บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ที่ปลอดจากการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 15 กรัม ซึ่งรวบรวมมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในเขตจังหวัดพัทลุง โดยเลี้ยงไว้ในตู้ทดลองความจุ 80 ลิตร เพื่อปรับให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 3 มื้อ

2. การตรวจสอบคุณสมบัติของโคโลนีและชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp.

นำเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากสมองของปลานิลป่วย (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) มา sub-culture แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติของโคโลนี เช่น การเคลื่อนที่, oxidase test, catalase test, การติดสีย้อม (Gram' s staining) และการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (haemolysis) รวมทั้งคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical activity) อื่น ๆ เช่น การผลิตเอนไซม์ การใช้กรดอะมิโน และน้ำตาลประเภทต่าง ๆ เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาเป็นเชื้อในกลุ่ม *Streptococcus* โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อจะใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 STREP (bioMerieux, France)

3. การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. บริสุทธิ์ ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มา inoculate ลงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปล่อยให้มีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วรวบรวมเซลล์แบคทีเรียโดยการนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของอาหารเหลวทิ้งไป และปั่นล้าง 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.85% เตรียมเป็นสารละลายเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85% โดยเจือจางสารละลายเชื้อที่ได้ให้มีปริมาณของเชื้อตามต้องการ (นับปริมาณเชื้อโดยวิธี plate count) ก่อนนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

4. การหาปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (Median lethal dose, LD_{50})

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 7 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 6 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร และเตรียมสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีปริมาณเชื้อ 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 colony

forming unit (cfu)/ml เพื่อใช้ฉีดเข้าตัวปลาในแต่ละกลุ่มทดลอง ฉีดเชื้อโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 25G และหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ปริมาตรตัวละ 0.2 มิลลิลิตร เข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) ส่วนชุดควบคุมจะใช้การฉีดน้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อ สังเกตอาการของปลาหลังการฉีดเชื้อ และบันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน แล้วนำไปคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีการของ Reed & Muench (1938) โดยใช้ความสัมพันธ์

$$LD_{50} = A + B/C \times D$$

โดยที่ A = log concentration below 50%

B = 50 - mortality below 50%

C = mortality above 50% - mortality below 50%

D = log concentration above 50% - log concentration below 50%

ค่า LD_{50} ที่ได้นี้จะใช้เป็นปริมาณเชื้ออ้างอิงสำหรับการชักนำให้ปลานิลติดเชื้อในการทดลองต่อ ๆ ไป

5. การศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ผ่านช่องทางการติดเชื้อ (routes of infection) ที่แตกต่างกัน

5.1 วิธีการฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร และเตรียมสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับค่า LD_{50} เพื่อใช้ฉีดเข้าตัวปลาในแต่ละกลุ่มทดลอง ฉีดเชื้อโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 25G และหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ปริมาตรตัวละ 0.2 มิลลิลิตร เข้าบริเวณช่องท้อง ชุดควบคุมจะใช้การฉีดน้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อ สังเกตอาการของปลาหลังการฉีดเชื้อ และบันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน

5.2 วิธีการแช่ (Bath exposure)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร และเตรียมสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp.ที่มีปริมาณเชื้อ เท่ากับค่า LD_{50} เติมสารละลายเชื้อลงไปในตู้ของแต่ละชุดทดลอง โดยชุดควบคุมจะมีการปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่ไม่มีการเติมเชื้อ *Streptococcus* sp. สังเกตอาการของปลาหลังการแช่เชื้อ และบันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน

5.3 วิธีการผสมอาหาร (Oral exposure)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร และเตรียมอาหารผสมเชื้อ *Streptococcus* sp. ตามวิธีการของ Bromage และ Owens (2002) โดยนำอาหารเม็ดมาบดให้เป็นผงละเอียดแล้วผสมลงในสารละลาย 10% เจลาตินที่อุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 20% (w/v) ปรับปริมาตรของส่วนผสมให้ได้ 45 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอุ่นฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากันดีแล้วเติมสารละลายของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LD_{50} ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงบนถาดที่มีความลึก 10 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง แล้วตัดออกเป็นชิ้น ๆ ให้มีขนาดชิ้นละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปให้ปลาในชุดทดลองกินตัวละ 1 ชิ้น ภายในเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากเตรียมเสร็จ ส่วนปลาในชุดควบคุมให้กินอาหารผสมเจลาตินที่ไม่มีเชื้อ สังเกตอาการของปลาหลังการให้อาหารผสมเชื้อที่มีปริมาณต่าง ๆ กัน และบันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน และเพื่อเป็นการยืนยันว่าอาหารที่เตรียมขึ้นมีเชื้อ *Streptococcus* sp. ผสมอยู่ จะต้องนำอาหารตัวอย่างมา 5 ชิ้น บดให้ละเอียด ละลายในสารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^2 cfu/ml แล้วนำสารละลายอาหารที่มีเชื้อผสมอยู่ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. บนอาหาร

5.4 วิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาที่ติดเชื้อ (Cohabitation)

เป็นวิธีการที่เลียนแบบการติดต่อของโรคตามธรรมชาติจากปลาป่วยไปสู่ปลาปกติที่อยู่ร่วมกัน โดยการฉีดเชื้อเข้าตัวปลาแล้วนำไปเลี้ยงรวมกับปลาปกติ เพื่อให้มีการแพร่กระจายของโรคจากปลาป่วยไปยังปลาปกติ โดยเตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร ชักนำให้เกิดการติดเชื้อในปลาชุดทดลองโดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าช่องท้องปลานิลจำนวน 5 ตัว ตามวิธีการใน 5.1 โดยใช้ปริมาณของเชื้อเท่ากับค่า LD_{50} ปล่อยให้มีการแสดงอาการของโรค แล้วนำปลาที่เป็นโรคหรือตายใหม่ ๆ ไปใส่ในตู้ปลาสำหรับชุดทดลอง cohabitation หลังจากเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง จึงนำปลาที่ฉีดเชื้อออกจากตู้ทดลอง สังเกตอาการของปลา และบันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน โดยในชุดควบคุมจะไม่มีการนำปลาที่ฉีดเชื้อเลี้ยงร่วมกับปลาปกติ

5.5 วิธีการฉีดเข้าช่องจมูก (Nare inoculation)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร และ

เตรียมสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp.ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับค่า LD_{50} ทำการสลบปลาโดยใช้สารละลาย MS-222 แล้วฉีดสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นเข้าบริเวณช่องจมูกของปลาแต่ละตัวในปริมาณตัวละ 10 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปต ชุดควบคุมจะมีการปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่ใช้น้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อ ปล่อยปลากลับลงในตู้ทดลอง สังเกตอาการของปลาหลังการฉีดเชื้อ และบันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน

6. การศึกษาผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค

6.1 ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยง

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มแรกสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด กลุ่มที่สองสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงร่วม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 3 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) โดยที่แต่ละชุดทดลองมีความหนาแน่นของปลาแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ

- ความหนาแน่นต่ำ (8 กรัม/ลิตร)
- ความหนาแน่นปานกลาง (12 กรัม/ลิตร)
- ความหนาแน่นสูง (17 กรัม/ลิตร)

ชักนำให้ปลาในแต่ละกลุ่มการทดลองเกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงร่วม ตามลำดับ สังเกตอาการของปลาที่ติดเชื้อ บันทึกอัตราการตายของปลาในแต่ละวันจนครบ 14 วัน เปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคเนื่องจากผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

6.2 ผลของอุณหภูมิ

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มแรกสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด กลุ่มที่สองสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงร่วม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย 6 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 3 ชุด และชุดควบคุม 3 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) โดยแต่ละชุดทดลองจะเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ

- อุณหภูมิต่ำ (24 องศาเซลเซียส)
- อุณหภูมิปกติ (27 องศาเซลเซียส)
- อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส)

ชักนำให้ปลาในแต่ละชุดทดลองเกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงร่วม ในแต่ละระดับอุณหภูมิจะมีชุดควบคุม สังเกตอาการของปลาที่ติดเชื้อทั้ง 3 ชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตายของปลาในแต่ละวันจนครบ 14 วัน เปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคเนื่องจากผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน

6.3 ผลของความเค็มของน้ำ

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 8 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 4 ชุด และชุดควบคุม 4 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) โดยแต่ละชุดทดลองจะเลี้ยงปลาที่ความเค็มของน้ำแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 5, 10 และ 15 ppt ชักนำให้ปลาในแต่ละชุดทดลองเกิดการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงร่วม ในแต่ละระดับความเค็มจะมีชุดควบคุม โดยที่ชุดควบคุมจะไม่มีการนำปลาที่ฉีดเชื้อเลี้ยงรวมกับปลาปกติ สังเกตอาการของปลาที่ติดเชื้อทั้ง 4 ชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตายของปลาในแต่ละวัน เปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคเนื่องจากผลของความเค็มของน้ำที่แตกต่างกัน

7. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและระดับแอนติบอดี

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศโดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร ปลาในชุดทดลองจะถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง ส่วนชุดควบคุมฉีดน้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 14 วัน สลบปลาด้วยสารละลาย MS-222 ความเข้มข้น 100 ppm แล้วทำการเก็บเลือดปลาทั้งหมด โดยใช้เข็มขนาด 25G ดูดเลือดจากเส้นเลือดบริเวณโคนหาง (caudal vein) ของปลาตัวละประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบเลือดต่าง ๆ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าองค์ประกอบเลือดระหว่างปลาที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อกับปลาปกติในชุดควบคุม

7.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte counts)

ตามวิธีการของ Blaxhall และ Daisley (1973) โดยนำเลือดปลามาเจือจาง 100 เท่าด้วยสารละลาย Dacie's fluid (10 ml Formaldehyde, 31.3 g Trisodium citrate และ 1.0 g Brilliant cresyl blue ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) หยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) นับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และรายงานผลในหน่วยเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (cells/mm^3)

7.2 ค่าฮีมาโตคริต (Haematocrit, packed cell volume)

บรรจุเลือดปลาเข้าสู่หลอดฮีมาโตคริต (microhaematocrit tubes) ประมาณ 80% ของความยาวหลอด โดยอาศัยแรง capillary action อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วย synthetic sealant หรือดินน้ำมัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง microhaematocrit centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดระดับของ packed cell volume เทียบกับปริมาณของเลือดทั้งหมด รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ (percent haematocrit)

7.3 ปริมาณฮีโมโกลบิน (Haemoglobin determination)

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินของเลือดปลา โดยทั่วไปจะใช้วิธีการของ Larsen และ Snieszko (1961) ซึ่งเป็น Cyanmethemoglobin method โดยใช้หลักของการเปลี่ยนอนุพันธ์ของฮีโมโกลบิน (haemoglobin derivatives) ทั้งหมดไปเป็น methemoglobin โดยใช้ ferricyanide และ cyanide ions ซึ่ง methemoglobin จะเป็นสารประกอบสีแดงที่เสถียร และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วิธีการวิเคราะห์เริ่มต้นจากการหยดเลือดตัวอย่างปริมาตร 20 µl ลงในหลอดที่บรรจุ 5 ml ของ Drabkin's solution (20 mg Potassium ferricyanide และ 50 mg Potassium cyanide ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ผสมให้เข้ากันดี แล้วทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้ Drabkin's solution เป็น blank คำนวณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในหน่วยกรัมต่อเดซิลิตร (g/dl) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของฮีโมโกลบินมาตรฐาน (human haemoglobin) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

7.4 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (Serum protein)

นำเลือดปลาที่เจาะได้ ทิ้งให้เกิดการแข็งตัว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของน้ำเลือด หรือซีรัม มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งวิธีการนี้จะใช้ working solution สองชนิด คือ alkaline copper solution และ folin reagent โดยอาศัยหลักการที่ ammonia (NH_3) ในโปรตีนตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ copper ions (Cu^{2+}) ใน alkaline copper solution เกิดเป็น biuret complex ($Cu(NH_3)_4^{2+}$) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะทำปฏิกิริยากับ phosphomolybdotungstate ใน folin reagent ไปเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงินเข้ม และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

วิธีการวิเคราะห์โปรตีนเริ่มต้นจากการเจือจางซีรัมด้วยน้ำกลั่น 200 เท่า โดยใช้ซีรัมตัวอย่างปริมาตร 5 µl เติมลงในหลอดที่บรรจุน้ำกลั่น 995 µl จากนั้นเติม alkaline copper working solution ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที เติม folin reagent (เจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่น) ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640

นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นที่เติมสารเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (standard albumin) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

7.5 การวัดระดับแอนติบอดี (Antibody titre)

โดยวิธี microtitration agglutination เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ microtitre plate หลังจากนั้นเติม 50 ไมโครลิตร ของซีรัมของปลานิลแปลงเพศ ลงในหลุมแรกของแต่ละแถว ผสมให้เข้ากันดีกับ PBS แล้วทำการเจือจางแบบ two-fold dilution ในหลุมต่อ ๆ ไป ส่วนหลุมที่เป็น negative control จะเติม PBS แทนซีรัม แล้วเติมสารละลายของเชื้อ *Streptococcus* sp. ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไปทุกหลุม วาง microtitre plate ไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตการกระจายของแบคทีเรียบริเวณก้นหลุม หลุมที่ไม่มีแอนติบอดีจะสังเกตเห็นการตกตะกอนของแบคทีเรียคล้ายเม็ดกระดุมบริเวณก้นหลุม ระดับของแอนติบอดีคำนวณได้จากค่าส่วนกลับของ dilution factor

8. การศึกษาพยาธิสภาพ (Histopathology) ของเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. จะใช้ปลาชุดเดียวกับการศึกษาองค์ประกอบเลือด หลังจากการเก็บเลือด จะใช้อุปกรณ์ผ่าตัดแยกเก็บอวัยวะต่าง ๆ ทันที เพื่อป้องกันการเกิด autolysis ตัดอวัยวะส่วนที่ต้องการศึกษา ได้แก่ ตับ ไต ม้าม และสมอง วางลงในถาดที่มีน้ำยารักษาสภาพ (Phosphate buffered formalin) เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างแห้ง ตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดไม่เกิน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แช่ไว้ใน Phosphate buffered formalin เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) แล้วฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน (embed) นำไปตัดให้เป็นชิ้นบางด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 4-7 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสีย้อม Haematoxylin และ Eosin (H&E) ตามวิธีของ Humason (1979) เตรียมเป็นสไลด์ถาวรเพื่อนำไปศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลองจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA)