ห้องหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลา, สตูล และจังหวัดอื่นๆ ในภาคใต้ ที่มีการเลี้ยงปลากะพงขาว คัดเลือกปลาที่มีอาการ ลำตัวสีคล้ำ และตกเลือดที่บริเวณลำตัว นำมาวัดขนาดความยาว, สอบถามอายุจากผู้เลี้ยง และตรวจวัดคุณภาพน้ำโดยรวมเช่น ความเป็นกรดด่าง, ปริมาณออกซิเจน, ความเป็นด่าง, และแอมโมเนีย ตัวอย่างปลานำมาผ่าท้องด้วยวิธีปลอดจากเชื้อ (aseptic technique) แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากตับ ไต (ไตตอนหน้าและตอนกลาง) ม้าม และสมอง นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร สุ่มเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ มาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อไปทดสอบ catalase เพื่อที่จะแยกกลุ่มของเชื้อในขั้นต้น หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ที่มี glycerin ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาแยกชนิดเชื้ออย่างละเอียดและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ตามขั้นตอนของ Koch 's postulates เก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้งในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม 2547 และ ช่วงเดือนมกราคม-กุมภาพันธุ์ 2548 จำนวนทั้งสิ้น 100 สายพันธุ์

2. การแยกชนิดของเชื้อ

นำเชื้อที่แยกได้และมีความบริสุทธิ์ มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทำการทดสอบคือ การสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase, การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic) บน Sheep blood agar, การทนต่อพีเอชที่ 9.6, การทนต่อความเค็มของเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์, การทนต่ออุณหภูมิต่ำ 10 องศาเซลเซียส และสูง 45 องศาเซลเซียส, การเจริญใน 40 % bile salt, การทดสอบการย่อยเจลาติน แป้ง (starch), sodium hippurate, esculin และ arginine, การทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ คือ arabinose, glucose, glycerol, lactose, maltose, manitol, sucrose, tehalose และ xylose, การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

3. การทดสอบการเกิดโรค

นำเชื้อจากที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส ของแต่ละ isolate มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับหลอดมาตรฐาน McFarland No. 0.5 นำเชื้อดังกล่าวไปฉีดเข้าตัวอย่างปลากะพงขาวปกติ ขนาดความยาว 3-4 นิ้ว โดยปลาจะต้องมีความแข็งแรง ไม่แสดงอาการโรคใดๆ

โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว การทดลองใช้ปลาจำนวน 10 ตัวต่อ isolate มีชุดควบคุมเป็นปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แทนการฉีดเชื้อ ปลาจะเลี้ยงไว้จนแสดงอาการของโรค แล้วทำการแยกเชื้อตามข้อที่ 1

4. **การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ** *Streptococcus* sp.

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่บริสุทธิ์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหวี่ยงให้ตกตะกอน โดยใช้ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที นำเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปวัดค่าความทึบแสง (optical density ; OD) ที่ 540 nm ให้มีค่า OD ที่ระดับต่างๆ กันคือ 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.10 จากนั้นนำปลาที่มีขนาด 3-4 นิ้ว จำนวน 60 ตัว ทำการฉีดเชื้อในระดับต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้ปลากะพงขาวทดลองระดับละ 10 ตัว โดยจะฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้อง ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ของแต่ละระดับความเข้มข้น ส่วนในกลุ่มควบคุมมี 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่ง ให้ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งไม่ต้องฉีดสารใดๆ บันทึกเวลาและจำนวนปลากะพงขาวที่ตาย แล้วนำผลมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

นอกจากนี้นำเชื้อที่เจือจางที่มีค่า OD ระดับต่างๆ มาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) โดยวิธีการ Spread plate หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร โดยเจือจางความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 10^1 – 10^6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนีที่เกิดขึ้น

5. **การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ**

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. โคโลนีเดี่ยว ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับหลอดมาตรฐาน McFarland No. 0.5 จากนั้นใช้สำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. แล้วนำไปเกลี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำ disk ยาชนิดต่างๆ วางลงบนอาหาร Muller Hinton Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น จากนั้นแปลผลโดยใช้ตารางมาตรฐานในการแปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะ

6. **ศึกษาการเจริญของเชื้อ** *Streptococcus* **sp.ที่ระดับพีเอชและความเค็มที่ ต่างๆ กัน**

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่บริสุทธิ์ ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีระดับ pH ต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยให้มีปริมาตรของเชื้อเท่ากันทุกๆ หลอด โดย

ใช้เชื้อที่มีปริมาณเชื้อ 4.43 x 10^3 CFU/ml นำหลอดทดลองที่เติมเชื้อแล้วทุกหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วทิ้งไว้ให้เวลาผ่านไป 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระดับความเค็มต่างกัน คือ 0, 10, 20, 30, 40, และ 50 ส่วนในพันส่วน โดยให้มีปริมาตรของเชื้อเท่ากันทุกๆ หลอด 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

7. การศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว

7.1 การศึกษาองค์ประกอบของเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือด หลังจากติดเชื้อไปแล้ว 1, 6, 12, 18, 24 ชั่วโมง, 3, 7, 14, 21, 28 วัน โดยเก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 10 ตัว เลือดที่เก็บมาจะนำมาหาองค์ประกอบต่างๆ คือ ฮีมาโตคริต, ฮีโมโกลบิน, จำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว, การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว, กลูโคสในเลือด, ซีรั่มโปรตีน ตามวิธีการที่เคยรายงานไว้ใน กิจการ (2530)

7.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ (natural infection) และปลาที่ติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยแยกอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต ม้าม สมอง และเหงือก ดองด้วยฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Humason (1979)

7.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อในอวัยวะต่างๆ (สำหรับการฉีดเชื้อ)

ทำการเก็บเนื้อเยื่อตับ ไต และสมอง โดยจะนำเนื้อเยื่อมาเจือจางกับ phosphate buffer saline (PBS) ในอัตรา 1 : 100 แล้วหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) โดยวิธีการ drop plate หลอดละ 100 ไมโครลิตร โดยเจือจางความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 10^1-10^6 CFU บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนีที่เกิดขึ้น

<u>สูตรการคำนวณ</u>

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

N = จำนวนแบคทีเรียต่อ100 ไมโครลิตร

D = dilution

8. การผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Streptococcus* sp.

แยกเชื้อแบคทีเรียจนได้เชื้อบริสุทธิ์ และเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เหลว ปั่นแยกเชื้อที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียให้สะอาดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl และละลายเชื้อให้มีปริมาณเซลล์ 10^8-10^9 เซลล์/มล. ผสมเชื้อกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดเข้าบริเวณใต้ผิวหนัง กระต่ายเพศผู้อายุ 4 เดือน จำนวน 5 ครั้งๆ ละ 1 มล. ในการกระตุ้นแต่ละครั้งเว้นระยะห่างครั้งละ 1 สัปดาห์ หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 5 นาน 3 - 5 วัน เก็บตัวอย่างเลือดกระต่ายโดยเจาะเลือดจากหัวใจใส่ขวดและวางให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชั่วโมง แยกน้ำเลือดส่วนใสใส่หลอดและปั่นแยกที่ความเร็ว 500xg อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที นำแอนติบอดี้ที่ได้เก็บใส่หลอดๆ ละ 1.5 มล. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้งานต่อไป

9. ศึกษา cross protection และ cross immunity จากเชื้อแต่ละ strain

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ให้ค่า LD_{50} ที่ 14 วัน สูงสุด มาเตรียมเป็นวัคซีนเชื้อตายตามวิธีดังรายละเอียดต่อไปนี้

9.1 การเตรียมวัคซีนจากเชื้อ *Streptococcus* sp.

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 ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการเขี่ยสารละลายแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อเจริญให้นำสารละลายมาเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียตกตะกอน เทส่วนสารละลายทิ้งและล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำเช่นนี้ จนครบ 3 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรเท่ากับ 0.15 (ประมาณ $1x10^{10}$ CFU/ml) จากนั้นทดสอบการปลอดเชื้อ (sterile) ของวัคซีน โดยนำวัคซีนโดยนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อวัคซีนปลอดเชื้อจึงทำการเติมฟอร์มาลินให้ได้ 0.1 เปอร์เซ็นต์และเก็บวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

9.2 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

นำวัคซีนที่เตรียมได้มาฉีดเข้าช่องท้องปลาทดลองขนาด 10 กรัมตัวละ 0.1 มิลลิลิตร (มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียประมาณ 2.50×10^{10} CFU/ml) ในขณะที่ชุดควบคุม ฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

หลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 10 วันนำปลาทั้งสองกลุ่มมาศึกษา cross protection โดยการ challenge กับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกมาได้จากปลากะพงขาวที่เลี้ยงในพื้นที่ต่างกันจำนวน 5 สายพันธุ์

9.3 **การทดสอบความต้านทานโรค**

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่จะนำมา challenge นำมาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ LD_{50} ที่ 14 วันจำนวน 5 สายพันธุ์ และนำมาฉีดให้กับปลาที่ได้รับวัคซีนและชุดควบคุมเพื่อศึกษาความต้านทานโรค และ cross protection ของวัคซีนที่เตรียมได้

9.4 **การศึกษา** cross immunity

นำแอนติซีรัมที่เตรียมได้จากกระต่ายจากการทดลองในปีที่ 1 (เก็บใน -70 ^{o}C) มาทดสอบหาลักษณะ cross immunity ของเชื้อ *Streptococcus* sp. แต่ละตัวโดยวิธี slide agglutination test

10. **การทดสอบความปลอดภัยและ sterility ของวัคซีน**

นำวัคซีนที่เตรียมจากข้อ 9.1 มาใช้กับปลากะพงขาว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. ได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร มีปริมาณเซลล์ 2.5 x 10^{10} CFU/ml
2. ได้รับวัคซีนโดยวิธีการแช่โดยตรง เป็นเวลา 30 วินาที มีปริมาณเซลล์ในน้ำทะเล 2.5 x 10^{10} CFU/ml
3. ได้รับวัคซีนโดยวิธีการกินอาหารผสมวัคซีน ที่มีปริมาณเซลล์ 2.5 x 10^{10} CFU/กรัมอาหาร
4. กลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

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

ทดสอบ sterility ของวัคซีนโดยการนำวัคซีนที่เตรียมได้มาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

11. **การทดสอบปริมาณวัคซีนที่เหมาะสมในปลากะพงขาว** (Dec *et al.*, 1990)

นำวัคซีนที่เตรียมโดยวิธีการจากข้อ 9.1 ที่มีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่ต่างกัน 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

นำปลากะพงขาวแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 200 ลิตร โดยใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ในระหว่างการเลี้ยงให้อาหารผสมอัดเม็ดชนิดจมน้ำ โดยให้กินจนอิ่มทุกวัน วันละ 2 ครั้ง (เช้า – เย็น)

หลังจากให้วัคซีนไปแล้ว 10, 20 และ 30 วัน จึงทดสอบความต้านทานโรคโดยฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ความเข้มข้น 2.15 x 10^4 CFU/ml (LD_{50} ที่ 14 วัน) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายและความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) และค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ใช้วิธี agglutination (Roberson, 1990)

12. การศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว

การทดสอบวิธีการให้วัคซีนจะใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD: Completely Randomized Design) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลองย่อย

ชุดการทดลองที่ 1 การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีด

- การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ที่ปริมาณเซลล์วัคซีน 2.50 x 10^{10} CFU/ml (2.5 x10^9 CFU/ปลา)
- การให้วัคซีนผสม CFA (Complete Freund 's Adjuvent) ที่อัตรา 1 : 1 โดยฉีดเข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร
- ชุดควบคุม ฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 การให้วัคซีนโดยวิธีการแช่

คัดเลือกขนาดปลาและการจัดการเช่นเดียวกับวิธีข้อ 2.1 จากนั้นทำการแช่ปลากะพงขาวลงในวัคซีนที่มีความเข้มข้น 10^9 CFU โดยจะนำวัคซีนมาใช้ในอัตราส่วนระหว่างวัคซีนต่อน้ำเป็น 1:10 เป็นการแช่โดยตรง (direct immersion) แช่เป็นเวลา 30 วินาที (Akhlaghi *et al.*, 1996)

ชุดการทดลองที่ 3 การให้วัคซีนโดยวิธีการกิน

คัดเลือกขนาดปลาและการจัดการเช่นเดียวกับวิธีข้อ 2.1 ใช้อาหารที่ผสมกับวัคซีนที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหาร (วัคซีนผง) (Plumb and Vinitnantharat, 1994)

ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนจากแต่ละชุดการทดลองโดยการทดสอบความต้านทานโรคตามรายละเอียดดังนี้ เตรียมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ LD_{50} ที่ 14 วัน ฉีดปลาในชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ จำนวนปลา 20 ตัวต่อซ้ำ หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้ว 10, 20 และ 30 วัน โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ตรวจผลโดยพิจารณาจากจำนวนปลาตายภายในระยะเวลา 14 วัน นำ

เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลาในแต่ละชุดการทดลอง หลังจากทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. ไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (Ellis, 1988)

การคำนวณค่า Relative Percent Survival : RPS

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

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