**วิจารณ์ผลการศึกษา**

*การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ Streptococcus* sp.

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลากะพงขาวที่เกิดโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้เป็นเชื้อ *Streptococcus* sp. ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ เซลล์มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก ต่อกันเป็นสายสั้นๆ ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับรายงานของ เยาวนิตย์ และคณะ (2543) ที่แยกเชื้อจากปลากะพงขาวที่ป่วยใน อ.ยะหริ่ง จ.ปัตตานี และ ต.นาทับ อ.จะนะ จ.สงขลา เมื่อทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือด พบว่าไม่เกิดวงใส (clear zone) ทำให้แยกชนิดของเชื้อ *Streptococcus* sp. จัดอยู่ในกลุ่ม non-haemolytic สอดคล้องกับรายงานของ สถาพรและเยาวนิตย์ (2530) ซึ่งได้วิเคราะห์ชนิดของเชื้อ *Streptococcus* sp. เป็น non - haemolytic น่าจะเป็นผลมาจากการใช้เลือดคนแทนเลือดแกะ แล้วไม่พบวงใสจึงทำให้ แยกชนิดของเชื้อ *Streptococcus* sp.เป็น non - haemolytic ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อใช้เลือดคนและเลือดแกะ ก็ไม่เกิดวงใสเช่นกัน จึงทำให้แยกได้เป็น non - haemolytic ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ เยาวนิตย์และคณะในปี 2543 ที่พบเชื้อและแยกเป็น beta- haemolytic streptococci เนื่องจากพบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

จากผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคพบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากสมองมักจะมีความรุนแรงสูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากอวัยวะอื่นและเชื้อที่แยกได้จากสมองจะมีความบริสุทธิ์มากกว่าที่แยกได้จากอวัยวะอื่น (Kitao, 1982) โดยการติดเชื้อในสมองมีความสำคัญต่อการผิดปกติของปลาและเป็นอาการเริ่มแรกของการเกิดโรค (Evans *et al.*, 2000), Evans *et al.*, (2001) รายงานว่าเชื้อ *Streptococcus* sp.ที่แยก ได้จากสมอง จะทำให้ปลากระบอกและปลาซีบรีมตาย 90 – 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ และพบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกจากสมอง จะทำให้ปลาตายสูงถึง 81 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับ เชื้อที่แยกได้จากอวัยวะอื่น

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยใช้ API 20 STREP พบว่า ไม่มีการสร้างเอนไซม์ hippurate hydrolase, catalase และ oxidase แต่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase เพื่อย่อยแป้ง สำหรับการผลิตกรดจากน้ำตาล พบว่าสามารถผลิตกรดจากน้ำตาล glucose, mannitol, maltose, ribose และ trehalose ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bromage *et al.*, (1999) พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงขาวที่เลี้ยงในประเทศออสเตรเลีย สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล glucose, sucrose, mannitol, ribose และ trehalose เช่นเดียวกับรายงานของ เยาวนิตย์ และคณะ (2543)

จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงขาวมีความไวต่อยา นอร์ฟล๊อกซาซิน ออกซี่เตตร้าซัยคลิน ซัลฟาเมธท๊อกซาโซล+ไตรเมธโธพริม ซาราฟล๊อกซาซิน เพนนิซิลิน ไตรเมธโธพริม แอมพิซิลลิน และเออริโทรมัยซิน แต่จะดื้อต่อยาออกโซลินิค แอซิด และนาลิดิอิค แอซิด ในโรงเพาะฟักได้ ซึ่งในการทดสอบความไวและการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่

แยกได้ในครั้งนี้คล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีรายงานจากปลาสลิดหินในประเทศสิงคโปร์ (Foo *et al.*, 1985) ปลานิลลูกผสมในเท็กซัส (Perera *et al.*, 1994) และปลาเทอร์บอทในสเปน (Doménech *et al.*, 1996) จากการใช้ยาต้านจุลชีพในการควบคุมโรคที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถที่จะควบคุมอย่างได้ผลดังรายงานต่างๆ เช่น Kusuda and Takemaru (1987) ใช้ยา josamycin ในการรักษาปลาหางเหลืองที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยผสมลงในอาหารให้ปลากินในอัตรา 20 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 5 วัน และใช้ในอัตรา 30 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 3 วัน พบว่าสามารถรักษาการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาได้ ซึ่งทำให้ปลามีการรอดตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Aoki *et al.*, (1989) ใช้ lincomycin และ tetracyclin ในปลาหางเหลืองที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. นอกจากนี้ Ghittino and Prearo (1992) ใช้ erythromycin โดยผสมอาหารให้กินในอัตรา 50 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 7 วัน ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ติดเชื้อ *S. faecalis* หรือ *S. faecium*

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ความเป็นกรด - ด่างและความเค็มต่างๆ กัน พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 6 -10 และความเค็ม 0 - 50 ส่วนในพันส่วน ถ้าความเค็มสูงกว่านี้จะทำให้อัตราการเจริญลดลงอย่างรวดเร็ว โดยความเป็นกรด - ด่างจะเป็นตัวควบคุมขบวนการเมตาบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานของ Al-Harbi (1994) ได้รายงานว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลานิลลูกผสมสามารถเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 5.5 - 9.5 และความเค็ม 5 - 35 ส่วนในพันส่วน

*ความรุนแรงของเชื้อ Streptococcus sp. ในปลากะพงขาว*

จากการหาค่า $LD_{50}$ พบว่าปลากะพงขาวจะยอมรับการติดเชื้อได้ง่ายและรวดเร็ว โดยปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตายจะขึ้นอยู่กับขนาดของปลา ถ้าปลาขนาดเล็กการยอมรับการติดเชื้อจะง่ายขึ้น ถึงแม้ว่าปริมาณเชื้อจะต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการยอมรับการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว ปลานิล และปลากัลฟ์คิลลิฟิช (Rasheed and Plumb, 1984; Bromage *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2001) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเครียดจากการลดความเค็มของน้ำทะเลก็มีผลทำให้การเกิดโรครุนแรงขึ้น

*การก่อโรคของเชื้อ Streptococcus sp. ในปลากะพงขาว*

จากการศึกษาปริมาณเชื้อจากอวัยวะต่างๆ ของปลากะพงขาว พบว่าปริมาณเชื้อจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในทุกอวัยวะหลังจากได้รับเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อมีการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพของตัวปลา แล้วมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยในระยะแรกของการติดเชื้อจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยต์และกรานูลโลซัยต์ในกระแสเลือดลดลง จึงทำให้การกำจัดเชื้อเกิดขึ้นได้น้อย เช่นเดียวกับการรายงานของ Kusuda and Kimura (1978) ที่พบว่าไตจะมีปริมาณของเชื้อสูงที่สุด เนื่องจากไตเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบเลือดจึงทำให้มีปริมาณของเชื้อสูง แต่

เมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณของเชื้อจะลดลง เนื่องจากการเพิ่มกลไกในการป้องกันโรคของปลา ซึ่งในการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเชื้อจะมีลักษณะที่เหมือนกับการเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง โดยเชื้อมีระยะการเจริญและการตาย (Rasheed and Plumb, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเชื้อในเลือดจะลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่พบเชื้อ เนื่องจากปลามีการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาในระบบไหลเวียนเลือด โดยกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายคือ การเกิดฟาโกซัยโตซีส (สุทธิพันธ์, 2537)

อาการของโรคที่ปรากฏให้เห็นในการทดลองครั้งนี้ พบว่าปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. มีอาการว่ายน้ำควงสว่าน เสียการทรงตัว เคลื่อนที่ช้า ลำตัวจะมีสีคล้ำ ตาโปนข้างเดียวหรือ 2 ข้าง ตาขุ่น มีของเหลวในช่องท้อง เช่นเดียวกับรายงานการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดปัตตานีและสงขลา (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543) รวมทั้งปลาบู่ทราย (จิราพร และคณะ, 2529) และปลานิล (กมลพร, 2539) นอกจากนี้ยังพบอาการอื่นๆ อีก เช่น การตกเลือดบริเวณตา กระพุ้งแก้ม โคนครีบ บริเวณปาก บริเวณลำตัว รวมทั้งการเกิดบาดแผลบริเวณลำตัว (Plumb, 1994) โดยส่วนใหญ่แล้วการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. จะมีผลต่อตา ซึ่งสามารถพบได้บ่อย โดยจะเกิดบาดแผลบริเวณตา การบวมน้ำ มีการตายของเนื้อเยื่อบริเวณ optic nerve รวมทั้งเลนส์ตา (Inglis *et al.*, 1993) สำหรับอาการภายในนั้นพบว่าตับมีสีซีด ไตและม้ามบวม สมองเป็นสีชมพู เช่นเดียวกับรายงาน ในปลานิล (กมลพร, 2539) ปลาหางเหลือง (Sano and Fukuda, 1987) และปลาแรบบิทฟิช (Yuasa *et al.*, 1999)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เวลา 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน พบว่าค่าฮีมาโตคริตลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการทดลองของ Foo *et al.*, (1985) โดยมีค่าต่ำสุดในวันที่ 10 หลังจากได้รับเชื้อ แสดงว่าปลาอยู่ในสภาวะเลือดจาง (anemia) หลังจากนั้นค่าฮีมาโตคริตจะเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มที่จะกลับเข้าสู่สภาพปกติ ค่าฮีโมโกลบินมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งค่าจะลดลงตามระยะเวลาของการได้รับเชื้อและจะลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยค่าฮีโมโกลบินมีความสัมพันธ์กับค่าฮีมาโตคริต เมื่อค่าฮีมาโตคริตลดลงย่อมจะส่งผลให้ค่าฮีโมโกลบินลดลงตามไปด้วย (Cardwell and Smith, 1971; Hammerschag and Bejarano, 1991) นอกจากนี้ Foda (1973) รายงานว่าปลาแอตแลนติกแซลมอนที่เป็นโรคฟูรันคูโลซีส ค่าฮีมาโตคริตและค่าฮีโมโกลบินลดลงต่ำกว่าปลาปกติอย่างเห็นได้ชัดและตามรายงานของ Takahashi (1984) ปลาที่เกิดโรคจากเชื้อ *A. hydrophilla* จะมีค่าฮีมาโตคริตและค่าฮีโมโกลบินลดลงตามระยะเวลาของการติดเชื้อ ซึ่งแสดงว่าเมื่อปล่อยปลาให้เป็นโรคมากขึ้นค่าฮีมาโตคริตและค่าฮีโมโกลบินจะยิ่งลดลง (Cruz and Muroga, 1989; Kakuta and Namba, 1990) ในส่วนของค่าพลาสมาโปรตีนมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งค่าลดลงต่ำมากในวันที่ 5 และ 7 หลังจากได้รับเชื้อ (Taylor, 1977) แต่หลังจากนั้นค่าจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและกลับเข้าสู่สภาพปกติ สำหรับปริมาณเม็ดเลือดแดงจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกและลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการได้รับเชื้อ โดยปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำสุดในช่วงวันที่ 7 – 14 หลังจากได้รับเชื้อและปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (ส่งศรี และชัยชาญ, 2525; Pearson *et al.*, 1994) นอกจากนี้ปริมาณเม็ดเลือดขาว จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

ในช่วงวันแรกของการได้รับเชื้อ (Lehmann *et al.*, 1989) และลดลงต่ำสุดในวันที่ 3 แต่หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดขาวจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมในวันที่ 14 โดยที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวจะเป็นตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดในตัวปลา (Mcleay and Gordon, 1977) โดยส่วนใหญ่แล้วปลาที่เกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรียจะมีค่าองค์ประกอบเลือด (ค่าฮีมาโตคริต ค่าฮีโมโกลบิน และพลาสมาโปรตีน) ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (Harbell *et al.*, 1979; Qoentel and Aldrin, 1986; Lehmann *et al.*, 1987) นอกจากนี้ค่าองค์ประกอบเลือดเหล่านี้ มีการเปลี่ยนแปลงได้ในกรณีอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลหรือสภาพของตัวปลา (Banks *et al.*, 1971), สารพิษ (สิทธิ และคณะ, 2530) หรือการขาดสารอาหารบางตัว เช่น การขาดวิตามินซี (Agrawal and Mahajan, 1980) และวิตามินอี (Moccia *et al.*, 1984)

จากการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในอวัยวะหลายส่วน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากสาเหตุหลักคือการติดเชื้อ *Streptococcus* sp.และสาเหตุร่วมเช่น การอดอาหาร, การขาดวิตามินที่สำคัญเช่นการขาดวิตามินซี หรือการได้รับสารพิษต่างๆ ก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเช่นกัน เนื้อเยื่อตับที่เปลี่ยนแปลงพบว่าเกิดช่องว่างอยู่ภายในเซลล์จนดันนิวเคลียสไปชิดขอบเซลล์เป็นจำนวนมากทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่และเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ตับ อาจจะเนื่องจากการที่เซลล์บวมและมีไซโตพลาสซึมมากผิดปกติ รวมทั้งการเกิดกรานูล ซึ่งภายในมีแมคโครฟาจแทรกอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rasheed *et al.*, (1985) ที่พบว่าเนื้อเยื่อตับปลาบูลมินเนา (Bullminnows, *Fundulus grandis*) ที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. มีลักษณะของเซลล์เสื่อมสภาพ เกิดช่องว่างและการเกิดกรานูล ส่วนความผิดปกติของเนื้อเยื่ออื่นในการศึกษาครั้งนี้ พบเมลาโนแมคโครฟาจแทรกอยู่เป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อไตส่วนหน้า ไตส่วนหลังและม้าม โดยเห็นเป็นกลุ่มเซลล์สีน้ำตาลอ่อน เมื่อย้อมด้วยสี H&E (สุปราณี และคณะ, 2536) แต่จะมีสีเข้มในปลาที่อายุมากหรือปลาที่เป็นโรค (Ferguson, 1989) เมลาโนแมคโครฟาจจะมีลักษณะทรงกลมหรือรี ซึ่งจำนวนและขนาดของเมลาโนแมคโครฟาจจะขึ้นอยู่กับอายุปลา ความเครียดและโรค โดยพบว่าปลาที่มีอายุมากจะมีจำนวนและขนาดของเมลาโนแมคโครฟาจเพิ่มขึ้น (Ferguson, 1989) จากการศึกษาครั้งนี้พบเมลาโนแมคโครฟาจมีจำนวนมากผิดปกติ เนื่องจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Domitrovic (2000) ว่าตับปลา *Cichlasoma dimerus* ที่เป็นโรคจะมีจำนวนเมลาโนแมคโครฟาจเพิ่มขึ้นและมีขนาดใหญ่กว่าปลาที่ไม่เป็นโรค นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อไตส่วนหลัง พบว่ามีการหดตัวของโกลเมอรูลัสและเกิดไฮยาลินดร๊อปเลทในส่วนของท่อไต เช่นเดียวกับการติดเชื้อ *Streptococcus* sp . ในปลานิลและปลากดอเมริกัน (Chang and Plumb, 1996) ส่วนเนื้อเยื่อหัวใจพบว่าเกิดการอักเสบและเกิดกรานูลในบริเวณเยื่อบุหัวใจ (epicardium) และในกล้ามเนื้อหัวใจ สำหรับเนื้อเยื่อสมองพบว่า เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์สมอง ส่วนความผิดปกติของของเนื้อเยื่อเหงือกนั้นพบว่าเกิดการเชื่อมต่อกันของซี่เหงือกเป็นรูปทรงกระบอง เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติและการขยายตัวของเส้นเลือดบริเวณซี่เหงือกและยังพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตาเกิดการเสื่อมสภาพของเลนส์ตาโดยจะพบ

ช่องว่างและแคปซูลซึ่งมีเชื้อ *Streptococcus* sp. อยู่ภายใน จากลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในการทดลองครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ *L. garvieae* ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (Eldar and Ghittino, 1999) และเชื้อ *P. fluorescens* ในปลานิล (Miyazaki *et al.*, 1984a) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Miyazaki *et al.* (1984b) พบว่าปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. มีการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อบริเวณตา ซึ่งจะมีแมคโครฟาจแทรกอยู่ในบริเวณที่อักเสบ รวมทั้งการเกิดแคปซูล โดยมีเชื้อ *Streptococcus* sp. อยู่ภายใน เกิดการอักเสบและเกิดกรานูลในกล้ามเนื้อหัวใจ เกิดการการตาย เสื่อมสภาพของเซลล์ตับและการเกิดช่องว่าง ในเนื้อเยื่อม้ามจะมีแมคโครฟาจและฮีโมซิดารินเพิ่มขึ้น เนื้อเยื่อไตเกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัสและเกิดไฮยาลินดร๊อปเพลท รวมทั้งเกิดการตายของเซลล์สมอง

**การใช้วัคซีนในปลากะพงขาว**

*ความปลอดภัยของวัคซีนและการตอบสนองต่อปริมาณเซลล์วัคซีน*

ในการทดลองครั้งนี้ใช้วัคซีนชนิด formalin killed vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนที่สามารถผลิตขึ้นได้ง่ายและเป็นวัคซีนที่นิยมผลิตแบบการค้า (Mowat and Rweyemamu, 1997) เกรียงศักดิ์ และคณะ (2525) ได้ทำการทดลองใช้วัคซีน 2 ชนิด คือ heat killed vaccine และ formalin killed vaccine ที่เตรียมจากเชื้อ *A. hydrophila* พบว่าการใช้วัคซีนชนิด formalin killed vaccine จะทำให้ปลามีค่าไตเตอร์สูงและสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้นานกว่าการใช้วัคซีนชนิด heat killed vaccine เนื่องจากวัคซีนชนิด formalin killed vaccine จะมีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนที่ดีกว่า heat killed vaccine

วัคซีนที่ใช้ในการทดลองจะเก็บไว้ในฟอร์มาลินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่จะนำไปใช้ใน ปลากะพงขาว โดย Xu and Rogers (1993) รายงายว่าฟอร์มาลินจะตกค้างอยู่ในปลาไม่ควรเกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์ของปลาจะพบฟอร์มาลิน 12 – 55.2 ส่วนในล้านส่วน (ฟอร์มัลดีไฮด์ 3 – 12 ส่วนในล้านส่วน) โดยจะพบในกล้ามเนื้อ ผิวหนังและอวัยวะภายใน เนื่องจากฟอร์มัลดีไฮด์เป็นสารที่เกิดขึ้นจากขบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ปกติในร่างกาย ดังนั้นในการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องปลากะพงขาวและปลากะพงขาวไม่ตาย เป็นเพราะแบคทีเรียถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินและไม่มีฟอร์มาลินตกค้างเกินระดับของเซลล์ที่รับได้

ในการทดสอบความปลอดภัยของการให้วัคซีนทั้ง 3 แบบ คือ การฉีดเข้าช่องท้อง การแช่ และการกิน พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นไม่ทำให้ปลาตายและระดับของฟอร์มาลินที่อยู่ในวัคซีนอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อปลากะพงขาว ซึ่งสอดคล้องกับ Cardell and Eimers (1990) ได้ใช้วัคซีน formalin killed *V. anguillarum* และ *V. odalii* ในปลาเทร้าท์ พบว่ามีการรอดตาย 99.9 เปอร์เซ็นต์ หลังจากให้วัคซีนและมีประสิทธิภาพของวัคซีน 90 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปแล้วจะกำหนดให้ค่า

ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของวัคซีนมีค่าสูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ จึงถือว่าวัคซีนนั้นมีประสิทธิภาพดี (Ellis, 1988)

จากการทดสอบการตอบสนองของปลากะพงขาวต่อปริมาณเซลล์วัคซีน โดยฉีดวัคซีนที่ปริมาณเซลล์วัคซีนต่างๆ กัน คือ $2.50 \times 10^{8}$, $2.50 \times 10^{9}$ และ $2.50 \times 10^{10}$ CFU/ml แล้วทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ในวันที่ 10, 20 และ 30 หลังจากได้รับวัคซีน พบว่าปริมาณเซลล์วัคซีนที่ $2.50 \times 10^{10}$ CFU/ml มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด มีประสิทธิภาพของวัคซีนและค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงกว่าปริมาณเซลล์วัคซีน $2.50 \times 10^{8}$ และ $2.50 \times 10^{9}$ CFU/ml อย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองของ Pradit (1984) พบว่าการฉีดวัคซีนที่ปริมาณเซลล์วัคซีน $5.00 \times 10^{9}$ CFU/ml สามารถกระตุ้นให้ปลากดอเมริกันสร้างแอนติบอดี้ได้สูงสุด ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Gould *et al.*, (1979) ที่ใช้วัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาแซลมอน ด้วยวิธีแช่นาน 2 นาที พบว่าปริมาณเซลล์วัคซีนที่ $5.00 \times 10^{5}$ CFU/ml จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันการติดเชื้อ *V. anguillarum* อาจเป็นผลมาจากชนิดของปลาแตกต่างกัน ชนิดของเชื้อที่แตกต่างกัน รวมทั้งสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งสิ่งต่างๆ เหล่านี้ล้วนแต่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน จึงทำให้ปริมาณเซลล์วัคซีนแตกต่างกัน การให้วัคซีนในปริมาณเซลล์วัคซีนที่สูงหรือต่ำ สามารถที่จะกระตุ้นให้ปลามีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือการไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (tolerance) ดังนั้นในการให้วัคซีนจะต้องให้ในปริมาณเซลล์วัคซีนที่ไม่มากหรือน้อยเกินไป เพื่อป้องกันการไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน สุทธิพันธ์ (2537) รายงานว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น ปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ วิธีการให้แอนติเจนและคุณสมบัติของแอนติเจน โดยเกิดขึ้นเนื่องจากการไม่ตอบสนองของ helper T lymphocyte และ B lymphocyte ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของ suppressor T cell โดยการหลั่งสารออกมาควบคุมการทำงานของ B cell หรือ T cell และยังเป็นการยับยั้งการสร้างแอนติบอดี้

*วิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว*

*การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด*

จากผลการให้วัคซีนด้วยการฉีด 2 แบบ คือ การฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA และการฉีดวัคซีนผสม CFA พบว่าอัตราการตายของปลากะพงขาวที่ 10 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม โดยปลามีการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 20 และ 30 วัน พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการการฉีดวัคซีนผสม CFA มีอัตราการตายต่ำกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.67 และ 28.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ที่ 20 วัน) และที่มีค่าเท่ากับ 16.67 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ที่ 30 วัน) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการฉีดวัคซีนผสม CFA จะทำให้ปลามีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้นและยังกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้นานยิ่งขึ้น จึงทำให้สามารถป้องกันโรคได้ดีกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA โดยไปกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ ขบวนการจับกินและยังกระตุ้นให้เอ็นเค-เซลล์ (NK-cell) และเม็ดเลือดขาวเพิ่มปริมาณมากขึ้น (Kodama *et al.*, 1989; Kajita *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995a)

ค่า RPS ของปลาที่ให้วัคซีนด้วยการฉีด พบว่าที่ 10 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่า RPS เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 20 และ 30 วัน พบว่าปลาที่ฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่า RPS สูงกว่าปลาที่ฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA โดยมีค่า 97.29 และ 54.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ที่ 20 วัน) และมีค่าเท่ากับ 73.68 และ 31.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ที่ 30 วัน) จึงถือได้ว่าการฉีดวัคซีนผสม CFA มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจาก CFA มีผนังเซลล์ของ *Mycobacterium tuberculosis* ผสมอยู่จึงสามารถกระตุ้นแมคโครฟาจให้หลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1 : IL-1) ซึ่งมีผลทำให้การนำเสนอแอนติเจนและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Buchmann *et al.*, (1997) ที่ศึกษาผลของวัคซีนต่อการรอดตายของปลา บอลติคแซลมอนที่ให้วัคซีนด้วยการฉีดเข้าช่องท้อง โดยใช้วัคซีนผสมออยแอดจูแวนท์ (oil adjuvant) พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนผสมออยแอดจูแวนท์มีเปอร์เซ็นต์การตาย 0.02 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า RPS เท่ากับ 99.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตาย 10.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองของ Rahman *et al.*, (2000) ทดลองใช้วัคซีนที่ผสมออยแอดจูแวนท์และวัคซีนที่ไม่ผสมออยแอดจูแวนท์ ฉีดให้แก่ปลาเอยู (ayu) พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนที่ผสมออยแอดจูแวนท์ มีค่า RPS เท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ไม่ผสมออยแอดจูแวนท์ มีค่า RPS เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์

ส่วนค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีด พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ ที่ 10, 20 และ 30 วัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการให้วัคซีนผสม CFA มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงกว่าการให้วัคซีนไม่ผสม CFA (1:64, 1:128 และ 1:64) ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจาก CFA เป็นแอดจูแวนท์ที่อยู่ในรูปของ water - in oil emulsion จึงเป็นตัวช่วยให้แอนติเจนค่อยๆ ถูกปลดปล่อยและกระจายจากตำแหน่งที่ฉีดอย่างช้าๆ จึงทำให้มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอยู่ตลอดเวลา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Areechon *et al.*, (1991) ที่ศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาดุกอุยต่อวัคซีนเชื้อ *A. hydrophila* โดยการฉีดเข้าช่องท้อง แล้วเปรียบเทียบการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ คือ การฉีดวัคซีนไม่ผสม adjuvant และการฉีดวัคซีนผสม adjuvant พบว่าการฉีดวัคซีนผสม adjuvant มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม adjuvant ที่มีค่าเท่ากับ 1:47.6 และ 1:50 ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของ จิตต์เกษม และคณะ (2536) และ Hoel *et al.*, (1998) การทดลองครั้งนี้ พบว่าชุดควบคุมมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 0 แสดงว่าปลากะพงขาวที่นำมาทดลองไม่เคยได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. มาก่อน จึงไม่มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้อในซีรั่มและปลาที่มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ต่ำอาจมีสาเหตุมาจากความเครียดของปลา อันเนื่องมาจากการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่ม

*การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่*

การทดลองให้วัคซีนแก่ปลากะพงขาวด้วยการแช่ 2 แบบ คือ การแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic พบว่าอัตราการตายของปลากะพงขาวที่ 10 วัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 45 และ 18.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่ 20 และ 30 วัน พบว่าอัตราการตายในชุดควบคุมและ

การแช่วัคซีนโดยตรงจะไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic โดยมีค่าเท่ากับ 20 และ 58.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic จะทำให้ปลามีการสูญเสียน้ำ เมื่อนำมาแช่ในวัคซีนจึงทำให้มีการดูดน้ำกลับเข้าสู่ตัวปลาได้สูง จึงทำให้วัคซีนเข้าสู่ร่างกายเพิ่มมากกว่าการแช่วัคซีนโดยตรง เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาที่สัมผัสกับวัคซีนเท่ากัน (Croy *et al.*, 1977; Antipa *et al.*, 1980)

ค่า RPS ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการแช่ พบว่าที่ 10 และ 20 วัน การแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยค่า RPS จะสูงในการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic มีค่าเท่ากับ 71.80 และ 70.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Antipa *et al.*, (1980) ที่ทำการศึกษาการให้วัคซีนต้านทานเชื้อ *V. anguillarum* ในปลาซอคอายแซลมอน (sockeye salmon) โดยแช่ปลาในน้ำเกลือเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปแช่ในวัคซีนอีก 1.5 นาที และการแช่วัคซีนโดยตรง นาน 1.5 นาที พบว่าการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ให้ผลในการป้องกันโรคสูงกว่าการแช่วัคซีนโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนที่ 30 วัน พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.14 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากการตอบสนองการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนเริ่มลดลง ส่วนการทดลองของ Areechon and Plaimast (1999) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาดุกลูกผสมโดย การแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic และการกิน โดยแช่ปลาในน้ำเกลือเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที แล้วจึงแช่ปลาลงในวัคซีนนาน 60 นาที หลังจากเลี้ยงนาน 3 เดือน ทำการทดสอบความต้านทานโรค พบว่าปลามีอัตราการตาย 75 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า RPS เท่ากับ 53.03 เปอร์เซ็นต์

การหาค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการแช่ พบว่าที่ 10 และ 20 วัน ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่โดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากในช่วงแรกของการให้วัคซีนปลาจะมี การตอบสนองแบบไม่จำเพาะและมีการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ยังไม่มากพอ (Ellis, 1988) จึงทำให้การให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ที่ 30 วัน พบว่าการแช่วัคซีนโดยตรงและการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ลดลง มีค่าเท่ากับ 1:4 และ 1:16 ตามลำดับ ซึ่งถ้าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์มีค่าต่ำมากๆ จะทำให้ปลาไม่สามารถต้านทานต่อโรคได้ (Agius *et al.*, 1983) จากการทดลองของ Karunasagar *et al.*, (1991) ทดลองการตอบสนองของปลาคาร์พและปลายี่สกเทศต่อวัคซีนจากเชื้อ *A. hydrophila* โดยให้วัคซีนด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การแช่วัคซีนโดยตรง นาน 60 นาที และการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ซึ่งจะแช่ปลาในน้ำเกลือเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วนำไปแช่วัคซีนนาน 60 นาที พบว่าการแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ปลาคาร์พตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดี้ในปริมาณสูง (1:1,024) และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะมี

การเปลี่ยนแปลงตามชนิดของปลา เช่น ปลา *Catla catla* จะสร้างแอนติบอดี้ได้สูง (1:1,024) และปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) สร้างแอนติบอดี้ได้ต่ำสุด (1:16)

*การให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน*

ผลการทดลองของการให้วัคซีนด้วยการกิน คือ การกินอาหารผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน พบว่าที่ 10 และ 20 วัน อัตราการตายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และที่ 30 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ 33.33 และ 26.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทั่วไปแล้วการให้วัคซีนด้วยการกินจะไม่ค่อยได้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จึงทำให้มีระดับการป้องกันโรคต่ำ (Lillehaug, 1989) เนื่องจากแอนติเจนที่อยู่ในวัคซีนจะถูกทำลายในระบบย่อยอาหารก่อนที่จะถูกดูดซึม เพื่อใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Johnson and Amend, 1984; Ellis, 1988) แต่จะแตกต่างกับการทดลองในครั้งนี้เพราะการให้วัคซีนด้วยวิธีการกินจะให้ผลในการป้องกันได้ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากให้ปลากินอาหารที่ผสมวัคซีนติดต่อกันเป็นเวลานาน (ตลอดการทดลอง) จึงทำให้มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอยู่ตลอดเวลาจึงทำให้ปลามีระดับการป้องกันโรคดี ซึ่งจะต่างจากการทดลองของ Plumb and Vinitnantharat (1994) ที่ให้ปลากินอาหารผสมวัคซีนแค่ 5 - 7 วัน เท่านั้น จึงทำให้ปลามีการป้องกันโรคที่ต่ำ ส่วนการทดลองของ Agius *et al*., (1983) พบว่าปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ได้รับวัคซีนด้วยการกิน จะมีค่าอัตราการตาย 50 - 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์

ค่า RPS ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการกิน พบว่าค่า RPS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ 10 และ 20 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 30 วันพบว่าค่า RPS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 52.39 และ 61.90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดการทดลองที่ให้อาหารที่ผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารที่ผสมวัคซีน ตามลำดับ Lillehaug (1989) รายงานว่าปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ให้วัคซีนด้วยการกิน มีค่า RPS เท่ากับ 82.7 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับรายงานของ Dec *et al*., (1990) รายงานว่าปลาเทอร์บอทและปลาซีแบสส์ ที่ให้วัคซีนด้วยการกิน มีค่า RPS เท่ากับ 70 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในการกิน เช่น ปริมาณของวัคซีนที่ผสมลงในอาหารจะต้องมีปริมาณที่สูงพอ เนื่องจากวัคซีนอาจจะสูญเสียในขณะที่ปลากินอาหาร เพราะอาหารบางส่วนอาจจะละลายน้ำก่อนที่ปลาจะกินหรือการกัดกินของปลาทำให้เกิดเป็นเศษเล็กเศษน้อย Plumb and Vinitnantharat (1994) รายงานว่าการผสมวัคซีนลงในอาหารที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปลา มีอัตราการรอดตายสูงถึง 76.7 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า RPS เท่ากับ 69.6 เปอร์เซ็นต์

ส่วนค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการกิน พบว่าที่ 10 วัน ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมวัคซีนและการแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน โดยมีค่าเท่ากับ 1:32 และ 1:64 ตามลำดับ ส่วนที่ 20 วัน ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่มีความ

แตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ และที่ 30 วัน ก็เช่นกันค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 1:16 และ 1:32 ตามลำดับ โดยทั่วไปค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยการกินจะต่ำกว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีอื่นๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์กับสัตว์ชนิดอื่นที่ได้รับวัคซีน พบว่าในสัตว์ชนิดอื่นจะมีค่าสูงกว่าปลา ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1:16 ในขณะที่ปลาจะมีค่าเท่ากับ 1:4 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ (Agius *et al.*, 1983) จากการทดลองของ Gutierrez and Miyazaki (1994) ที่ให้ปลาไหลญี่ปุ่น (japanese eel) กินอาหารที่ผสมวัคซีน พบว่าปลามีการตอบสนองภูมิคุ้มกันได้ดี โดยมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 1:1,280 – 1:2,560 ในการแก้ไขปัญหาการถูกทำลายของวัคซีนในระบบย่อยอาหาร ได้มีการพัฒนาวัคซีนให้อยู่ในรูปของแคปซูล (capsul) (Kawai and Hatamoto, 1999) หรือการผสมสารบางชนิดลงในวัคซีน เช่น เซลลูโลส (cellulose) (Park *et al.*, 2001) หรือเจลาติน (gelatin) (Johnson and Amend, 1983)

จากการเปรียบเทียบค่า RPS ของปลาที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน พบว่าการให้วัคซีนด้วยการฉีดและการแช่ร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน จะให้ค่า RPS สูง โดยเฉพาะการฉีดวัคซีนผสม CFA เนื่องจากสามารถไปกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ส่วนการแช่ร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่า RPS สูง เพราะว่าการให้วัคซีนร่วมกันหลายๆ วิธี จะทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันปลาถูกกระตุ้นอยู่ตลอดเวลา