รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กมลพร ทองอุไทย สุปราณี ชินบุตร และชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2530. ผลของคลอรีนต่อปลาน้ำจืดบางชนิด. วารสารการประมง. 40 (5), 535-541.

กิจ สุนทร และพรทิพย์ คุฒิวณากานต์. 2545. ศักยภาพของสมุนไพรในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ "มุมมองการใช้สมุนไพร". หน้า 6-8. การประชุมวิชาการสมุนไพรไทย โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น เขตจตุจักร กรุงเทพฯ. วันที่ 24-25 ตุลาคม 2545.

กุลวรา ชาญชิตร. 2528. การศึกษาการเกิดโรคและรักษาโรคติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาบู่ทราย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2528. ประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อ 4 ชนิด ต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila*. เวชชสารสัตวแพทย์. 15 (4): 255-260.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ และวิชาญ ผสมกิจ. 2541. โรค Motile aeromonas ในปลา. เวชชสารสัตวแพทย์. 28 (4): 81-88.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2535. โรคปลา. เอกสารการสอนวิชาชีววิทยาประมง คณะประมงศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

เชนทร์ ผางนุย. 2547. ผลของการเสริมใบฝรั่ง และผลอ่อนผงในอาหารต่อสมรรถนะการผลิตและการควบคุมโรคในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เตือนพร พิสมยรมย์. 2543. การศึกษาประสิทธิภาพของยาโรเมต-30 ในการป้องกันโรคที่เกิดจาก *Aeromonas hydrophila* ในปลาดุกลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เทอด เทศประทีป. 2526. การศึกษาพยาธิสภาพของปลาป่วยจากโรคระบาดปลา พ.ศ. 2525. ประมวลประชุมวิชาการเรื่องโรคระบาดในปลาน้ำจืด. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. 257-276.

นันทริกา ชันซื่อ ธีรศักดิ์ มาตาเดิม และอัจฉริยา ไศละศูล. 2547. การศึกษาเบื้องต้นของน้ำแช่ใบหูกวาง *(Terminalia catappa)* ต่อเกล็ดปลากัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน. หน้า 140-144. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเรื่อง สมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่

ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ครั้งที่ 2.คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. วันที่ 15-16 มกราคม พ.ศ. 2547.

นันทริกา ชันซื่อ และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2548. การสำรวจโรคเคเอชวีของปลาคาร์พในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548. สัตวแพทยสาร. 56 (3): 13-21.

นันทริกา ชันซื่อ และสมหวัง พิมลบุตร. 2550. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับค่าทางเคมีในเลือดของปลาน้ำจืดในวงศ์ปลาตะเพียน หรือปลาคาร์พ (Family Cyprinidae). สัตวแพทยสาร. *In press.*

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2542. สมุนไพร.ไม้พื้นบ้าน (3). กรุงเทพฯ : ประชาชน, หน้า 143.

บังอร บัวคำไหล, สุชน ตั้งทวีพิพัฒน์, บุญล้อม ชีวอิสระกุล และวีระ วงศ์คำ. 2547. ระดับและชนิดของสมุนไพรที่มีผลต่อการป้องกันโรคบิดไก่. หน้า 163-168. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเรื่อง สมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ครั้งที่ 2. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. วันที่ 15-16 มกราคม พ.ศ. 2547.

บุญเทียม คงศักดิ์ตระกูล, รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, วิสุดา สุวิทยา, สมใจ นครชัย และยุวดี วงศ์กระจ่าง. 2537. การศึกษาฤทธิ์ลดไข้ของบอระเพ็ด. ว. เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 21 (1) : 1-6.

ประเสริฐ ไมตรีวงษ์. 2544. สายพันธุ์ และการเลี้ยงปลาคาร์พ ฉบับสมบูรณ์ : แฟนซีคาร์พ. สำนักพิมพ์เพชรกะรัต. กรุงเทพฯ. 180 หน้า.

พรรณพิศ สุภาพ. 2528. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและโลหิตวิทยาของปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus* Linn.) ที่เป็นโรคติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรนิภา ชุมศรี. 2526. แทนนินและโพลี่ฟีนอล. เภสัชวินิจฉัย เล่ม 1. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. หน้า 188-198.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2548. การดูแลสุขภาพแบบพึ่งตนเองด้วยยาสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน. ศูนย์พัฒนาตำราแพทย์แผนไทย. มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา.

พีรรัชต์ ไทยนะ, มาลินี วงศ์นาวา, วีรวัฒน์ มหัทธนตระกูล, นิสิตา บำรุงวงศ์, วันดี อุดมอักษร, อำพล รังสิมาพงศ์, อนุพงศ์ นิติเรืองจรัส และ ปนัดดา มุสิกวัณณ์. 2540. การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบฝรั่งในหนูขาวใหญ่. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันการแพทย์แผนไทย.

มงคล ปริ่มผล. 2533. การศึกษาสาเหตุ และการป้องกันโรค ในปลาดุกอุย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ และนันทริกา ขันซื่อ.2544. การศึกษาความรุนแรงของเชื้อแอร์โรโมนาสไฮโดรฟีล่าในกบนา (*Rana Tigerina*). เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/2544. สำนักงานวิชาการกรมประมง. 10 หน้า.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และสาโรช ค้าเจริญ. 2545. งานวิจัยสมุนไพรในไก่. หน้า. 9-13. การประชุมวิชาการสมุนไพรไทย โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น เขตจตุจักร กรุงเทพฯ. วันที่ 24-25 ตุลาคม 2545.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรพัฒน์ ประชาศิลป์ชัย, วิจิตร บรรลุนารา, คมกฤช เทียนคำ, นพดล พิฬารัตน์, อัจฉริยา ไศละยสูต, สมชาย โชติอภิสิทธิ์กุล และยงชัย อุตระ. 2546. รายงานสัตว์ป่วย: การติดเชื้อแบคทีเรียแอโรโมนาส ไฮโดรฟีรา ในลูกฮิปโปโปเตมัส. ว. สัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ฯ. 15 (1): 47-56.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม และเกษม เที่ยงบูรณธรรม. 2537. พจนานุกรมแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ : บริษัทรวมสาส์น จำกัด.

วีณา เคยพุดซา และมาลินี กิตกำธร. 2547. คู่มือปฏิบัติการ การตรวจคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. หน่วยอายุรศาสตร์สัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สกลกิจ พันธะวงศ์. 2002 (2545) ผลของสารสกัดจากผรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่ก่อโรคในสุกร. (ปัญหาพิเศษ). คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมพล ประคองพันธ์. 2545. แนวทางการพัฒนาการผลิตยาจากสมุนไพรสำหรับสัตว์. หน้า 1-5. การประชุมวิชาการสมุนไพรไทย โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น เขตจตุจักร กรุงเทพฯ. วันที่ 24-25 ตุลาคม 2545.

สมภพ ประธานธุรารักษ์ และพร้อมจิต ศรลัมพ์. 2547. สมุนไพร : การพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน.พิมพ์ครั้งที่ 2. โครงการเผยแพร่ข้อมูลและตรวจสอบมาตรฐานสมุนไพร ศูนย์ประยุกต์และบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์. 2544. วงศ์ปลาตะเพียน หรือปลาคาร์พ (Family Cyprinidae). อนุกรมวิธานปลาสวยงามต่างถิ่น : สินค้าส่งออก. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 57.

สาโรช ค้าเจริญ. 2542. อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. จังหวัดขอนแก่น.

สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน. 2541. ฝรั่ง. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน. กระทรวงสาธารณสุข. ดอกหญ้า, กรุงเทพฯ. หน้า 96-97.

สุปราณี ชินบุตร. 2526. การศึกษาทางฮิสโตพยาธิวิทยาของปลาดุกด้านที่เป็นโรคโคนครีบหูบวมเนื่องจาก แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*. กรุงเทพฯ : สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

สุรพล คงทิม. 2546. คู่มือปฏิบัติการทางเนื้อเยื่อวิทยา เล่ม 1. เอกสารการสอน. ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุวรงค์ วงษ์ศิริ. 2536. การสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โสภา อารีรัตน์. 2528. ผลของ *Aeromonas hydrophila* ที่มีต่อเนื้อเยื่อของปลาดุกด้าน. กรุงเทพฯ : สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

เอมมนัส อัตตวิชญ์, ปราณี ชวลิตธำรง, พัช รักษามั่น และปราณี จันทเพชร. 2538. การศึกษาพิษของใบฝรั่ง. ว. กรมวิทยาศาสตร์ 37 (4) : 289-305.

ภาษาอังกฤษ

Abdelrahim, S.I., A.Z. Almagboul, M.A.E. Omer and A. Elegami. 2002. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Fitoterapia. 73 : 713-715.

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T. and Iwatsuki, K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus.* J. Antimicrobial Chemotherapy. 48: 487-491.

Amdur, M.O., Doull, J. and Klaassen, C.D. 1991. Casarett and Doull's Toxicology the basis science of poison. (4th ed). New York: Pergamon press.

Arima, H. and G.I. Danno. 2002. Isolation of antimicrobial compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 (8): 1727-30.

Bahari, I.B., Noor, F.M., Daud, N.M., 1994. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. Mutat. Res. 313: 1–5.

Basile, A., S. Sorbo, S. Giordano, L. Ricciardi, S. Ferrara, D. Montesano, R. Cobianchi, M.L. Vuotto and L. Ferrara. 2000. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. Fitoterapia. 71 : 110-116.

Baulay, M.O.D., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and Gouvello, R.L. 1996. Effect of long-term oral administration of ß glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis Aquat Org 26 : 139-147.

Berges, R.R., Windeler, J., Trampisch, H.J. and Senge, T. 1995. Randomized placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patient with benign prostatic hyperplasia. Beta-sitosterol Study Group. *Lancet* 345: 1529-1532.

Bonga, S.E., Flik, G., Balm, P.H.M. and van der Meij, J.C.A. 1990. The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. Cell and Tissue Research 259 (3), 575-585.

Bowser, P.R. 1999. Disease of fish. Aquatic Animal Health Program. Department of Microbiology and Immunology. College of Veterinary Medicine. Cornell University, Ithaca, New York.

Boyd, C.E. 1990. Water Quality in ponds for Aquaculture. Songkhla : Shrimp Mart (Thai) Co. Ltd.

Bradley, E.B., Jonathan, S., Serody, D. and Myron, S.S. 1994. The role of an antiinflamatory molecule, Structure and function 5 : 143-151.

Caceres, A., L. Figueroa, A.M. Taracena and B. Samayoa. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 2. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. J. Ethnopharmacol. 39 (1): 77-82.

Carpenter, J.M., Mashima, T.Y. and Rupiper, D.J. 2001. Formulary and Biological/Medical information. Fish . Exotic Animal Formulary. ed 2. Philadelphia: W.B.Saunder company, pp. 1-38.

Chah, K.F., Eze, C.A., Emuelosi, C.E. and Esimone, C.O. 2006. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicine plants. J. Ethnopharmacol. 104:164-167.

Chung, K.T., Z. Lu and M.W. Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology 36 : 1053-1060.

Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonas Septicemias of Fish. Fish disease leaflet 68.

Cowan, M.M.1999. Plant product as antimicrobial agents. Clin. Micro. Rev. 12 (4) : 564-582.

delCorral, F., Shotts, E.B. and Brown,J. 1990. Adherence, haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonas virulent for fish. J. Fish. Dis.13: 255-268.

Direkbusarakom, S., S. Runghomnerdwong, A. Herunasalee and L. Rungpan. 1996. Screening of Thai traditional herbs against shrimp pathogenic bacteria. NICA Technical paper, No. 7.

Direkbusarakom, S., Y. Ezura, M. Yoshimizu and A. Herunsalee. 1997. Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. Proceeding of the international symposium on diseases in marine aquaculture. Hiroshima, 3-6O ctober. 33 (4): 437-441.

Dixon B.A. and Issvoran G. (1993) Antibacterial Drug Resistance in *Aeromonas* spp. Isolated from Domestic Goldfish and Koi from California. The Journal of the World Aquaculture Society 24 (1) :102–104.

Dunn, J.L., Buck, J.D. and Robeck,T.R. 2001. Bacterial Diseases of Cetaceans and Pinnipeds. Marine Mammal Medicine (ed. 2). Dierauf, L.A. and Gulland, F.M.D.(ed.). Boca Raton, Florida: CRC press, pp. 309-328.

Dutta, B.K., I. Rhaman and T.K. Das. 1998. Antifungal activity of indian plant extracts. Mycoses 41 (11-12): 535-536.

Ellis, A.E. 1985. Eosinophilic granular cells (EGC) and histamine responses to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. Dev. Comp. Immunol. 9 (2): 251-60.

Ellis, A.E. 1988. Fish Vaccination. DAFS Marine Laboratory PO Box 101 Victoria Road Aberdeen AB9 8DB. New York: Academic Press.

Ellis, A.E. 2001. The Immunology of Teleosts. In: R.J., Roberts (ed.). Fish pathology. Harcourt Publisher Limited, London, pp. 133-150.

Ellsaesser C. K. and Clem L. W. 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. J. fish biology. 28: 511-521.

Eurell, T.E., Lewis, D.H. and Grumbles, L.C. 1978. Comparison of selected diagnostic tests for the detection of motile Aeromonas septicemia in fish. American Journal of Veterinary Research. 39: 1384-1386.

Ezzat A. A., Shaban M. B. and Farghaly A. M. 1974. Studies on the blood characteristic of *Tilapia Zilli* (Gervais) I. Blood cells. J. Fish biology. 6: 1-12.

Farnsworth, N.R. and N. Bunyapraphatsara. 1992. *Psidium guajava* Linn. Thai medicinalplants : Recommended for primary health care system. Medicinal Plant Information Center. Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Bangkok. pp 202-207.

Gatto, M.T., S. Falcocchio, E. Grippa, G. Mazzanti, L. Battinelli, G. Nicolosi,D. Lambusta and L. Saso. 2002. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-Acyl-Esters. Bioorganic and Medical Chemistry10 : 269 -272.

Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G. and Bartolini, A. 2001. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. Il Farmaco 56: 387–389.

Giner-Chávez, B.I.1996. Condensed tannins in tropical forages. Ph.D.Thesis, Cornell University, New York.

Gnan, S.O. and M.T. Demello. 1999. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. J. Ethnopharmacol. 68 (1-3): 103-108.

Goncalves, J.L.S., Lopes, R.C., Oliveira, D.B., Costa, S.S., Miranda, M.M.F.S., Romanos, M.T.V., Santos, N.S.O. and Wigg, M.D. 2005. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. J. Ethnopharmacol 99 : 403-407.

Grover, I.S. and S. Bala. 1993. Studies on antimutagenic effects of guava (*Psidium guajava*) in *Salmonella typhimurium*. Mutation Reseach. 300 : 1-3.

Gursatej, G and Pankaj, S. 2002. The micronucleus test in urothelial cells of cervix cancer patients. Ind. J. Human Genetics 8 (2): 69-72.

Happaranta, A., Valtonen, E. T. and Hoffmann, R.W. 1997. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. Journal of fish Biology. 50 : 575-591.

Hardig J. and Hoglund L. B. 1983. On accuracy in estimating fish blood variables. *Comp.* Biochem. Physiol. 75A : 35-40.

Harikrishnan R., Nisha Rani M., and Balasundaram C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture 221: 41-50.

Hatha, A.A.M., Vivenkanandan, G., Joice J. and Christol. 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fishes. International Journal of Food Microbiology 98 : 131-134.

Hayashi, K. and Kishimura, H. 2003. Amount of Squalene and Fatty Acid Composition of Triacylglycerols and Phospholipid in flesh and liver lipid of some deep sea teleost fish, Morid cods and whiptails. J. Oleo Sci 53 (7): 339-345.

Hofmann, J., H.H. Fiebig, B.R. Winterhalter, D.P. Berger and Grunicke. 1990. Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by quercetin. International Journal of Cancer 45 (3): 536-539.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., William, S.T. 1994. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: J.G. Holt (ed.). Bergey's manual of

determinative bacteriology. 9th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, pp 190-191.

Hoole, D., Bucke, D., Burgess, P. and Wellby I. 2001. Diseases of Carp and Other Cyprinid Fishes. London: Blackwell Science.

Huguenin, J.E. and Colt, J. 1989. Water Recycling. Design and Operating Guide for aquaculture seawater system, pp167-173.

Huntman, L.C. 1995. In VITRO studies of eosinophilic granule cells of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) small intestine. A Thesis submitted to the Graduate Faculty in Partial Fulfillment of the requirement for the Degree of Master of Science in the Department of Anatomy and Physiology. Faculty of veterinary medicine University of Prince Edward Island.

Huys, G. 2002. Antibiotic Susceptibility Testing of Aquaculture-Associated Bacteria with The Disc Diffusion Method. Standard Operating Procedure. Laboratory of Microbiology K.L. Gent, Belgium, pp 1-10.

Jaiarj, P., P. Khoohaswan, Y. Wongkrajang, P. Peungvicha, P. Suriyawong, M.L.S. Sarayaand O. Ruangsomboon. 1999. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. J. Ethnopharmacol. 67 : 203-212.

Kaneko J. J. 1983. An investigation of a monogenetic trematode infestation of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in seawater. Master's Thesis, University of Hawaii, pp.1-75.

Kennedy, S. and Stoskopf, M.K. 1993. Immunology. In: M.K. Stoskopf (ed.). Fish medicine. Mexico: W.B. Saunder Company, pp.

Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., and Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. J. Ethnopharmacol. 99: 309-312.

Korcock D. E., Houston A. H. and Gray J. D. 1988. Effects of sampling conditions on selected blood variable of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish biology. 33, 319-330.

Kraivaphan, P., Amornchat, C. and T. Triratana. 1992. The effect of *Psidium guajava* and *Ficus religiosa* extracts against oral bacteria. J. Dent. Assoc. Thai. 42, 4 : 176-181.

Luskova V., Svoboda M. and Kolarova J. 2002. The effect of Diazinon on Blood Plasma Biochemistry in Carp (*Cyprinus carpio L.*). ACTA Vet. 71: 117-123.

Lutterodt, G.D. 1989. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of *Psidium guajava* leaf eaxtracts in the treatment of acute diarrheal disease. J. Ethnopharmacol 24 (3): 234-247.

Manning, M., Mughal, S. and McDowall, A. 1989. Responses of young carp, *Cyprinus carpio*, following immunization by direct immersion in vaccine or by injection, *In*: De Pauw, N. *et al.* (Ed.) (1989). Aquaculture: a biotechnology in progress, pp 935-939.

Manosroi, J., Dhumtanom, P., Manosroi, A. 2005. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicine plants on KB and P388 cell lines. Cancer letters. 235 (1): 114-120.

Martin, S., Padilla, E., Ocete, M.A., Galvez, J., Jime´nez, J. and Zarzuelo, A. 1993. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticescens*, Planta Med. 59: 533–536.

Mathews E.S., Warinner J.E. and Weeks B.A. 1990. Assays of immune function in fish macrophages. Techniques in fish immunology. Fair Haven, USA: SOS Publications, pp.155-163.

McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M and Krause, D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminant. Anim. Feed Sci. Technol. 91: 83.

Meckes, M., Calzada, F., Tortoriello, J., Gonzales,J.L. and Martinez, M. 1996. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. Phytotherapy Research 10 : 600-603.

Metodiewa, D., A.K. Jaiswal, N. Cenas, E. Dickancaite and J.S. Aguilar. 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinoneand quinoidal product. Free Radical and Medicine. 26 (1/2): 107-116.

Mila, I., A. Scalbert and D. Expert. 1996. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. Phytochemistry 42 : 1551-1555.

Minnaganti, V., Patel P., Iancu, D., Schoch, P. and Cunha, B. 2000. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care. 29 (4): 306-308.

Morales, M.T. and X. Lozoya. 1994. Calcium-Antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. Planta Medica 60 : 313-317.

Morton, J.F. 1980. Atlas of Medicinal Plants of Middle America (Bahama to Yucatan), Charles C Thomas, Springfield, Illinois, pp. 623-631.

Noga, E.J. 2000. Fish disease diagnosis and treatment. Iowa: Iowa State University press.

Ogara, W.O., Mbuthia, P.G., Kaburia, H.F.A., Sorum, H., Kagunya, D.K., Nduthu, D.I. and Colquhoun, D. 1998. Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss)* mortility in Kenya. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 18 : 7-9.

Oh, W.K., Lee, C.H., Lee, M.S., Bae, E.Y., Sohn, C.B., Oh, H., Kim, B.Y., Ahn, J.S., 2005. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. J. Ethnopharm. 96 (3): 411-415.

Olajide, O.A., Awe, S.O. and Makinde, J.M. 1999. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. Fitoterapia 70 : 25-31.

Osman, A.M., Younes, M.E. and Sheta, A.E. 1974. Triterpenoids of the leaves of *Psidium guajava*. Phytochemistry 13 : 2015-2016.

Palhares, D. and Grisolia, C. K. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. Genet. Mol. Biol. 25(3): 281-284.

Quentel, C., and Obach, A. 1992. The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Journal of Fish Biology 41: 709-716.

Rabe, T. and Staden, J.V. 1997. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. J. Ethnopharm. 56 : 81-87.

Rao G. M. M. 1969. Effect of activity, salinity and temperature on plasma concentrations of rainbow trout. Can. J. Zool. 47: 131-134.

Rauha, J.P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H.Vuorela and P. Vuorela. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology. 56 : 3-12.

Roberts, R.J. and Ellis, A.E. 2001. The Anatomy and Physiology of Teleosts. In: R.J., Roberts (ed.). Fish pathology. London: Harcourt Publisher Limited, pp.12-54.

Roed, K.H., Fevolden, S.E. and Fjalestad, K.T. 2002. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. Aquaculture 209 : 91-101.

Sahoo, P.K., Meher, P.K., Kanta, D.M., Saha, J.N., Jana, R.K. and Reddy, V.G.K. 2004. Immune responses in different fullsib families of Indian major carp, *Labeo rohita*, exhibiting differential resistance to *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture 238 : 115-125.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30 : 1875-3883.

Scott, D.B.C. and Currie, C.E. 1980. Social hierarchy in relation to adrenocortical activity in Xiphophorus neller Heckel. Stress and fish. New York: Academic Press.

Secombes, C.J., Sharp, G.J.E., Jang, S.I., Ashton, I., Novoa, B., Daniels, G. and Hardie, L.J. 1996. Down-regulation of rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) macrophage activity by host-derived molecules. In: J.S. Stolen et al., (ed). Modulators of immune responses. SOS publications, Fair Haven, pp. 93-106.

Shaheen, H.M., Ali, B.H., Alqarawi, A.A. and Bashir, A.K. 2000. Effect of *Psidium guajava* leaves on some aspects of the central nervous system in mice. Phytotherapy Research 14 (2) : 107-111.

Stoskopf, M.K. 1993. Bacterial Disease of Goldfish, Koi, and Carp. In: M.K., Stoskopf (ed.). Fish Medicine. Philadelphia: W.B. Sunders, pp. 473-475.

Takei, M., Umeyama, A. and Arihara, S. 2006. T-cadinol and calamenene induce dendritic cells from human monocytes and drive Th1 polarization. European J. Pharmacology 537: 190–199.

Thrall, M.A., Balcer, D.C., Campbell, T.W., Denicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A. and Weiser, G. 2004. Clinical Chemistry of Fish and Amphibians.

Veterinary hematology and clinical chemistry. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 499-503.

Thuvander, A., Norrgren, L. and Fossum, C. 1987. Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri (*Richardson) Characterized by flow cytometry and electron microscopy. J. fish. Biol. 31: 197-208.

Tona, L. K. Kambu, N. Ngimbi, K. Cimanga and A.J. Vlietinck. 1998. Antiamoebic andphytochemical screening of some Congolese medicinal plants. Journal of Ethnopharmacol. 61 : 57-65.

Treves-Brown, K.M. 2000. Applied fish Pharmacology. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Voigt, G.L. 2000. Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians. Blackwell Publishing.

Waagbo R., Sandnes K., Espelid S. and Lie O. 1988. Haematological and biochemical analyses of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, suffering from cold water vibriosis (Hitra disease). J. Fish Disease. 11 : 417-423.

Wangsomnuk, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Chitramvong, Y.P. 1997. Histology changes of organs in the respiratory, reproductive, nervous and digestive system of Indoplanorbis exustus after the application of niclosamide and Brassaia actinophylla. Journal of Science Society Thailand. 23: 284-296.

Weeks-Perkins, B.A., Chansue, N. and Wong-Verelle, D. 1995.Assays of Immune Function in Shrimp Phagocytes: Techniques Used As Indicators of Pesticide Exposure.Techniques. In: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zelikoff, S.L. Kaattari, R.S. Anderson, K. Soderhall, and B.A. Weeks-Perkin (eds.). Fish Immunology. Fish Immnunology Technical Communiaction 4. Fair Haven, USA: SOS Publications, pp. 223-232.

Wie, L., Li, Z. and Chen, B. 2000. Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *Psidium guajava*. Chinese Journal Integrated Traditional and Western Medicine. 20 : 893-895.

Yambot, A.V. and Inglis, V. 1994. *Aeromonas hydrophila* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) with "Eye Disease". International Symposium on

Aquatic Animal Health, Seattle, WA (USA), 4-8 September 1994. University of Califonia, School of Veterinary Medicine, Davis, CA. p.103.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

1. กายวิภาค และจุลกายวิภาคของอวัยวะต่าง ๆ ในปลาคาร์พ

ลักษณะทางกายวิภาค และจุลกายวิภาคเป็นสิ่งที่สำคัญในการนำมาใช้ประเมินสภาพความเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ หรือการเกิดพยาธิสภาพในปลาได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อ หรือความเป็นพิษของสารต่างๆ ทั้งในแบบเฉียบพลัน และเรื้อรัง ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะอวัยวะที่น่าสนใจในปลากระดูกแข็งซึ่งมีความแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ดังนี้

เหงือก (Gills)

ปลากระดูกแข็งทั่วไปจะมีซี่กระดูกเหงือก (gill arches) 4 คู่ แต่ละซี่กระดูกเหงือกจะประกอบด้วยแกนเหงือก (hemibranchs) 2 เส้นที่เป็นตัวยึดกับเส้นเหงือกปฐมภูมิ (primary lamellae) ในแต่ละด้านของเส้นเหงือกปฐมภูมิ ประกอบด้วยเส้นเหงือกทุติยภูมิ (secondary lamella) จำนวนมากมาย ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซ และคัดหลั่งสารต่างๆ มีลักษณะเป็นเยื่อบุรูปครึ่งวงกลม ยื่นออกมาทางด้านบนและด้านล่างซึ่งจะตั้งฉากกับเส้นเหงือกปฐมภูมิ (Bowser, 1999)

เยื่อบุเซลล์ที่เหงือกประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิดหลักคือ pavement cell ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเป็น stratified squamous epithelium เรียงตัวเป็น fingerprint-like micro-ridgesบนเส้นเหงือกปฐมภูมิ chloride cell หรือ salt-secreting cell อยู่ตรงฐานของ เส้นเหงือกทุติยภูมิ และ mucous cell ซึ่งเป็นเซลล์หลักที่ช่วยในการขับเมือก นอกจากนี้อาจพบเซลล์อื่นๆได้บ้าง เซลล์เหล่านั้นได้แก่ neuroepithelial cell, granular cell, taste bud, rodlet cell เป็นต้น

เยื่อบุเหงือกที่ปกคลุม secondary lamellae เรียงตัวอยู่บน basement membraneโดยมี pillar cell ค้ำจุน ระหว่าง pillar cell มีช่องว่างเรียกว่า lacunae เป็นทางผ่านของ afferent และ efferent arterioles ช่องว่างนี้สามารถยืดหดได้เป็นผลมาจากการหดตัวได้ของ pillar cell เพื่อช่วยในการควบคุมปริมาณกระแสโลหิตที่ไหลผ่าน โดยเส้นเลือดฝอยจะทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนสูงกับเลือดดำที่มีปริมาณก๊าซออกซิเจนต่ำ ซึ่งเรียกลักษณะการแลกเปลี่ยนนี้ว่า counter current (Roberts and Ellis, 2001)

ไต (kidneys)

ในปลาคาร์พไตมีลักษณะแบ่งเป็นสองตอนอย่างชัดเจน (two unique organ) ต่างจากปลากลุ่มแซลมอน วางตัวทอดยาวจากด้านต้นถึงด้านท้ายของด้านบนกระเพาะลม (swim bladder) โดยไตส่วนต้น (Anterior หรือ head kidney) จะทำหน้าที่หลักในการเป็นอวัยวะสร้างเลือด (Hematopoietic) และต่อมไร้ท่อ (endocrine organ) ส่วนไตส่วนท้าย (posterior kidney) จะทำหน้าที่ควบคุมสมดุลน้ำและแร่ธาตุ (osmoregulatory) และอวัยวะขับถ่ายสาร (excretory) อย่างไรก็ตามหน้าที่หลักในการกำจัดของเสียจำพวกไนโตรเจนในปลา ไม่ได้อยู่ที่ไต แต่เป็นหน้าที่หลักของเหงือก (Bowser, 1999)

ท่อหน่วยไตของปลาคาร์พ ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดประกอบด้วย glomerulus, open neck segment และ proximal convoluted tubule ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ distal convoluted tubule และ initial collecting tubule น้ำปัสสาวะจะถูกสร้างขึ้นภายใน glomerulus โดยการกรองจากเส้นเลือดแดงผ่านมายัง convoluted tubule ซึ่งจะช่วยดูดซึมเกลือและสารอื่นๆที่เป็นประโยชน์กลับสู่เส้นเลือด โดยจะมีส่วนของ glomerulus จำนวนมาก และมีขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับปลาทะเล ถ้าไตของปลาเกิดความเสียหายทำงานไม่ได้ ปลาจะมีลักษณะพองกลมเหมือนลูกบอลลูน เนื่องจากมีการสะสมน้ำอยู่ภายในร่างกายมากเกินไป เรียกสภาวะนี้ว่า Dropsy (Roberts and Ellis, 2001)

Corpuscle of Stannius

อวัยวะที่ชื่อ corpuscles of stannius เป็นกลุ่มของ eocinophillic cells พบที่พื้นผิวไตส่วนด้านข้างและท้าย (latero-ventral surface) มีอยู่เป็นคู่ ทำหน้าที่สร้างและหลั่ง hypocalcin (telocalcin) ซึ่งเป็น hypocalcemic hormone ที่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการลด Ca^{2+} uptake บริเวณเหงือก และ ลำไส้ ทำงานร่วมกับ Calcitonin ในการควบคุมเมตาบอลิซึมของแคลเซียม ซึ่งเปรียบได้ว่า corpuscles of stannius เป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่เดียวกับต่อมพาราไทรอยด์ (ซึ่งไม่มีในปลา) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (Bowser, 1999) โดยฮอร์โมนจะกระตุ้นการดูดกลับของแคลเซียมที่เหงือก (Hoole *at al.*, 2001)

Ultimobranchial Gland

ต่อมชนิดนี้เป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ ที่วางตัวเรียงอยู่ตรงกลางของเยื่อกั้นระหว่างหัวใจ และช่องท้อง โดย Ultimobranchial Gland จะทำหน้าที่หลั่งฮอร์โมน Calcitonin ขณะที่แคลเซียมในซีรั่มมีความเข้มข้นต่ำกว่าที่ร่างกายขณะนั้นต้องการ โดยทำงานร่วมกับฮอร์โมน hypocalcin (Bowser, 1999)

Interrenal Cells

เซลล์ชนิดนี้พบที่ไตส่วนต้น โดยทำหน้าที่เหมือนต่อมหมวกไต (adrenal gland) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เนื่องจากในปลาคาร์พ และปลาส่วนใหญ่ไม่มีต่อมหมวกไต เซลล์มีลักษณะเป็นสีส้มแดงจางๆ (pale eosinophilic cell) กระจายอยู่ในส่วนอวัยวะสร้างเม็ดเลือด ใกล้หลอดเลือดใหญ่ในไตส่วนต้น ทำหน้าที่ในการหลั่งฮอร์โมน Glucocorticoid และ mineralocorticoid (Bowser, 1999) การเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนอาจสามารถบ่งบอกภาวะโรคที่รุนแรงในปลาคาร์พ (Hoole *et al.*, 2001)

Chromaffin Cells

เซลล์ชนิดนี้ในปลาเทียบเท่าได้กับ ต่อมหมวกไตชั้นในของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ซึ่งพบในบริเวณใกล้กับเนื้อเยื่อของ Interrenal Cells ใกล้หลอดเลือดใหญ่ในไตส่วนต้น โดยชื่อของเซลล์มาจากการทำหน้าที่ซึ่งมีสัมพันธภาพ (affinity) กับเกลือโคลแมต (Chromate salts) ดังนั้น การย้อมสี Potassium dichromate จะสามารถแสดงให้เห็นแกรนูลของเซลล์ที่ติดสีน้ำตาล และแยกได้จาก interrenal cells ได้อย่างชัดเจน เซลล์ชนิดนี้ทำหน้าที่ในการหลั่ง adrenalin และ noradrenalin (Bowser, 1999)

ต่อมไทรอยด์ (Thyroid Gland)

ลักษณะของไทรอยด์ฟอลลิเคิล (thyroid follicle) ในปลา มีลักษณะใกล้เคียงกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โดยพบที่ตำแหน่งคอหอย (pharyngeal region) และทางเดินอาหารส่วนต้น ทำหน้าที่ในการสร้าง growth hormone (Hoole *et al.*, 2001)

ต่อมไร้ท่อของตับอ่อน (Endocrine Pancreas)

ต่อมไร้ท่อของตับอ่อนพบอยู่ที่บริเวณ Islets of Langerhans และพบร่วมกันเสมอกับต่อมมีท่อของตับอ่อน (Exocrine Pancreas) ซึ่งอยู่ติดกัน โดยจะเห็นเป็นหย่อมกระจายอยู่ตามเยื่อยึดลำไส้ (mesenteries) ใกล้กับลำไส้เล็กของปลา (Bowser, 1999)

ระบบย่อยอาหาร (Digestive system)

ปลาคาร์พเป็นปลาในกลุ่มกินพืช (herbivore) ซึ่งมีทางเดินอาหารยาวกว่าในปลากินเนื้อ (carnivore) อื่นๆ กระเพาะอาหารในปลาคาร์พมีลักษณะตรง แบ่งสัดส่วนได้ยากทางมหกายวิภาค เพื่อให้อาหารผ่านจากคอหอยไปที่กระเพาะและลำไส้อย่างรวดเร็ว (Hoole *et al.*, 2001) ลักษณะลำไส้ของปลาไม่สามารถแยกส่วนที่เป็นลำไส้ใหญ่ (colon) และหน้าที่ของลำไส้ของปลายังเป็นทั้งระบบย่อยอาหารและดูดซึมอาหาร (Bowser, 1999)

ตับ (liver)

ตับปลาคาร์พจะเป็นแบบ Compound organ ที่สามารถพบต่อมมีท่อของตับอ่อนได้ จึงเรียกว่า hepatopancreas ตับในปลาคาร์พเป็นสีน้ำตาลอ่อนชมพู (brown pink) (Hoole *et al.*, 2001)

หัวใจ (Heart)

ปลามีห้องหัวใจ 2 ห้อง ประกอบด้วยหัวใจห้องบน (atrium) และหัวใจห้องล่าง (ventricle) อย่างละ 1 ห้อง เลือดจะนำเข้าสู่ช่อง sinus venosus ก่อนนำเข้าสู่หัวในห้องบน และเมื่อเลือดได้ปั้มออกจากหัวใจห้องล่างจะต้องผ่านช่อง bulbus arteriosus จึงกล่าวได้ว่าปลามีช่องหัวใจ 4 ช่อง โดยส่วนของ bulbus arteriosus เนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะไม่ใช่กล้ามเนื้ออย่างช่องอื่น แต่จะเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Bowser, 1999)

เส้นข้างตัว (lateral line system)

เส้นข้างตัวจัดเป็นระบบประสาทรับสัมผัสพิเศษในปลา ซึ่งมีความไวรับต่อการเปลี่ยนแปลงความดันน้ำ (hydrostatic stimuli) และเสียง (Bowser, 1999) หน่วยรับความรู้สึกสั่นสะเทือนพื้นฐานภายใน lateral line เรียกว่า neuromast ซึ่งประกอบด้วย sensory hair cell ซึ่งเป็น sensory cell ชนิดเดียวกับในหูของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปและคลุมด้วย copula อีกชั้น แต่ละอันจะอยู่เป็นอิสระบริเวณ lateral line เส้นประสาทที่มาหล่อเลี้ยง ได้แก่ เส้นประสาทสมองคู่ที่ 7, 8, 9 และ 10 และส่วนของ medulla oblongata โดยทางส่วนบนจะรับคลื่นความสั่นสะเทือนจากส่วนหัวและทางด้านล่างจะรับจากส่วนลำตัว (Roberts and Ellis, 2001)

ผิวหนัง (Skin)

ผิวหนังของปลาไม่มีส่วนของเคราติน (keratinized skin) เซลล์ส่วนที่อยู่ชั้นบนสุดที่มีชีวิตจะคลุมทับด้วย cuticle ที่มาจากเมือก mucopolysaccharides อิมมูนโนโกลบูลิน และกรดไขมันอิสระ ผิวหนังชั้นนอก (epidermis) ประกอบด้วยเซลล์ stratified squamous cells ซึ่งมีความหนา 4-20 ชั้น ส่วนผิวหนังชั้นใน (dermis) ซึ่งอยู่ถัดมาจากชั้นนอกจะเป็นตำแหน่งของเซลล์เม็ดสี (melanophores, xanthophores, iridophores) เกล็ดมีต้นกำเนิดมาจากผิวหนังชั้นในที่มีการเกาะของแคลเซียมทำให้แข็ง (calcified) จัดเรียงแบบเลื่อมต่อกัน (overlapping) เพื่อปกป้องผิวหนังชั้นนอก

ผิวหนังปลามีหน้าที่ที่สำคัญในการควบคุมแรงดันออสโมติก และเป็นด่านแรกที่ปกป้องร่างกายต่อการติดเชื้อต่างๆ ซึ่งในชั้นผิวหนังมีระบบภูมิคุ้มกันที่ประกอบด้วย เม็ดเลือดขาว

(leukocytes) และ macrophages รวมทั้งอิมมูนโนโกลบูลิน (Bowser, 1999) ซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อการศึกษาทางระบบภูมิคุ้มกันในปลา

2. ระบบภูมิคุ้มกันในปลา

2.1 อวัยวะที่เกี่ยวข้องและการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกันในปลากระดูกแข็งคล้ายคลึงกับสัตว์เลือดอุ่นทั่วไปในบางส่วน คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ (มีเฉพาะในสัตว์มีกระดูกสันหลังเท่านั้น) แต่เนื่องจากปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังขั้นต่ำ ระบบภูมิคุ้มกันจึงแตกต่างไปจากสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง myeloid tissue และ lymphoid tissue ไม่ได้แยกจากกันอย่างสมบูรณ์ คงรวมกันอยู่ในรูปของ lymphomyeloid tissue ปลาไม่มี bone marrow และ lymphnode อย่างไรก็ดี ปลามีเนื้อเยื่อตับไตที่เป็น lymphomyeloid tissue ซึ่งเป็นแหล่งสร้าง phagocytic cell โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น phagocyte ในปลา ได้แก่ neutrophil และ monocyte (Hoole *et al.*, 2001) neutrophil และ monocuyte เป็น phagocyte ที่พบอยู่ในกระแสเลือดสร้างและผลิตจาก myeloid tissue ส่วน macrophage เป็น phagocyte ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก monocyte ในกระแสเลือดและเคลื่อนตัวออกมาอยู่ในเนื้อเยื่อ (Kennedy and Stoskopt, 1993)

อวัยวะสร้างเม็ดเลือดขาวที่เป็นตัวทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ (cellular immune response) แบบไม่จำเพาะในปลา ได้แก่ ต่อมไธมัส พบอยู่ในบริเวณผนังด้านบนส่วนปลายของคอหอย บริเวณช่องกระพุ้งแก้มใกล้โคนครีบหู ประกอบด้วยเซลล์ lymphocyte ที่กำลังพัฒนาจำนวนมาก ไตส่วนหน้าประกอบด้วย haemopoietic tissue ที่มีเซลล์ lymphocyte, macrophage และ plasma cell ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการสร้างแอนติบอดี และม้ามประกอบด้วยหลอดเลือดขนาดเล็ก (ellipsoid) ที่มี reticular fiber จำนวนมาก และ macrophage มีหน้าที่สำคัญในการทำลายเม็ดเลือดแดง และเก็บสะสมเหล็กเพื่อนำกลับไปสร้างเม็ดเลือด ดังนั้นจึงเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันน้อยกว่าไทมัส และไตส่วนหน้า รวมทั้งบางส่วนของตับ โดยมี melanomacrophage center เป็นแหล่งรวมการสังเคราะห์ ในแต่ละอวัยวะ มีเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ reticular cell, lymphocyte, macrophages และ plasma cell เซลล์เหล่านี้จะมีหน้าที่แตกต่างกันไป เซลล์ที่มีหน้าที่กินทำลายสิ่งแปลกปลอม คือ phagocyte โดยร้อยละ 96 ของเซลล์ในไตส่วนต้นเป็นเม็ดเลือดขาว (Quetel and Obach, 1992)

ไตของปลามีลักษณะเป็นคู่ยาวเรียงตัวเหนือช่องว่างในลำตัว ทางด้านล่างของกระดูกสันหลังอยู่นอกเยื่อบุช่องท้อง มีสีน้ำตาลปนแดง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ไตส่วนต้น

(anterior kidney) และไตส่วนท้าย (posterior kidney) ไตส่วนต้นเป็นส่วนที่มีหน้าที่ ในการสร้างเม็ดเลือดขาว โดยที่ไตส่วนท้ายจะทำหน้าที่หลักในการกรองของเสียและปรับสมดุลน้ำในร่างกาย (Ellis, 2001)

การพัฒนาของอวัยวะน้ำเหลืองในปลา พิจาณาจากการพบเซลล์ lymphocyte ในอวัยวะดังกล่าว พบว่าในปลาส่วนใหญ่มีการพัฒนาของต่อมไธมัสเป็นอวัยวะแรก อวัยวะถัดมาคือไตส่วนหน้า และม้ามตามลำดับ ซึ่งการพัฒนาของต่อมไธมัส และไตส่วนหน้าจะมีความสัมพันธ์กับขนาดน้ำหนักมากกว่าอายุ และมีความแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด (Ellis, 2001) ในปลา Atlantic salmon ที่อุณหภูมิน้ำ 4-7 องศาเซลเซียส จะเริ่มมีการพัฒนาของต่อมไธมัส และไตส่วนหน้า เมื่ออายุ 22 และ 14 วันหลังจากการฟักตามลำดับ ในปลา rainbow trout ที่อุณหภูมิน้ำ 14 องศาเซลเซียส เมื่ออายุ 3-5 และ 5-6 วันหลังจากการฟักตามลำดับ ในปลาไนที่อุณหภูมิน้ำ 22 องศาเซลเซียส เมื่ออายุ 5 (0.5-0.6 เซนติเมตร) และ 7-8 (0.8-0.9 เซนติเมตร) วันหลังจากการฟักตามลำดับ (Ellis, 1988) ถึงแม้จะมีการพัฒนาของอวัยวะดังกล่าวแล้วก็ตามแต่ปลาก็ไม่สามารถสร้างแอนติบอดี เพื่อมากำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ เนื่องจากมีเซลล์ B-lymphocyte ที่เจริญไม่เต็มที่ คือ เป็น B-lymphocyte ที่ขาดอิมมูโนโกลบุลินที่ผิวเซลล์ (surface immunoglobulin) ซึ่งในปลา Atlantic salmon จะพบเซลล์ B-lymphocyte ที่เจริญเต็มที่เมื่ออายุ 48 วัน และในปลาคาร์พเมื่ออายุ 14 วัน (Ellis, 1988)

2.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ที่เข้าสู่ร่างกายเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การตอบสนองแบบไม่จำเพาะ และการตอบสนองแบบจำเพาะ

2.2.1 กลไกระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific defence mechanisms) การตอบสนองแบบไม่จำเพาะเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการทำงานของเซลล์พวก polymorphonuclear cell และ macrophage เพื่อทำการจับ (phagocytosis) ย่อยสลายด้วยเอนไซม์และขบวนการอื่นๆ ในเซลล์ แล้วจึงปล่อยส่วนที่ถูกทำลายออกนอกเซลล์ การ phagocytosis จะทำได้ดีเมื่อมีความช่วยเหลือของแอนติบอดี และคอมพลีเมนต์ (complement) การ phagocytosis เป็นขบวนการแรกที่ช่วยป้องกันสิ่งแปลกปลอมไม่ให้เข้าสู่ตัวปลา และในระยะที่ระบบภูมิคุ้มกันยังพัฒนาไม่เต็มที่ (Manning *et al.*, 1989) ซึ่งประกอบด้วยกลไกการทำงานโดยละเอียด ดังนี้

ก. อวัยวะของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่พื้นผิว (Surface barriers)

เมือก (Mucus) : ในระบบห่อหุ้มร่างกายของปลา (ผิวหนัง เหงือก และลำไส้) จะถูกปกคลุมด้วย ชั้นของเมือก ซึ่งจะช่วยดักจับเชื้อโรคแล้วทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ การสร้างเมือกนี้สามารถเพิ่มการตอบสนองต่อการติดเชื้อหรือการเกิดการระคายเคืองได้

ผิวหนัง (Skin) : ผิวหนังของปลาแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ คือผิวหนังชั้นนอก (epidermis) จะประกอบด้วยเซลล์ non-keratinized เพื่อช่วยในการควบคุมสมดุลสารน้ำ และกำจัดเชื้อจุลชีพจากการตอบสนองของ non-specific immune โดยการหนาตัวขึ้นของคิวติเคิล (cuticle) หรือการแบ่งตัวมากขึ้นของเซลล์มัลพิเกียล (malpighian cell) ส่วนการหายของแผลก็สามารถทำได้อย่างรวดเร็วแม้ขณะอุณหภูมิต่ำ เพราะอาศัย เซลล์มัลพิเกียลจากด้านข้างของบาดแผล

เหงือก (Gills) : บริเวณผิวของเหงือกมีความบอบบาง และง่ายต่อการเข้ามาของเชื้อโรค เหงือกจึงถูกป้องกันโดยมีการสร้างเมือกมาปกคลุมและมีการตอบสนองของเซลล์เยื่อบุมาก เช่น หนาตัวขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ นอกจากนี้เหงือกยังมี phagocytic cells ที่ผนังของ branchial capillaries

ทางเดินอาหาร (Gastrointestinal tract) : เยื่อบุในทางเดินอาหารจะมีเยื่อบุผนังด้านใน (mucous membrane) คล้ายกับที่ผิวหนัง นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยผลของการหลั่งกรดจากกระเพาะและเอนไซม์จากทางเดินอาหารและน้ำดีได้

ข. ปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์แบบไม่จำเพาะ (Non-specific cellular factors)

Phagocyte : มีเซลล์ 2 ชนิดที่จำเพาะว่าเป็นเซลล์ลักษณะนี้ คือ

Macrophage/Monocyte : Macrophage พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อ รวมทั้งเหงือกและช่องว่างในลำตัว แต่มักจะพบเป็น reticuloendothelial cells ในไตและม้าม (ปลาบางชนิดสามารถพบได้ใน atrium ของหัวใจ) ไม่พบที่ตับ ส่วน Monocyte จะพบในไต และพบเล็กน้อยในเลือด

Macrophage ในปลามักมี melanosome ภายใน lysosome จึงเรียกว่า melanomacrophage centre (MMC) โดยที่ melanin จะช่วยในกลไกกำจัดแบคทีเรียได้ เมื่อจำแนกหน้าที่ของ macrophage แล้ว พบว่ามีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อได้คือ phagocytosis, chemotaxis, การทำลายโดยอาศัย Respiratory burst และสร้าง nitric oxide, สร้าง IL-1, นำเสนอแอนติเจน และทำให้เกิด free radical ในรายที่เชื้อถูกกำจัดออกได้ยาก macrophage จะเปลี่ยนเป็น epitheloid cell หรือ giant cell เพื่อทำงานต่อไป

Neutrophil : มีลักษณะคล้ายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยในปลาจะมี myeloperoxidase ใน cytoplasmic granule ซึ่งพบได้ในไตม้าม เลือด และบริเวณที่เกิดการอักเสบ กลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อคือ phagocytosis และ chemotaxis

ผลการทำงานของ phagocyte ทั้ง 2 ชนิดจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อมี

Opsonin: จะช่วยให้เกิดการจับกินได้แบบไม่จำเพาะเช่นเดียวกับคอมพลีเมนต์ หรือแบบจำเพาะเช่นเดียวกับแอนติบอดี ในปลา แอนติบอดีจะแสดงผลทาง opsonize ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับคอมพลีเมนต์ที่ผลมาจาก Classical complement pathway

Lymphokine หรือ macrophage activating factor (MAF) : สามารถเพิ่มปริมาณ superoxide anion ผ่านทาง Respiratory burst ทำให้ macrophage ฆ่าเชื้อเช่น *Aeromonas salmonicida* และ *Renibacterium salmoninarum* ได้ Lymphokine สร้างจาก T-lymphocyte คล้ายกับ INF-γ

ค. ปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันชนิดของเหลวแบบไม่จำเพาะ (Non-specific humoral factors)

ภูมิคุ้มกันชนิดของเหลวแบบไม่จำเพาะ มีผลตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอม หรือเชื้อโรคได้ 4 รูปแบบ คือ

แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Growth inhibitors) โดยแย่งจับสารอาหารที่สำคัญต่อเชื้อ ได้แก่

- *ทรานเฟอริน (Transferrin)* เป็นโปรตีนที่พบในซีรั่ม ซึ่งสามารถจับได้สูงกับธาตุเหล็กที่เป็นสารสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้มีผลต่อการแย่งจับกับแบคทีเรียและรา

- *อินเตอร์ฟีรอน (Interferon)* จะพบหลังจากเกิดการติดเชื้อไวรัส และขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ กลไกของโปรตีนชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด

แบบยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อ (Enzyme inhibitors) เช่น antiproteases พบได้ในของเหลวจากเนื้อเยื่อหรือซีรั่ม

แบบใช้เอนไซม์สลายเชื้อ (Lysins) เป็นเอนไซม์จากร่างกายที่มีผลในเกิดการสลาย (lysis) ของเชื้อ ได้แก่

- คอมพลีเมนต์ (Complement) จะมีผลทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ พบมากในของเหลวในเนื้อเยื่อและซีรั่ม และพบได้บ้างในสารคัดหลั่งที่เป็นเมือก คอมพลีเมนต์มีกลไกการทำงาน 2 กลไก คือ กลไกปกติ (Classical pathway) ซึ่งต้องใช้แอนติบอดีที่จะไปมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายนั้น และกลไกพิเศษ (Alternative pathway) ที่มีผลเมื่อถูกการกระตุ้นอย่างไม่จำเพาะจาก endotoxin หรือ inulin จากเชื้อ ทำให้มีผลกระตุ้น properdin อันจะไปกระตุ้นคอมพลีเมนต์อีกต่อหนึ่ง นอกจากนี้คอมพลีเมนต์ยังถูกกระตุ้นการทำงานได้จาก C-reactive protein ได้ด้วย

- ไลโซไซม์ (Lysozyme) พบได้ใน phagocytic cells ซีรั่ม เมือก และรังไข่ ผลการทำลายจะขึ้นอยู่กับการมี peptidoglycan ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อ โดยมีผลมากกว่าในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง และสามารถฆ่าเชื้อได้หลายชนิด

แบบใช้การจับและตกตะกอนของเชื้อ (Precipitins and agglutinins) โดยใช้

- ซี-รีเอกชั่นโปรตีน (C-reactive protein ;CRP) พบในซีรั่มและไข่ ใช้จับที่ phosphoryl choline ที่อยู่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย รา และพยาธิตัวกลม โดยการจับจะอาศัยแคลเซียมไอออนเข้าช่วย นอกจากนี้ CRP สามารถกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์และออปโซไนซ์ได้ด้วย

- เลกติน (Lectins) พบในซีรั่ม เมือก และรังไข่ ใช้จับโดยตรงต่อน้ำตาล (*Ellis*, 2001)

ง. เซลล์ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ ชนิด Eosinophil, Basophil **และ** Mast cell

ในบางตำราจัดเซลล์เหล่านี้รวมกับการตอบสนองเช่นเดียวกันกับ Neutrophil (Secombes *et al.*,1996) ปลาบางชนิดมี eosinophilic granular cells (EGCs) ซึ่งคล้ายกับ Mucosal Mast cell ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิวหนัง หรือเหงือก หรือเยื่อบุทางเดินอาหาร นอกจากนี้ Mast cell ในปลายังขาด histamine ดังนั้น

serotonin (อยู่ในกลุ่ม vasoactive amine) จึงมีบทบาทมากกว่า โดยเมื่อมีการแตกออกของ Mast cell จากผลของ CRP หรือคอมพลีเมนต์แล้ว ก็จะมีการหลั่งของสารกลุ่ม vasoactive amine นี้แบบไวจำเพาะต่อ IgE หรือแบบไม่ไวจำเพาะต่อ C3 และ C5a ของคอมพลีเมนต์ หรือเอนไซม์อื่นๆ ออกมา แต่เนื่องด้วยปลาไม่มี IgE จึงทำให้พบปลาที่เกิด anaphylaxis ได้น้อยมาก อย่างไรก็ตามผลจาก EGC นั้น ก็สามารถทำให้เกิดการตอบสนองของเส้นเลือด และมีอาการแพ้ที่ผิวหนังได้สักครู่หนึ่ง (Ellis, 2001)

2.2.2 **กลไกระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ** (Specific defence mechanisms) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) หรือ อิมมูโนเจน (immunogen) โดยการทำงานประสานกันระหว่างเซลล์ macrophage, T-lymphocyte และ B-lymphocyte มักเรียกว่า Immunocompetent cell กลไกในระบบนี้ประกอบด้วย 3 กลไก คือ หนึ่ง การตอบสนองทางด้านการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ (humoral immunity) เป็นการตอบสนองที่ใช้แอนติบอดีจำเพาะ (Ig)ในการกำจัดแอนติเจน โดยการทำงานของเซลล์ B-lymphocyte และ plasma cell กลไกที่สอง การตอบสนองทางด้านเซลล์ (cell-mediated immunity; CMI) เป็นการตอบสนองของ T-lymphocyte ร่วมกับเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น activated macrophage และ natural killer cell เพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดแอนติเจน และกลไกการตอบสนองจากการจดจำ (Immunological memory) เพื่อใช้ตอบสนองได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะต่อเชื้อหากเกิดการติดเชื้อนั้นซ้ำอีก ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ก. การตอบสนองทางด้านเซลล์แบบจำเพาะ (CMI)

เซลล์หลักที่ทำหน้าที่คือ lymphocyte ซึ่งพบได้ในกระแสเลือด อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organs) และเนื้อเยื่อ อวัยวะน้ำเหลืองหลักในปลาได้แก่ ต่อมไทมัส ไต และม้าม และสามารถพบได้ที่ ผิวหนัง เหงือก และทางเดินอาหาร ส่วนตำแหน่งที่พบนั้น ใน B-lymphocyte และ plasma cell จะพบอยู่ที่เนื้อเยื่อและชั้น lamina propria แต่ T-lymphocyte จะพบอยู่ที่ชั้น epithelium ส่วนหากพบการเพิ่มขึ้นมากของ lymphocyte ที่นอกจากจะเป็นผลมาจากเกิดการติดเชื้อหรือการระคายเคืองแล้ว ยังสามารถใช้บ่งบอกอายุของปลาได้ เช่น ปลา rainbow trout ที่โตเต็มที่จะมีปริมาณของ lymphocyte มากกว่าตัวที่ยังเล็กอยู่และมีผลสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนของปลาด้วย

ไทมัส (Thymus) คล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีลักษณะเป็นคู่ ภายในมี lymphocyte ในหลายๆ ระยะเป็นส่วนใหญ่ และพบ macrophage ด้วยบ้าง หน้าที่ของต่อมไทมัสในปลาจะเป็น lymphoid organ แรกๆ ที่สำคัญในการสร้างแอนติบอดีอย่างต่อเนื่องในช่วงที่โตแล้ว และยังเป็นอวัยวะหลักที่สร้าง lymphocyte ส่งไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ อีกด้วย

ไต (Kidney) มีหน้าที่คล้ายกับในต่อมน้ำเหลืองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และจะมีการพัฒนาให้สมบูรณ์ไปตามอายุ การสร้าง lymphoid cells จะพบอยู่ในเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือดแดง และจะมีการสร้างเป็นแอนติบอดีออกมาหลังจากมีการกระตุ้นของแอนติเจน และปริมาณที่สร้างได้ก็จะมากกว่าการสร้างในม้าม

ม้าม (Spleen) มีการสร้างแอนติบอดีได้เช่นเดียวกับไต แล้วเกิดเป็น melanomacrophage centre (MMC) ซึ่งคาดกันว่า MMC นี้ เป็นจุดเริ่มต้นของ germinal centres ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง

ในการจับกับแอนติเจนของแอนติบอดีนั้น ในปลาซึ่งไม่มี germinal centers แต่จะใช้ anamnestic responses ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ immune memory มาช่วยในกลไก อย่างไรก็ตามแอนติบอดีจะเกิดได้ก็ต่อเมื่อมี reticulin fibers ที่อยู่ภายใน macrophage ellipsoids และ MMC ที่อยู่ที่ผิวของ macrophage เป็นตัวดักจับแอนติเจนไว้ก่อน แล้วจึงมีกระบวนการทางภูมิคุ้มกันตามมาคล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Ellis, 2001) สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response ในปลา rainbow trout และปลาคาร์พจะทำหน้าที่ได้ดีในช่วงอายุ 2-4 สัปดาห์หลังจากฟักออกจากไข่ (Ellis, 1988)

ข. การตอบสนองทางด้านการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ หรืออิมมูนโนโกลบูลิน (Immunoglobulin ; Ig)

แอนติบอดีหรือ Ig เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ในปลาจะมีเพียงไอโซไทป์เดียว คือ IgM แอนติบอดีจะพบได้ที่เมือกซึ่งถูกหลั่งออกมาที่ผิวหนัง ในทางเดินอาหาร หรือน้ำดี นอกจากนี้ในปลาบางชนิดยังสามารถพบได้ในไข่ แสดงว่าสามารถเกิดการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูกได้ และคุณสมบัติทางเคมีของแอนติบอดีก็อาจแตกต่างกันไปได้ตามปลาแต่ละชนิด แอนติบอดีสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้โดย

Neutralization เกิดได้ดี และเป็นกลไกที่สำคัญมากเมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัสหรือได้รับพิษของเชื้อแบคทีเรีย

Complement activation เกิดโดยผ่านทาง Classical pathway คล้ายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Opsonization ในปลาจะมีการใช้แอนติบอดีจับกับเชื้อจำนวนหนึ่งเมื่อไม่มีคอมพลีเมนต์ เพื่อเป็นการกระตุ้นให้ phagocyte ทำงาน ดังนั้นแอนติบอดีในปลาจึงทำหน้าที่เป็น opsonin อย่างหนึ่ง

Hypersensitivity responses แม้ว่าในปลาจะไม่มี IgE และที่ EGC (Mast cell) ก็ไม่มี histamine แต่ความไวต่อการตอบสนองของผิวหนังก็ยังสามารถเกิดได้ โดยใช้ C-reactive protein และ C3a และ C5a เข้ามาช่วย (Ellis, 2001)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ต่อแอนติเจนพบว่าในปลาต่างชนิดจะมีระยะเวลาในการพัฒนาที่แตกต่างกันไป เช่นในปลา rainbow trout ที่ 4-6 องศาเซลเซียส ปลาจะสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ไม่ต้องอาศัยไธมัส เมื่ออายุ 4 สัปดาห์หลังจากการฟัก (น้ำหนัก 0.11-0.15 กรัม) และสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องอาศัยไธมัส เมื่ออายุ 8 สัปดาห์หลังจากการฟัก (น้ำหนัก 0.22-0.28 กรัม) และเกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดเดิมได้ดีขึ้นเมื่อได้รับแอนติเจนชนิดเดิมอีกครั้งหนึ่ง ส่วนในปลาคาร์พ พบว่าการตอบสนองแบบ humoral immune response ที่ 18-22 องศาเซลเซียส ต่อแอนติเจนที่ไม่ต้องอาศัยไทมัส จะทำหน้าที่ได้ดีในช่วงอายุ 4 สัปดาห์ และที่ต้องอาศัยไธมัสจะทำหน้าที่ได้ดีเมื่ออายุ 13-14 สัปดาห์ หลังจากฟัก ตามลำดับ (Ellis, 1988)

ค. กลไกการตอบสนองจากการจดจำ

เกี่ยวข้องกับ Memory cell ซึ่งในปลานั้นจะเป็นเซลล์ของการตอบสนองทางด้านการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ หรืออิมมูนโนโกลบูลิน และการตอบสนองทางด้านเซลล์แบบจำเพาะ คือหลังจากผ่านกระบวนการพบเชื้อและจดจำได้แล้ว การตอบสนองเมื่อพบเชื้อเดิมครั้งต่อไป โดยการตอบสนองแบบนี้จะสามารถเปลี่ยนแปลงได้ง่าย คงอยู่ได้ไม่นาน ดังนั้นการจะสร้างขึ้นใหม่ให้มีประสิทธิภาพสูงเหมือนเดิมนั้นต้องเกิดจากเชื้อที่เคยสัมผัสมาแล้ว (secondary

response) ซึ่งให้ผลตอบสนอง ได้ต่ำกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และยังขึ้นกับอุณหภูมิด้วย (Ellis, 2001)

อย่างไรก็ตามถ้าสัตว์น้ำได้รับแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมในระยะที่ระบบภูมิคุ้มกันยังพัฒนาไม่เต็มที่ อาจจะเกิดภาวะที่ร่างกายไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อการกระตุ้นของสิ่งแปลกปลอมที่เคยที่ได้รับมาแล้วครั้งหนึ่ง (immunological tolerance) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่ชักนำให้เกิดภาวะนี้ ได้แก่ ลักษณะของแอนติเจนในรูปของสารละลาย (soluble antigen) เช่น โปรตีนในซีรั่ม แอนติเจนในรูป hapten ปริมาณแอนติเจนที่มากเกินไปการให้แอนติเจนโดยวิธีการฉีด และอุณหภูมิน้ำที่ต่ำเป็นต้น (Manning *et al.*, 1989)

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลาคาร์พ

การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอาจมีประสิทธิภาพลดลงในภาวะที่มีสารปนเปื้อนในน้ำ โดยสารนั้นอาจมีผลโดยตรงต่อระบบชีวเคมีของร่างกาย กระบวนการสร้างภูมิคุ้มกัน หรือการทำงานของเซลล์ ผลกระทบที่เกิดจากสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อระบบภูมิคุ้มกันมีหลายประการ เช่น การยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน (immunousuppression) การขยายตัวผิดปกติของอัวยวะต่างๆ (uncontrolled proliferation) การไม่สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม การเกิดสภาพภูมิแพ้ และการสร้างแอนติบอดีต่อต้านต่อเนื้อเยื่อตนเอง (Amdur *et al.*, 1991) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่

อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์เลือดเย็น (Poikilotherms) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลาจะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมของปลาแต่ละชนิด การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า phagocytic activity จากของปลา rainbow trout ที่ทดลองที่ 4 องศาเซลเซียสจะต่ำกว่าที่ 19 องศาเซลเซียส (Thuvander *et al.*, 1987) ในธรรมชาติ สัตว์เลือดเย็นจะมีการตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรคต่ำลงในช่วงฤดูหนาว (Kennedy and Stoskopf, 1993)

Neuroendocrine function

เป็นการทำงานร่วมกันของสมองส่วน hypothalamus และต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ไปยังอวัยวะเป้าหมาย การกระตุ้นของ hypothalamus มีผลมาจากความเครียด

ซึ่งจะทำให้มีการส่งกระแสประสาทไปให้ต่อมใต้สมองหลั่ง adenocorticotropin (ACTH) ซึ่งมีผลต่อไปยังส่วนของ interrenal cell ให้มีการปล่อย corticosteroid

ในปลามีฮอร์โมน cortisol เป็นสารหลักของ corticosteroid ซึ่งมีอิทธิพลในเชิงลบต่อจำนวน และประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาวในระบบไหลเวียนเลือด รวมทั้งกระบวนการอักเสบ (Kennedy and Stoskopf, 1993) ในปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปลาตัวที่มีความแข็งแรง ในฝูงเท่านั้นที่สร้างแอนติบอดีต่อพยาธิ Trypanosomes ส่วนปลาตัวที่อ่อนแอกว่าจะมีการทำงานของ Interrenal tissue ที่สูงกว่าปกติ มีการเพิ่มระดับของ corticosteroid ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกดภูมิคุ้มกันตามมา นอกจากนี้ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมยังมีความเกี่ยวข้องกับ stress pheromones ซึ่งมักตรวจพบได้จากน้ำและเนื้อปลาที่เลี้ยงอย่างหนาแน่นอีกด้วย (Scott and Currie 1980)

โลหะหนัก (Heavy metal) มลภาวะ (pollutants) และยา (drug)

ภาวะโลหิตจาง (anemia) เป็นสภาพที่พบเห็นได้ชัดเจนที่สุดในปลาที่ได้สัมผัสกับโลหะหนัก ส่วนอิทธิพลต่อเม็ดเลือดขาวของโลหะหนักมีหลากหลาย โดยอาจทำให้เม็ดเลือดขาวลดลง (lymphopenia) หรือเพิ่มขึ้น (lymphocytosis) ขึ้นกับชนิดของปลานั้นๆ (Kennedy and Stoskopf, 1993) ปลาที่ได้รับยาปฏิชีวนะบางอย่างจะพบว่ามีจำนวน granulocyte ในม้ามเพิ่มขึ้น ในปลาคาร์พ พบว่า oxytetracycline มีผลกดการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Ellis, 1985)

โภชนาการ (nutrition)

นอกเหนือจากความสมดุลของอาหารที่ต้องมีสารอาหารที่จำเป็นในปริมาณที่เพียงพอ เพื่อให้ปลามีสุขภาพร่างกายที่สมบูรณ์ และสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้เหมาะสมแล้ว ยังมีสารอาหารที่จำเพาะบางอย่างที่สามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลา เช่น การเพิ่มวิตามินซี (ascorbic acid) จะช่วยเพิ่มอัตรารอดของปลาต่อการติดเชื้อได้หลากหลายชนิด รวมทั้งเพิ่ม phagocytic indices เมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับวิตามินซีในการทดลอง (Kennedy and Stoskopf, 1993)

ความหลากหลายในสายพันธุ์ปลา (Species Variability)

ในปลาแต่ละสายพันธุ์ยังมีความแตกต่างของความไวรับต่อการเกิดโรคที่แตกต่างกันไป (intraspecies differences) (Kennedy and Stoskopf, 1993) ซึ่งในการศึกษาที่

เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันจึงควรมีการเปรียบเทียบกับปลาที่เลือกสายพันธุ์ หรือครอกเดียวกันเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา

ชนิดของแอนติเจน (Pathogen)

การได้รับแอนติเจนที่แตกต่างกันอาจเหนี่ยวนำหรือกดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโรค หรืออาจกระตุ้นการตอบสนองที่ต่างไป (Kennedy and Stoskopf, 1993)

ภาคผนวก ข.

1. รายละเอียด และผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบฝรั่ง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปคโตมิเตอร์ (GC/MS) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

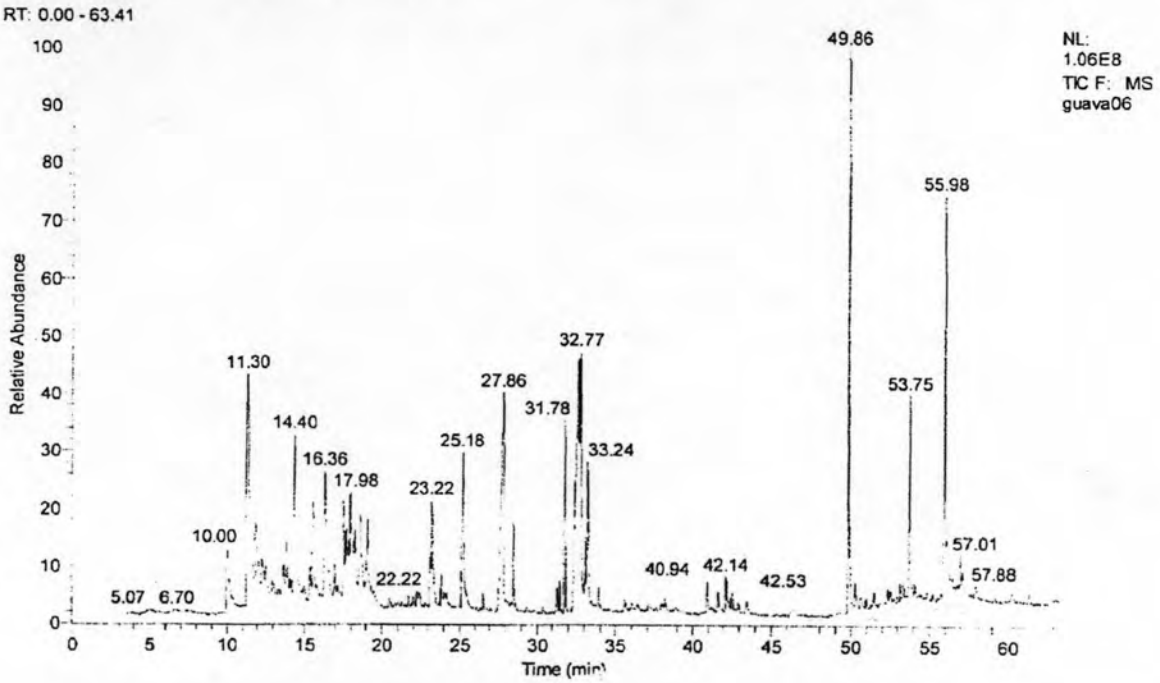
GC/MS

Sample	20 mg/ml in methanol
GC	GCFinnigan Trace GC ultra
MS	Finnigan PolarisQ ion trap detector
Capillary column	BPX5 fused silica column (30 m x 0.25 mm, 0.25 um film thickness)
Injector temperature	180°C
Sample	1 µl splitter 1:100
Carrier gas	Helium, flow 1 ml/min
Oven temperature	programmed temperature 100°C, ramp (3.3 °C/min) to 240°C (5 min), ramp (10°C/min) to 300°C (10 min)
Ion source temperature	200°C
MS scan	50-650 m/z, EI 70 eV

{#Raw File Name}

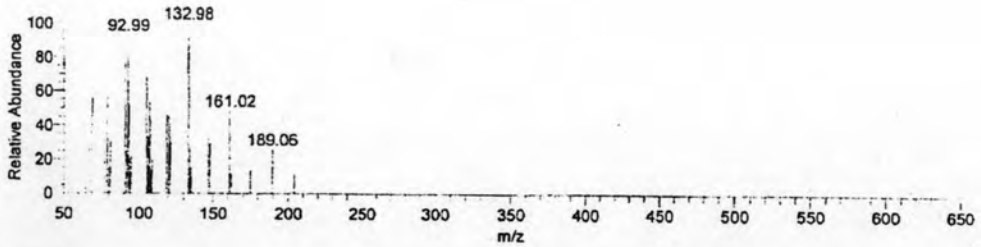
Library Search Report # 2

Data File:	guava06	Orig Data Path:	guava06.RAW
Curr Data Path:	C:\Xcalibur\Data\essential oil\DTAM\	Sample Type:	Unknown
Sample ID:	1	Sample Name:	
Operator:	DSQ	Acquisition Date:	02/17/07 03:40:20
Run Time (min):	59.91	Comments:	water extract 20 mg/ml
Vial:	31	Inst Method:	C:\Xcalibur\methods\Essential oil_chang5.meth
Proc Method:	C:\Xcalibur\methods\tan		

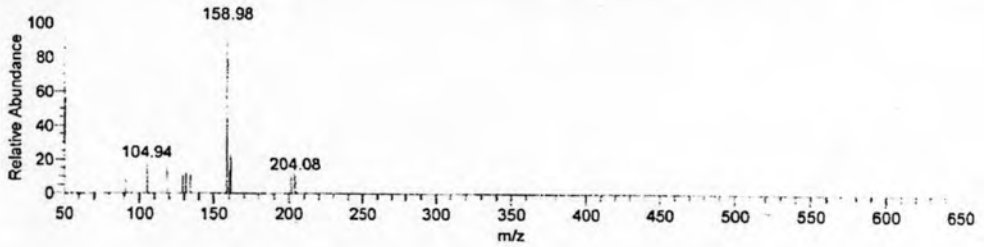


RT	Chemical composition	Area %
11.30	Caryophyllene	12.32
14.40	Calamenene	6.76
16.36	Globulol	5.11
17.54	Propylparaben	2.40
17.98	aromadendrene epoxide	4.86
23.22	Isoaromadendrene epoxide	3.04
25.18	4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	4.29
27.86	n-Hexadecanoic acid	9.89
31.78	Phytol	3.12
32.63	Linoleic acid	13.36
32.77	Oleic Acid	8.22
33.24	Octadecanoic acid	3.86
49.86	trans-Squalene	10.07
53.75	Vitamin E	3.74
55.98	ç-Sitosterol	8.95

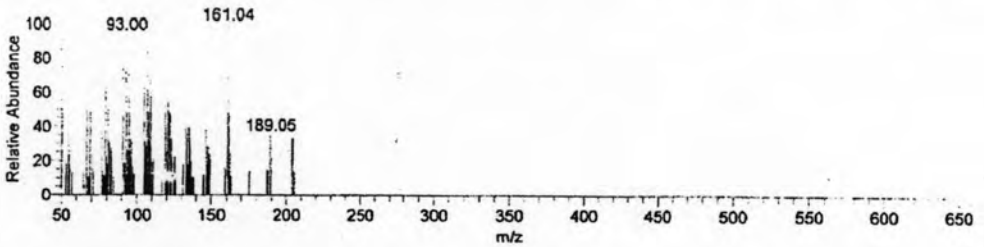
{#Raw File Name}



RT	Name	SI	Library	Formula
11.30	Isocaryophillene	900	mainlib	C15H24
11.30	Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-	900	replib	C15H24
11.30	Caryophyllene	908	replib	C15H24

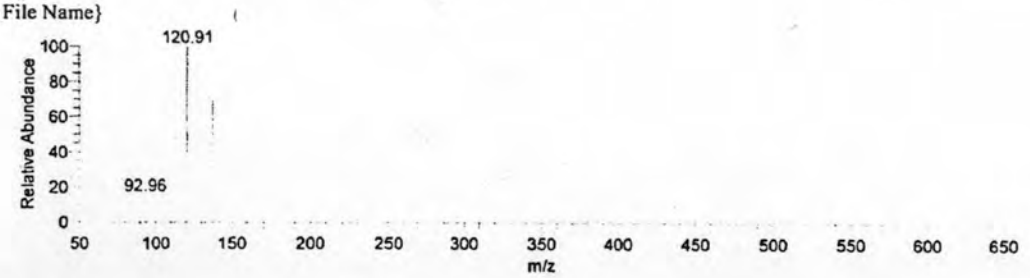


RT	Name	SI	Library	Formula
14.40	2(5H)-Furanone, 5-(bromomethyl)-5-phenyl-	452	mainlib	C11H9BrO2
14.40	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,1,6-trimethyl-	659	replib	C13H18
14.40	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	763	replib	C15H22

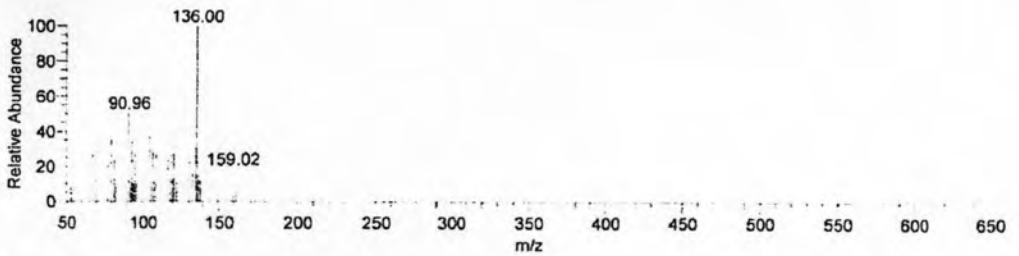


RT	Name	SI	Library	Formula
16.36	1-Naphthalenol, decahydro-4a-methyl-8-methylene-2-(1-methylethyl)-, acetate, [1S-(1à,2á,4aà,8aà)]-	308	mainlib	C17H28O2
16.36	1H-3a,7-Methanoazulene, octahydro-1,9,9-trimethyl-4-methylene-, (1à,3aà,7à,8aá)-	729	mainlib	C15H24
16.36	VERIDIFLOROL	760	mainlib	C15H26O

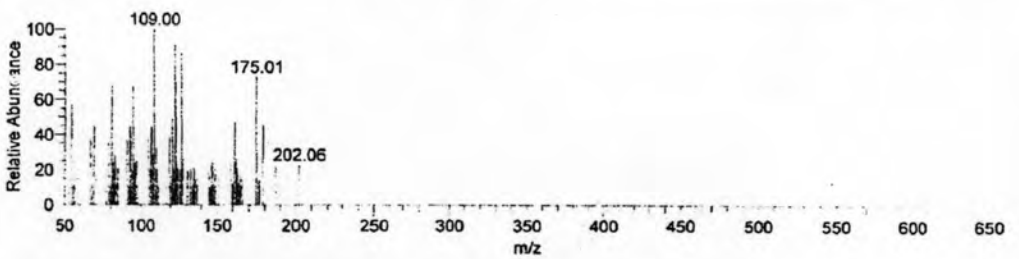
{#Raw File Name}



RT	Name	SI	Library	Formula
17.54	Benzoic acid, 4-hydroxy-	757	replib	C7H6O3
17.54	Isobutyl p-hydroxybenzoate	768	replib	C11H14O3
17.54	Propylparaben	823	mainlib	C10H12O3

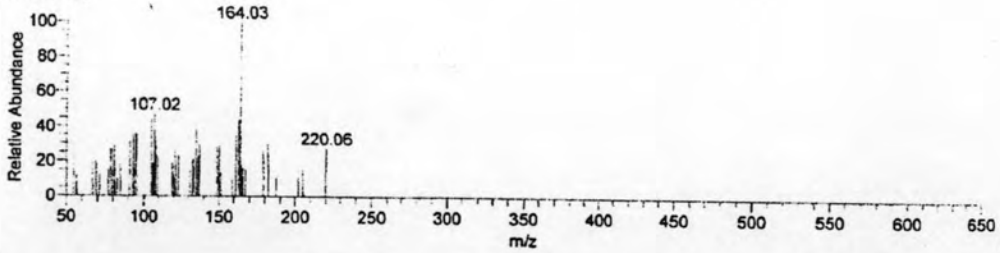


RT	Name	SI	Library	Formula
17.98	à-Ethyl-o-methoxybenzyl alcohol	233	mainlib	C10H14O2
17.98	1-Methylene-2b-hydroxymethyl-3,3-dimethyl-4b-(3-methylbut-2-enyl)-cyclohexane	329	mainlib	C15H26O
17.98	10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5á-ol	508	mainlib	C15H24O

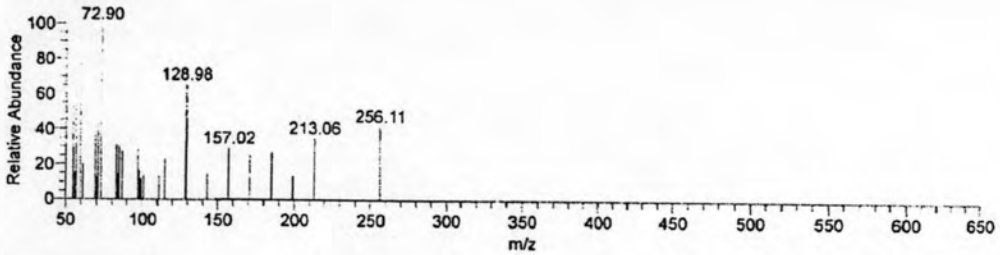


RT	Name	SI	Library	Formula
23.22	1-Naphthalenepropanol, à-ethenyldecahydro-5-(hydroxymethyl)-à,5,8a-trimethyl-2-methylene-, [1S-[1à(R*),4aá,5á,8aà]]-	264	mainlib	C20H34O2
23.22	à-t-Butyl-à-isopropyl-o-methoxybenzyl alcohol	305	mainlib	C15H24O2
23.22	1,2-Pentanediol, 5-(6-bromodecahydro-2-hydroxy-2,5,5a,8a-tetramethyl-1-naphthalenyl)-3-methylene-	326	mainlib	C20H35BrO3

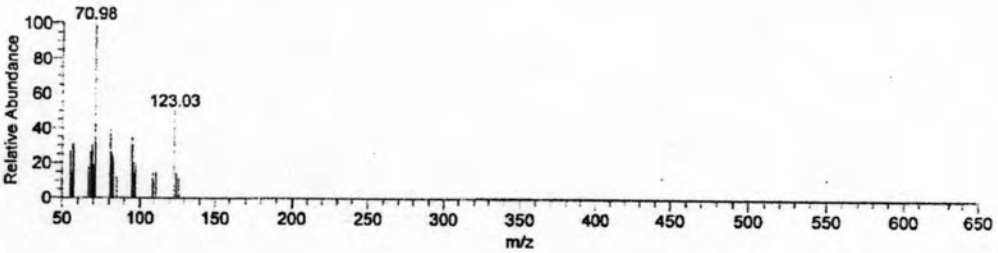
{#Raw File Name}



RT	Name	SI	Library	Formula
25.18	Cyclohexanol, 1,3,3-trimethyl-2-(3-methyl-2-methylene-3-butenylidene)-, (Z)-	386	mainlib	C15H24O
25.18	2,3'-Bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro-	514	mainlib	C10H16N2
25.18	4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	923	mainlib	C15H26O2

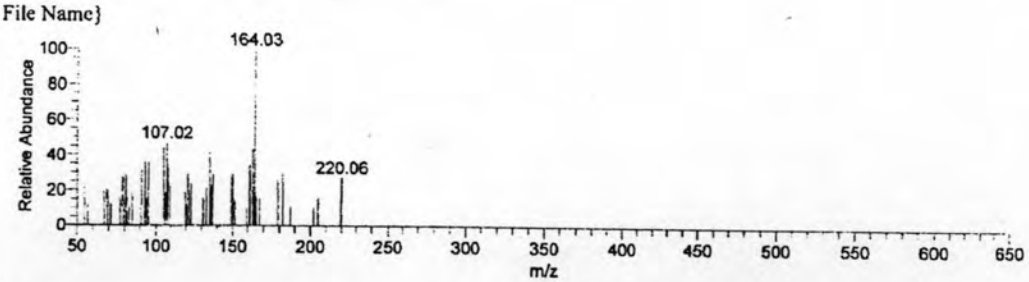


RT	Name	SI	Library	Formula
27.86	Tridecanoic acid	750	replib	C13H26O2
27.86	Tetradecanoic acid	760	replib	C14H28O2
27.86	n-Hexadecanoic acid	881	replib	C16H32O2

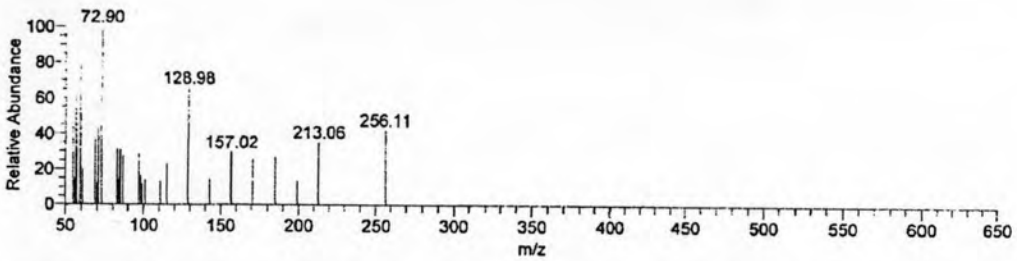


RT	Name	SI	Library	Formula
31.78	Phytol	883	replib	C20H40O
31.78	Phytol	885	replib	C20H40O
31.78	Phytol	899	replib	C20H40O

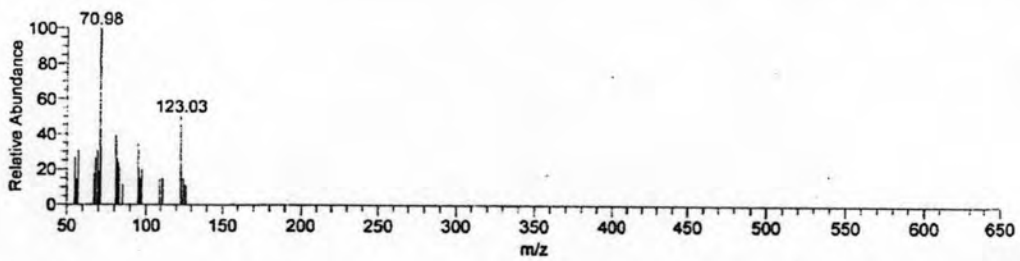
{#Raw File Name}



RT	Name	SI	Library	Formula
25.18	Cyclohexanol, 1,3,3-trimethyl-2-(3-methyl-2-methylene-3-butenylidene)-, (Z)-	386	mainlib	C15H24O
25.18	2,3'-Bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro-	514	mainlib	C10H16N2
25.18	4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	923	mainlib	C15H26O2

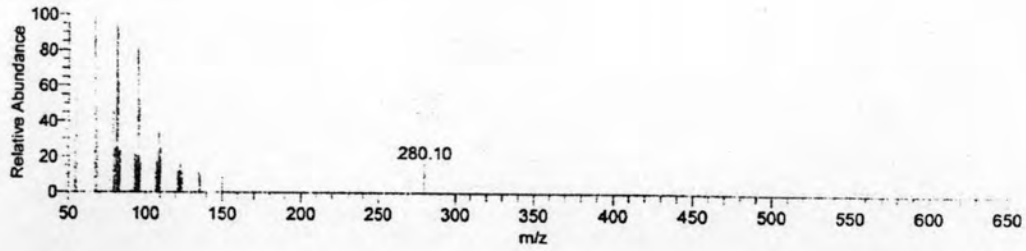


RT	Name	SI	Library	Formula
27.86	Tridecanoic acid	750	replib	C13H26O2
27.86	Tetradecanoic acid	760	replib	C14H28O2
27.86	n-Hexadecanoic acid	881	replib	C16H32O2

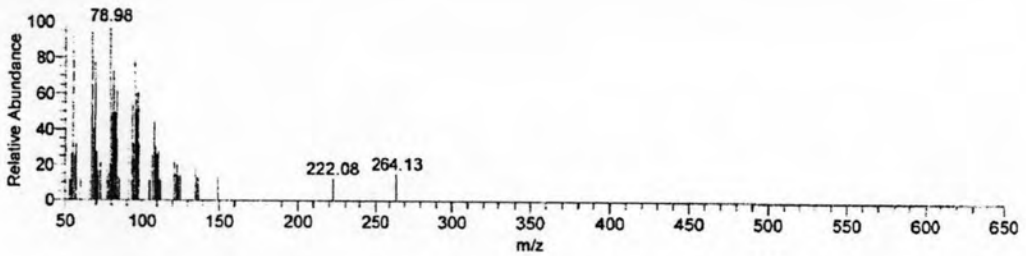


RT	Name	SI	Library	Formula
31.78	Phytol	883	replib	C20H40O
31.78	Phytol	885	replib	C20H40O
31.78	Phytol	899	replib	C20H40O

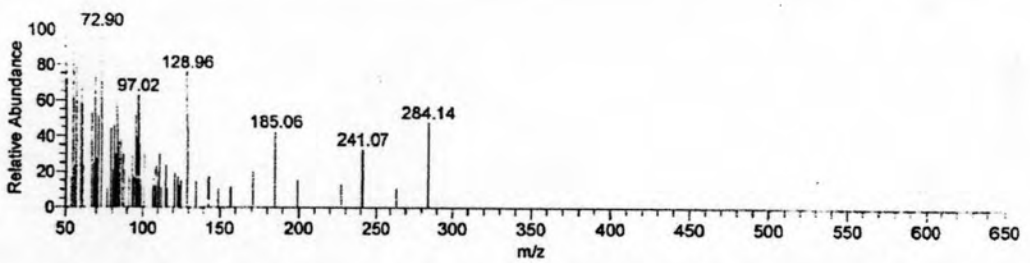
{#Raw File Name}



RT	Name	SI	Library	Formula
32.63	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	763	replib	C18H32O2
32.63	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	791	replib	C19H34O2
32.63	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	904	mainlib	C18H32O2

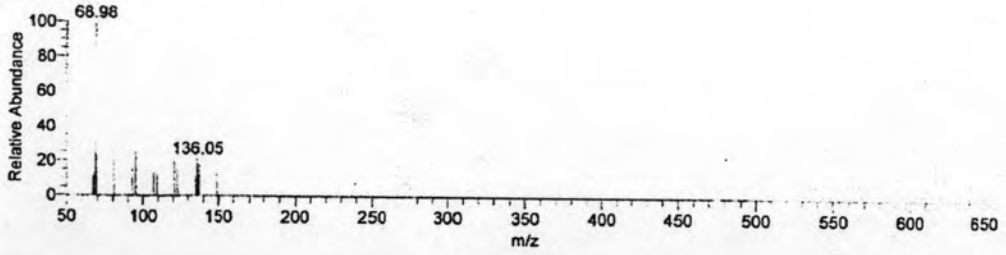


RT	Name	SI	Library	Formula
32.77	(1S,15S)-Bicyclo[13.1.0]hexadecan-2-one	496	mainlib	C16H28O
32.77	cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal	674	mainlib	C16H26O
32.77	cis,cis-7,10,-Hexadecadienal	712	mainlib	C16H28O

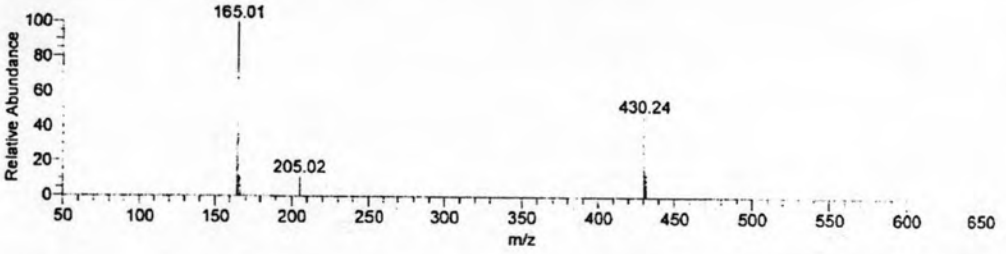


RT	Name	SI	Library	Formula
33.24	9,9-Dimethoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione	564	mainlib	C11H16O4
33.24	Octadecanoic acid	762	replib	C18H36O2
33.24	Octadecanoic acid	787	replib	C18H36O2

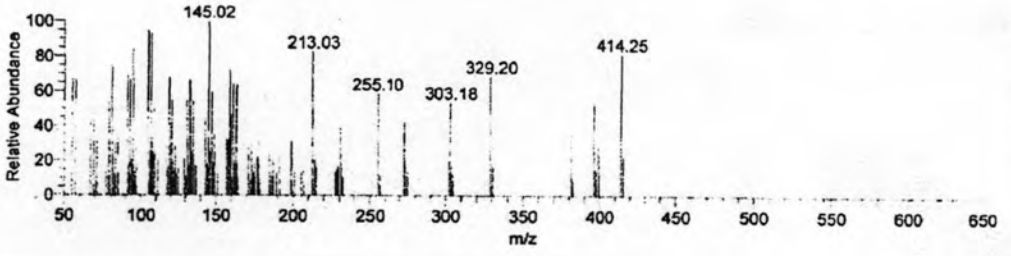
{#Raw File Name}



RT	Name	SI	Library	Formula
49.86	2-Methyl-3-(3-methyl-but-2-enyl)-2-(4-methyl-pent-3-enyl)-oxetane	472	mainlib	C15H26O
49.86	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	895	replib	C30H50
49.86	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	932	mainlib	C30H50



RT	Name	SI	Library	Formula
53.75	Vitamin E	849	replib	C29H50O2
53.75	Vitamin E	902	mainlib	C29H50O2
53.75	Vitamin E	917	replib	C29H50O2



RT	Name	SI	Library	Formula
55.98	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	882	mainlib	C29H50O
55.98	á-Sitosterol	900	replib	C29H50O
55.98	ç-Sitosterol	925	mainlib	C29H50O

2. แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเทนนินรวม ที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตามตำรามาตรฐานสมุนไพรเล่มที่ 2, 2543 ภาคผนวกข้อ 7.21H หน้า 142- 143

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
โทรศัพท์ 0 2589 0022, 0 2951 0000 ต่อ 99963 โทรสาร 0 2589 9866

รายงานผลการตรวจวิเคราะห์

หมายเลขวิเคราะห์ที่ : 19500058

หมายเลขวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ : 111/50

รายละเอียดตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์ : สารสกัดแห้งละเอียดสีน้ำตาลดำเข้ม บรรจุอยู่ในขวดแก้วใส ฝาปิดพลาสติกสีขาวแบบเกลียว ข้างขวดมีฉลากระบุจำนวน "จำนวน 25 กรัม"

ชื่อตัวอย่าง : สารสกัดใบฝรั่ง

ชื่อการค้า : -

ปริมาณ : 25 กรัม

ผู้ส่ง : นายสถิตย์ อรุณแสง 60 หมู่ที่ 3 ถนนเอเชีย-นครสวรรค์ ตำบลหันตรา อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โทรศัพท์ 089-7767815 และ 089-1151109

วัตถุประสงค์การตรวจ : ตรวจวิเคราะห์ปริมาณแทนนินรวม

ผลการตรวจวิเคราะห์ : ปริมาณแทนนินรวมเท่ากับ 46.17% โดยน้ำหนัก
(ปริมาณความชื้นโดยวิธี Loss on drying เท่ากับ 8.45% โดยน้ำหนัก)
วิธีตรวจ : ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เล่มที่ 2, 2543
ภาคผนวก ข้อ 7.21H หน้า 142-143

วันที่ตรวจวิเคราะห์ : 9-13 มีนาคม 2550

วันที่รายงานผล 14 มีนาคม 2550

(นางสาววิไลลักษณ์ ชื่นนางชี)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
ผู้วิเคราะห์

(ว่าที่ร.ต.ธนวัฒน์ ทองจีน)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
ผู้วิเคราะห์

(นางธิดารัตน์ บุญรอด)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 8ว
ผู้รับรอง (หัวหน้าศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร)

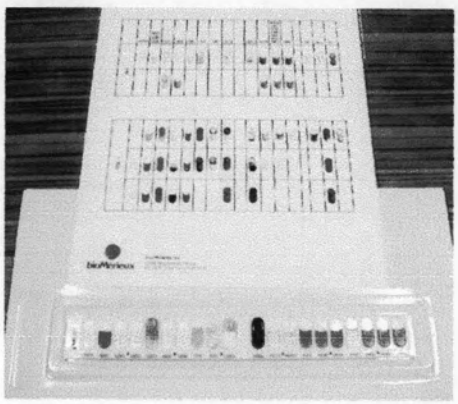
(นางปราณี ชวลิตธำรง)
ผู้จำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร
หน้าที่ 1 ในจำนวน 1 หน้า

รายงานนี้รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เท่านั้น
ห้ามนำรายงานไปคัดลอกหรือทำสำเนาเฉพาะบางส่วนโดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษร
ห้ามนำรายงานนี้ไปประกาศโฆษณา

ภาคผนวก ค.

ผลพิสูจน์เชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลา ด้วยวิธี API 20E

เชื้อ *A. hydrophila* ที่เคลื่อนที่ได้ และเลือกนำมาทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีด้วยวิธี API 20E assay ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Bio Merieux, France)



รูปผนวกที่ 1 การพิสูจน์เชื้อ *A. hydrophila* ที่ใช้ทดลองด้วยการทดสอบทางชีวเคมีด้วยอุปกรณ์ API 20E assay เทียบผลคุณสมบัติของเชื้อกับแผ่นมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ 1 แสดงรายละเอียดของวิธีการอ่านผล และผลของการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *A. hydrophila* ที่ใช้ในการทดลองทางชีวเคมี ด้วยวิธี API 20E assay

ชื่อการทดสอบ	สารตั้งต้น	ตัวทำปฏิกิริยา	การอ่านผลลบ (-)	การอ่านผลบวก (+)	ผลของเชื้อ *A.hydrophila* ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้
ONPG	ONPG	beta-galactosidase	colorless	yellow	+
ADH	arginine	arginine dihydrolase	yellow	red/orange	+
LDC	lysine	lysine decarboxylase	yellow	red/orange	+
ODC	ornithine	ornithine decarboxylase	yellow	red/orange	-
CIT	citrate	citrate utilization	pale green/yellow	blue-green/blue	+
H2S	Na thiosulfate	H2S production	colorless/gray	black deposit	_
URE	urea	urea hydrolysis	yellow	red/orange	_
TDA	tryptophan	deaminase	yellow	brown-red	_
IND	tryptophan	indole production	yellow	red (2 min.)	+
VP	Na pyruvate	acetoin production	colorless	pink/red (10 min.)	+
GEL	charcoal gelatin	gelatinase	no diffusion of black	black diffuse	+

ชื่อการทดสอบ	สารตั้งต้น	ตัวทำปฏิกิริยา	การอ่านผลลบ (-)	การอ่านผลบวก (+)	ผลของเชื้อ *A.hydrophila* ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้
GLU	glucose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	+
MAN	mannitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	+
INO	inositol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	–
SOR	sorbitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	–
RHA	rhamnose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	–
SAC	sucrose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	+
MEL	melibiose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	–
AMY	amygdalin	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	–
ARA	arabinose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow	–
OX	oxidase	oxidase	colorless/yellow	violet	+

125

ภาคผนวก ง.

รายละเอียดการคำนวณสารสกัดใบฝรั่ง และยาเอนโรฟ็อกซาซินผสมในอาหาร

ก. การคำนวณสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหาร 1 กิโลกรัม

ให้ปลากินอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อวัน

คือ ปลาน้ำหนัก 100 กรัม กินอาหาร 3 กรัม/ วัน

ให้ปลากินสาร 1600 พีพีเอ็ม ต่อวัน

คือ ปลาน้ำหนัก 100 กรัม กินสารสกัด 0.16 กรัม /วัน

อาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 1000 กรัม ต้องผสมสารสกัดใบฝรั่ง

อาหาร 3 กรัม ต้องผสมสารสกัดใบฝรั่ง 0.16 กรัม

อาหาร 1,000 กรัม ต้องผสมสารสกัดใบฝรั่ง $\frac{1000 \times 0.16}{3}$ = 53 กรัม

ดังนั้น ผสมสารสกัดใบฝรั่งในอาหารปลาเท่ากับ 53 กรัม ต่อกิโลกรัมอาหาร
หรือเท่ากับ 5.3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักอาหาร

ข. การคำนวณยาเอนโรฟอกซาซินผสมในอาหาร 1 กิโลกรัม

ให้ปลากินอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อวัน

คือ ปลาน้ำหนัก 100 กรัม กินอาหาร 3 กรัม/ วัน

ให้ปลากินยาเอนโรฟอกซาซิน 5 มก.ต่อ กก.น้ำหนักปลา ต่อวัน

คือ ปลาน้ำหนัก 100 กรัม ยาเอนโรฟอกซาซิน 0.0005 กรัม /วัน

อาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 1000 กรัม ต้องผสมยาเอนโรฟอกซาซิน

อาหาร 3 กรัม ต้องผสมยาเอนโรฟอกซาซิน 0.0005 กรัม

อาหาร 1,000 กรัม ต้องผสมยาเอนโรฟอกซาซิน $\frac{1000 \times 0.0005}{3}$ = 0.17 กรัม

ดังนั้น ผสมยาเอนโรฟอกซาซิน ในอาหารปลาเท่ากับ 0.17 กรัม (170 มิลลิกรัม) ต่อกิโลกรัมอาหาร
หรือเท่ากับ 0.017 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักอาหาร
โดยยาที่ใช้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร
ดังนั้น 170 มิลลิกรัม ต้องใช้ยา 1.7 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมอาหาร

ภาคผนวก จ.

ตารางผนวกที่ 2 ผลการตรวจคุณภาพน้ำตลอดการทดลอง โดยทำการตรวจคุณภาพน้ำทุก 7 วัน ก่อนการเปลี่ยนน้ำ

จำนวนวันของการทดลอง	อุณหภูมิ (C°)	พีเอช	ออกซิเจนละลายในน้ำ (ppm)	ความเป็นด่าง (ppm)	ความกระด้าง (ppm)	แอมโมเนีย (ppm)	ไนไตรท์ (ppm)
0	27.0-27.5	7.3-7.6	4.8-5.0	60-80	600-800	0.00-0.25	0.5-1.0
7	27.0-27.5	7.3-7.6	4.8-5.0	60-80	600-800	0.00-0.25	0.5-2.0
14	27.5-28.0	7.2-7.6	4.8-5.0	60-70	400-600	0.00-0.50	0.5-2.0
21	27.0-27.5	7.3-7.6	4.8-5.0	60-70	400-600	0.25-0.50	0.5-2.0

ภาคผนวก ฉ.

แสดงวิธีการเตรียมเชื้อ *A.hydrophila* ในการศึกษาส่วนที่ 5

1. วิธีการทดลองระดับความเข้มข้นของเชื้อ *A. hydrophila* ที่ทำให้ปลาคาร์พตายในเวลา 96 ชั่วโมง

สุ่มเลือกปลาคาร์พที่ปรับสภาพแล้ว จำนวน 175 ตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50 ลิตร

- **การเตรียมเชื้อ *A. hydrophila***

นำเชื้อ *A. hydrophila* ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีด้วยวิธี API 20E assay และดูความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตในขั้นต้นแล้ว มาทำ การบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือด (blood agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ 1-2 โคโลนี มาทำละลายในน้ำเกลือร้อยละ 0.9 เพื่อปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard 0.5 ซึ่งจะทำให้ได้เชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml และนำแต่ละความเข้มข้นมาทำให้เจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten-fold dilution) เพื่อใช้ในการหาค่า 96 ชั่วโมง LD_{50} ต่อไป

การทดลองเบื้องต้น (preliminary test)

ทำการทดลองเบื้องต้นโดยหาปริมาณของแบคทีเรีย *A. hydrophila* เพื่อจัดระดับของปริมาณแบคทีเรีย ซึ่งอยู่ระหว่างช่วงต่ำที่สุดที่ฉีดเข้าช่องท้องแล้วทำให้ปลาคาร์พตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสูงที่สุดที่ไม่ทำให้ปลาคาร์พตายเลยในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ในแต่ละระดับความเข้มข้นของเชื้อใช้ปลาคาร์พ จำนวน 25 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ฉีดเชื้อที่ 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 และกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณที่เท่ากับกลุ่มที่ฉีดเชื้อจริง คือ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เข้าช่องท้อง

การฉีดจะใช้เข็มฉีด ขนาด 26G x ½ นิ้ว และกระบอก syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร โดยฉีดช่องท้อง บริเวณกลางลำตัว เหนือช่องทวารร่วม สังเกตอาการ บันทึกจำนวนปลาที่ตายภายในเวลา 96 ชั่วโมง ปลาที่ตายจะถูกเอาออกจากตู้ทันทีที่สังเกตเห็น เมื่อได้ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับแล้ว ต้องสังเกตว่าปลาที่ทดลองเหนี่ยวนำให้ป่วยต้องมีอาการในแบบเฉียบพลัน และ แบบไม่รุนแรงเฉียบพลัน โดยปลา

บางส่วนจะแสดงอาการป่วยออกมาและจะมีปลาบางส่วนที่รอดตายหลังจากการติดเชื้อแล้ว 3 วัน ทำการบันทึกอัตราการตายเฉลี่ยสะสมที่ 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

การทดลองอย่างละเอียด (definitive test)

เมื่อทราบระดับความเข้มของเชื้อทั้ง 2 ระดับแล้ว จึงทำการเจือจางความเข้มข้นของเชื้อเป็น 5 ระดับเท่า ๆ กัน ให้อยู่ระหว่างระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ฉีดเข้าช่องท้องแล้วทำให้ปลาคาร์พตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสูงที่สุดที่ไม่ทำให้ปลาคาร์พตายเลยในระยะเวลา 96 ชั่วโมง มาฉีดเข้าช่องท้องปลาจำนวน 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำปลามาเลี้ยงในตู้แยกกันตามกลุ่มการทดลอง บันทึกจำนวนปลาคาร์พที่ตายทั้งหมด ไปคำนวณหาอัตราการตายที่ 96 ชั่วโมง

2. **ผลการทดสอบปริมาณของเชื้อ *A. hydrophila* ที่ทำให้ปลาคาร์พตายในเวลา 96 ชั่วโมง**

เมื่อนำเชื้อที่ 10^8 cfu/ml (McFarland standard 0.5) และเชื้อที่ทำให้เจือจางครั้งละ 10 เท่า มาทำการทดลองเบื้องต้นในการหาปริมาณของแบคทีเรีย *A. hydrophila* เพื่อจัดระดับของปริมาณแบคทีเรีย พบว่าเชื้อช่วงต่ำที่สุดที่ฉีดเข้าช่องท้องแล้วทำให้ปลาคาร์พตายร้อยละ 100 พบว่ามีค่าเท่ากับ 10^6 cfu/ml และปริมาณสูงที่สุดที่ไม่ทำให้ปลาคาร์พตายเลยในระยะเวลา 96 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 10^4 cfu/ml

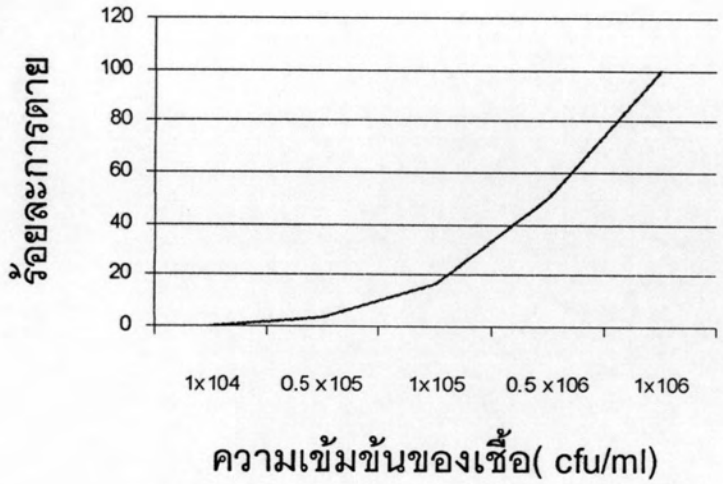
เมื่อทำการทดลองอย่างละเอียดได้เปอร์เซ็นต์การตายสะสมในทุกระดับความเข้มข้นของเชื้อดังตารางผนวกที่ 4 ปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตาย 50% จะมีค่าเท่ากับ 0.5×10^6 cfu/ml ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* ต่อไป

ตารางผนวกที่ 3 แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเบื้องต้นของปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้นต่างกัน ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของเชื้อ (cfu/ml)	อัตราการตาย (ร้อยละ)
0 (กลุ่มควบคุม)	0
10^3	0
10^4	0
10^5	80
10^6	100

ตารางผนวกที่ 4 แสดงจำนวนและร้อยละการตายสะสมอย่างละเอียดของปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้นต่างกัน ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของเชื้อ (cfu/ml)	n	R1	R2	R3	อัตราการตาย (ร้อยละ)
$1x10^4$	30	0	0	0	0
$0.5 x10^5$	30	0	0	1	3.3
$1x10^5$	30	2	2	1	16.7
$0.5 x10^6$	30	3	6	6	50
$1x10^6$	30	10	10	10	100



รูปผนวกที่ 2 แสดงปริมาณของเชื้อ *A. hydrophila* ที่ทำให้ปลาคาร์พตายในเวลา 96 ชั่วโมง

ภาคผนวก ช.1

ตารางผนวกที่ 5 ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในโลหิต และสภาพภูมิคุ้มกัน ในการทดลองส่วนที่ 4 การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ไม่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila (in vivo)*

ตาราง ก. ค่าการทำงานของเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (U/L) **ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ**

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	165.93[a] ±33.96	153.57[a] ±22.27	139.40[a] ±11.20	142.23[a] ±17.23	217.30[a] ±47.57	162.43[a] ±43.03
20	193.07[a] ±33.91	189.90[a] ±35.81	177.36[a] ±22.00	193.43[a] ±44.71	205.53[a] ±44.70	174.97[a] ±25.25

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ข. ค่าการทำงานของเอนไซม์ Alanine aminotransferase (U/L) **ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ** *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	41.70[a] ±1.60	51.63[a] ±8.91	47.60[a] ±7.30	42.60[a] ±10.88	40.13[a] ±10.58	46.23[a] ±6.61
20	33.20[a] ±6.16	34.80[a] ±10.05	40.97[a] ±9.85	39.97[a] ±1050	37.47[a] ±8.16	40.33[a] ±10.98

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ค. ระดับน้ำตาลในเลือด (mg/dl) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	58.23[a] ±10.20	45.10[a] ±11.56	42.17[a] ±9.25	52.20[a] ±7.26	52.57[a] ±10.38	63.10[a] ±12.80
20	55.63[a] ±13.30	53.23[a] ±9.24	42.43[a] ±8.76	46.13[a] ±10.41	50.13[a] ±11.70	59.37[a] ±20.21

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ง. ค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสม่า (g/dl) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	4.53[a] ±0.49	4.77[a] ±1.19	4.13[a] ±1.02	4.97[a] ±0.65	5.13[a] ±0.80	4.33[a] ±0.70
20	5.20[a] ±0.52	3.93[a] ±1.27	4.97[a] ±0.28	4.27[a] ±1.27	4.53[a] ±0.64	4.40[a] ±0.52

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง จ. ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (ร้อยละ) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	28.67[a] ±1.15	28.00[a] ±1.00	27.67[a] ±2.08	27.33[a] ±1.52	29.33[a] ±3.05	28.33[a] ±1.52
20	28.00[a] ±2.00	28.00[a] ±2.00	30.33[a] ±4.50	29.67[a] ±1.52	28.67[a] ±1.15	28.33[a] ±2.08

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ฉ. จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (10^6 mm^{-3}) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	1.80[a] ±0.36	2.20[a] ±0.52	1.77[a] ±0.25	2.13[a] ±0.51	2.03[a] ±0.55	1.80[a] ±0.20
20	1.97[a] ±0.40	2.10[a] ±0.45	2.03[a] ±0.55	1.87[a] ±0.23	1.87[a] ±0.11	2.10[a] ±0.45

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ช. จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (10^4 mm^{-3}) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

วันที่ \ กลุ่ม	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	2.93[a] ±0.25	3.07[a] ±0.30	2.90[a] ±0.10	3.17[a] ±0.20	2.90[a] ±0.20	2.63[a] ±0.32
20	2.87[a] ±0.28	2.97[a] ±0.20	3.00[a] ±0.40	3.07[a] ±0.50	3.10[a] ±0.26	2.80[a] ±0.17

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ซ. ค่าฮีโมโกลบิน (g/dl) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

วันที่ \ กลุ่ม	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	8.37[a] ±2.11	10.07[a] ±1.09	8.77[a] ±1.96	9.10[a] ±1.21	9.03[a] ±1.59	9.70[a] ±0.70
20	9.13[a] ±1.16	9.93[a] ±0.90	9.34[a] ±1.09	10.30[a] ±0.30	10.07[a] ±0.92	9.23[a] ±1.18

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ฌ. ร้อยละความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	17.47[a] ±1.19	19.13[b] ±1.38	19.20[a] ±0.88	18.47[a] ±1.05	19.43[a] ±2.67	18.30[a] ±3.74
20	19.87[a] ±2.91	25.00[a] ±3.13	19.50[a] ±2.70	18.77[a] ±1.32	24.60[a] ±4.17	19.23[a] ±0.55

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ญ. ร้อยละChemotaxic activity ในเลือด ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	Oral C	Oral G	Oral E	Dip C	Dip G	Dip E
0	30.40[a] ±2.10	36.30[b] ±2.89	36.43[a] ±10.35	34.33[a] ±5.03	33.77[a] ±6.36	30.40[a] ±2.10
20	36.30[a] ±9.08	48.33[a] ±2.11	34.97[a] ±4.53	34.27[a] ±5.90	45.40[a] ±3.57	36.33[a] ±3.99

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ภาคผนวก ช.2

ตารางผนวกที่ 6 แสดงค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในโลหิต และสภาพภูมิคุ้มกัน ในการทดลองส่วนที่ 5 การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

ตาราง ก. ค่าของเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (U/L) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่ม / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	167.50[a] ±45.27	179.53[a] ±20.76	198.23[a] ±66.49	161.87[a] ±35.97	170.07[a] ±16.18	199.63[a] ±44.42
3	187.87[a] ±21.59	224.80[a] ±55.60	226.27[a] ±31.13	185.27[a] ±54.36	213.73[a] ±67.39	184.93[a] ±9.28
10	211.20[a] ±34.85	228.90[a] ±25.21	194.40[a] ±37.48	185.70[a] ±42.97	244.40[a] ±43.14	188.90[a] ±24.53
20	199.53[a] ±44.31	169.00[a] ±29.27	175.40[a] ±20.81	187.50[a] ±4.37	207.87[a] ±33.24	163.53[a] ±24.54

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตารางที่ ข. ค่าของเอนไซม์ Alanine aminotransferase (U/L) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	33.47[a] ±2.91	43.07[a] ±1.92	56.20[a] ±16.17	35.57[a] ±8.62	45.17[a] ±3.81	47.23[a] ±5.74
3	58.60[b] ±12.23	48.07[a] ±2.19	56.93[a] ±6.57	42.43[a] ±2.51	49.40[a] ±9.08	49.33[a] ±3.82
10	48.80[ab] ±9.18	47.10[a] ±9.78	53.80[a] ±6.12	41.63[a] ±4.19	50.97[a] ±9.09	54.20[a] ±6.63
20	44.67[ab] ±12.78	41.47[a] ±7.68	41.53[a] ±1.76	38.90[a] ±9.76	41.97[a] ±8.20	45.70[a] ±4.78

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ค. ระดับน้ำตาลในเลือด (mg/dl) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	56.93[b] ±15.36	50.60[a] ±10.50	53.13[a] ±15.06	53.70[b] ±5.63	64.30[a] ±14.77	54.30[a] ±5.40
3	27.80[a] ±8.15	37.40[a] ±10.70	41.70[a] ±7.65	25.53[a] ±2.50	46.03[a] ±1.76	47.10[a] ±5.38
10	21.53[a] ±3.70	46.17[a] ±17.51	47.47[a] ±3.66	28.70[a] ±6.44	50.27[a] ±9.66	49.70[a] ±1.87
20	39.83[ab] ±8.84	50.50[a] ±20.05	51.70[a] ±1.15	34.93[a] ±5.05	50.17[a] ±9.75	49.07[a] ±4.35

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ง. ค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสม่า (g/dl) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	4.63[a] ±0.93	4.57[a] ±0.60	4.93[a] ±0.15	5.00[a] ±1.00	4.67[a] ±0.49	4.93[a] ±1.07
3	2.80[b] ±0.30	3.67[a] ±0.58	4.73[a] ±0.91	2.40[b] ±0.35	4.60[a] ±0.72	3.93[a] ±0.15
10	2.77[b] ±0.15	3.90[a] ±0.26	4.60[a] ±0.40	2.43[b] ±0.25	3.97[a] ±0.45	4.67[a] ±1.20
20	3.40[b] ±0.10	3.73[a] ±0.80	4.67[a] ±0.76	4.13[a] ±1.39	4.50[a] ±0.30	5.00[a] ±0.72

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง จ. ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (ร้อยละ) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	29.67[a] ±4.51	29.67[ab] ±2.08	29.33[a] ±1.15	30.00[a] ±2.00	32.00[a] ±4.00	30.00[a] ±9.17
3	25.33[ab] ±4.04	25.67[b] ±2.25	29.00[a] ±3.00	21.00[b] ±2.00	28.67[a] ±0.58	28.00[a] ±2.00
10	25.00[ab] ±5.00	28.00[b] ±4.00	28.00[a] ±5.00	29.00[a] ±2.00	30.33[a] ±7.51	28.67[a] ±0.58
20	21.67[b] ±0.58	35.00[a] ±4.36	28.67[a] ±2.08	23.33[b] ±3.51	29.00[a] ±1.00	31.33[a] ±1.53

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ฉ. จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (10^6 mm^{-3}) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	2.13[a] ±0.15	2.03[a] ±0.25	2.23[a] ±0.23	2.33[a] ±0.32	2.23[a] ±0.49	2.20[a] ±0.20
3	2.03[a] ±0.15	1.87[a] ±0.06	2.20[a] ±0.36	1.70[b] ±0.36	1.80[a] ±0.26	1.93[a] ±0.31
10	1.80[a] ±0.46	2.00[a] ±0.35	2.00[a] ±0.40	2.17[ab] ±0.15	2.33[a] ±0.06	2.07[a] ±0.15
20	1.73[a] ±0.15	2.40[a] ±0.40	2.10[a] ±0.26	1.97[ab] ±0.32	2.03[a] ±0.25	2.20[a] ±0.35

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ช. จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (10^4 mm^{-3}) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	3.13^{a}	2.80^{a}	3.00^{a}	3.17^{a}	2.83^{a}	2.77^{a}
	±0.23	±0.35	±0.40	±0.67	±0.40	±0.21
3	4.47^{b}	4.33^{b}	3.97^{b}	4.07^{a}	4.40^{c}	3.90^{b}
	±0.15	±0.93	±0.21	±0.12	±0.61	±0.60
10	4.00^{b}	4.00^{ab}	3.10^{a}	4.20^{a}	3.70^{bc}	3.30^{ab}
	±0.72	±0.80	±0.53	±0.53	±0.46	±0.30
20	4.17^{b}	3.23^{ab}	2.77^{a}	3.70^{a}	3.33^{ab}	2.90^{a}
	±0.35	±0.25	±0.25	±1.08	±0.06	±0.20

^{a,b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ซ. ค่าฮีโมโกลบิน (g/dl) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	9.97^{a}	9.90^{a}	10.00^{a}	9.90^{a}	10.07^{a}	10.23^{a}
	±1.66	±0.46	±1.74	±0.66	±1.01	±0.87
3	8.47^{ab}	9.13^{a}	10.03^{a}	5.90^{c}	8.40^{a}	9.40^{a}
	±1.36	±1.10	±0.57	±0.30	±1.42	±0.72
10	7.00^{b}	9.30^{a}	9.63^{a}	9.37^{a}	9.47^{a}	9.73^{a}
	±0.78	±0.66	±1.08	±0.64	±0.72	±0.74
20	6.83^{b}	10.07^{a}	9.43^{a}	7.63^{b}	9.23^{a}	8.80^{a}
	±0.31	±1.32	±0.40	±1.15	±0.78	±0.92

^{a,b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ฌ. ร้อยละความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของแมคโครฟาจ ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	18.67[a] ±0.81	18.50[a] ±0.92	20.47[a] ±1.36	20.03[a] ±1.89	18.43[a] ±1.11	19.40[a] ±1.06
3	16.00[bc] ±1.97	17.97[a] ±1.65	18.67[a] ±0.31	15.10[b] ±1.45	17.60[a] ±4.13	17.60[a] ±0.69
10	14.37[c] ±1.17	17.80[a] ±1.30	19.70[a] ±1.18	14.90[b] ±1.04	17.33[a] ±0.93	19.57[a] ±3.31
20	17.33[ab] ±0.74	18.57[a] ±0.55	20.13[a] ±1.25	19.77[a] ±0.31	19.03[a] ±2.87	20.23[a] ±0.68

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตาราง ญ. ร้อยละ Chemotaxic activity ในเลือด ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

กลุ่มที่ / วันที่	+Oral C	+Oral G	+Oral E	+Dip C	+Dip G	+Dip E
0	34.10[a] ±3.32	32.23[a] ±1.76	32.40[a] ±0.44	32.17[a] ±1.15	30.00[b] ±0.85	30.37[a] ±3.15
3	23.40[b] ±1.57	28.57[a] ±1.55	29.70[ab] ±1.57	25.20[b] ±4.25	28.20[b] ±0.62	27.37[a] ±0.81
10	23.40[b] ±1.75	29.20[a] ±3.08	29.10[b] ±0.62	22.70[b] ±1.90	28.97[b] ±1.00	28.50[a] ±1.05
20	25.10[b] ±3.50	29.60[a] ±2.31	30.50[ab] ±2.46	27.27[ab] ±4.44	32.53[a] ±1.29	30.10[a] ±2.71

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสถิตย์ อรุณแสง เกิดเมื่อวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2511 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนทวีธาภิเศก ปี พ.ศ. 2528 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี พ.ศ. 2539 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2546 ปัจจุบันรับราชการในตำแหน่งอาขาจรย์ ระดับ 5 ที่สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ