53.80 [a]
5	126.00±101.00 [a]	320.00±192.00 [a]	405.00±170.00 [a]	4.87±2.87 [a]
7	4.31±4.00 [a]	1.03±0.71 [a]	4.05^6±3.95 [a]	1.13±0.64 [a]
9	2.64±2.51 [a]	0.30±0.17 [a]	1.45±1.25 [a]	0.33±0.19 [a]
11	0.73±0.68 [a]	0.13±0.08 [a]	0.30±0.29 [a]	0.03±0.02 [a]
13	0.17±0.16 [a]	0.03±0.03 [a]	0.10±0.09 [a]	0.08±0.06 [a]
15	0.01±0.01 [a]	0 [a]	0 [a]	0.05 ±0.04 [a]
17	0 [a]	0 [a]	0 [a]	0 [a]

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปลา 10 ตัว

ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)



รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณปรสิต trypanosome ในปลาดุกพันธุ์ผสม เมื่อได้รับ heat-killed antigen ใช้ β-glucan เป็นแอดจูแวนท์

ตารางที่ 6 ความสามารถในการกำจัดปรสิต trypanosome ของปลาดุกพันธุ์ผสมหลังจากฉีด sonicated antigen (SA) และใช้ Freund's เป็นแอดจูแวนท์

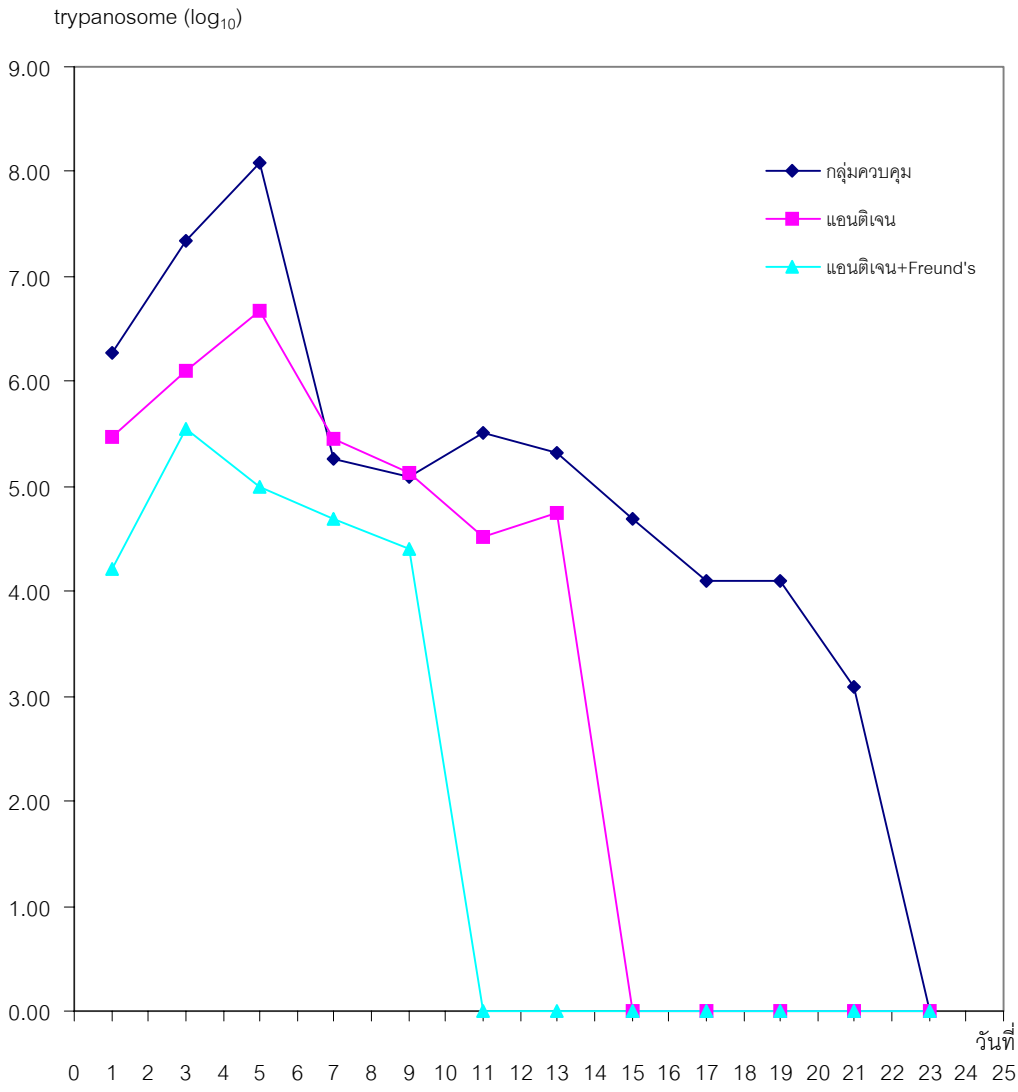
วันที่	กลุ่มควบคุม [1] (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	SA [1] (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	SA + Freund's [2] (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)
1	1.91±0.69 [a]	0.29±0.18 [b]	0.01±0.01 [b]
3	22.1±12.6 [a]	1.26±0.72 [a]	0.35±0.33 [a]
5	119±119 [a]	4.63±4.34 [a]	0.10±0.04 [a]
7	0.18±0.09 [a]	0.29±0.24 [a]	0.05±0.01 [a]
9	0.12±0.06 [a]	0.13±0.09 [a]	0.02±0.01 [a]
11	0.32±0.20 [a]	0.03±0.01 [a]	0 [a]
13	0.20±0.18 [a]	0.05±0.03 [a]	0 [a]
15	0.05±0.05 [a]	0 [a]	0 [a]
17	0.01±0.01 [a]	0 [a]	0 [a]
19	0.01±0.01 [a]	0 [a]	0 [a]
21	0.001±0.001 [a]	0 [a]	0 [a]
23	0 [a]	0 [a]	0 [a]

[1] ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปลา 10 ตัว

[2] ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปลา 6 ตัว

ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ฉีด SA และ กลุ่มที่ฉีด SA ผสม Freund's



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณปรสิต trypanosome ในปลาดุกพันธุ์ผสม เมื่อได้รับ sonicated antigen ใช้ Freund' s เป็นแอดจูแวนท์

ตารางที่ 7 ความสามารถในการกำจัดปรสิต trypanosome ของปลาดุกพันธุ์ผสมหลังจากฉีด sonicated antigen (SA) และใช้ Freund's เป็นแอดจูแวนท์

วันที่	กลุ่มควบคุม [3] (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	SA [2] (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	Freund's [1] (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)	SA + Freund's [2] (10^6 ตัว/มิลลิลิตร)
1	6.86±2.37 [a]	2.74±2.37 [a]	17.00±4.33 [b]	2.45±1.04 [a]
3	3.63±2.61 [a]	46.0±31.1 [ab]	140.00±61.0 [b]	45.00±42.00 [ab]
5	36.00±35.0 [a]	0.10±0.04 [a]	0.95±82.00 [a]	0.57±0.57 [a]
7	0.23±0.10 [a]	0 [a]	1.52±1.22 [a]	0.08±0.08 [a]
9	0.13±0.08 [a]	0 [a]	0.24±0.19 [a]	0.28±0.28 [a]
11	0.11±0.06 [a]	0 [b]	0.02±0.02 [ab]	0.28±0.28 [ab]
13	0.06±0.03 [a]	0 [a]	0.04±0.04 [a]	0 [a]
15	0.01± 0.01 [a]	0 [a]	0 [a]	0 [a]
17	0 [a]	0 [a]	0 [a]	0 [a]

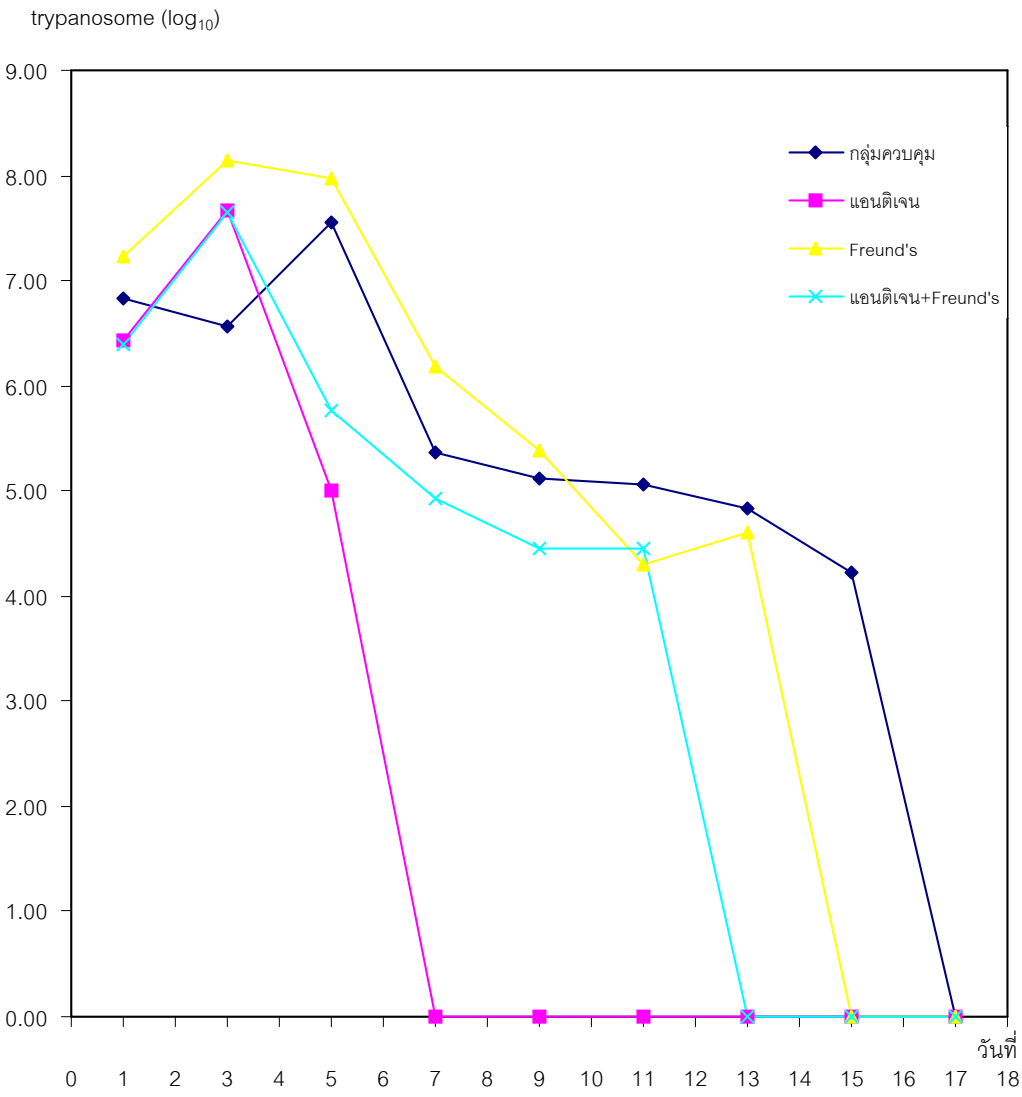
ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

[1] ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปลา 10 ตัว

[2] ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปลา 9 ตัว

[3] ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปลา 7 ตัว

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ฉีด SA กลุ่มที่ฉีด Freund's และ กลุ่มที่ฉีด SA ผสม Freund's

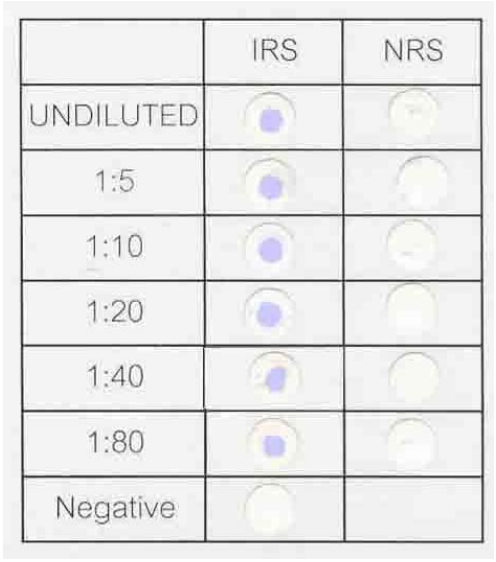


รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณปรสิต trypanosome ในปลาดุกพันธุ์ผสม เมื่อได้รับ sonicated antigen ใช้ Freund' s เป็นแอดจูแวนท์

5. การตรวจหาแอนติบอดีต่อปรสิต trypanosome ในซีรัมกระต่าย

จากการนำซีรัมกระต่ายที่ได้รับการฉีดด้วย sonicated antigen 2 ครั้ง มาทำการตรวจสอบหาแอนติบอดีด้วยวิธี Ouchterlony โดยเจือจางซีรัม และแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ไม่เจือจาง (undiluted) 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 ไม่พบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติเจนทุกซีรัมกระต่าย หลังจากนั้นนำซีรัมดังกล่าวมาทดสอบโดยวิธี Dot-blot ELISA ซึ่งทดลองแบบ checker board โดยใช้แอนติเจนแบบ sonicated และ supernatant มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้ ไม่เจือจาง 1:10 1:20 1:40 1:80 และ 1:160 เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ทดสอบหาระดับแอนติบอดี พบว่าค่าความเจือจางที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นที่ไม่เจือจาง ของ supernatant antigen

จากการนำซีรัมกระต่ายที่ได้รับการฉีดด้วย sonicated antigen 3 ครั้งมาทำการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี Ouchterlony (double diffusion) พบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติเจนกับซีรัมกระต่าย เกิดแถบตะกอนเห็นได้ชัดในซีรัมที่ไม่เจือจาง และเจือจาง 1:2 และนำมาทดสอบโดยวิธี passive hemagglutination มีค่าแอนติบอดีเท่ากับ 1:64 แต่วิธีDot-blot ELISA มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 1:80



รูปที่ 19 ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนของปรสิต trypanosome กับซีรัมกระต่าย
IRS หมายถึง ซีรัมกระต่ายที่ได้รับการฉีดด้วยแอนติเจน
NRS หมายถึง ซีรัมกระต่ายก่อนทดลอง

6. การตรวจหาปริมาณแอนติบอดีของปลาโดยวิธี passive hemagglutination

จากการทดลองที่แบ่งปลาทดลองออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ฉีด sonicated antigen และ กลุ่มที่ฉีด sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ เมื่อนำซีรัมปลาดังกล่าว มาตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่จำเพาะกับปรสิต trypanosome โดยซีรัมที่นำมาทดสอบมา 3 ระยะคือ ระยะหลังจากได้รับ sonicated antigen 1 สัปดาห์ ระยะที่ตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด และระยะหลังจากที่ตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้ผลดังตารางที่ 6 คือ สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมจากระยะหลังได้รับ sonicated antigen 1 สัปดาห์ ของปลากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen มีค่าเท่ากับ 1:8 และ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์มีค่า 1:2 อย่างละ 1 ตัวจากปลาทดลอง 10 ตัว ส่วนแอนติบอดีในซีรัมของระยะที่ตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด ตรวจพบในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย sonicated antigen ซึ่งมีค่า 1:4 (1 ตัวใน 8 ตัว) และ 1:2 (1 ตัวใน 9 ตัว) ตามลำดับ และแอนติบอดีจากระยะหลังจากตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถตรวจพบเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ เป็นจำนวน 3 ตัวให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ดังนี้ 1:2 (1 ตัวใน 10 ตัว) และ 1:128 (2 ตัวใน 10 ตัว) ดังแสดงในตารางที่ 8

การตรวจสอบซีรัมปลาจากการทดลองที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ฉีด sonicated antigen กลุ่มที่ฉีด Freund's แอดจูแวนท์ และ กลุ่มที่ฉีด sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ รวม 4 ระยะได้แก่ ซีรัมก่อนทดลอง ซีรัมหลังได้รับ sonicated antigen ครบ 1 สัปดาห์ ซีรัมที่ตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด และซีรัมหลังการฉีดปรสิตซ้ำ (rechallence) ให้ผลการทดลองดังนี้ ไม่พบแอนติบอดีในซีรัมปลาก่อนทดลองของทุกกลุ่มทดลอง ส่วนระยะหลังได้รับสารทดสอบ 1 สัปดาห์ มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉพาะกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์มีค่า 1:4 (1 ตัวใน 10 ตัว) และ 1:8 (2 ตัวใน 10 ตัว) ส่วนกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ ไม่พบแอนติบอดี และในระยะที่ตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด สามารถตรวจพบแอนติบอดีจากปลากลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้นและพบเพียงแค่ 1 ตัวจากปลา 8 ตัวมีค่าเท่ากับ 1:2 ส่วนค่าแอนติบอดีในซีรัมหลังการฉีดปรสิตซ้ำมีค่า 1:2 และ 1:4 ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์อย่างละ 1 ตัวจากปลาทดสอบ 9 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 แอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี passive hemagglutination ของซีรัมปลาในชุดทดสอบความสามารถในการกำจัดปรสิต (ไม่มีกลุ่มที่ฉีด Freund's)

	หลังได้รับสารทดสอบ 1 สัปดาห์	หลังจากตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด	หลังจากตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด 1 สัปดาห์
กลุ่มควบคุม	- (0/10)[1]	1:4 (1/8)	- (0/8)
SA	1:8 (1/10)	1:2 (1/9)	- (0/9)
SA+Freund's	1:2 (1/10)	- (0/10)	1:128 (2/10) 1:2 (1/10)

[1] จำนวนปลาที่เกิดแอนติบอดีต่อจำนวนปลาทั้งหมดที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 9 แอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี passive hemagglutination ของซีรัมปลาในชุดที่ทดสอบความสามารถในการกำจัดปรสิต

	ก่อนทดลอง	หลังได้รับสารทดสอบ 1 สัปดาห์	หลังจากตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด	หลังได้รับการฉีดปรสิตซ้ำ
กลุ่มควบคุม	- (0/10) [1]	- (0/10)	- (0/9)	1:4 (1/9) 1:2 (1/9)
SA	- (0/10)	1:4 (1/10)	1:2 (1/8)	- (0/8)
Freund's	- (0/10)	- (0/10)	- (0/6)	- (0/6)
SA + Freund's	- (0/10)	- (0/10)	- (0/9)	1:4 (1/9) 1:2 (1/9)

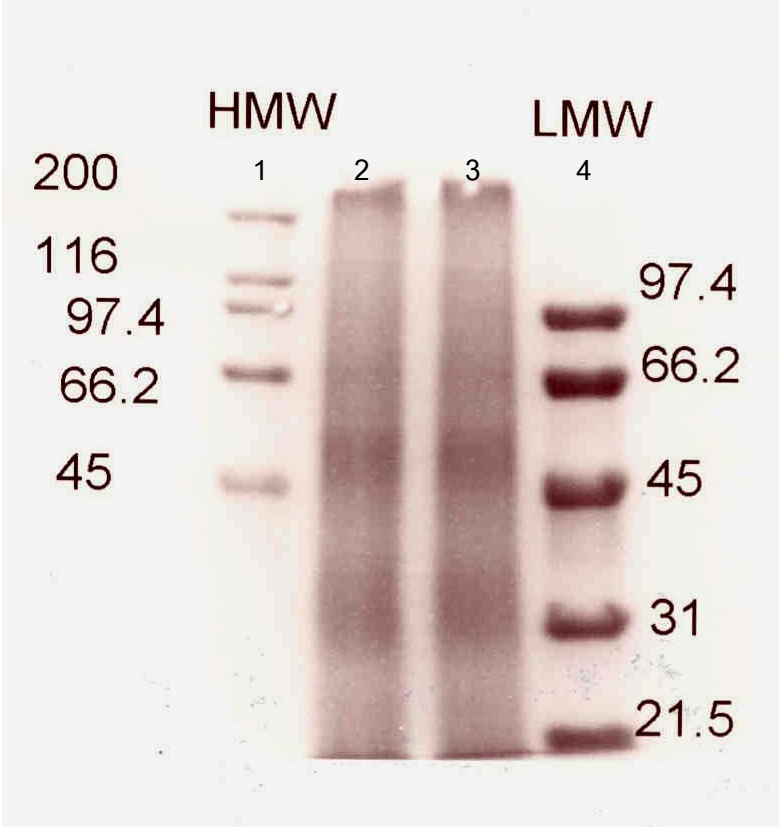
[1] จำนวนปลาที่เกิดแอนติบอดีต่อจำนวนปลาทั้งหมดที่นำมาทดสอบ

7. การตรวจหาแอนติเจนของปรสิต trypanosome ในซีรัมปลาโดยวิธี Dot-blot ELISA

เมื่อนำซีรัมปลาระยะก่อนทดลองและระยะที่พบปรสิตในกระแสเลือด7 วัน (9 ตัว) 15 วัน (2 ตัว) 30 วัน (1 ตัว) 45 วัน (1 ตัว) รวม 13 ตัวอย่าง มาทดสอบหาแอนติเจนด้วยวิธี Dot-blot ELISA ไม่พบตัวอย่างซีรัมปลาที่ให้ผลบวก (positive)

8. การศึกษาคุณสมบัติของ sonicated antigen โดยวิธี SDS-PAGE

นำปรสิต trypanosome มาทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator (sonicated antigen) ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของ Mc Farland No.3 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.92 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาศึกษาลักษณะโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโตรโฟไลซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) พบว่ามีแถบโปรตีน 3 แถบซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 72.3 kDa 56.07-46.33 kDa และ 32.30-24.00 kDa ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 20 ลักษณะแถบโครงสร้างโปรตีนของ sonicated antigen ของปรสิต trypanosome เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (marker protein) ซึ่งประกอบด้วย myosin (200,000) β-galactosidase (116,250) Phosphorylase b (97,400) Ovalbumin (45,000) Carboric anhydase (31,000) และ Trypsin inhibitor (21,500) ตามลำดับ
แถวที่ 1 และ 4 แถบโปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 และ 3 sonicated antigen