สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	2
Abstract	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	9
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	12
บทนำ	13
การค้นคว้าจากเอกสาร	15
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	20
1. การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์	20
2. การแยกชนิดของเชื้อ	20
3. การทดสอบการเกิดโรค	20
4. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp.	21
5. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ	21
6. ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับพีเอช และความเค็มที่ต่างๆ กัน	21
7. การศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว	22
8. การผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Streptococcus* sp.	23
9. ศึกษา cross protection และ cross immunity จากเชื้อแต่ละ strain	23
10. การทดสอบความปลอดภัยและ sterility ของวัคซีน	24
11. การทดสอบปริมาณวัคซีนที่เหมาะสมในปลากะพงขาว	24
12. การศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว	25
ผลการทดลอง	26
1. ตัวอย่างปลาและเชื้อแบคทีเรีย	26
2. การแยกชนิดของเชื้อ	27
3. การทดสอบการเกิดโรค	29
4. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp.	29

5. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 29
6. ความเค็มและ pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ 30
7. การก่อโรคของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว 31
8. การผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. จากกระต่าย 44
9. Cross protection และ cross immunity ของเชื้อ *Streptococcus* sp. 44
10. การทดสอบความปลอดภัยและ sterility ของวัคซีน 44
11. การตอบสนองของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณที่แตกต่างกัน 45
12. ผลการศึกษาวิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว 48

วิจารณ์ผลการทดลอง 58

สรุป 68

เอกสารอ้างอิง 69

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตาราง		หน้า
1	Current list of vaccines licensed for aquaculture world-wide	18
2	ผลการเพาะเชื้อจากอวัยวะต่างๆ ในแต่ละแหล่งที่เก็บตัวอย่าง	27
3	ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่เลี้ยงปลาในกระชังที่เก็บตัวอย่าง	27
4	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงขาว	28
5	ความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงขาว จากแหล่งต่างๆ	29
6	ความไวของเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่อยาปฏิชีวนะ	30
7	การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเป็นกรด - ด่าง ต่างๆ กัน	31
8	การเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ความเค็มต่างๆ กัน	31
9	การเจริญเติบโตของเชื้อในอวัยวะต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อ (ปริมาณเชื้อต่อกรัมของเนื้อเยื่อ)	43
10	แสดงค่า RPS (relative percent survival) ของปลาที่ได้รับวัคซีนและนำมาฉีดเชื้อที่ต่างสายพันธุ์	44
11	เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณเซลล์ของวัคซีนต่างกัน	46
12	เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนในปริมาณเซลล์วัคซีนต่างๆ	46
13	เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง	49
14	เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง	49
15	เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่	52
16	เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่	52

17 เปรียบเทียบอัตราการตาย (%) และความสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน 55
18 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน 55
19 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการต่างๆ กัน 57

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

ภาพประกอบ		หน้า
1	เปรียบเทียบค่าฮีมาโตคริตและค่าฮีโมโกลบินของปลากะพงขาว ที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม	32
2	เปรียบเทียบค่าพลาสมาโปรตีนของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. กับชุดควบคุม	32
3	เปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาว ที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp.	33
4	ตับปลากะพงขาวปกติ แสดงให้เห็นโครงสร้างเนื้อเยื่อตับเรียงตัวเป็นระเบียบ มีลักษณะเซลล์ปกติ ลูกศรสีดำชี้แสดง hepatic sinusoid, ลูกศรีขาวแสดง เนื้อเยื่อตับอ่อนปกติ, ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 50μm)	35
5	ตับปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ทำให้สูญเสียโครงสร้างของเนื้อเยื่อตับ พบช่องว่างในเซลล์ตับมากขึ้น (ศรสีดำ) พบมีเซลล์ตายบางส่วน ศรสีขาวแสดง pancreatic acinar ที่ยังมีไซโมเจนกรานูลอยู่, ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 50μm)	35
6	ไตส่วนหลัง (Posterior kidney) ปลากะพงขาวปกติแสดงให้เห็นถึงท่อไตอวัยวะสร้าง เม็ดเลือดปกติ พบเมลาโนแมคโครฟาจกระจายอยู่เล็กน้อย (ศรสีขาว), ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 50 μm)	36
7	ไตปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่ามีเมลาโนแมคโครฟาจจำนวนมาก แทรกตัวเข้ามาในเนื้อเยื่อไต (ศรสีขาว) ท่อไตและ hemopoeitic tissue ยังดูปกติ, ย้อมสี H&E, (กำลังขยาย 20 เท่า)	36
8	ม้ามปลากะพงขาวปกติ แสดงโครงสร้างปกติของ red pulp และ white pulp มีเมลาโนแมคโครฟาจ กระจายอยู่เล็กน้อย, ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 200 μm)	37
9	ม้ามปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบเมลาโนแมคโครฟาจขนาดใหญ่ และจำนวนมาก (ศรชี้) แทรกเข้ามาในเนื้อเยื่อม้าม, ย้อมสี H&E, (กำลังขยาย 20 เท่า)	37
10	ภาพขยายของเมลาโนแมคโครฟาจเซนเตอร์ในเนื้อเยื่อม้าม พบแบคทีเรียรูปกลม จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปปะปนอยู่กับเมลาโนแมคโครฟาจเซล, ย้อมสี Geimsa's, (กำลังขยาย 500 เท่า)	38
11	เนื้อเยื่อหัวใจปลากะพงขาวปกติ, แสดงเยื่อหุ้มหัวใจ (epicardium) ปกติ มีเส้นเลือด (cardiac artery) ศรสีแดงนำเลือดมาเลี้ยงหัวใจ กล้ามเนื้อส่วน bulbus arteriosus และ ventricle ปกติ, ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 200 μm)	38

12 เนื้อเยื่อหัวใจปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. เนื้อหุ้มหัวใจหนาขึ้น (ศรสีดำ) และมีเม็ดเลือด ขาวและแมคโครฟาจขนาดใหญ่จำนวนมากแทรกตัวเข้ามา (ศรสีขาว) พบการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจส่วน ventricle, ย้อมสี H&E, (กำลังขยาย 20 เท่า) 39

13 เนื้อเยื่อหัวใจปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบการอักเสบอย่างรุนแรง บริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ, เมลาโนแมคโครฟาจขนาดใหญ่ที่จับกินเซลล์แบคทีเรีย ถูกห้อมล้อมด้วยเม็ดเลือดขาว (encapsulation) (ศรสีดำ) ในขณะที่เม็ดเลือดขาว จำนวนมากเข้ามาในบริเวณนี้ (ศรสีขาว), ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 100 µm) 39

14 ตาปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีลักษณะขุ่น (cataract) และเลนส์ตาเสื่อมสภาพ (L) และเกิดการอักเสบอย่างรุนแรง และมีเม็ดเลือดขาวและแมคโครฟาจขนาดใหญ่จำนวนมากแทรกตัวเข้าไปอยู่ในส่วนของน้ำในลูกตา (vitreous humor) เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย, บริเวณจอรับภาพ (retina) เสื่อมสลายและหดตัว (ศรสีขาว), ย้อมสี H&E, (กำลังขยาย 10 เท่า) 40

15 ตาปลากะพงขาวที่มีลักษณะขุ่น (cataract) พบการเสื่อมสลายของเลนส์ตาอย่างรุนแรงมีแคปซูลขนาดเล็กจำนวนมากภายในมีเซลแบคทีเรีย (ศรสีดำ) ในขณะที่รอบเลนส์ตาจะมีเม็ดเลือดขาวและเซลล์ตายจำนวนมาก อยู่ในส่วนของ vitreous humor (ศรสีขาว), ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 200 µm) 40

16 สมองปลากะพงขาวติดเชื้อ *Streptococcus* sp. เกิด granuloma ขนาดใหญ่ในส่วนของ third ventricle ของสมองและถูกห้อมล้อม (encapsulated) ด้วยเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก, ย้อมสี H&E, (เส้นขีดขนาด 100 µm) 41

17 ภาพขยายเนื้อเยื่อสมองส่วนกลางที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. พบเซลล์แบคทีเรียจำนวนมากในบริเวณนี้ (ศรชี้), ย้อมสี Geimsa's, (เส้นขีดขนาด 10 µm) 41

18 เปรียบเทียบค่า RPS ของวัคซีนในปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 2.50×10^8, 2.50×10^9 และ 2.50×10^{10} CFU/ml โดยทำการวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วันหลังจากเริ่มให้วัคซีน 47

19 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 2.50×10^8, 2.50×10^9 และ 2.50×10^{10} CFU/ml โดยทำการวิเคราะห์วันที่ 10, 20 และ 30 วัน หลังจากเริ่มให้วัคซีน 47

20 เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง 50

21 เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง 50

22	เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่	53
23	เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการแช่	53
24	เปรียบเทียบค่า RPS ของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน	56
25	เปรียบเทียบค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์เฉลี่ยของปลากะพงขาว ที่ได้รับวัคซีนด้วยวิธีการกิน	56

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

Alk.	= ค่าความเป็นด่างของน้ำ
ARS – 10	= เชื้อ *Streptococcus iniae* ที่แยกมาจากปลานิล
ARS - 60	= เชื้อ *Streptococcus iniae* ที่แยกมาจากปลา striped ลูกผสม
CFA	= Complete Freund's Adjuvent
CFU/ml	= colony forming unit
DO	= ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ
LD_{50}	= ปริมาณสารทดสอบที่สัตว์ทดลองได้รับเข้าไปในร่างกายแล้วทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (50%) ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด โดยมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของสารทดสอบ/น้ำหนักของสัตว์ทดลองที่ใช้ 1 กิโลกรัม (mg/kg)
ppm	= ส่วนในล้านส่วน (part per million)
ppt	= ส่วนในพันส่วน (part per thousand)
RPS	= ค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (Relative Percent Survival)
Sal.	= ค่าความเค็มของน้ำ