ผลการทดลอง

1. ตัวอย่างปลาและเชื้อแบคทีเรีย

1.1 ตัวอย่างปลาป่วยและแหล่งของตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวป่วยที่เลี้ยงในกระชังในช่วง ก.ย. 2546 - ธ.ค. 2546 จากจังหวัดสงขลา, ปัตตานี และสตูล ได้ตัวอย่างปลาป่วยแหล่งละ 20 ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างปลาปกติแหล่งละ 10 ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

1.2 อาการและการแยกเชื้อจากปลาป่วย

ปลาปกติที่เก็บตัวอย่างมีลักษณะปกติทั้งภายนอกและภายใน ขนาดปลาที่เก็บตัวอย่างทั้งที่ปกติและป่วยมีขนาด 5 - 10 กรัม อาการปลาป่วยพบว่ามีลำตัวสีคล้ำ, ตาโปน (exopthalmus) และขุ่น (cataract) ตกเลือดบริเวณลำตัว, ผอมเนื่องจากไม่กินอาหาร เมื่อผ่าช่องท้องตรวจดูอวัยวะภายในพบว่าตกเลือดเล็กน้อยบริเวณตับ, สมอง ผลการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงตามตารางที่ 2 ตรวจไม่พบเชื้อจากปลาปกติที่เก็บตัวอย่าง

อาหารปลากะพงขาวที่เกษตรกรให้ส่วนใหญ่จะเป็นปลาเป็ดสับ ขนาดของชิ้นอาหารจะขึ้นกับขนาดปลาที่เลี้ยงโดยให้กินจนอิ่มและให้วันละมื้อ วันเว้นวัน คุณภาพน้ำบริเวณกระชังของแต่ละแหล่งดังแสดงตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงผลการเพาะเชื้อจากอวัยวะต่างๆ ในแต่ละแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง		อวัยวะที่นำมาเพาะเชื้อ			
		ตับ	ไต	ม้าม	สมอง
จ. สงขลา	เม.ย.-พ.ค. 2547	8/20	12/20	2/20	20/20
	ม.ค.-ก.พ. 2548	23/40	27/40	18/40	37/40
จ. ปัตตานี	เม.ย.-พ.ค. 2547	10/20	11/20	5/20	20/20
จ. สตูล	เม.ย.-พ.ค. 2547	12/20	9/20	3/20	20/20

*จำนวนตัวอย่างที่เพาะเชื้อได้/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่เลี้ยงปลาในกระชังที่เก็บตัวอย่าง

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	คุณภาพน้ำ				
	pH	DO	Sal.	Alk.	NH_3
จ. สงขลา	7.3	5.5	7	100	1.2
จ. ปัตตานี	8.5	5.7	20	112	0.8
จ. สตูล	8.2	5.3	28	156	0.5

DO = dissolve oxygen (ppm), Sal. = salinity (ppt), Alk. = Alkalinity (ppm), NH_3 (ppm)

1.3 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาป่วย

เชื้อแบคทีเรียทุกตัวที่แยกได้จากปลาป่วยนำมาจดบันทึกลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ, การย่อยเม็ดเลือดบนอาหาร blood agar และนำมาแยกชนิดเบื้องต้นโดยการย้อมแกรมและทดสอบ catalase

ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากสมองปลาป่วยจะมีความสม่ำเสมอ เป็นโคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มม. สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้เป็นแบบ gamma hemolysis ย้อมติดสีแกรมบวก ลักษณะเซลล์เป็น coccus ต่อกันเป็นสายยาว (chain) เมื่อนำมาทดสอบ catalase พบว่าเป็นลบ

2. การแยกชนิดของเชื้อ

นำเชื้อแกรมบวก cocci มีลักษณะเป็นสายยาวมาศึกษาในรายละเอียด โดยทำการทดสอบผลทางชีวเคมีซึ่งให้ผลใกล้เคียงกันทั้ง 20 isolate ดังตารางที่ 4 (แสดงผลจากตัวแทนของเชื้อทั้งหมดซึ่งให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่เหมือนกัน)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงขาว

	เชื้อที่แยกได้จากปลากะพงขาว	Perera *et al.* (1994)
		Hybrid tilapia
Gram 's stain/cocci	+	+
Haemolysis	γ	β
Catalase	-	-
Oxidase	-	-
Mortality	-	-
Growth in NaCl 6.5 %	-	-
Tolerance of		
pH 9.6	+	-
temp 10 ^{0}C	+	+
temp 45 ^{0}C	-	+
Indole	-	NT
Pyruvate	-	-
OF – medium	-	NT
MR test	-	NT
Hippurate	-	-
Esculin	+	NT
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	+	NT
α-D-galactopyranoside	-	NT
β-D-glucuronate	-	NT
β-D-galactopyranoside	-	NT
2-naphthyl phosphate	-	NT
L-leucine-2-naphthylamide	-	NT
Arginine	+	+
Glycogen	-	NT
Acid from		
Glucose	+	+
Sucrose	-	+
Saccharose	-	NT
Lactose	-	-
Mannitol	+	+
Maltose	+	+
Dextrose	-	NT
Sorbitol	-	-
Ribose	+	NT
L-Arabinose	-	-
Trehalose	+	-
Inulin	-	-
Raffinose	-	-
Xylose	-	-
Hydrolysis		
Starch	+	+
Gelatin	-	-

+ = positive - = negative NT = not test

Perera, R.P., Johnson, S.K., and Lewis, D.H., 1997 Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. Aquaculture 152 : 25 - 33.

3. การทดสอบการเกิดโรค

จากการทดสอบการเกิดโรคของเชื้อที่แยกได้โดยนำไปฉีดกลับเข้าปลาปกติเพื่อยืนยันผลตาม Koch's postulate พบว่าเชื้อดังกล่าวทำให้ปลากะพงขาวแสดงอาการเหมือนกับที่พบในการแยกเชื้อครั้งแรกและสามารถแยกเชื้อชนิดเดิมกลับมาได้

4. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp.

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ

จากการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. จำนวน 20 isolated โดยทำการฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ให้แก่ปลากะพงขาวขนาด 3.0 - 4.0 นิ้ว น้ำหนักเฉลี่ย 4.97 $\pm$ 1.24 กรัม โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง แล้วบันทึกเวลาและจำนวนปลากะพงขาวที่ตาย นำผลที่ได้มาคำนวณค่า LD_{50} พบว่ามีค่าขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ซึ่งอยู่ในช่วง 1.93×10^3 - 2.12×10^5 CFU/ml (ตารางที่ 5)โดยพบว่าอาการของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. มีสีลำตัวเป็นสีคล้ำ เสียการทรงตัว เคลื่อนที่ช้า แต่เมื่อได้รับเชื้อเป็นเวลานาน เกิดอาการตาขุ่น ตาโปนข้างเดียวหรือ 2 ข้าง มีของเหลวในช่องท้อง ตับมีสีซีด ไตและม้ามบวม สมองเป็นสีชมพู ได้คัดเลือกเชื้อตัวที่ให้ค่าความรุนแรงของโรคสูงสุดมาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงขาวจากแหล่งต่างๆ

แหล่งของเชื้อ	LD_{50} (CFU/ml)				
	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
จ. สงขลา	2.15×10^4	1.93×10^3	2.26×10^3	3.73×10^3	2.54×10^3
จ. ปัตตานี	3.72×10^3	3.43×10^3	1.58×10^5	1.84×10^4	1.22×10^4
จ. สตูล	2.12×10^5	2.94×10^4	1.34×10^5	1.73×10^5	3.46×10^4

5. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อนำเชื้อ *Streptococcus* sp. มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้ยา 12 ชนิด พบว่า เชื้อจะดื้อต่อยาออกโซลินิค แอซิดและนาลิดิอิค แอซิด แต่มีความไวต่อยาซัลฟาเมธ๊อกซาโซล+ไตรเมธโธพริม นอร์ฟล็อกซาซิน ออกซี่เตตร้าซัยคลิน ซาราฟล็อกซาซิน เพนนิซิลลิน ไตรเมธโธพริม เออริโทรมัยซิน และแอมพิซิลลิน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความไวของเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่อยาปฏิชีวนะ

ชนิด ยา	วงใส (มิลลิเมตร)	แปลผล
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
เออริโทรมัยซิน (E ; 15 μg)	30	S
แอมพิซิลลิน (AMP ; 10 μg)	40	S

R = resistance S = susceptible

6. ความเค็มและ pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ

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 (ตารางที่ 7)

การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน พบว่า เชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถที่จะเจริญได้ในระดับความเค็ม ในช่วง 0 – 50 ส่วนในพันส่วน โดยปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (เวลาที่ 0) จำนวน 4.43×10^3 CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. จะเจริญเพิ่มขึ้นในทุกระดับความเค็ม โดยที่ระดับความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน เจริญได้ดีที่สุด (2.30×10^{11} CFU/ml) รองลงมาคือระดับความเค็ม 10 และ 20 ส่วนในพันส่วน (1.35×10^{11} และ 1.75×10^{10} CFU/ml) ตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อเริ่มลดลงเรื่อยๆ จนถึงเวลา 120 ชั่วโมง ปริมาณของเชื้อที่ระดับความเค็ม 0, 10, 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน จะเป็น 1.75×10^3, 3.02×10^3, 3.02×10^3 และ 3.20×10^2 CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเป็นกรด - ด่าง ต่างๆ กัน

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

ตารางที่ 8 การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ความเค็มต่างๆ กัน

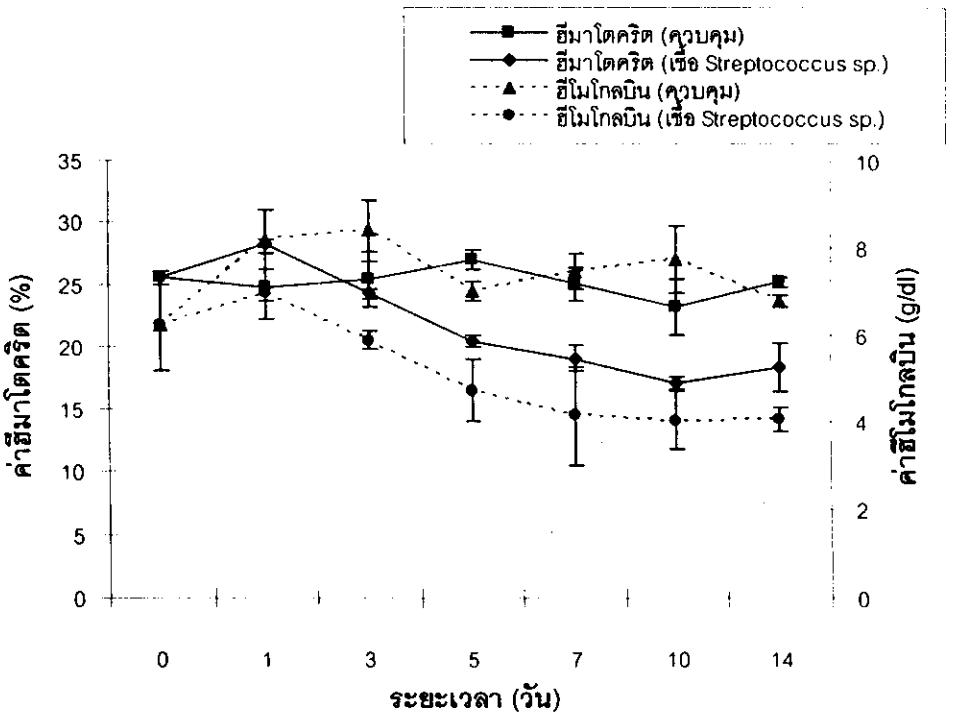
	ปริมาณของเชื้อ (cfu/ml)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0 ppt	$4.43x10^3$	$2.30x10^{11}$	$5.02x10^9$	$1.44x10^8$	$1.99x10^6$	$1.75x10^4$
10 ppt	$4.43x10^3$	$1.35x10^{11}$	$2.38x10^9$	$2.38x10^7$	$1.34x10^5$	$3.02x10^3$
20 ppt	$4.43x10^3$	$1.75x10^{10}$	$2.38x10^8$	$1.50x10^7$	$1.02x10^5$	$3.02x10^3$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

7. การก่อโรคของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว

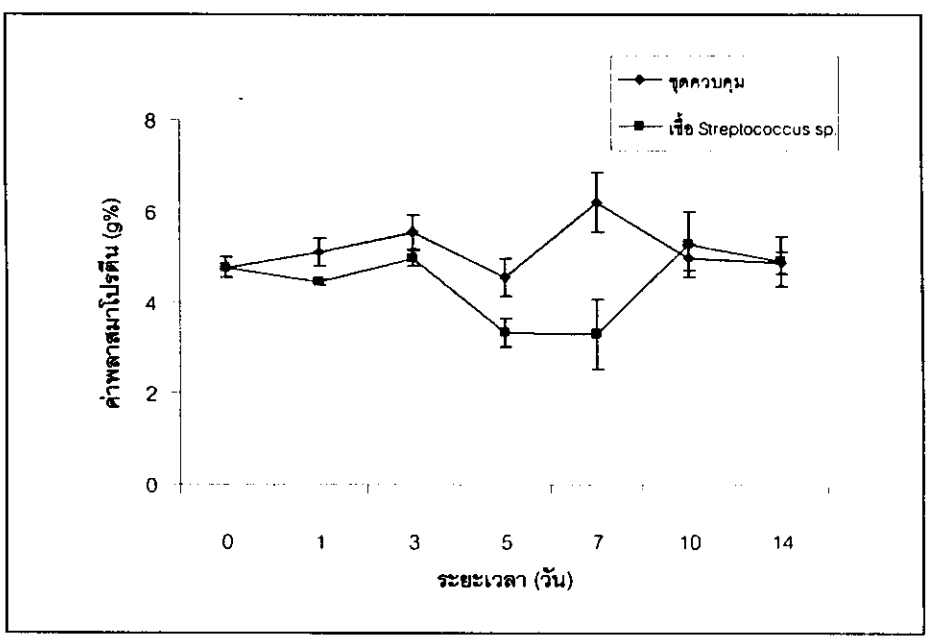
7.1 ผลของการติดเชื้อต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด

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 1 ส่วนค่าพลาสมาโปรตีนมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งค่าจะลดลงต่ำมากในวันที่ 5 และ 7 หลังจากได้รับเชื้อ แต่หลังจากนั้นค่าจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและกลับเข้าสู่สภาวะปกติ ดังภาพที่ 2 สำหรับจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกและลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการได้รับเชื้อ โดยมีจำนวนเม็ดเลือดต่ำในช่วงวันที่ 7 – 14 วัน หลังจากได้รับ

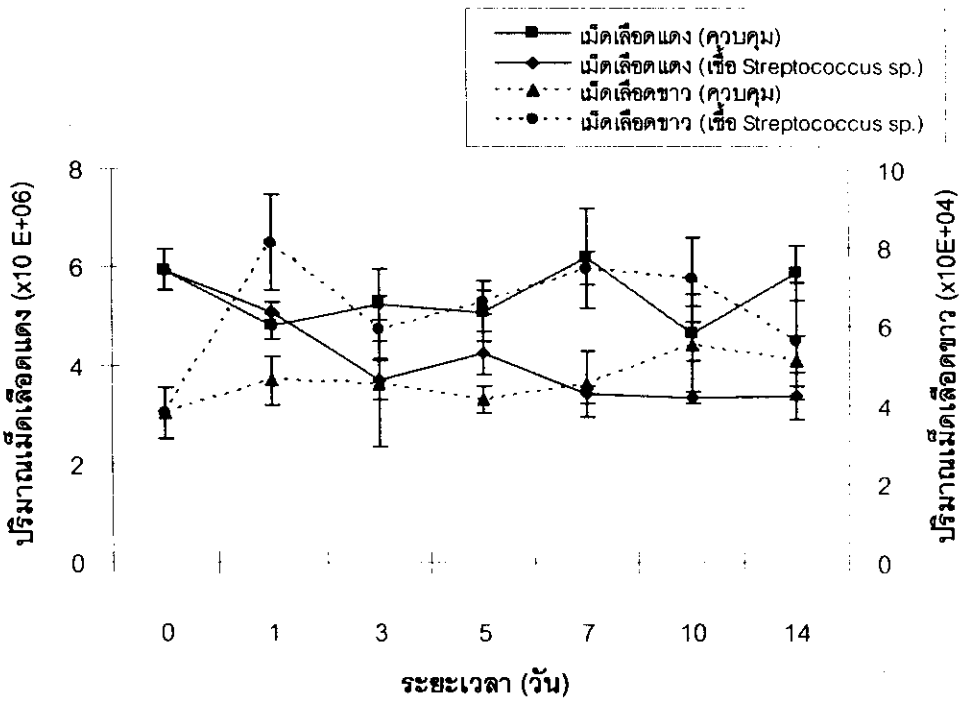
เชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการได้รับเชื้อและลดลงใน วันที่ 3 แต่หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและมีจำนวนที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมในวันที่ 14 ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบค่าฮีมาโตคริตและค่าฮีโมโกลบินของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบค่าพลาสมาโปรตีนของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม

7.2 ผลของการติดเชื้อต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาพยาธิสภาพของปลากะพงขาวปกติและที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในหลายอวัยวะ ซึ่งระดับความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการติดเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของปลาที่เกิดโรคตามธรรมชาติกับปลาที่เกิดโรคจากการเหนี่ยวนำในห้องปฏิบัติการมีลักษณะคล้ายคลึงกัน

ตับและตับอ่อน

ปลากะพงขาวปกติมีโครงสร้างเนื้อเยื่อตับที่มีการเรียงตัวของเซลล์ตับเป็นระเบียบ เนื่องจากมีการสะสมไขมันและไกลโคเจนในเซลล์ตับส่วนใหญ่จึงสังเกตเห็นว่านิวเคลียสถูกดันให้อยู่ตรงบริเวณขอบของเซลล์ ลักษณะนิวเคลียสปกติ และมีการเรียงตัวของ hepatic sinusoid ที่ชัดเจน เซลล์ตับอ่อนย้อมติดสีเข้ม มีไซโมเจนกรานูลที่เห็นได้ชัดเจน ปลาที่ติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสจะทำให้โครงสร้างดังกล่าวเปลี่ยนไป hepatic sinusoid เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และมีช่องว่างในเนื้อตับมากขึ้น, เกิดการตายของเซลล์ตับบริเวณที่มีการติดเชื้อ (focal necrosis), บางครั้งทำให้เซลล์ตับหดลีบ เล็กลง (atrophy) และไซนูซอยด์ขยายกว้างขึ้น ตับอ่อนจะหดลีบเล็กลง รวมทั้งไซโมเจนกรานูลในเซลล์ลดลง พบช่องว่างในเซลล์ตับมากขึ้น รวมถึงมีการแทรกตัวของเมลาโนแมคโครฟาจเข้าสู่เนื้อเยื่อตับมากขึ้น (ภาพที่ 4-5)

ไตและม้าม

ไตปลากะพงขาวปกติจะแบ่งเป็น 2 ส่วนคือไตตอนหน้า (anterior kidney) จะพบเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือด (hemopoeitic tissue) เป็นส่วนใหญ่, มีท่อไตเล็กน้อยแทรกอยู่ ส่วนไตตอนหลัง (posterior kidney) จะพบหน่วยไต (glomerulus), ท่อไต (renal tubule) และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ในขณะที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่ามีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิล (eosinophilic infiltration) บริเวณที่มีการติดเชื้อ และพบเมลาโนแมคโครฟาจจำนวนมากเข้าไปทำลายเชื้อทั้งในส่วนของไตตอนหน้าและไตตอนหลัง ลักษณะเนื้อเยื่อม้ามปลากะพงขาวปกติจะแบ่งเป็นส่วน red pulp ประกอบไปด้วยเม็ดเลือดแดงที่โตเต็มวัยและที่กำลังพัฒนา, แมคโครฟาจ และ reticular cell ที่ใช้ทำลายเม็ดเลือดที่หมดอายุ ในส่วนของ white pulp ประกอบไปด้วย lymphomyeloid tissue ซึ่งมีส่วนของเม็ดน้ำเหลือง, hemoblast และแมคโครฟาจเป็นองค์ประกอบ ในปลาที่ติดเชื้อพบว่ามีเมลาโนแมโครฟาจเข้ามาแทรกอยู่ในเนื้อม้ามจำนวนมาก, โครงสร้างของ red และ white pulp เสียไปและพบการสะสมของฮีโมซิเดอรินจำนวนมาก (ภาพที่ 6-10)

หัวใจ

การติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ทำให้มีการอักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจอย่างรุนแรง พบว่ามีเม็ดเลือดขาวและแมคโครฟาจเซนเตอร์จำนวนมากแทรกตัวอยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจส่วน ventricle และ bulbus arteriosus เนื้อเยื่อหัวใจในส่วน ventricle มีการอักเสบและพบ endothelial cell จำนวนมากจับกินเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่11-13)

ตา

ตาปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ส่วนใหญ่จะมีลักษณะตาขุ่น (cataract) อาจมีการตกเลือดร่วมด้วย ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อบริเวณลูกตาและพบเชื้อจำนวนมากใน vitreous humor ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อตาและเลนส์ตา มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวจำนวนมากเข้าสู่บริเวณรอบเลนส์ตา การเกิดบาดแผลบริเวณตาเป็นผลมาจากการคั่งของเลือดบริเวณหลังลูกตาและการบวมน้ำ (edema) แต่จะมีการอักเสบมากขึ้นและเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณ choroid เกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณกระจกตาและเกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อตา ทำให้เกิดแผลบริเวณแก้วตา (cornea) เลนส์ตาที่ติดเชื้อจะมีการเสื่อมสลายและมีเชื้อแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก (ภาพที่14-15)

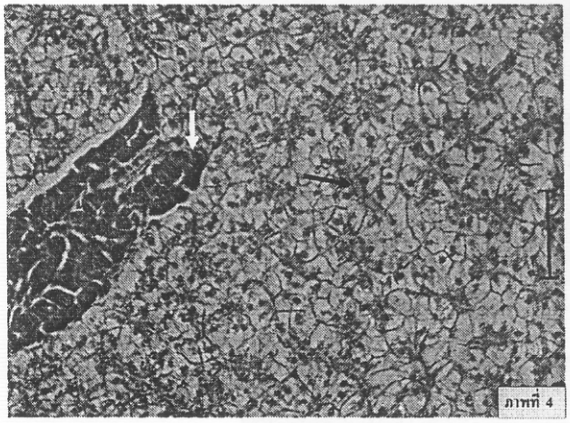
สมอง

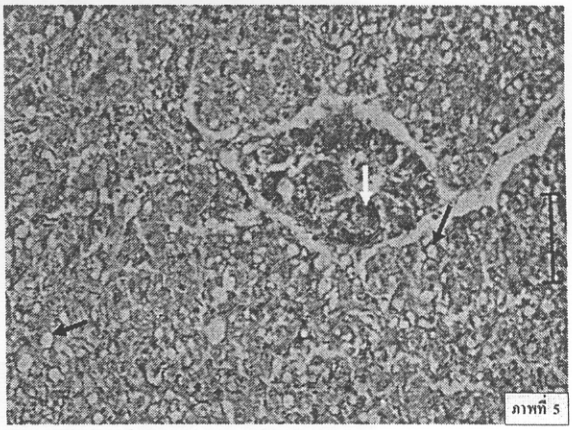
สมองเป็นอวัยวะสำคัญที่เชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าทำลายได้ โดยเชื้อสามารถเข้าสู่สมองผ่านทางระบบไหลเวียนเลือด ถึงแม้ว่าสมองจะมีระบบ blood-brain barrier เพื่อป้องกันเชื้อโรค แต่เชื้อที่รุนแรงก็สามารถผ่านเข้ามาได้ สมองที่ติดเชื้อจะเกิดได้เกือบทุกส่วนยกเว้นบริเวณก้านสมอง (medulla oblongata) และไขสันหลัง (spinal cord) ที่พบการติดเชื้อน้อยหรือไม่มีเลย พยาธิสภาพของสมองปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่าเกิด granuloma ในบริเวณ third ventricle โดยเกิดลักษณะของการห้อมล้อมแบบ

encapsulation ของเชื้อแบคทีเรียโดยเม็ดเลือดขาว เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองโดยมีเม็ดเลือดขาวจำนวนมากเข้ามาแทรกตัวอยู่ (ภาพที่ 16-17)

เหงือก

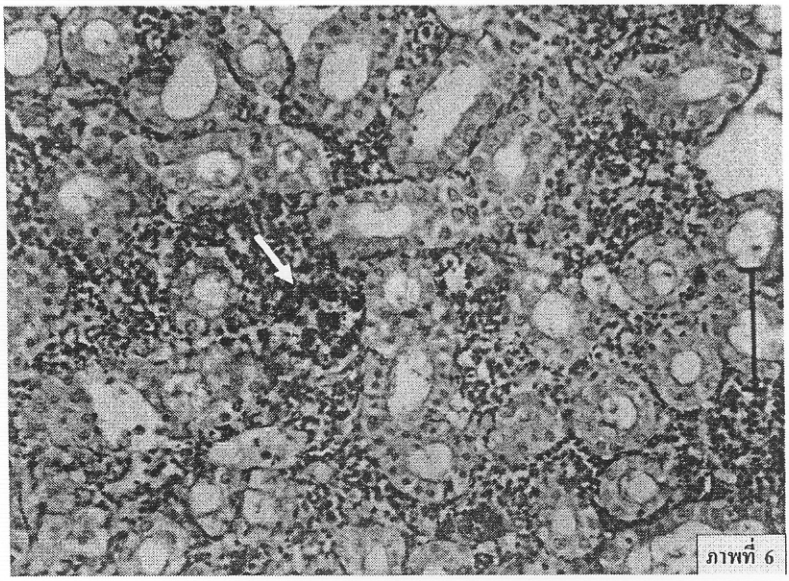
เหงือกปลาที่ติดเชื้อพบว่ามีการเชื่อมติดกันของซี่เหงือก (fusion of gill lamella) ซึ่งอาจเกิดเป็นบริเวณหรือเกิดทั้งซี่เหงือก ในกรณีที่รุนแรงพบว่าการเชื่อมติดกันจะทำให้เกิดลักษณะของ club shape ของซี่เหงือก ซึ่งมีผลต่อการหายใจ



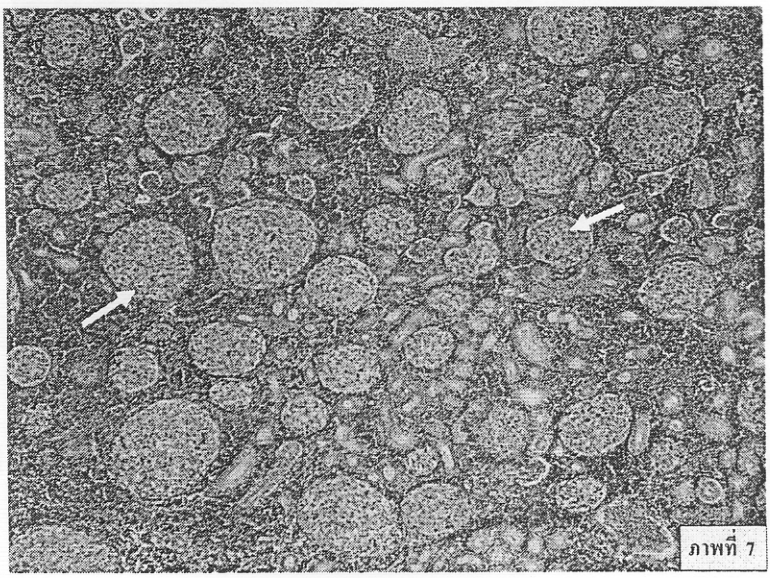


ภาพที่ 4 ตับปลากะพงขาวปกติ แสดงให้เห็นโครงสร้างเนื้อเยื่อตับเรียงตัวเป็นระเบียบ มีลักษณะเซลปกติ ลูกศรสีดำชี้แสดง hepatic sinusoid, ลูกศรสีขาวแสดงเนื้อเยื่อตับอ่อนปกติ, ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 50μm)

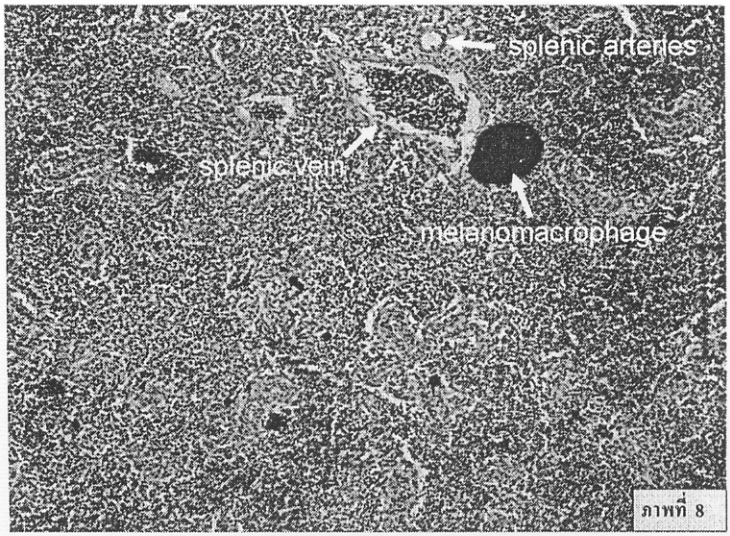
ภาพที่ 5 ตับปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ทำให้สูญเสียโครงสร้างของเนื้อเยื่อตับ พบช่องว่างในเซลตับมากขึ้น (ศรสีดำ) พบมีเซลตายบางส่วน ศรสีขาวแสดง pancreatic acinar ที่ยังมีไซโมเจนกรานูลอยู่, ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 50μm)



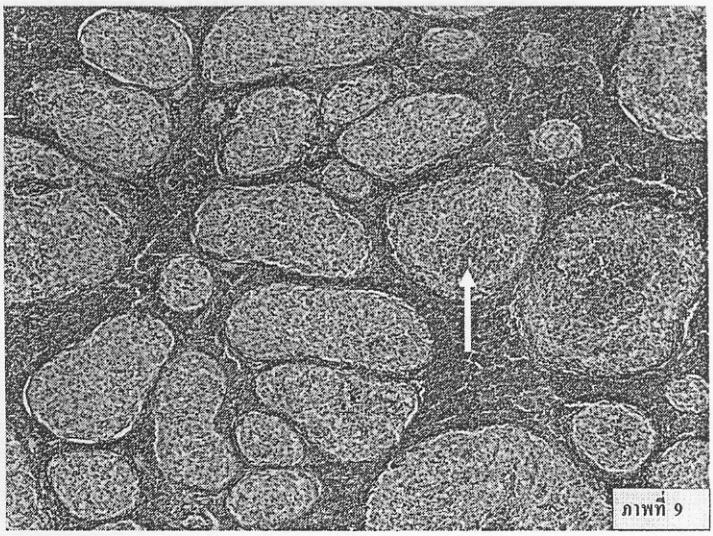
ภาพที่ 6 ไตส่วนหลัง (Posterior kidney) ปลากะพงขาวปกติแสดงให้เห็นถึงท่อไตอวัยวะสร้างเม็ดเลือดปกติ พบเมลาโนแมคโครฟาจกระจายอยู่เล็กน้อย (ศรสีขาว),
ย้อมสี H&E , (เส้นขีดขนาด 50 µm)



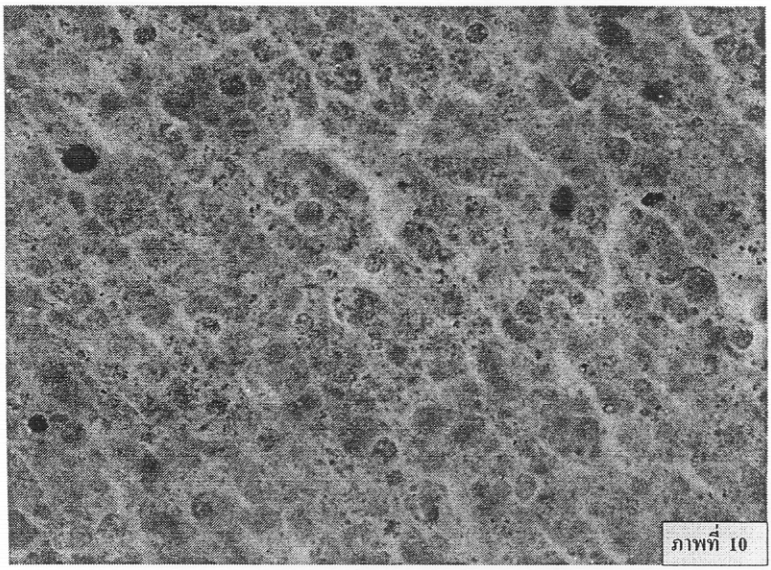
ภาพที่ 7 ไตปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่ามีเมลาโนแมคโครฟาจจำนวนมากแทรกตัวเข้ามาในเนื้อเยื่อไต (ศรสีขาว) ท่อไตและ hemopoeitic tissue ยังดูปกติ,
ย้อมสี H&E, (กำลังขยาย 20 เท่า)



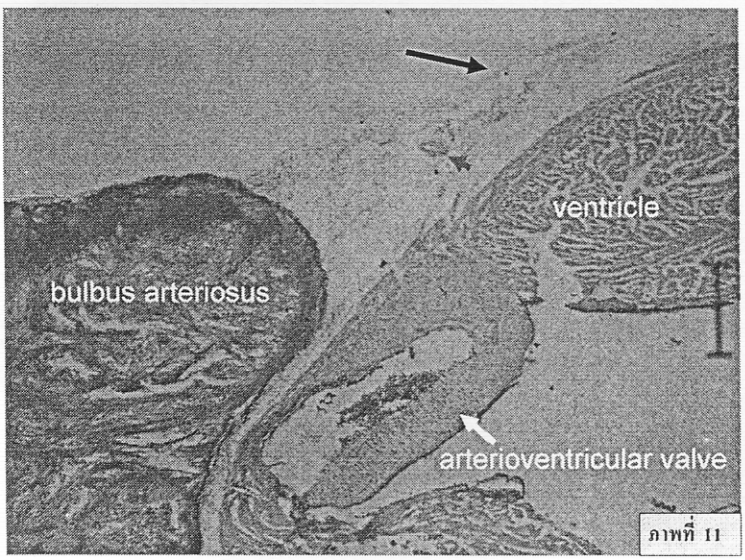
ภาพที่ 8 ม้ามปลากะพงขาวปกติ แสดงโครงสร้างปกติของ red pulp และ white pulp มีเมลาโนแมคโครฟาจ กระจายอยู่เล็กน้อย , ย้อมสี H&E , (เส้นขีดขนาด 200 μm)



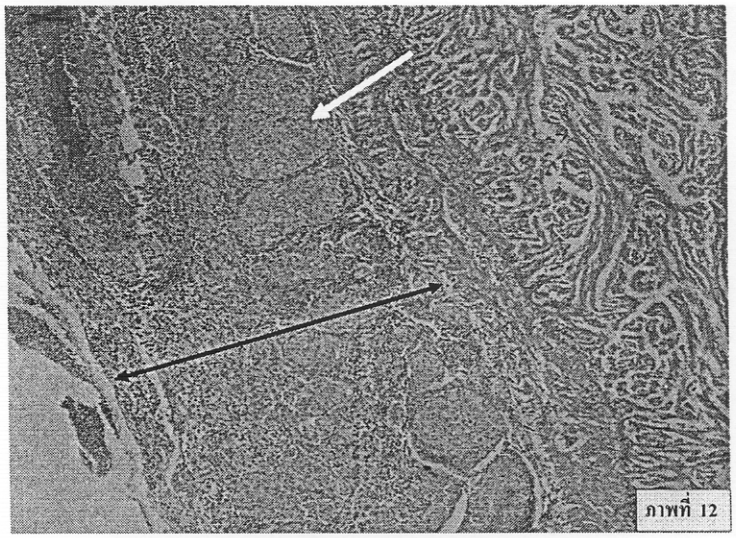
ภาพที่ 9 ม้ามปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบเมลาโนแมคโครฟาจขนาดใหญ่และจำนวนมาก (ศรชี้) แทรกเข้ามาในเนื้อเยื่อม้าม , ย้อมสี H&E, (กำลังขยาย 20 เท่า)



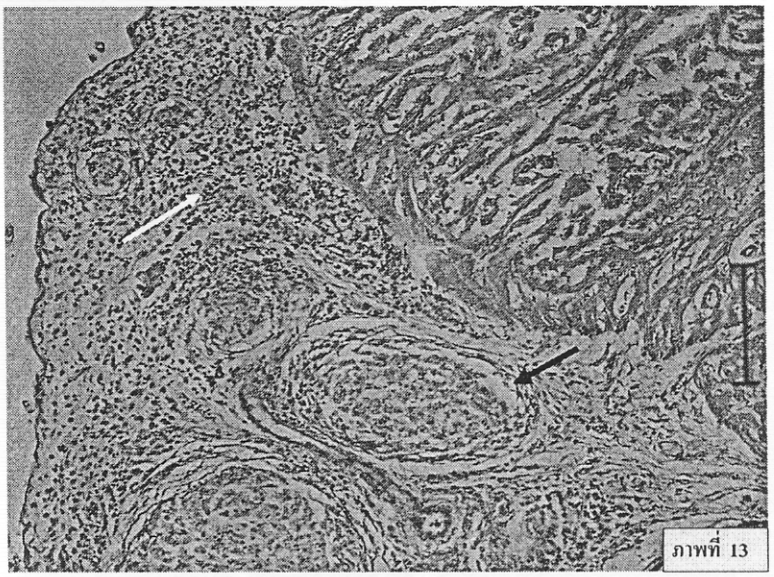
ภาพที่ 10 ภาพขยายของเมลาโนแมคโครฟาจเซนเตอร์ในเนื้อเยื่อม้าม พบแบคทีเรียรูปกลม จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปปะปนอยู่กับเมลาโนแมคโครฟาจเซล, ย้อมสี Geimsa's, (กำลังขยาย 500 เท่า)



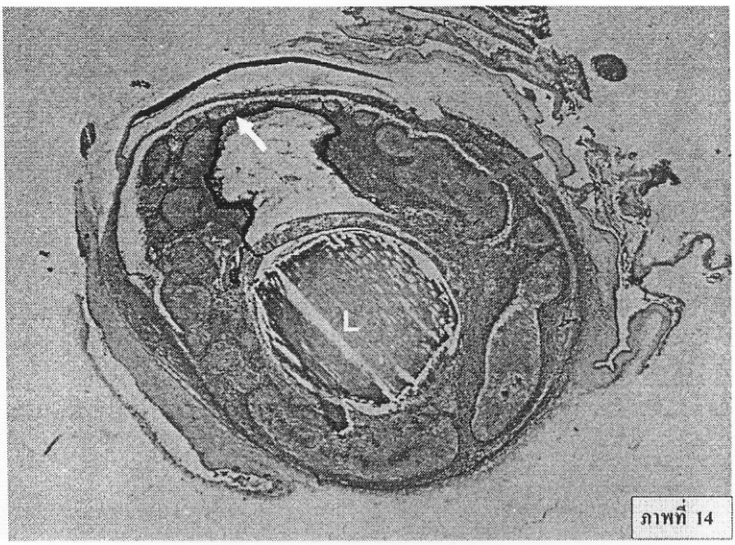
ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อหัวใจปลากะพงขาวปกติ, แสดงเยื่อหุ้มหัวใจ (epicardium) ปกติ มีเส้นเลือด (cardiac artery) ศรสีแดงนำเลือดมาเลี้ยงหัวใจ กล้ามเนื้อส่วน bulbus arteriosus และ ventricle ปกติ, ย้อมสี H&E , (เส้นขีดขนาด 200 µm)



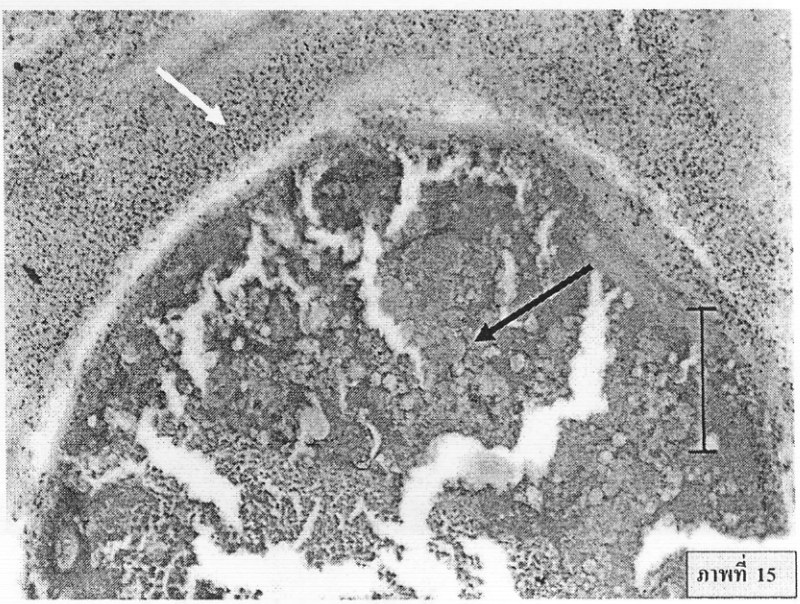
ภาพที่ 12 เนื้อเยื่อหัวใจปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่าเนื้อหุ้มหัวใจหนาขึ้น (ศรสีดำ) และมีเม็ดเลือด ขาวและแมคโครฟาจขนาดใหญ่จำนวนมากแทรกตัวเข้ามา (ศรสีขาว) พบการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจส่วน ventricle , ย้อมสี H&E , (กำลังขยาย 20 เท่า)



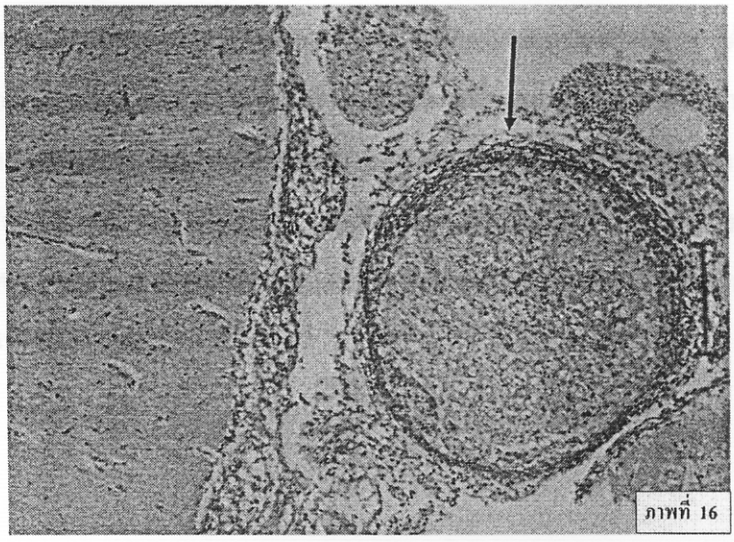
ภาพที่ 13 เนื้อเยื่อหัวใจปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบการอักเสบอย่างรุนแรง บริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ, เมลาโนแมคโครฟาจขนาดใหญ่ที่จับกินเซลแบคทีเรีย ถูกห้อมล้อมด้วย เม็ดเลือดขาว (encapsulation) (ศรสีดำ) ในขณะที่เม็ดเลือดขาวจำนวนมากเข้ามาในบริเวณนี้ (ศรสีขาว) , ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 100 µm)



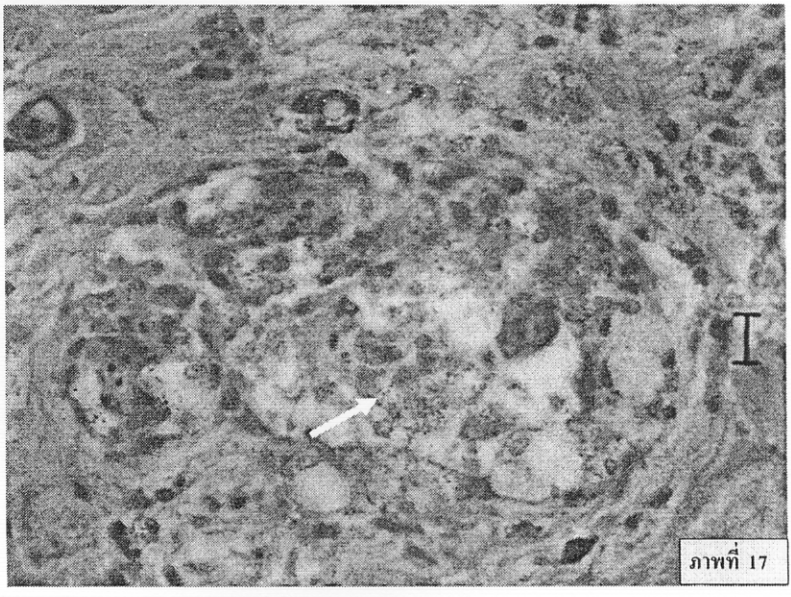
ภาพที่ 14 ตาปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีลักษณะขุ่น (cataract) และ เลนส์ตาเสื่อมสภาพ (L) และเกิดการอักเสบอย่างรุนแรง และมีเม็ดเลือดขาวและแมคโครฟาจขนาดใหญ่จำนวนมากแทรกตัวเข้าไปอยู่ในส่วนของน้ำในลูกตา (vitreous humor) เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย , บริเวณจอรับภาพ (retina) เสื่อมสลายและหดตัว (ศรสีขาว) ย้อมสี H&E (กำลังขยาย 10 เท่า)



ภาพที่ 15 ตาปลากะพงขาวที่มีลักษณะขุ่น (cataract) พบการเสื่อมสลายของเลนส์ตาอย่างรุนแรงมีแคปซูลขนาดเล็กจำนวนมากภายในมีเซลแบคทีเรีย (ศรสีดำ) ในขณะที่รอบเลนส์ตาจะ มีเม็ดเลือดขาวและเซลตายจำนวนมาก อยู่ในส่วนของ vitreous humor (ศรสีขาว), ย้อมสี H&E , (เส้นขีดขนาด 200 µm)



ภาพที่ 16 สมองปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. เกิด granuloma ขนาดใหญ่ในส่วนของ third ventricle ของสมองและถูกห้อมล้อม (encapsulated) ด้วยเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก ,ย้อมสี H&E (เส้นขีดขนาด 100 µm)



ภาพที่ 17 ภาพขยายเนื้อเยื่อสมองส่วนกลางที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบเซลแบคทีเรียจำนวนมากในบริเวณนี้ (ศรชี้), ย้อมสี Geimsa's, (เส้นขีดขนาด 10 µm)

7.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อในอวัยวะต่าง

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 9

ตารางที่ 9 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อในอวัยวะต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อ (ปริมาณเชื้อ cfu/g เนื้อเยื่อ)

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±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากปลาจำนวน 10 ตัว

8. **การผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ** *Streptococcus* sp. **จากกระต่าย**

เมื่อทดสอบระดับความเข้มข้นของแอนติบอดี้จากเลือดกระต่ายโดยวิธีการตกตะกอนในหลอด พบว่าระดับของแอนติบอดี้ที่ได้สูงถึง 1: 25,600 และสามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อได้อย่างชัดเจน

9.Cross protection **และ** cross immunity **ของเชื้อ** *Streptococcus* sp.

พบว่าเชื้อที่นำมาทำวัคซีน (สายพันธุ์ ST-2 สงขลา) สามารถให้ความคุ้มโรคได้หลังจากได้รับเชื้อตัวเดิมและได้รับเชื้อสายพันธุ์อื่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ Streptococcus สามารถเกิด cross protection ได้เมื่อนำมาทำเป็นวัคซีน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงค่า RPS (relative percent survival) **ของปลาที่ได้รับวัคซีนและนำมาฉีดเชื้อที่ต่างสายพันธุ์**

ชุดทดลอง	สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ	
	ST-2 สงขลา	ST-1 ปัตตานี
ชุดควบคุม	-	-
ชุดฉีดวัคซีน	80	75

Cross immunity **ของเชื้อ** Streptococcus

พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากที่ต่างๆ สามารถเกิดการตกตะกอนกับแอนติซีรัมที่เตรียมได้จากเชื้อสายพันธุ์ ST-2 สงขลา แสดงให้เห็นถึงลักษณะของ cross reaction ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีความใกล้เคียงกัน

10. **การทดสอบความปลอดภัยและ** sterility **ของวัคซีน**

วัคซีนที่เตรียมได้นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และบ่มไว้เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ จึงสรุปได้ว่าวัคซีนที่เตรียมได้ปลอดเชื้อ (sterile)

จากการให้วัคซีนทั้ง 3 แบบ คือการฉีดเข้าช่องท้อง แช่ และกิน พบว่าไม่มีผลต่อปลากะพงขาวในทุกกลุ่มของการทดลองโดยไม่พบความผิดปกติภายนอกและไม่มีการตายเกิดขึ้น เมื่อเลี้ยงไว้นาน 7 วัน หลังจากที่ได้รับวัคซีนและปลามีความแข็งแรงรวมถึงกินอาหารปกติ ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นมามีความปลอดภัยในการใช้ในปลากะพงขาว

11. การตอบสนองของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณที่แตกต่างกัน

การทดสอบการตอบสนองต่อปริมาณเซลล์วัคซีนในปลากะพงขาว ในปลาชุดควบคุม ฉีดด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 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 พบว่าอัตราการตายของปลากะพงขาวที่ 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 11)

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 2.50×10^9 และ 2.50×10^{10} CFU/ml (RPS = 64 และ 72 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกับชุดปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^8 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 11 และภาพที่ 18)

นอกจากนี้ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในชุดที่ได้รับวัคซีนและในชุดที่ไม่ได้รับวัคซีน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่าชุดควบคุมมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 0 ส่วนชุดที่ได้รับวัคซีนปริมาณเซลล์วัคซีนแตกต่างกัน จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ ที่ 10 วัน พบว่าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในแต่ละปริมาณเซลล์วัคซีนมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงสุด เท่ากับ 1:64 ส่วนที่ 20 วัน ในชุดควบคุมและปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^8 CFU/ml (1:32) ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^9 CFU/ml มีค่า 1:64 และที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml เท่ากับ 1:128 และที่ 30 วัน ในชุดควบคุมและปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^8 CFU/ml (1:4) ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^9 CFU/ml (1:8) และที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50×10^{10} CFU/ml เท่ากับ 1:16 (ตารางที่ 12 และภาพที่ 19)

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

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณเซลล์ของวัคซีนต่างกัน

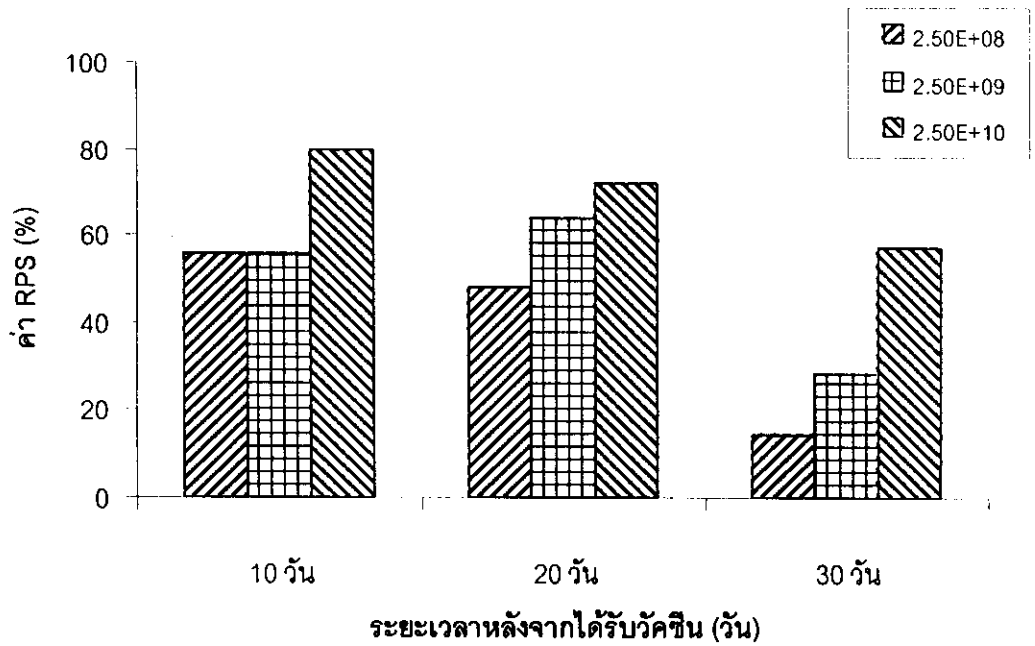
ปริมาณเซลล์ของวัคซีน (CFU)	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	83.33 ^{a}	-	83.33 ^{a}	-	93.33 ^{a}	-
$2.5x10^{8}$	36.67 ^{b}	55.99 ^{a}	43.33 ^{b}	48.00 ^{a}	80.00 ^{b}	14.28 ^{a}
$2.5x10^{9}$	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 ($p<0.05$)

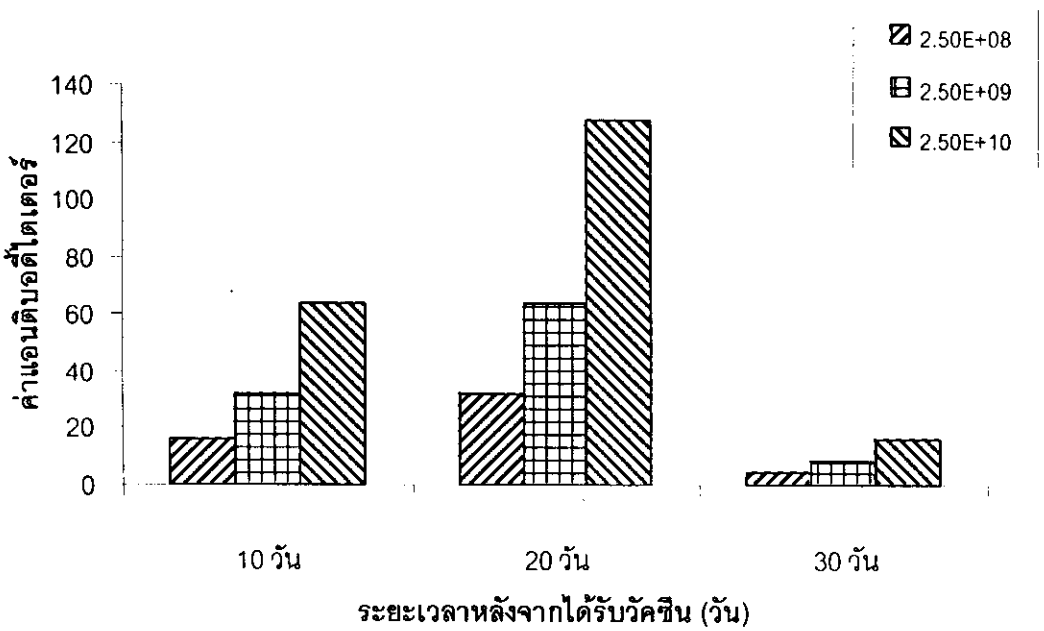
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณเซลล์วัคซีนต่างๆ

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 18 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 19 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

12. ผลการศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว

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

อัตราการตาย

หลังจากฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ให้แก่ปลาที่ได้รับวัคซีน แล้วคำนวณค่าอัตราการตายของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA กับ การฉีดวัคซีนผสม 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 ($p<0.05$) โดยการ ฉีดวัคซีนผสม CFA มีอัตราการตาย 1.67 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าการ ฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA ที่มีค่าเท่ากับ 28.33 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 13, ภาพที่ 20)

ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์

ผลการทดลองพบว่าในชุดควบคุมมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ 0 และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของการให้วัคซีนทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากฉีดวัคซีน โดยการฉีดวัคซีนผสม CFA มีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เท่ากับ1:64, 1:128 และ 1:64 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA อย่างมีนัยสำคัญ ที่มีค่าเท่ากับ 1:32, 1:32 และ 1:32 ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 21)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง

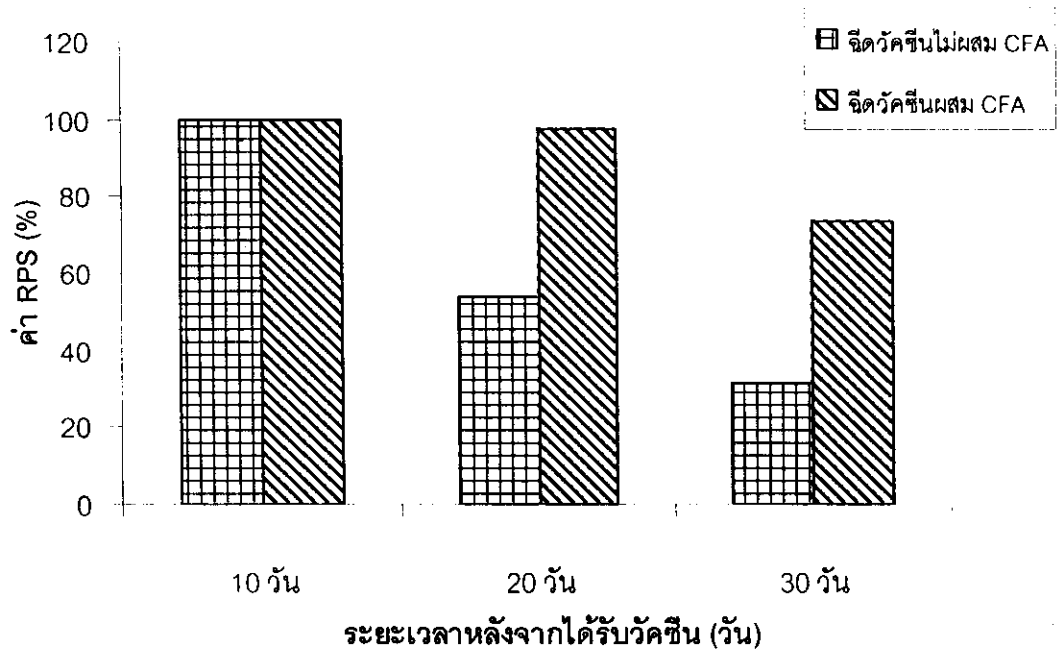
การให้วัคซีน	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	60.00 [a]	-	61.67 [a]	-	63.33 [a]	-
วัคซีนไม่ผสม CFA	0.00 [b]	100 [a]	28.33 [b]	54.06 [a]	43.33 [b]	31.58 [a]
วัคซีนที่ผสม CFA	0.00 [b]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

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

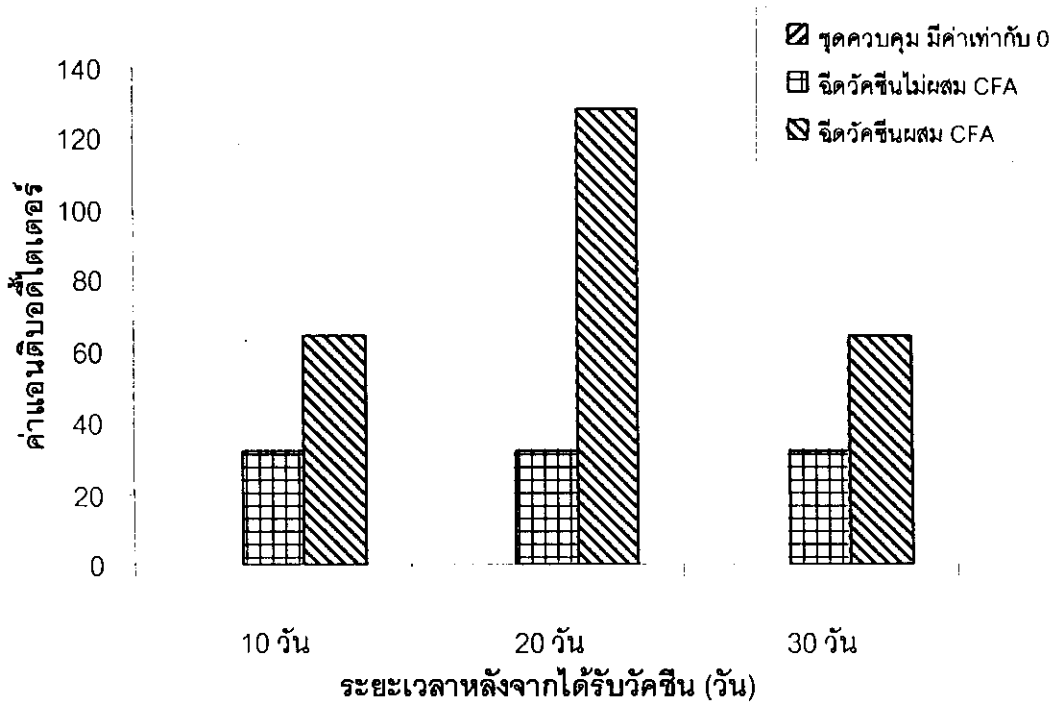
ตารางที่ 14 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง

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 20 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง



ภาพที่ 21 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง

การให้วัคซีนด้วยวิธีการแช่

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

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 15, ภาพที่ 22)

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 แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดที่แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic ซึ่งมีค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงสุด เท่ากับ 1:16 (ตารางที่ 16 และภาพที่ 23)

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่

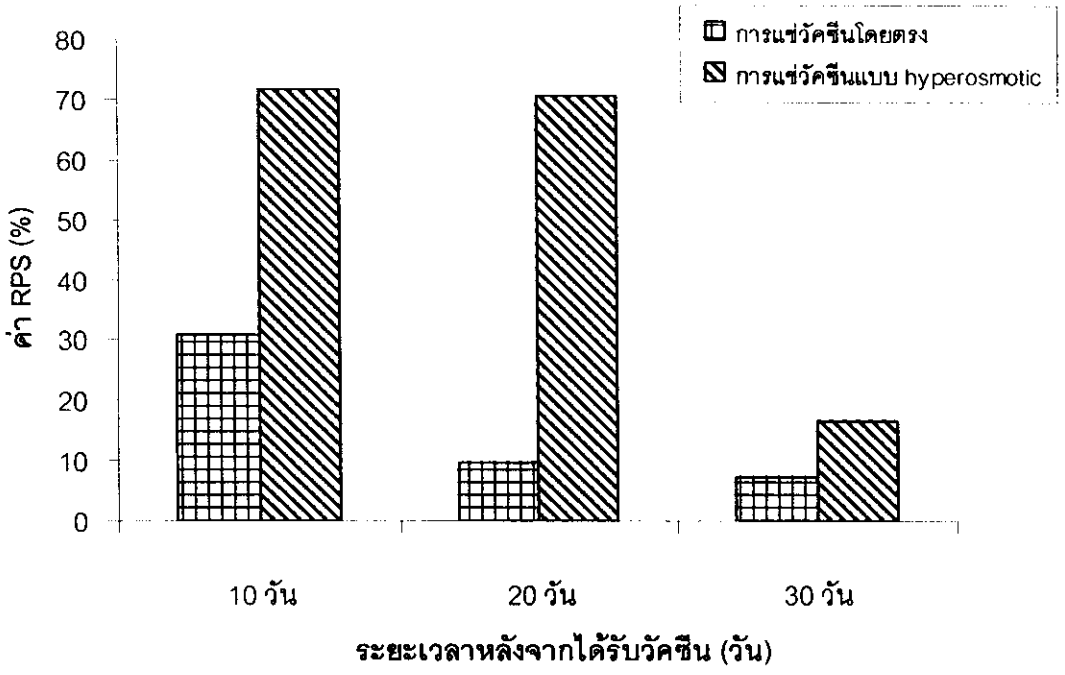
การให้วัคซีน	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	65.00 ^{a}	-	68.33 ^{a}	-	70.00 ^{a}	-
แช่วัคซีนโดยตรง	45.00 ^{b}	30.77 ^{a}	61.67 ^{a}	9.75 ^{a}	65.00 ^{a}	7.14 ^{a}
แช่วัคซีนแบบ hyperosmotic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

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

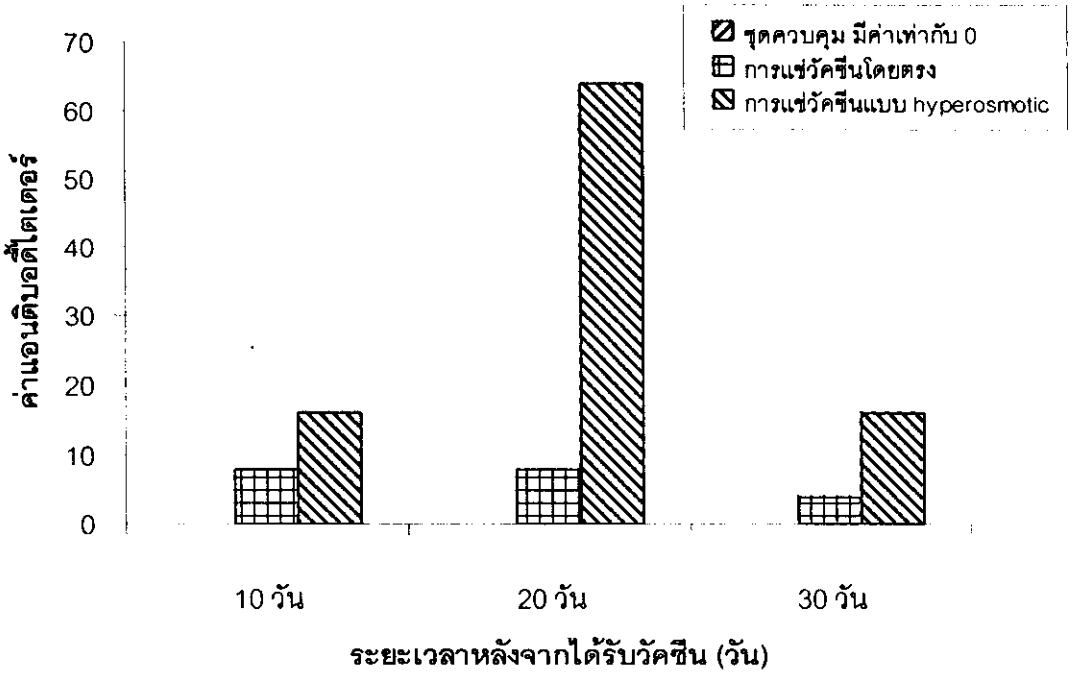
ตารางที่ 16 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่

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 22 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่



ภาพที่ 23 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่

การให้วัคซีนด้วยวิธีการกิน

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

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 17, ภาพที่ 24)

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 พบว่า การให้วัคซีนด้วยวิธีการกินจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 1:16 และ 1:32 แต่จะมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีค่าเท่ากับ 0 (ตารางที่ 18 และภาพที่ 25)

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน

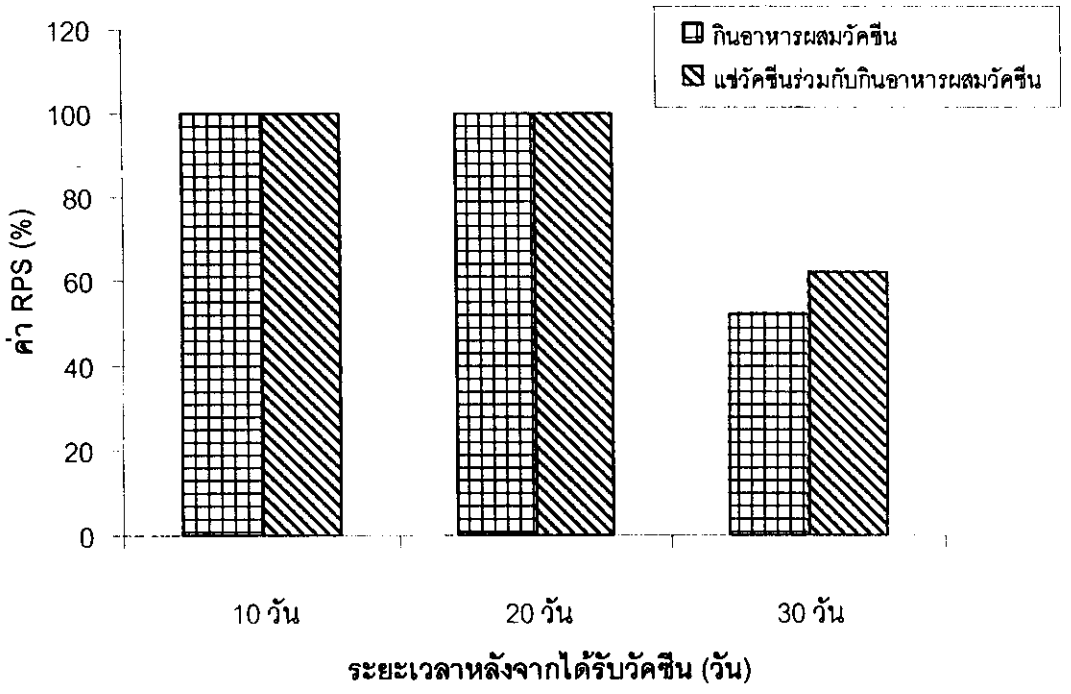
การให้วัคซีน	จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน					
	10 วัน		20 วัน		30 วัน	
	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)	อัตราการตาย (%)	ค่า RPS (%)
ชุดควบคุม	66.67 [a]	-	66.67 [a]	-	70.00 [a]	-
กินอาหารผสมวัคซีน	0.00 [b]	100 [a]	0.00 [b]	100 [a]	33.33 [b]	52.39 [a]
แช่วัคซีนร่วมกับกินอาหารผสมวัคซีน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

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

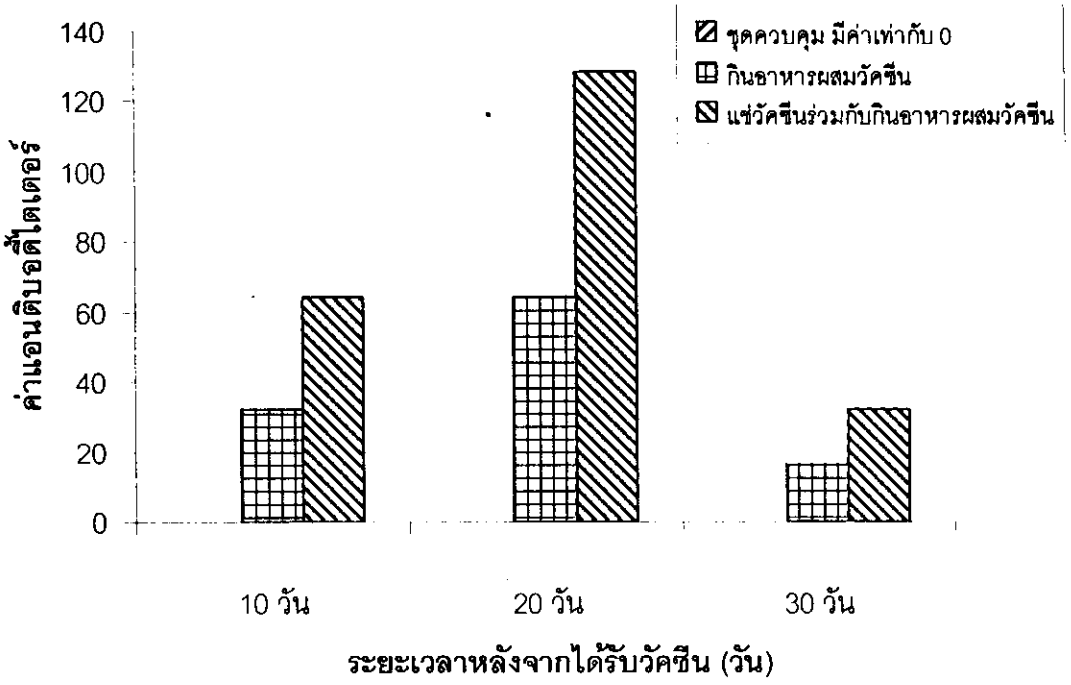
ตารางที่ 18 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน

จำนวนวันหลังจากได้รับวัคซีน	ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์		
	ชุดควบคุม	กินอาหารผสมวัคซีน	แช่วัคซีน+กินอาหารผสมวัคซีน
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 24 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน



ภาพที่ 25 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เฉลี่ยของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า RPS โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าช่องท้องปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ การทดลองที่ 10 วันหลังจากได้รับวัคซีน พบว่า การแช่วัคซีน 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 การกินอาหารผสมวัคซีนและ การแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งมีค่า RPS เท่ากับ 97.29, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการทดลองที่ 30 วัน พบว่าการแช่วัคซีนและ การฉีดวัคซีน มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 7.14 และ 31.58 เปอร์เซ็นต์ แต่การแช่วัคซีนแบบ hyperosmotic มีค่า RPS เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ กับการแช่วัคซีนและการฉีดวัคซีนไม่ผสม CFA ส่วนการกินอาหารผสมวัคซีนและการฉีดวัคซีนผสม CFA มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 52.39 และ 73.68 เปอร์เซ็นต์ แต่การแช่วัคซีนร่วมกับการกินอาหารผสมวัคซีน มีค่าเท่ากับ 61.90 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ การกินอาหารผสมวัคซีนและการฉีดวัคซีนผสม CFA (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 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 ($p<0.05$)