รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*)
และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)
Streptococcosis in Climbing Perch (*Anabas testudineus*)
and Günther's Walking Catfish (*Clarias macrocephalus*)

คณะนักวิจัย

ผศ.ดร.นเรศ ซ่วนยุก
ผศ.ดร.ชุติมา ตันติกิตติ

ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) เป็นแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงปลาทั่วโลก การศึกษาครั้งนี้รายงานการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่เลี้ยงร่วมกันในภาคใต้ของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2554 ถึงปี พ.ศ. 2558 ระหว่างการระบาดของโรคพบอัตราการตาย 10-40 เปอร์เซ็นต์ ในปลาหมอไทยน้ำหนัก 60-150 กรัม และปลาดุกอุยน้ำหนัก 30-90 กรัม โดยปลาที่ติดเชื้อแสดงอาการของโรคสเตรปโตคอคโคซีสหลายแบบ ได้แก่ เซื่องซึม ตาโปน ตาขุ่น น้ำขังในช่องท้อง เลือดออก และว่ายน้ำผิดปกติ การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียจากปลาป่วยจำนวน 126 ไอโซเลต และจำแนกชนิดได้เป็นแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ซีรั่มวิทยา และการวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุล การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง (*bca*, *bac*, *scpB*, *lmb* และ GBSi1) ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย พบเพียงยีน *bca* ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิล (*Oreochromis* spp.) ป่วย การศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไม่พบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทย ปลาดุกอุย และปลานิล การศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล อิริโทรมัยซิน ลินโคมัยซิน และออกซี่เตตร้าซัยคลิน แต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะออกโซลินิค แอซิด และซัลฟาเมทอกซาโซล/ไตรเมโทพริม

การคัดเลือกแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib จำนวน 20 ไอโซเลต ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย โดยวิธีการฉีดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าช่องท้องปลาหมอไทย พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีความรุนแรงสูง ทำให้ปลาตาย 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 7 วันหลังการติดเชื้อ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบเลือดออกกระจายตามเยื่อหุ้มสมอง เยื่อหุ้มหัวใจ ตา ไต ม้าม และตับ และพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวจำนวนมากในสมอง ม้าม และไต

การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib สายพันธุ์ PSU-KSAAHRC-298 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ภายใต้สภาวะต่างๆ พบว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ และความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ในปลาหมอไทยโดยวิธีการฉีดแบคทีเรียความเข้มข้นตั้งแต่ 10^1-10^4 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าช่องท้อง พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีความรุนแรงสูง สามารถทำให้ปลาหมอไทยตาย 60-97 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่งที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ $4.5x10^2$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และ $6.3x10^1$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ฮีโมโกลบิน ปริมาณโปรตีนในซีรั่ม จำนวนเม็ดเลือดแดงการลดลงของไนโตรบลู เตตร้าโซเลียม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และจำนวนเม็ดเลือดขาว กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทย พบว่าปลาหมอไทยที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 34.07±0.45 องศาเซลเซียส และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 1.73±0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการตายสูงสุด (96.67±5.77 เปอร์เซ็นต์) และปลาหมอไทยที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28.97±0.12 องศาเซลเซียส และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 5.52±0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร มี

อัตราการตายต่ำสุด (56.67±5.77 เปอร์เซ็นต์) การทดสอบการยอมรับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) โดยวิธีการฉีดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าช่องท้องปลาหมอไทย พบปลานิลมีอัตราการตาย 40 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน แต่ไม่พบการตายของปลากะพงขาว

การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาดุกอุยพบการตายเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการทดลองติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาดุกอุย พบว่าปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรียมีอัตราการตายเฉลี่ยสูงสุด คือ 36.7±12.6 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับปลาดุกอุยที่ติดแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ที่มีอัตราการตายเฉลี่ย 6.7±5.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบการตายของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสเพียงอย่างเดียวกับปลาดุกอุยกลุ่มควบคุม ปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอาการว่ายน้ำควงสว่าน มีของเหลวในช่องท้อง ตับซีด ม้ามโต เลือดออกในสมอง มีการขับเมือกมากผิดปกติ ครีบกร่อน และผิวหนังมีสีซีด การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาดุกอุยป่วย พบเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เลือดออกในสมอง มีการแทรกตัวของเมลาโนแมคโครฟาจในเนื้อเยื่อตับ ท่อไตเสื่อมสลาย มีเลือดออกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อม้าม การทดลองแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใสในปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลิงใส ที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อร่วมกันระหว่างปรสิตและแบคทีเรียสร้างปัญหาอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้นประมาณ 10^5 - 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตาย 33.33 – 90.00 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน ปลาที่ติดเชื้อแสดงอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำเสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำ ตาโปนข้างเดียวหรือทั้งสองข้าง ร่วมกับอาการขุ่นขาวของกระจกตา เลือดออกตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย อาการภายในของปลาป่วยพบว่า สมองมีสีชมพู ตับซีด และม้ามโตผิดปกติ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบเซลล์ตับเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และมีช่องว่างในเซลล์ ไซโมเจนแกรนูลบริเวณตับอ่อนลดลง เกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส และมีเมลาโนแมคโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อไตและม้าม เยื่อหุ้มหัวใจมีเลือดออกและหนาผิดปกติ เยื่อหุ้มสมองอักเสบและมีการแทรกตัวของเม็ดเลือด การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 6 และ 9 วัน หลังการติดเชื้อ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ และการลดลงของไนโตรบลู เตตร้าโซเลียม แต่พบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในซีรั่ม ปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดขาว การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib สามารถก่อโรคและสร้างความรุนแรงต่อปลานิลได้

รายงานฉบับนี้นับเป็นครั้งแรกของการแยกแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันในภาคใต้ของประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทย ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นับเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทยอย่างยั่งยืน

Abstract

Streptococcus agalactiae (Group B *Streptococcus*; GBS) causes serious damage to fish aquaculture worldwide. The present study reports a *S. agalactiae* infection in climbing perch (*Anabas testudineus*) and Günther's walking catfish (*Clarias macrocephalus*) polycultured in southern Thailand between 2011 and 2015. During the disease outbreak, a mortality rate of 10-40 % was observed, affecting climbing perch and Günther's walking catfish weighing from 60-150 g and 30-90 g, respectively. Infected fish exhibited a variety of symptoms typical of streptococcosis, including lethargy, exophthalmia, corneal opacity, ascites, haemorrhage and erratic swimming. One hundred and twenty six isolates from infected fish were identified as *S. agalactiae* serotype Ib by biochemical, serological, as well as molecular analyses. Investigation of virulence-associated genes (*bca*, *bac*, *scpB*, *lmb* and GBSi1) indicated that *S. agalactiae* isolates from climbing perch and Günther's walking catfish contain only *bca* which differed from *S. agalactiae* previously isolated from infected tilapia (*Oreochromis* spp.). Study on DNA pattern indicated that there was no difference among *S. agalactiae* isolates from climbing perch, Günther's walking catfish and tilapia after cut with restriction enzyme. *S. agalactiae* isolates from the present study were completely sensitive to chloramphenicol, erythromycin, lincomycin and oxytetracycline but resistant to oxolinic acid and sulfamethoxazole/trimethoprim.

Screening of 20 *S. agalactiae* serotype Ib isolates from infected climbing perch and Günther walking catfish by intraperitonelly injection with 0.1 ml of bacterial suspension at concentration of 10^7 CFU/ml indicated that all *S. agalactiae* serotype Ib isolates were strongly virulent with 80-100 % mortality was observed within 7 days post infection. Histopathological examination revealed diffused hemorrhage in the brain, heart, eye, kidney, spleen and liver tissues as well as infiltration of white blood cell in the brain, the spleen and the kidney of infected fish.

Study on growth of *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 in tryptic soy broth under various conditions indicated that optimal growth of *S. agalactiae* serotype Ib was at temperature 30 °C, salinity 0.5 % and pH 7. Experimental infection of climbing perch with *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 by intraperitoneally injected with 0.1 ml of bacterial suspension at concentrations of 10^1-10^4 CFU/ml revealed that infected fish exhibited 60-97 % mortality with 60 h LD_{50} and 72 h LD_{50} of $4.5x10^2$ and $6.3x10^1$ CFU/ml, respectively. Determination of hemato-immunological changes showed the significantly decreasing of hematocrit, hemoglobin, serum protein, red blood cell and reduction of nitroblue tetrazolium ($p<0.05$) and significantly increasing of white blood cell, lysozyme activity,

phagocytic index and average bead per cell ingested ($p<0.05$) of climbing perch injected with *S. agalactiae* serotype Ib.

Investigation on the effect of environment factors i.e., temperature and dissolved oxygen on the susceptibility of climbing perch to *S. agalactiae* serotype Ib infection revealed that high water temperature (34.07±0.45 °C) and low dissolved oxygen level (1.73±0.21 mg.l) proved to increase mortality of climbing perch (96.67±5.77 %) while climbing perch maintained in ambient water temperature (28.97±0.12 °C) and dissolved oxygen level (5.52±0.21 mg/l) exhibited lowest mortality (56.67±5.77 %). Study on susceptibilitie of *S. agalactiae* serotype Ib in other fish species by intraperitoneally injection with 0.1 ml of bacterial suspension at concentration of 10^7 CFU/ml showed that Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exhibited 40 % mortality within 14 day while no mortality was observed in Asian seabass (*Lates calcarifer*).

Günther's walking catfish experimental infected with *S. agalactiae* serotype Ib revealed less mortality. However, concurrent experimental infection with *Gyrodactylus* sp. and *S. agalactiae* in Günther's walking catfish revealed 36.7±12.6 % mortality in comparison with fish infected with *S. agalactiae* (6.7±5.8 %) and fish infected with *Gyrodactylus* sp. (0 %) as well as uninfected control fish (0 %). During the experiment, infected fish showed several disease signs including, serpentine movement, ascites, pale liver, splenomegaly, hemorrhagic brain, increased mucus secretion on the skin, tail and fin rot and pale to white skins. Histopathological alterations in fish infected by *Gyrodactylus* sp. and *S. agalactiae* showed meningitis, encephalitis, congestion and infiltration of melanomacrophage in the liver, hemorrhagic kidney and diffuse hemorrhage in the spleen. *S. agalactiae* was isolated from *Gyrodactylus* sp. collected from infected fish at 36 and 48 h post infection. This study indicated concurrent parasitic and bacterial infections cause serious problem in fish aquaculture.

Experimental infection of *S. agalactiae* serotype Ib in tilapia by intraperitoneally injection of bacterial concentrations of 10^5-10^8 CFU/ml indicated that infected tilapia exhibited 33.33-90.00 % mortality within 14 days. Clinical signs of infected fish including lethargy, erratic swimming, darkening of skin pigment, unilateral or bilateral exophthalmia together with eye opacity, haemorrhagic septicemia in several organs. Internally, haemorrhagic brain, pale liver and splenomegaly were observed. Histopathological finding indicated that tilapia infected with *S. agalactiae* exhibited sloughing and vacuolization of the hepatic cell, reduction of zymogen granule in the pancreas, shrinkage glomerulus,

infiltration of melanomacrophage in the kidney and the spleen, haemorrhagic and extended epicardium as well as meningitis and infiltration of white blood cell in the brain. Determination of hemato-immunological changes of tilapia infected with *S. agalactiae* serotype Ib at 0, 1, 3, 6 and 9 days post infection revealed no significantly different in hematocrit, hemoglobin, lysozyme activity and reduction of nitroblue tetrazolium, but significantly changing of serum protein, red blood cell and white blood cell was observed. The present study indicated that *S. agalactiae* serotype Ib is a pathogenic bacterium in tilapia.

To our knowledge, this is the first isolation of the *S. agalactiae* serotype Ib from climbing perch and Günther's walking catfish polycultured in southern Thailand. The present study indicated that *S. agalactiae* serotype Ib has a great impact on fish aquaculture in Thailand. These findings are useful information for sustainable aquaculture in Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2557-2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณชุติมา คลิ้งขลิบ คุณธรานันท์ คงกะพันธ์ คุณอัครวิทย์ อิสสะโร คุณมัชลิน แดงเวชงาม คุณธาตรี เกื้อสุข คุณธีรภัทร์ ชูแก้ว คุณสาวิตรี เสรีกิจเจริญ คุณอโณทัย บุญโยดม และคุณพีระพงษ์ เจริญลาภ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาหมอไทยและปลาดุกอุย

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2560

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ **13**

วัตถุประสงค์ **14**

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร **15**

1. ปลาหมอไทย 15

2. ปลาดุกอุย 15

3. โรคสเตรปโตคอคโคซีส (Streptococcosis) 16

บทที่ 3 *Streptococcus agalactiae* ซีโรไทป์ Ib แบคทีเรียอุบัติใหม่ที่ก่อโรคในปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันในบ่อดินในภาคใต้ของประเทศไทย **20**

1. บทนำ 20

2. วิธีการทดลอง 21

3. ผลการทดลอง 25

4. วิจารณ์ผลการทดลอง 36

บทที่ 4 พยาธิวิทยา การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือด และผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) **40**

1. บทนำ 40

2. วิธีการทดลอง 40

3. ผลการทดลอง 45

4. วิจารณ์ผลการทดลอง 52

บทที่ 5 การติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) **54**

1. บทนำ 54

2. วิธีการทดลอง 54

3. ผลการทดลอง 57

4. วิจารณ์ผลการทดลอง 63

บทที่ 6 การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล (*Oreochomis niloticus*) **66**

1. บทนำ 66

2. วิธีการทดลอง 67

3. ผลการทดลอง 68

4. วิจารณ์ผลการทดลอง 74

บทที่ 7 สรุป **77**

เอกสารอ้างอิง **78**

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลาป่วย	19
2	ไพรเมอร์และยีนเป้าหมายที่ใช้สำหรับการเปรียบเทียบยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วย	23
3	การเก็บตัวอย่างปลาป่วยที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้	26
4	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีรั่มวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วย	28
5	ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *S.agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วย	32
6	การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ	49
7	อัตราการตายของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำแตกต่างกัน	51
8	ค่าองค์ประกอบเลือดของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. และปลาดุกอุยปกติ	58
9	อัตราการตายของปลาดุกอุยในแต่ละชุดการทดลอง	59
10	จำนวนปลิงใสที่พบบริเวณผิวหนังและเหงือกของปลาดุกอุยในแต่ละกลุ่ม	60
11	แสดงจำนวนปลิงใส และเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใสในระยะเวลาต่างๆ หลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*	63
12	การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่ระยะเวลาต่างๆ	75

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	อาการของปลาหมอไทย (บน) และปลาดุกอุย (ล่างซ้าย) ที่ป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซีสและแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. (ล่างขวา) จำนวนมากที่แยกได้จากตับ ไต และสมองของปลาป่วย	26
2	ผล PCR ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bca, lmb, scpB, bac,* GBSi1 และ *16s rRNA* L; 100 bp DNA ladder, Ia; *S. agalactiae* serotype Ia, III; *S. agalactiae* serotype III, 224, 263, 298, 308, 325 และ 421; *S.agalactiae* serotype Ib จากปลาหมอไทย, 252 และ 430; *S. agalactiae* serotype Ib จากปลาดุกอุย, N; Negative control (DDW)	29
3	ลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาป่วย	29
4	Phylogenetic tree บนฐานของลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาป่วย (*S. agalactiae* KSAAHRC298) เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จากฐานข้อมูล Genbank	30
5	รูปแบบดีเอนเอของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III Lane 1; 100 bp DNA ladder, Lane 2; *S. agalactiae* serotype Ia, Lane 3; *S. agalactiae* serotype III, Lane 4-9; *S.agalactiae* serotype Ib จากปลาหมอไทย, Lane 10-11; *S. agalactiae* serotype Ib จากปลาดุกอุย	31
6	อัตรารอดของปลาหมอไทยจากการทดสอบการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทย และปลาดุกอุยโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง	32
7	เนื้อเยื่อสมองของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีการอักเสบบริเวณเยื่อหุ้มสมอง โดยมีเม็ดเลือดแดง (ศรชี้) แทรกบริเวณเยื่อหุ้มสมองเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 50 μm)	33
8	เนื้อเยื่อตาของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีเลือดออกและเสื่อมสลายของตาโดยมีเม็ดเลือดแดง (ดอกจัน) จำนวนมากแทรกบริเวณเรตินา (H&E, Bar = 50 μm)	34
9	เนื้อเยื่อหัวใจของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib (a) มีการอักเสบอย่างรุนแรงบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ โดยมีเม็ดเลือดแดง (ศรชี้) แทรกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจเป็นจำนวนมาก และ (b) พบการเกิดกรานูล (ดอกจัน) บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ (H&E, Bar = 100 μm)	34

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	เนื้อเยื่อไตตอนท้ายของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีการอักเสบและมีเลือดออกจากการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณไตตอนท้าย โดยมีเม็ดเลือดแดง (ดอกจัน) แทรกตัวเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 50 µm)	35
11	เนื้อเยื่อตับของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบช่องว่าง (ศรชี้) ในเซลล์ตับเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 10 µm)	35
12	เนื้อเยื่อม้ามของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบการเสื่อมสลาย (D) และมีเลือดออก โดยพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดแดง (ศรสีดำ) และเม็ดเลือดขาว (ศรสีขาว) เป็นจำนวนมากบริเวณม้าม (H&E, Bar = 50 µm)	36
13	ผลของอุณหภูมิ (ก) ความเค็ม (ข) และความเป็นกรด-ด่าง (ค) ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เวลา 0 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง	46
14	อัตราการตายสะสมของปลาหมอไทยที่ได้ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ความเข้มข้นต่างๆ ภายในระยะเวลา 14 วัน	47
15	อัตราการรอดของปลากะพงขาวและปลานิลหลังติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* นาน 14 วัน	51
16	ปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ที่แยกได้จากปลาดุกอุย	57
17	อัตราการตายสะสมของปลาดุกอุยในแต่ละชุดการทดลอง	59
18	อาการของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* (ก) ผิวหนังมีสีซีด และครีบกร่อน (ข) ม้ามโต (ค) เลือดออกในสมอง	60
19	สมองของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* (ก) เลือดออกในสมอง (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm (ข) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm	61
20	ตับของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* (ก) เลือดคั่งภายในตับ (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm (ข) เกิดการแทรกตัวของเมลาโนแมคโครฟาจในเนื้อเยื่อตับ (ดอกจัน) H&E, bar = 10 µm	61
21	ไตของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* เกิดการเสื่อมสลายของท่อไต (ดอกจัน) และมีเลือดออกในไต H&E, bar = 50 µm	62
22	ม้ามของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอาการเลือดออกกระจายในเนื้อเยื่อ (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm	62

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธีการฉีด	68
24	อาการตัวคล้ำของปลานิลภายหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib	69
25	อาการตาโปนทั้งสองข้างและเลือดออกในตาของปลานิลภายหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib	69
26	อาการตับซีด (L) ของปลานิลภายหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib	70
27	เนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib (a) แสดงการตายเป็นหย่อมๆ (ดอกจัน) ของเซลล์ตับ (b) แสดงเซลล์ตับเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีการหลุดลอกและมีช่องว่าง (ศรชี้) ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก [H&E, (a) Bar = 100 µm, (b) Bar = 10 µm]	70
28	เนื้อเยื่อตับอ่อน (P) ของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีลักษณะเสื่อมสภาพและมีจำนวนไซโมเจนแกรนูลลดลง (H&E, Bar = 10 µm)	71
29	เนื้อเยื่อไตของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib (a) แสดงเมลาโนแมคโครฟาจ (M) แทรกตัวอยู่ในเนื้อเยื่อ (b) แสดงเกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส (G) (H&E, Bar = 10 µm)	71
30	เนื้อเยื่อม้ามของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เกิดการสลายตัวของไวท์พัลป์ (D) และมีเมลาโนแมโครฟาจและเม็ดเลือดแทรกตัวเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 50 µm)	72
31	เนื้อเยื่อหัวใจของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีเยื่อหุ้มหัวใจหนาขึ้นและมีเลือดออก (ดอกจัน) กระจายทั่วไปบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ (H&E, Bar = 100 µm)	72
32	เนื้อเยื่อสมองของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบและเกิดการแทรกตัวของเม็ดเลือดแดง (ดอกจัน) เป็นจำนวนมากบริเวณเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมอง (H&E, Bar = 50 µm)	73

บทที่ 1

บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลาเป็นอาชีพที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรมาก เนื่องจากพื้นที่ของประเทศส่วนใหญ่อยู่ใกล้แหล่งน้ำ ประกอบกับผลผลิตสัตว์น้ำสามารถทำรายได้ดี และใช้เป็นอาหารบริโภคภายในครัวเรือนได้ ดังนั้นการทดแทนปริมาณการผลิตจากการประมงซึ่งมีจำนวนลดน้อยลง ด้วยการเพาะเลี้ยงจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะเพิ่มพูนทรัพยากรสัตว์น้ำให้มีศักยภาพมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) และปลาดุก (*Clarias* spp.) มีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาดุกซึ่งเป็นสัตว์น้ำสำคัญชนิดหนึ่ง ที่เกษตรกรให้ความสนใจเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย เนื่องจากเลี้ยงง่าย โตเร็ว ให้ผลตอบแทนสูง เช่นเดียวกับปลาหมอไทยซึ่งเป็นปลาน้ำจืดพื้นบ้านของไทยอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นปลาที่ประชาชนทุกระดับชนชั้นของสังคมไทยนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย และความต้องการของตลาดมีสูงมาก โดยเฉพาะปลาขนาดใหญ่ (3-5 ตัว/กิโลกรัม) ทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ เช่น ตะวันออกกลาง จีน ไต้หวัน เกาหลี และมาเลเซีย ที่มีความต้องการสูง อย่างไรก็ตามพบว่าการเพาะเลี้ยงปลาหมอไทยมีปริมาณผลผลิตที่ไม่แน่นอน และค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีปริมาณผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงในปี พ.ศ. 2555 เท่ากับ 203,030 ตันต่อปี ในขณะที่ผลผลิตของปลาหมอไทยเท่ากับ 12,100 ตันต่อปี (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2558) ส่วนการเพาะเลี้ยงปลาดุกนั้นมีเกษตรกรนิยมเลี้ยงปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) และปลาดุกลูกผสมหรือปลาดุกบิ๊กอุยที่ได้จากการผสมระหว่างปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) โดยพบว่าเกษตรกรหันมาเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมกันมากขึ้น เนื่องจากโตเร็ว แต่สำหรับผู้บริโภคยังมีความต้องการบริโภคปลาดุกอุย เนื่องจากรสชาติดีและเนื้อนุ่ม โดยผลผลิตปลาดุกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554 มีปริมาณ 95,375 ตันต่อปี (เรืองไร และคณะ, 2558)

แม้ว่าปลาดุกและปลาหมอไทยเป็นปลาที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจและสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นจำนวนมาก การเพาะเลี้ยงปลาเหล่านี้ให้ประสบความสำเร็จนั้นมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อาหาร คุณภาพน้ำ รวมทั้งปัญหาสิ่งแวดล้อมและการเกิดโรคติดเชื้อ โดยโรคติดเชื้อที่สำคัญและมักพบระหว่างการเพาะเลี้ยงปลาหมอไทยและปลาดุก ได้แก่ โรคติดเชื้อแบคทีเรียแอโรโมแนส (motile *Aeromonas* septicemia) (Angka *et al*., 1995) โรคหางและครีบกร่อน (tail and fin rot disease) (Rahman *et al*., 2010) โรค enteric septicemia of catfish (Suanyuk *et al*., 2014) และโรคสเตรปโตคอคโคซีส (streptococcosis) (Dung and Duy, 2013)

โรคสเตรปโตคอคโคซีสเป็นโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. เป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบหนาแน่น มีรายงานการเกิดโรคติดเชื้อชนิดนี้ในสัตว์น้ำหลายประเทศ เช่น สิงคโปร์ (Foo *et al*., 1985) ซาอุดิอาระเบีย (Al-harbi, 1994) สหรัฐอเมริกา (Perera *et al*., 1994; Shoemaker *et al*., 2000) สเปน (Domènech *et al*., 1996) ญี่ปุ่น (Nguyen *et al*., 2001; 2002) คูเวต (Evans *et al*., 2002) และออสเตรเลีย (Bromage *et al*., 1999) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสครั้งแรกในปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmoratus*) เมื่อปี พ.ศ. 2529 (จิราพรและคณะ, 2529) ต่อมามีรายงานพบโรคชนิดนี้ทั้งในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (สถาพร และเยาวนิตย์, 2530; เยาวนิตย์ และคณะ, 2543;

เฉลิมและคณะ, 2548; Suanyuk *et al*., 2010) และปลานิล (*Oreochromis* spp.) (Suanyuk *et al*., 2008; Suanyuk *et al*., 2010)

จากข้อมูลที่ศึกษาโดยกลุ่มผู้วิจัยเอง พบว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลากะพงขาว และปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทย มีสองชนิดหลัก ได้แก่ แบคทีเรีย *S. agalactiae* และ *S. iniae* โดยพบการระบาดของแบคทีเรีย *S. iniae* ในปลากะพงขาว ส่วนในปลานิลพบการระบาดของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในเกือบทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ และพบ *S. iniae* เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (นเรศและคณะ, 2548; Suanyuk *et al*., 2008; Suanyuk *et al*., 2010; Dangwetngam *et al*., 2016) จากการศึกษาและเก็บตัวอย่างอย่างต่อเนื่องโดยกลุ่มผู้วิจัย พบการตายของปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันในบ่อดินในฟาร์มของเกษตรกร อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช การศึกษาเบื้องต้นพบว่าปลาป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซีสซึ่งไม่เคยมีรายงานการเกิดโรคชนิดนี้ในปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันมาก่อนทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ดังนั้นเพื่อเป็นการรับมือกับปัญหาที่กำลังเกิดขึ้นและอาจเกิดขึ้นต่อไปอีกในอนาคต จึงจำเป็นต้องศึกษาชนิดและคุณสมบัติของแบคทีเรีย การแพร่กระจาย ความหลากหลายของเจ้าบ้านรวมทั้งการก่อโรคและความรุนแรงของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาทั้งสองชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาหมอไทยและปลาดุกอุย
2. เพื่อศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib รวมทั้งพยาธิสภาพของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อ
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib
4. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการติดเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทย
5. เพื่อศึกษาพยาธิวิทยาของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib
6. เพื่อศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib จากปลาดุกอุยสู่ปลิงใส *Gyrodactylus* sp.
7. เพื่อศึกษาถึงความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล
8. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib
9. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเลือดในปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1 ปลาหมอไทย

1.1 ชีววิทยาปลาหมอไทย

ปลาหมอไทย (Climbing Perch) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Anabas testudineus* (Bloch) มีการจัดลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Class Actinopterygii
Order Perciformes
Family Anabantidae
Genus *Anabas*
Species *testudineus* (Bloch)

รูปร่างลักษณะภายนอกของปลาหมอไทยมีลำตัวค่อนข้างแบน ลำตัวมีสีน้ำตาลดำหรือคล้ำ ส่วนท้องมีสีขาวหรือเหลืองอ่อน ลำตัวมีเกล็ดแข็ง กระพุ้งแก้มมีลักษณะเป็นหนามหยักแหลมคม ใช้ในการปีนป่าย บริเวณโคนหางมีจุดกลมสีดำ ปลาหมอไทยเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ส่วนท้องของเพศเมียจะอูมเป่ง ส่วนเพศผู้มีลักษณะลำตัวเรียวยาว (นฤมล, 2549)

1.2 แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

ปลาหมอไทยอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดทั่วๆไป ทั้งแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหล พบในแถบจีนตอนใต้ อินโดนีเซีย ไทย มาลายู พม่า อินเดีย ศรีลังกา ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย สามารถปรับตัวเจริญเติบโตเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำกร่อย ป่าจากหรือที่ลุ่มดินเค็มชายฝั่งทะเลที่มีความเค็มไม่เกิน 10 ส่วนในพัน และน้ำที่ค่อนข้างเป็นกรดจัด เช่น ป่าพรุ ตลอดจนมักฝังหรือหมกตัวในโคลนตมได้เป็นระยะเวลานานๆ จึงเป็นปลาที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เนื่องจากมีอวัยวะพิเศษช่วยการหายใจ มีเกล็ดหนาและแข็งปกคลุมทั่วตัว

2 ปลาดุกอุย

2.1 ชีววิทยาของปลาดุกอุย

ปลาดุกอุย (Günther's walking catfish) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias macrocepthalus* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน (สุภาพร, 2542) ดังนี้

Kingdom Animal
Phylum Chordata
Class Actinoptherygii

Order Siluridae

Family Siluriformes

Genus *Clarias*

Species *macrocephalus*

ในประเทศไทยพบว่ามีปลาดุกด้วยกัน 2 ชนิด คือ ปลาดุกอุย และปลาดุกด้าน ส่วนที่มาจากต่างประเทศ คือ ปลาดุกรัสเซียและปลาดุกบิ๊กอุย (คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542) ปัจจุบันพบว่าปลาดุกมีขายอยู่ตามท้องตลาดทั่วไปและมีราคาสูง เนื่องจากเป็นที่ต้องการของตลาด เลี้ยงง่าย โตเร็ว และทนต่อสภาพแวดล้อม จึงทำให้มีผู้สนใจในการเลี้ยงมากขึ้น โดยปลาดุกที่นิยมเลี้ยงกันมากคือ ปลาดุกลูกผสมหรือที่เรียกกันทั่วไปว่า "บิ๊กอุย" ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกรัสเซีย (ดุกยักษ์ หรือดุกเทศ) ซึ่งปลาดุกลูกผสมนี้จะเลี้ยงง่ายโตเร็ว และต้านทานโรคได้ดี (วิทย์ และคณะ, 2530) พบว่าใช้เวลาเลี้ยงเพียง 2-3 เดือน จึงสามารถจับขายได้ น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 5-6 ตัวต่อกิโลกรัม (พิชัย, 2551)

2.2 สรีรวิทยาของปลาดุก

ปลาดุกมีรูปร่างเรียวยาว ไม่มีเกล็ด มีอวัยวะช่วยหายใจลักษณะคล้ายพุ่มไม้สีขาวอยู่ภายในส่วนหัวเรียกว่า dendrite ซึ่งช่วยให้ปลาดุกมีความอดทน สามารถอยู่ในที่ไม่มีน้ำหรือมีน้ำน้อยๆ ได้นาน ตามีขนาดเล็กมาก มีหนวด 4 คู่อยู่ที่บริเวณปาก ซึ่งสามารถรับความรู้สึกได้ดี ปลาดุกจึงใช้หนวดมากกว่าใช้ตาในการหาอาหารตามพื้นดิน ครีบหลังยาวไม่มีกระโดง ครีบอกก้านแรกมีลักษณะยื่นแหลม และอาจมีหรือไม่มีลักษณะเป็นฟันเลื่อยก็ได้ ส่วนนี้ช่วยพยุงร่างกายให้เกาะอยู่ในสภาพต่างๆ ได้ดี ปลาดุกสามารถสร้างเสียงด้วยการเคลื่อนไหวของครีบ ทำให้เกิดการกระทบกันของข้อต่อหรือการเคลื่อนไหวของถุงลม

ปลาดุกชอบหากินตามหน้าดิน มีนิสัยว่องไว สามารถอยู่บนบกได้นานกว่าปลาชนิดอื่นๆ รวมถึงสามารถอาศัยอยู่ในดิน โคลน เลน และในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำได้นาน เนื่องจากมีอวัยวะพิเศษช่วยในการหายใจ อาหารที่ปลาดุกชอบกินส่วนมากเป็นอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ แต่ถ้านำมาเลี้ยงในบ่อก็สามารถฝึกให้กินอาหารจำพวกพืชได้ รวมถึงสามารถฝึกนิสัยให้ปลาดุกขึ้นมากินอาหารบริเวณผิวน้ำแทนการหาอาหารตามหน้าดินได้ (คณิต, 2543)

3 โรคสเตรปโตคอคโคซีส (Streptococcosis)

โรคสเตรปโตคอคโคซีสเป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก โรคชนิดนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในปลาเรนโบว์ เทร้าท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1957 (Hoshina *et al*., 1958) ต่อมาพบโรคชนิดนี้ในปลาหลายชนิดทั่วโลก ทั้งในปลาทะเลและปลาน้ำจืด รวมทั้งสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น กบ (Teska and Shotts, 1994) และปลาไหล (Kusuda *et al*.,1978) โรคติดเชื้อชนิดนี้มีความรุนแรงค่อนข้างสูง มีรายงานว่าโรคสเตรปโตคอคโคซีสที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. iniae* ทำให้ปลาที่เลี้ยงตายได้มากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Eldar *et al*., 1994 อ้างโดย Dodson *et al*., 1999) หรือมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในระบบปิด (Perera *et al*., 1994) โดยโรคติดเชื้อชนิดนี้สามารถติดต่อผ่านทางการกินบาดแผล หรือโดยการฉีด (Evans *et al*., 2000)

ประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสครั้งแรกในปลาบู่ทรายที่เลี้ยงในจังหวัดอยุธยา ชัยนาท และนครสวรรค์ (จิราพร และคณะ, 2529) ต่อมามีรายงานการพบโรคนี้อีกครั้งในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เลี้ยงในจังหวัดปัตตานีและสงขลาในปี พ.ศ. 2530 โดยสถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา (สถาพร และเยาวนิตย์, 2530) หลังจากนั้นเป็นต้นมา การระบาดของโรคนี้ยังคงเกิดขึ้นอย่าง

ต่อเนื่องในปลากะพงขาวและปลานิลที่เลี้ยงบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดปัตตานี สงขลา นครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี รวมทั้งพื้นที่อื่นๆ ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย

การเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลามีผลทำให้เกิดเลือดออกบริเวณตาหรืออวัยวะภายใน โรคนี้ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นแบบฉับพลัน (acute) โดยจะแพร่กระจายเข้าสู่ปลาภายใน 48 – 72 ชั่วโมง และจะพบการตายภายใน 4 – 5 วัน หลังการติดเชื้อ และอาจจะเกิดในลักษณะเรื้อรัง (chronic) อาการของโรคที่เกิดขึ้นในปลาจะปรากฏให้เห็นภายนอก ส่วนใหญ่ปลาที่ป่วยจะมีอาการว่ายน้ำควงสว่าน เสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำ ตาโปนข้างเดียวหรือ 2 ข้าง ตาขุ่น ท้องบวม เกิดการอักเสบบริเวณ dorsal-lateral portion ของลำตัว พบเลือดออกบริเวณตา กระพุ้งแก้ม โคนครีบ รอบปาก ลำตัว และเกิดแผลบริเวณผิวของลำตัว (Austin and Austin, 1987; Plumb,1994) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ส่วนใหญ่จะมีผลต่อตา ซึ่งสามารถพบได้บ่อยมาก โดยการเกิดบาดแผลบริเวณตาจะเป็นผลมาจากการคั่งของเลือดบริเวณหลังลูกตาและมีการบวมน้ำ (oedema) แต่จะมีการอักเสบมากขึ้น และเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณเส้นประสาทตา (optic nerve) และโครอยด์ (choroid) พบเบ้าตา (orbit) ขยายกว้างในตาที่เกิดเลือดคั่ง ซึ่งเกิดจากการมีเลือดออกบริเวณส่วนของวุ้นใสที่อยู่ในเบ้าตา ต่อมาจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณกระจกตา และเกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อตา ทำให้เกิดแผลบริเวณแก้วตา (cornea) (Kitao, 1993)

Streptococcus spp. เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ก่อโรคได้ในคน มีรายงานการเกิดโรคชนิดนี้ในคนป่วยซึ่งอาจได้รับเชื้อมาจากปลา โดย Weinstein และคณะ (1996) อ้างโดย Dodson และคณะ (1999) พบเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* จากบาดแผลของผู้ป่วยที่เกิดขึ้นในขณะสัมผัสกับปลา และยังพบว่าเมื่อทำการสำรวจคนไข้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบบุคคลเหล่านี้มักจะมีความเกี่ยวข้องกับปลานิล นอกจากนี้ Teska และ Shotts (1994) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ non - haemolytic group B *Streptococcus* จำนวน 16 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากปลา กบ และมนุษย์ และศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อทั้งหมดในปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) พบว่าเชื้อทั้งหมดมีลักษณะทางฟีโนไทป์เหมือนกันมาก และสามารถทำให้ปลากดอเมริกันตายได้ ซึ่งจากการทดลองข้างต้นนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้อาจจะสามารถถ่ายทอดระหว่างสัตว์กับมนุษย์ได้

3.1 แบคทีเรีย *Streptococcus* spp.

แบคทีเรีย *Streptococcus* spp. จัดจำแนกอยู่ในครอบครัว Streptococcaceae ลักษณะเซลล์เป็นรูปกลม แกรมบวก อาจเรียงตัวเป็นคู่ เป็นสาย หรือสี่เซลล์ติดกัน สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ ไม่สามารถเคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ได้น้อยมาก ไม่สร้างเอนโดสปอร์ สามารถผลิตกรดแลกติค อะซิติก ฟอร์มิก และผลิตเอธทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์จากคาร์โบไฮเดรตได้ (Buchanan and Gibbons, 1974) สำหรับชนิดของแบคทีเรียในครอบครัวนี้มีเป็นจำนวนมาก แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ เช่น *S. agalactiae, S. iniae, S. parauberis* และ *S. equisimilis*

3.2 การป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซีส

ปัจจุบันมีรายงานพบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในสัตว์น้ำมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น nalidixic acid, polymycin B, metronidazole และ furazolidine จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาเทคนิคการควบคุมและการป้องกัน เช่นการใช้วัคซีน โดยในต่างประเทศมีการทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคชนิดนี้ เช่น Sakai และคณะ (1987) ทดลองใช้วัคซีนที่ผลิตจาก beta-haemolytic *Streptococcus* sp. โดยวิธีฆ่าด้วยฟอร์มาลิน (Formalin killed) เพื่อป้องกันโรคสเตรปโต

คอคโคซีส ในปลาเรนโบว์ เทร้าท์ (*Salmo gairdneri*) โดยใช้วิธีการแช่ (immersion) นาน 3 นาที แล้วทดสอบความต้านทานเชื้อโดยการฉีดแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. เข้าช่องท้อง (intraperitoneal) พบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตรารอดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ หลังจากฉีดเชื้อ 10 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Sakai และคณะ (1995) ที่รายงานว่าการฉีดวัคซีนป้องกันโรค สามารถที่จะใช้ได้ผลในปลาเรนโบว์ เทร้าท์ (*Oncorhynchus mykiss*)

Pelacios และคณะ (1993) ใช้วัคซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ชนิดฆ่าด้วยฟอร์มาลินเพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาเรนโบว์ เทร้าท์ ขนาดประมาณ 30-50 กรัม ทั้งในห้องปฏิบัติการและในฟาร์ม พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนสามารถต้านทานต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าประสิทธิภาพของวัคซีนจะขึ้นกับวิธีการให้วัคซีนด้วย

Eldar และคณะ (1997) ใช้วัคซีนชนิด Formalin killed เพื่อต้านทานเชื้อ *S. iniae* ในฟาร์มปลาเรนโบว์ เทร้าท์ โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลาสามารถผลิตแอนติ้บอดี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนจะมีอัตราการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาที่ได้รับวัคซีนจะมีอัตราการตายน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์

Suwannasang และคณะ (2017) ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และซีโรไทป์ III ในปลานิล พบว่าวัคซีนที่ผลิตได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อซีโรไทป์ของแบคทีเรีย โดยปลานิลที่ได้รับวัคซีนแต่ละชนิดมีอัตรารอดสูง เมื่อทดสอบความต้านทานโรคโดยการฉีดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์เดียวกับที่นำมาผลิตวัคซีน แต่ปลานิลจะมีอัตรารอดต่ำเมื่อทดสอบความต้านทานโรคโดยใช้แบคทีเรีย *S. agalactiae* ต่างซีโรไทป์กับที่นำมาผลิตเป็นวัคซีนให้ปลานิล นอกจากนี้ Suwannasang และคณะ (2017) ยังทดลองใช้วัคซีนผสมที่ผลิตจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทั้งสองซีโรไทป์ และพบว่าวัคซีนที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพดี ทำให้ปลามีความต้านทานต่อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทั้งสองซีโรไทป์ได้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลาป่วย

Test	Foo และคณะ (1985)	Perera และคณะ (1994)	Bromage และคณะ (1999)	เยาวนิตย์และคณะ (2543)	Evans และคณะ (2002)
Source	Rabbit fish	Tilapia	Sea bass	Sea bass	Sea bream and mullet
Gram staining reaction	+	+	+	+	+
Cell morphology	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Catalase production	-	-	-	-	-
Oxidase production	-		-	-	-
Haemolysis	α	β	β	β	β
Growth in:					
- 0.1% Methylene blue milk	+		+		
Tolerance of:					
- pH 9.6	+	-	-	-	
- 6.5% NaCl	+	-	-	-	
- temp 10°C	+	+	-	-	-
- temp 45°C	-	+	-	-	
Hydrolysis of:					
- Gelatin	-	-			
- Starch	+	+	+	+	
- Hippurate	-	-	-		+
- Esculin	+	-	+	+	
- Arginine		+	+	+	+
Decarboxylation of:					
- Lysine	-				
- Ornithine	-				
- PYRA	+	+	+	+	+
- α- Galactosidase	-		-		+
- β- Glucuronidase	+		+		-
- β- Galactosidase	-		-		+
- Alkaline phosphatase	+		+		+
- Leucine aminopeptidase	+		+		+
Acid production from:					
- Ribose	+		+		+
- Arabinose	-	-	-	-	
- Mannitol	+	+	+	+	
- Sorbitol	-	-	-		
- Lactose	-	-	-	-	+
- Trehalose	+	+	+	+	+
- Inulin	-	-	-		
- Raffinose	-	-	-		
- Glucose	+	+	+	+	
- Sucrose	+	+	+	+	+
- Maltose	+	+		+	+
Species	*S. faecalis* or *S. faecium*	*S. iniae*	*S. iniae*	*S. suis*	*S. agalactiae*

บทที่ 3

Streptococcus agalactiae ซีโรไทป์ Ib แบคทีเรียอุบัติใหม่ที่ก่อโรคในปลาหมอไทยและปลาดุกอุย ที่เลี้ยงร่วมกันในบ่อดินในภาคใต้ของประเทศไทย

1. บทนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจัดเป็นกิจกรรมทางการเกษตรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศและขยายตัวอย่างรวดเร็วในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของผลผลิตสัตว์น้ำที่จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และผลของการขยายความต้องการของผลผลิตทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ ส่งผลให้เกิดการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลากหลายชนิด เพื่อทดแทนผลผลิตสัตว์น้ำที่จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีผลผลิตสัตว์น้ำที่สำคัญของโลก ประกอบด้วยสัตว์น้ำที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง โดยในปี พ.ศ. 2551 ประเทศไทยมีผลผลิตสัตว์น้ำประมาณ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ของโลก และประมาณ 46.67 เปอร์เซ็นต์ ของภูมิภาคอาเซียน (กรมควบคุมมลพิษ, 2554; เรืองไร และคณะ, 2558) เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาด เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่จึงหันมาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบหนาแน่น (intensive culture system) กันมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบนี้ให้ประสบความสำเร็จ เกษตรกรจำเป็นต้องมีการจัดการฟาร์มที่ดี เพื่อป้องกันปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพสัตว์น้ำ เช่น การเกิดโรคที่อาจเกิดขึ้นตามมาในภายหลัง โดยโรคสัตว์น้ำที่สำคัญในสัตว์น้ำ ได้แก่ โรคติดเชื้อไวรัส ปรสิต รา และแบคทีเรีย

โรคสเตรปโตคอคโคซีส (streptococcosis) เป็นโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. โรคชนิดนี้สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบหนาแน่น มีรายงานการเกิดโรคติดเชื้อชนิดนี้ในสัตว์น้ำหลายประเทศทั่วโลก เช่น สิงคโปร์ (Foo *et al*., 1985) ซาอุดิอาระเบีย (Al-harbi, 1994) สหรัฐอเมริกา (Perera *et al*., 1994; Shoemaker *et al*., 2000) สเปน (Domènech *et al*., 1996) ออสเตรเลีย (Bromage *et al*., 1999; Bowater *et al*., 2012) ญี่ปุ่น (Nguyen *et al*., 2001; 2002) คูเวต (Evans *et al*., 2002) และจีน (Li *et al*., 2013; Liu *et al*., 2014) ในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmoratus*) (จิราพร และคณะ, 2529) ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (สถาพร และเยาวนิตย์, 2530; เยาวนิตย์ และคณะ, 2543; เฉลิม และคณะ, 2548) และปลานิล (กิจการ และคณะ, 2549; Suanyuk *et al*., 2008; Suanyuk *et al*., 2010; Dangwetngam *et al*., 2016)

ปัจจุบันโรคสเตรปโตคอคโคซีสที่พบในปลากะพงขาวและปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* spp. สองชนิด ได้แก่ *S. agalactiae* และ *S. iniae* โดยพบการระบาดของแบคทีเรีย *S. iniae* ในปลากะพงขาว ส่วนในปลานิลพบการระบาดของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในเกือบทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ และพบ *S. iniae* เพียงเล็กน้อย (นเรศ และคณะ, 2548; กิจการและคณะ, 2549; Suanyuk *et al*., 2008; Suanyuk *et al*., 2010) อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2554 ถึงปี พ.ศ. 2558 พบการตายของปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันในบ่อดินในฟาร์มของเกษตรกร บริเวณอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช การศึกษาเบื้องต้นพบว่าปลาป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซีสซึ่งไม่เคยมีรายงานการเกิดโรคชนิดนี้ในปลาหมอไทยและปลาดุกอุยมาก่อนในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อเป็นการรับมือกับปัญหาที่กำลังเกิดขึ้นและอาจเกิดขึ้นต่อไปอีกในอนาคต จึงจำเป็นต้องศึกษาชนิดของแบคทีเรีย รวมทั้งการก่อโรคและความรุนแรงของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลา เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

2. วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างปลาป่วยและการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วยจากฟาร์มเลี้ยงปลาของเกษตรกร อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช มาบันทึกอาการของปลาป่วยอย่างละเอียดรวมทั้งวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้นได้แก่ ชนิดของแพลงก์ตอน ความเค็ม ความเป็นด่างทั้งหมด และความเป็นกรด-ด่าง โดยวิธีมาตรฐาน (Boyd and Tucker, 1992; APHA *et al*., 1998) จากนั้นแยกเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อตับ ไต ม้าม และสมอง ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) แล้วนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร สุ่มเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ มาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาของเชื้อ จากนั้นนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส และนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ที่ผสมกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา กายภาพ ชีวเคมี และซีรั่มวิทยา

คัดเลือกแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาป่วยโดยการสุ่มให้ครอบคลุมทุกฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง นำมาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือด การสร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส การทดสอบ VP, Hippurate, Esculin, Arginine การสร้างเอนไซม์ Decarboxylase การผลิต Pyrrolidonylarylamidase, α-Galactosidase, β-Glucuronidase, β-Galactosidase, Alkaline phosphatase, Leucine arylamidase ความสามารถในการหมัก Ribose, Arabinose, Mannitol, Sorbitol, Lactose, Trehalose, Inulin, Raffinose, Starch และ Glycogen

ทดสอบคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ได้แก่ การทดสอบ Lancefield serogrouping โดยใช้ชุดทดสอบ SLIDEX Strep Plus (bioMérieux, France) และจำแนกซีโรไทป์ของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ Group B streptococci typing antisera (Denka Seiken Co. Ltd., Japan)

นำข้อมูลที่ได้มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้โปรแกรม APILABPLUS (bioMérieux, France) ร่วมกับตำรา Bergey's manual for determinative bacteriology (Hardie, 1986)

3. การยืนยันชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วยที่บริสุทธิ์จำนวน 126 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Berridge และคณะ (1998) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานต่อไป

3.2 ยีนเป้าหมาย ไพรเมอร์และสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

การทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ F1 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ IMOD (5'-ACCAACATGTGTTAATTACTC-3') ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* (Martinez *et al*., 2001) ที่ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดประกอบด้วย Red Dye PCR MasterMix (GeNei ™) ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิด (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5

ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนต่างๆ ด้วยเครื่อง Thermal cyclers ภายใต้สภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที; denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยใช้แบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-ST81 ซีโรไทป์ Ia และแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-ST87 ซีโรไทป์ III เป็นแบคทีเรียเปรียบเทียบ เมื่อได้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากการทำ PCR นำไปตรวจสอบโดยใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซีสใน agarose gel เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ TBE (90 mM Tris, 90 mM borate and 2 mM ethlylenediaminetetraacetic acid, pH 8) และใช้ DNA molecular weight ขนาด 100 คู่เบส (Biolabs Inc., New England) เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำเจลไปย้อมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบแถบสีที่ปรากฏเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานภายใต้แสงอัตราไวโอเลต

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rDNA* และการทำ Phylogenetic analysis

วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rDNA* ทำโดยการสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการ phenol-chloroform (Ausubel *et al*., 1999) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *16S rDNA* โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 20F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ 1500R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg *et al*., 1991) ที่ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดประกอบด้วย Red Dye PCR MasterMix (GeNei ^{TM}) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิด (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนต่างๆ ด้วยเครื่อง Thermal cyclers ภายใต้สภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที; denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบโดยโดยใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซีสใน agarose gel เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ TBE และใช้ DNA molecular weight ขนาด 100 คู่เบส (Biolabs Inc., New England) เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit (Qiagen) และวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 20F และ 1500R เป็นไพรเมอร์ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, http://www.ncbi.nlm.nig.gov) และทำการวิเคราะห์ phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package

5. การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae*

ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาป่วยแต่ละฟาร์ม จำนวน 8 ไอโซเลต (ปลาหมอไทยป่วยจำนวน 6 ไอโซเลต และปลาดุกอุยป่วยจำนวน 2 ไอโซเลต) เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-ST81 ซีโรไทป์ Ia และแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-ST87 ซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลป่วย (Suanyuk *et al*., 2008) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วยตามวิธีการของ Granlund และคณะ (2001) และใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน ได้แก่ *bca*, *lmb*, *scpB*, *bac* และ group II intron GBSi1 (ตารางที่ 2)

โดยยีน *bca* ถอดรหัสเป็นโปรตีน Cα ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบุกรุกเซลล์เยื่อบุ (Baron *et al*., 2007) ยีน *bac* ถอดรหัสเป็นโปรตีน Cβ ทำหน้าที่จับกับ IgA ของมนุษย์ที่ตำแหน่ง Fc และมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อเมือก (Berner *et al*., 2002) ยีน *lmb* ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสื่อกลางให้แบคทีเรีย *S. agalactiae* จับกับลามินิน รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและการทำลายเยื่อบุผิวของเจ้าบ้าน (Spellerberg *et al*., 1999) ยีน *scpB* ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ C5a peptidase ซึ่งทำหน้าที่ตัด C5a และเชื่อมกับไฟโบรเนคติน (fibronectin) (Beckman *et al*., 2002) และยีน GBSi1 ซึ่งเป็น group II intron มีตำแหน่งถัดจากยีน *scpB* (Granlund *et al*., 2001; Al Safadi *et al*., 2010)

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจโดยใช้เครื่อง MJ Mini™ thermal cycler (Bio-Rad) โดยใช้ RBC Blue *Tag* Mastermix (RBC Bioscience) ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิด (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร สำหรับยีน *bca, scpB, bac* และ *GBSi1* ควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สำหรับยีน *lmb* ควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จะนำไปตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสใน agarose gel เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ TBE และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย ethidium bromide และใช้ DNA molecular weight ขนาด 100 คู่เบส (GeneDirex®) เป็นแถบมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์และยีนเป้าหมายที่ใช้สำหรับการเปรียบเทียบยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วย

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ยีนเป้าหมาย	PCR amplicon (คู่เบส)	อ้างอิง
bca F	CAGGAGGGGAAACAACAGTAC	*Bca*	184	Dmitriev และคณะ (1999)
bca R	GTATCCTTTGATCCATCTGGATACG			
lmb F	ACCGTCTGAAATGATGTGG	*Lmb*	572	Jain และคณะ (2012)
lmb R	GATTGACGTTGTCTTCTGC			
scpB F	ACAATGGAAGGCGCTACTGTTC	*ScpB*	255	Dmitriev และคณะ (1999)
scpB R	ACCTGGTGTTTGACCTGAACTA			
bac F	TGTAAAGGACGATAGTGTGAAGAC	*Bac*	530	Dmitriev และคณะ (2002)
bac R	CATTTGTGATTCCCTTTTGC			
GBSi1F	CGAGTGGATTGTGGACATTG	GBSi1	197	Bidet และคณะ (2003)
GBSi1R	GTGATAGATTCCCGCCTTGA			

6. การศึกษารูปแบบดีเอนเอของแบคทีเรียโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ศึกษารูปแบบดีเอนเอของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาป่วยแต่ละฟาร์ม จำนวน 8 ไอโซเลต (ปลาหมอไทยป่วยจำนวน 6 ไอโซเลต และปลาดุกอุยป่วยจำนวน 2 ไอโซเลต) เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-ST81 ซีโรไทป์ Ia และแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-ST87 ซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลป่วย (Suanyuk *et al*., 2008) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียตามวิธีการของ Granlund และคณะ (2001) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *16S rDNA* โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 20F และ 1500R (Weisburg *et al*., 1991) ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบรูปแบบของดีเอนเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III (5'-GGCC-3') ตามวิธีการที่ระบุในเอกสาร (Thermo Scientific) ก่อนนำดีเอนเอที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสใน agarose gel เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TBE และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย ethidium bromide และใช้ DNA molecular weight ขนาด 100 คู่เบส (GeneDirex®) เป็นแถบมาตรฐาน

7. การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Disc diffusion method

ทดสอบความไวของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Disc diffusion method (CLSI, 2012) โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากปลาป่วยแต่ละฟาร์มจำนวน 20 ไอโซเลต ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTSA มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความทึบแสงเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 แล้วใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายที่เตรียมไว้ นำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar ที่ผสมเม็ดเลือดแดงแกะ 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ และนำแผ่นยาปฏิชีวนะ (Oxoid) ชนิดต่างๆ ทั้งที่อนุญาตและไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ออกโซลินิค แอซิด (Oxolinic acid: 2 µg) ซัลฟาเมธทอกซาโซล/ไตรเมโธพริม (Sulfamethoxazole /Trimethoprim: 25 µg) อิริโทรมัยซิน (Erythromycin: 15 µg) คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol: 30 µg), ลินโคมัยซิน (Lincomycin: 2 µg) ออกซี่เตตร้าซัยคลิน (Oxytetracycline: 30 µg) นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin 10 µg) แอมพิซิลลิน (Ampicillin: 10 µg) และซิโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin: 5 µg) วางบนอาหารที่เกลี่ยสารละลายแบคทีเรีย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ก่อนวัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น แปลผลเป็นแบคทีเรียดื้อยา ปานกลาง หรือไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยการเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (CLSI, 2012) โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *S. aureus* ATCC25923 เป็นแบคทีเรียควบคุม

8. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาหมอไทย

อนุบาลลูกปลาหมอไทยที่ซื้อมาจากฟาร์มเลี้ยงปลาในจังหวัดนครศรีธรรมราช ตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014) โดยนำลูกปลาน้ำหนักประมาณ 3 กรัม มาอนุบาลในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 0.33 ตัวต่อลิตร และถ่ายน้ำ 2 วันต่อครั้ง ในปริมาตร 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำทั้งหมด ระหว่างการเลี้ยงให้อาหารวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) โดยให้ปลากินจนอิ่ม ก่อนการทดลอง สุ่มปลามาตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. โดยนำตับ ไต และสมองของปลามาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง โดยต้องไม่พบแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำแบคทีเรีย *S. agalactiae* บริสุทธิ์ที่คัดเลือกจากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วยจากแต่ละฟาร์ม จำนวน 20 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคตามวิธีการที่ดัดแปลงจากเฉลิมและคณะ (2548) โดยเลี้ยงปลาหมอไทยน้ำหนักเฉลี่ย 24.25±3.84 กรัม ในถังไฟเบอร์ขนาด 45x60x45 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำ 60 ลิตร จำนวน 21 ถังๆ ละ 5 ตัว เป็นเวลานานอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง จากนั้นเลี้ยงแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง และแยกเซลล์แบคทีเรียโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ก่อนละลายด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) ปรับความเข้มข้นปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลา (intraperitoneal injection) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 25Gx1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ชุดควบคุมฉีดปลาด้วยสารละลาย PBS เข้าช่องท้องปลาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สังเกตอาการและบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน ยืนยันสาเหตุการตายของปลาโดยนำปลาใกล้ตายหรือตายใหม่ๆ มาเพาะเชื้อจาก ตับ ไต และสมอง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง และจำแนกชนิดเชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมกับชุดทดสอบ API20 STREP วัดระดับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* แต่ละไอโซเลตโดยกำหนดให้แบคทีเรียมีความรุนแรงสูง (strongly virulent) เมื่อทำให้ปลาตายอย่างน้อย 4 ตัว แบคทีเรียมีความรุนแรง (virulent) เมื่อทำให้ปลาตาย 2-3 ตัว แบคทีเรียมีความรุนแรงต่ำ (weakly virulent) เมื่อทำให้ปลาตาย 1 ตัว และแบคทีเรียไม่มีความรุนแรง (avirulent) เมื่อไม่พบการตายของปลา แบคทีเรียที่มีความรุนแรงสูงสุดจะถูกนำไปใช้สำหรับการทดลองต่อไป

9. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน (Humason, 1979) และนำตัวอย่างปลาที่แสดงอาการของโรคชัดเจนจากการทดลองรวมทั้งที่เก็บได้จากธรรมชาติ มาตัดตับ ไต สมอง ม้ามและเหงือก ดองในฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงนำอวัยวะทั้งหมดมาผ่านขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่อง Automatic Tissue Processor (Autotechnicon MonoMOD. 2A) โดยผ่านระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ จาก 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ แล้วผ่านลงในไอโซโพรพิลและไซลีน และฝังในพาราพลาส แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (Jung AG Heidelberg) หนา 3 – 5 ไมครอน ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (H&E) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, AX70) และถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD (Olympus, DP71)

3. ผลการทดลอง

1. ตัวอย่างปลาป่วยและการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วยที่เลี้ยงในบ่อดิน อ. สิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2554 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2558 (ตารางที่ 3) โดยสามารถแยกแบคทีเรียได้เจริญค่อนข้างบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และคัดเลือกได้จำนวน 126 ไอโซเลต อาการของปลาหมอไทยป่วยที่พบ ได้แก่ ครีบกร่อน เลือดออกบริเวณลำตัว รูทวารและครีบ ตับซีด ท้องบวม และมีน้ำขังในช่องท้อง ส่วนปลาดุกอุยป่วยมีแผลถลอกบริเวณลำตัว และตับซีด (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 3 การเก็บตัวอย่างปลาป่วยที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

วันที่	สถานที่ (จำนวนฟาร์ม)	ปลา	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลต)	ระบบการเลี้ยง
20 ตุลาคม 2554	อ. สิชล จ. นครศรีธรรมราช (2)	ปลาหมอไทย ปลาดุกอุย	41 13	บ่อดิน
26 ตุลาคม 2554	อ. สิชล จ. นครศรีธรรมราช (1)	ปลาหมอไทย ปลาดุกอุย	21 1	บ่อดิน
6 สิงหาคม 2555	อ. สิชล จ. นครศรีธรรมราช (3)	ปลาหมอไทย	38	บ่อดิน
29 พฤษภาคม 2558	อ. สิชล จ. นครศรีธรรมราช (1)	ปลาหมอไทย ปลาดุกอุย	9 3	บ่อดิน

ภาพที่ 1 อาการของปลาหมอไทย (บน) และปลาดุกอุย (ล่างซ้าย) ที่ป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซีสและแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. (ล่างขวา) จำนวนมากที่แยกได้จากตับ ไตและสมองของปลาป่วย

2. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา กายภาพและชีวเคมี

การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา กายภาพและชีวเคมี จากแบคทีเรียที่สุ่มเลือกจากแต่ละฟาร์ม พบแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ติดสีแกรมบวก รูปกลม เรียงตัวต่อกันเป็นโซ่ การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตาเลสให้ผลเป็นลบ และไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแกะได้ (γ-haemolysis) การทดสอบ Lancefield serogrouping พบเป็นกลุ่ม B และจำแนกซีโรไทป์เป็นซีโรไทป์ Ib คุณสมบัติอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 การจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีพบเป็นแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib

3. การยืนยันชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR

การใช้เทคนิค PCR เพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วยพบแถบขนาด 220 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยเทคนิค PCR สามารถยืนยันชนิดของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทั้ง 126 ไอโซเลตที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วย รวมทั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากปลานิล (ภาพที่ 2)

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rDNA* และการทำ Phylogenetic analysis

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rDNA* โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 20F และ 1500R แสดงดังภาพที่ 3 พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้ มีลำดับเบสเหมือนกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* FO393392 *S. agalactiae* CP007482 *S. agalactiae* HF952106 และ *S. agalactiae* HG939456 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ การทำ Phylogenetic tree บนพื้นฐานของยีน *16S rDNA* จึงสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 อยู่ในกลุ่มเดียวกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* FO393392 *S. agalactiae* CP007482 *S. agalactiae* HF952106 และ *S. agalactiae* HG939456 (ภาพที่ 4)

5. การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae*

การศึกษาจีโนไทป์ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย พบเพียงยีน *bca* และไม่พบยีน *bac,* GBSi1, *scpB* และ *lmb* จากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย แตกต่างจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลที่พบยีน *bca, bac* และ GBSi1 จากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และพบยีน *bca*, *scpB* และ *lmb* จากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III (ภาพที่ 2)

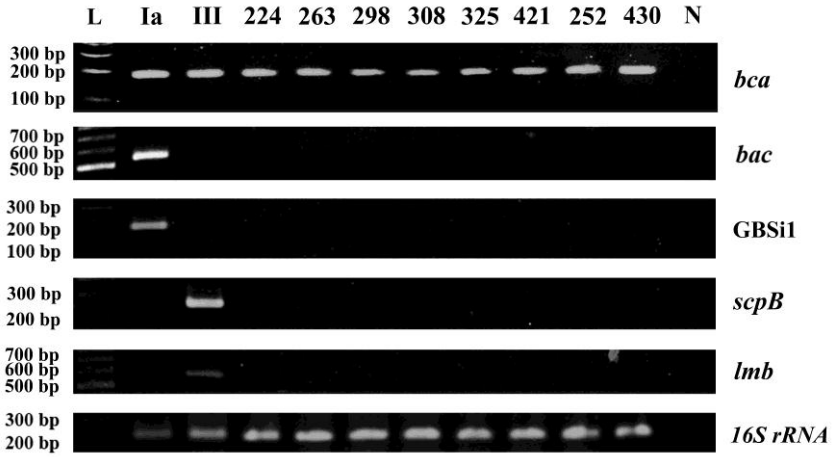
6. การศึกษารูปแบบดีเอนเอของแบคทีเรียโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

การศึกษารูปแบบดีเอนเอของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III พบแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไปท์ Ia และ III ที่แยกได้จากปลานิล มีรูปแบบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีรั่มวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วย

Test	Present isolates		*S.difficile**	Test	Present isolates		*S.difficile**
	Climbing perch (n= 16)	Günther's walking catfish (n=4)			Climbing perch (n= 16)	Günther's walking catfish (n=4)	
Gram staining reaction	+	+	+	Alkaline phosphatase	+	+	+
Cell morphology	Cocci	Cocci	Cocci	Leucine aminopeptidase	+	+	+
Catalase	-	-	-	Arginine dihydrolase	+	+	+
Oxidase	-	-	nt	Acid production from			
Serogroup	B	B	nt	- Ribose	-	-	+
Serotype	Ib	Ib	nt	- Arabinose	-	-	-
Haemolysis	ϒ	ϒ	ϒ	- Mannitol	-	-	-
VP test	+	+	+	- Sorbital	-	-	-
Hippurate	+	+	-	- Lactose	-	-	-
Esculin	-	-	-	- Trehalose	-	-	-
Pyrrolidonyl arylamidase	-	-	-	- Inulin	-	-	-
α-Galactosidase	-	-	-	- Raffinose	-	-	-
β-Glucuronidase	+	+	-	- Starch	-	-	-
β-Galactosidase	-	-	-	- Glycogen	-	-	-

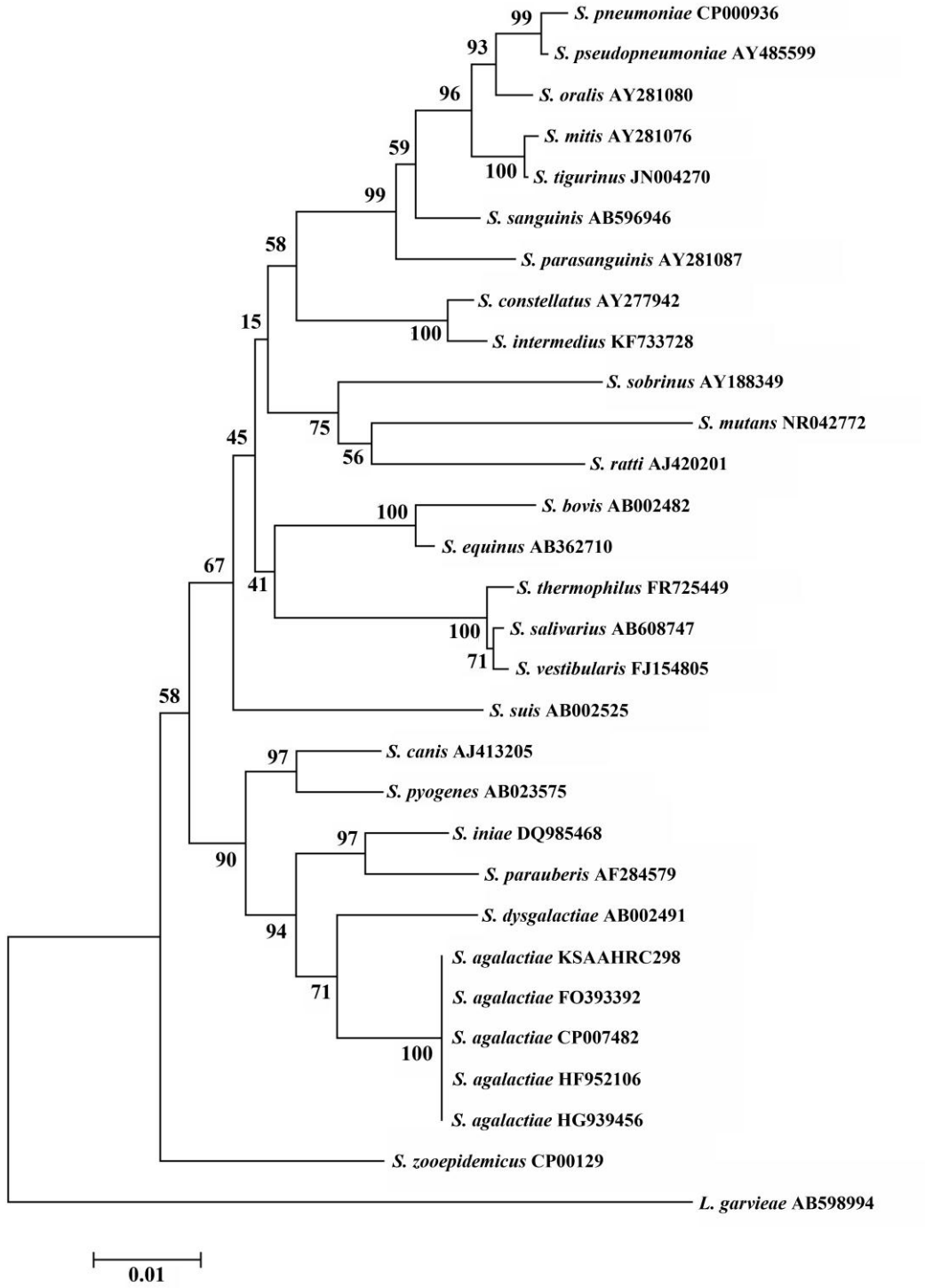
Eldar และคณะ (1994)



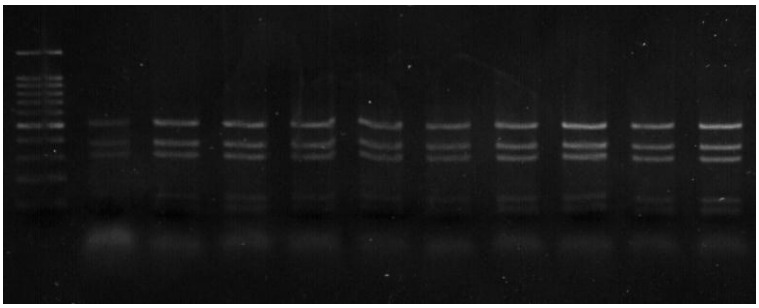
ภาพที่ 2 ผล PCR ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bca, lmb, scpB, bac,* GBSi1 และ *16s rRNA* L; 100 bp DNA ladder, Ia; *S. agalactiae* serotype Ia, III; *S. agalactiae* serotype III, 224, 263, 298, 308, 325 และ 421; *S.agalactiae* serotype Ib จากปลาหมอไทย, 252 และ 430; *S. agalactiae* serotype Ib จากปลาดุกอุย, N; Negative control (DDW)

TTGCGAACGG GTGAGTAACG CGTAGGTAAC CTGCCTCATA GCGGGGGATA ACTATTGGAA
ACGATAGCTA ATACCGCATA AGAGTAATTA ACACATGTTA GTTATTTAAA AGGAGCAATT
GCTTCACTGT GAGATGGACC TGCGTTGTAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAA GGCTCACCAA
GGCGACGATA CATAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC
CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCGGCAA TGGACGGAAG TCTGACCGAG
CAACGCCGCG TGAGTGAAGA AGGTTTTCGG ATCGTAAAGC TCTGTTGTTA GAGAAGAACG
TTGGTAGGAG TGGAAAATCT ACCAAGTGAC GGTAACTAAC CAGAAAGGGA CGGCTAACTA
CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGTC CGAGCGTTG TCCGGATTTA TTGGGCGTAA
AGCGAGCGCA GGCGGTTCTT TAAGTCTGAA GTTAAAGGCA GTGGCTTAAC CATTGTACGC
TTTGGAAACT GGAGGACTTG AGTGCAGAAG GGGAGAGTGG AATTCCATGT GTAGCGGTGA
AATGCGTAGA TATATGGAGG AACACCGGTG GCGAAAGCGG CTCTCTGGTC TGTAACTGAC
GCTGAGGCTC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA
AACGATGAGT GCTAGGTGTT AGGCCCTTTC CGGGGCTTAG TGCCGCAGCT AACGCATTAA
GCACTCCGCC TGGGGAGTAC GACCGCAAGG TTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG
CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCAACGCG AAGAACCTTA CCAGGTCTTG
ACATCCTTCT GACCGGCCTA GAGATAGGCT TTCTCTTCGG AGCAGAAGTG ACAGGTGGTG
CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC
CCTATTGTTA GTTGCCATCA TTAAGTTGGG CACTCTAGCG AGACTGCCGG TAATAAACCG
GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
TACAATGGTT GGTACAACGA GTCGCAAGCC GGTGACGGCA AGCTAATCTC TTAAAGCCAA
TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC
GGATCAGCAC GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAC
GAGAGTTTGT AACACC

ภาพที่ 3 ลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาป่วย



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree บนฐานของลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาป่วย (*S. agalactiae* KSAAHRC-298) เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จากฐานข้อมูล Genbank



ภาพที่ 5 รูปแบบดีเอนเอของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III Lane 1; 100 bp DNA ladder, Lane 2; *S. agalactiae* serotype Ia, Lane 3; *S. agalactiae* serotype III, Lane 4-9; *S.agalactiae* serotype Ib จากปลาหมอไทย, Lane 10-11; *S. agalactiae* serotype Ib จากปลาดุกอุย

7. การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Disc diffusion method

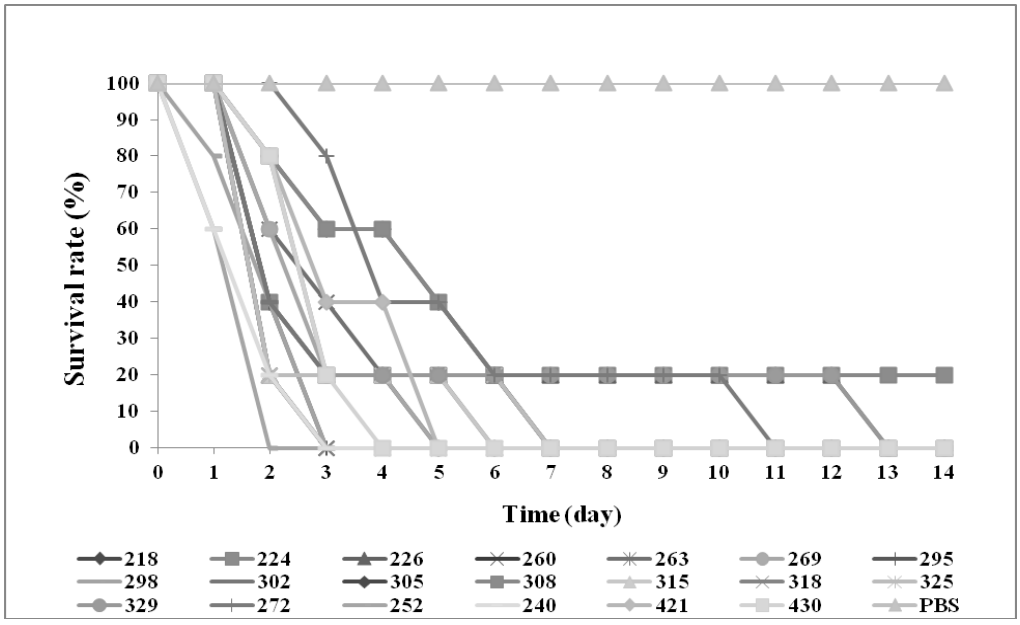
การทดสอบความไวของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าแบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล อิริโทรมัยซิน ออกซี่เตตร้าซัยคลิน และลินโคมัยซิน และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือออกโซลินิค แอซิด และซัลฟาเมธทอกซาโซล/ไตรเมโธพริม (ตารางที่ 5)

8. การทดสอบการก่อโรค

การทดสอบความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาหมอไทยโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทั้ง 20 ไอโซเลตมีความรุนแรงสูง ทำให้ปลาหมอไทยตาย 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 7 วัน (ภาพที่ 6) โดยปลาหมอไทยที่ติดเชื้อมีอาการเซื่องซึม ลำตัวสีคล้ำ ตาขุ่น ว่ายน้ำควงสว่าน เลือดออกที่รูทวารและเยื่อหุ้มสมองการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการตายของปลาหมอไทยที่ฉีดด้วยสารละลาย PBS และพบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ที่แยกได้จากปลาหมอไทยป่วยและแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-252 ที่แยกได้จากปลาดุกอุยป่วยมีความรุนแรงสูงที่สุด โดยทำให้ปลาหมอไทยตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 3 วัน ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 5 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *S.agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยป่วย

Antibiotic disc(µg)	Resistance		Intermediate		Sensitive	
	Number of isolate	Percent (%)	Number of isolate	Percent (%)	Number of isolate	Percent (%)
Oxolinic acid (2)	20	100				
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim (25)	20	100				
Chloramphenicol (30)					20	100
Lincomycin (2)					20	100
Oxytetracycline (30)					20	100
Norfloxacin (10)			4	20	16	80
Ampicillin (10)	4	20	5	25	11	55
Ciprofloxacin (5)			9	45	11	55
Erythromycin (15)					20	100



ภาพที่ 6 อัตรารอดของปลาหมอไทยจากการทดสอบการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทย และปลาดุกอุยโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง

9. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาหมอไทยที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในอวัยวะภายในหลายอวัยวะ เช่น สมอง ตา หัวใจ ไต ตับ และม้าม โดยลักษณะทางพยาธิสภาพที่พบมีรายละเอียดดังนี้

8.1 สมอง พบการอักเสบอย่างรุนแรงบริเวณเยื่อหุ้มสมอง (meningitis) เนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยมีเม็ดเลือดแดงแทรกบริเวณเยื่อหุ้มสมองเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 7)

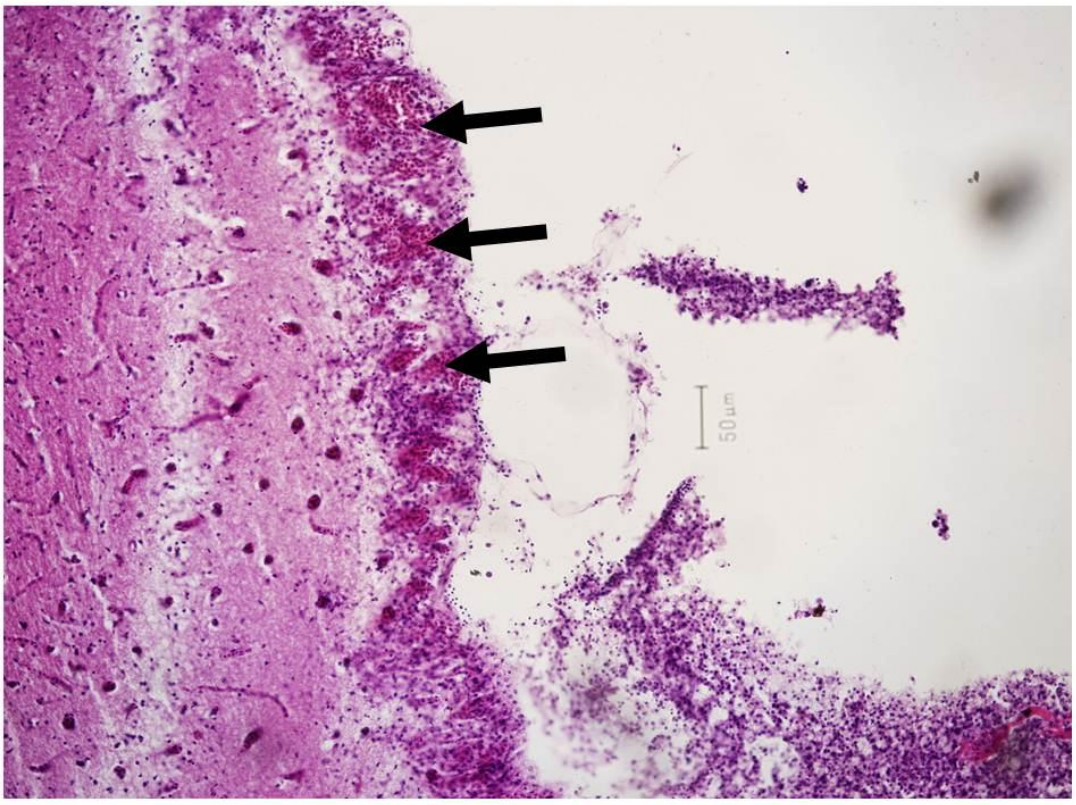
8.2 ตา พบการมีเลือดออก (haemorrhage) และเสื่อมสลายของตาโดยมีเม็ดเลือดแดงจำนวนมากแทรกบริเวณเรตินา (ภาพที่ 8)

8.3 หัวใจ พบอักเสบอย่างรุนแรงบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ (pericarditis) เนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยมีเม็ดเลือดแดงแทรกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบการเกิด กรานูล (granuloma formation) บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ (ภาพที่ 9)

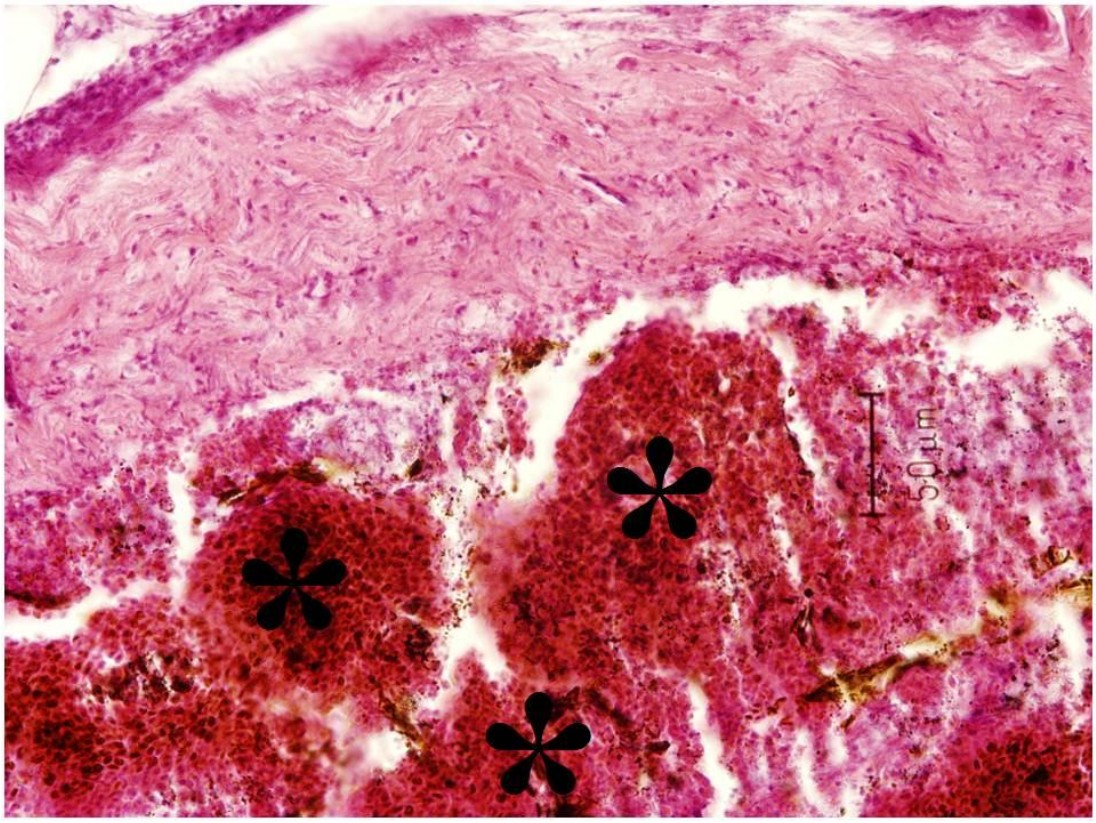
8.4 ไต พบการอักเสบและมีเลือดออก (haemorrhage) จากการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณไตตอนท้าย โดยมีเม็ดเลือดแดงแทรกตัวเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 10)

8.5 ตับ การติดเชื้อแบคทีเรียทำให้โครงสร้างของตับเปลี่ยนแปลง โดยพบช่องว่าง (vacuole) ในเซลล์ตับเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 11)

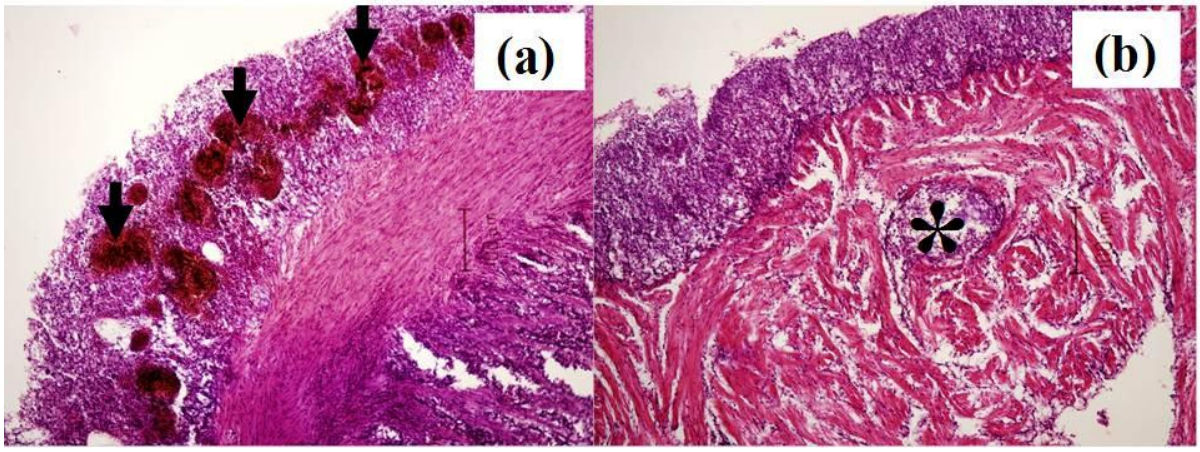
8.6 ม้าม พบการเสื่อมสลาย (degeneration) และมีเลือดออก (haemorrhage) โดยพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนมากบริเวณม้าม (ภาพที่ 12)



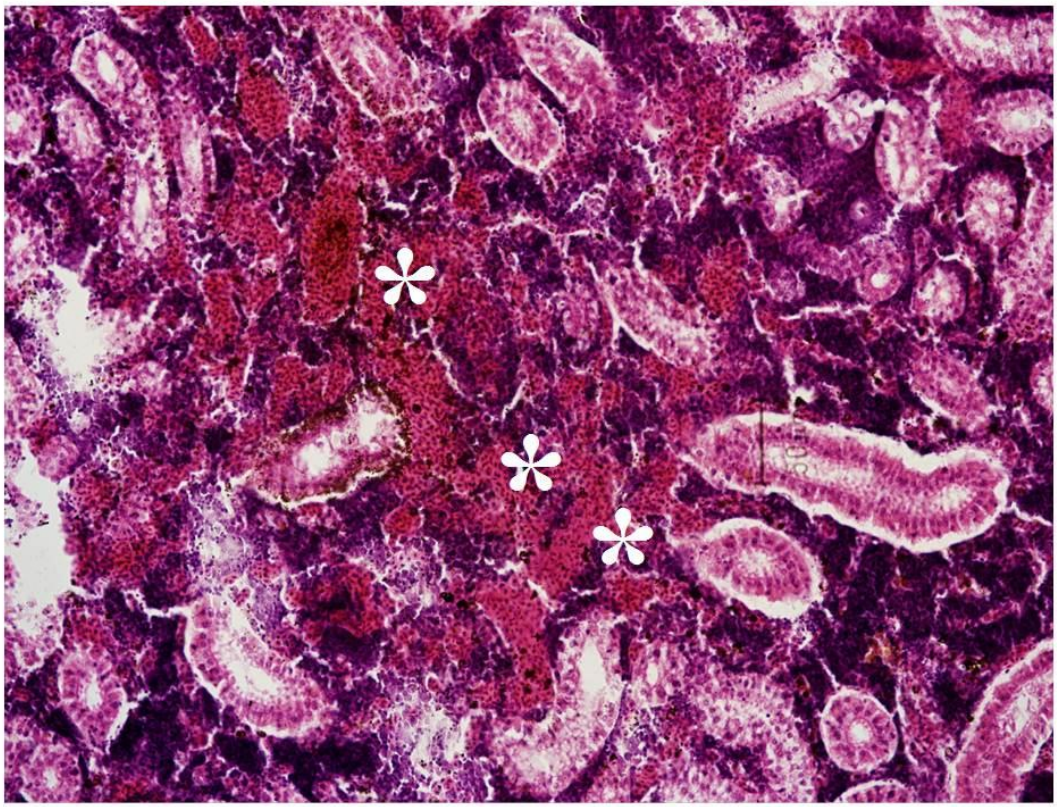
ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อสมองของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีการอักเสบบริเวณเยื่อหุ้มสมอง โดยมีเม็ดเลือดแดง (ศรชี้) แทรกบริเวณเยื่อหุ้มสมองเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 50 µm)



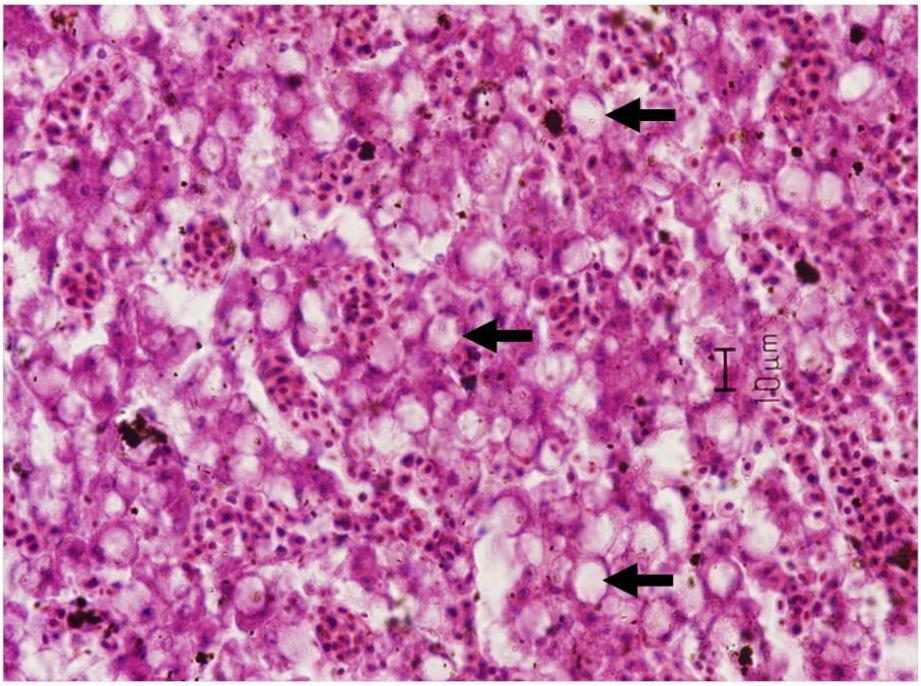
ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อตาของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีเลือดออก และเสื่อมสลายของตาโดยมีเม็ดเลือดแดง (ดอกจัน) จำนวนมากแทรกบริเวณเรตินา (H&E, Bar = 50 µm)



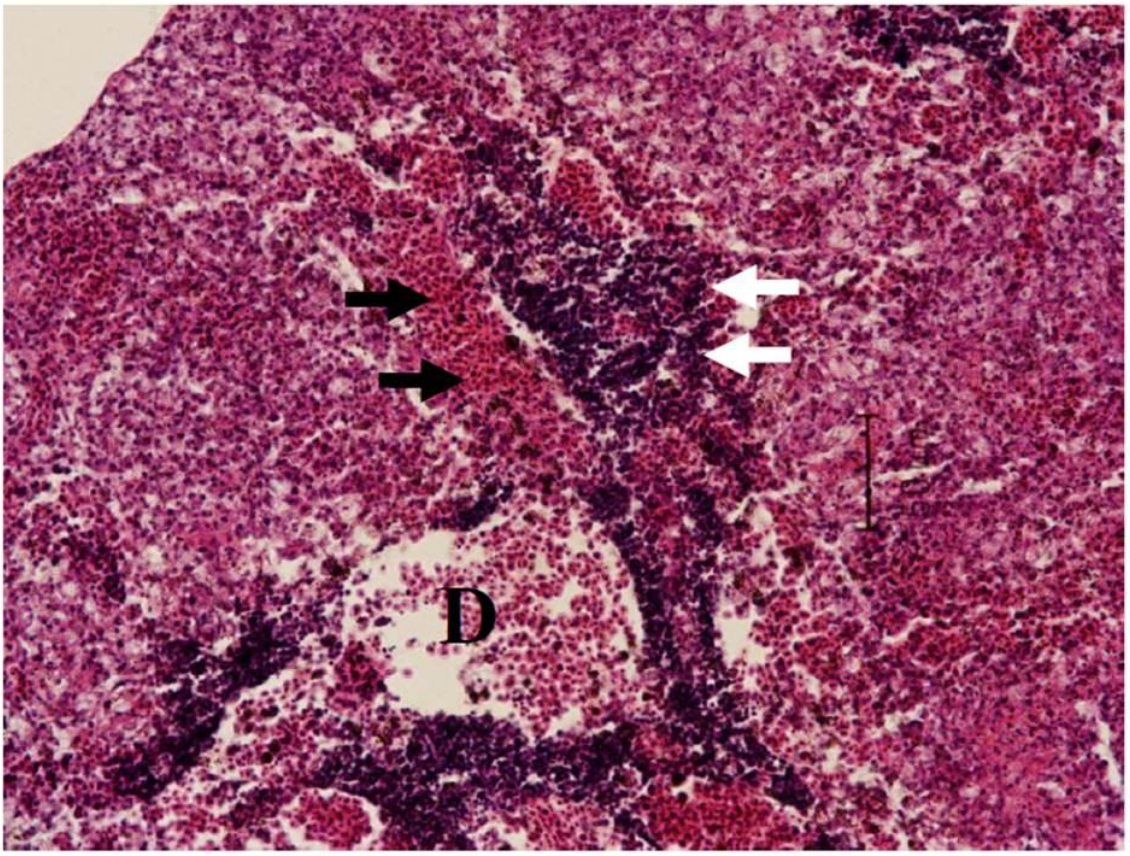
ภาพที่ 9 เนื้อเยื่อหัวใจของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib (a) มีการอักเสบอย่างรุนแรงบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ โดยมีเม็ดเลือดแดง (ศรชี้) แทรกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจเป็นจำนวนมาก และ (b) พบการเกิดกรานูล (ดอกจัน) บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ (H&E, Bar = 100 µm)



ภาพที่ 10 เนื้อเยื่อไตตอนท้ายของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีการอักเสบและมีเลือดออกจากการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณไตตอนท้าย โดยมีเม็ดเลือดแดง (ดอกจัน) แทรกตัวเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อตับของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบช่องว่าง (ศรชี้) ในเซลล์ตับเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 10 µm)



ภาพที่ 12 เนื้อเยื่อม้ามของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบการเสื่อมสลาย (D) และมีเลือดออก โดยพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดแดง (ศรสีดำ) และเม็ดเลือดขาว (ศรสีขาว) เป็นจำนวนมากบริเวณม้าม (H&E, Bar = 50 μm)

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นกิจกรรมทางการเกษตรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศเป็นอย่างมาก โดยสัตว์น้ำสำคัญที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ กุ้งทะเล ปลานิล ปลากะพงขาว ปลากะรัง ปลาสวาย ปลาดุก และปลาหมอไทย เป็นต้น ปัจจุบันการเลี้ยงปลาหมอไทยร่วมกับปลาดุกอุยได้รับความนิยมค่อนข้างมากในภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากปลาดุกอุยเป็นปลาที่มีนิสัยหากินบริเวณพื้นท้องน้ำ ซึ่งสามารถกินอาหารเหลือจากปลาหมอไทยได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงปลาดุกในความหนาแน่นสูงภายใต้สภาวะที่น้ำมีคุณภาพต่ำ (Wattanutchariya, 1982) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงปลาหมอไทยและปลาดุกอุยภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลให้ปลามีความเครียดและติดโรคได้ง่าย โดยโรคที่พบในปลาหมอไทยและปลาดุกได้แก่ โรคติดเชื้อแบคทีเรียแอโรโมแนส (motile *Aeromonas* septicemia) (Angka *et al*., 1995) โรคหางและครีบกร่อน (tail and fin rot disease) (Rahman *et al*., 2010) โรค enteric septicemia of catfish (Suanyuk *et al*., 2014) และโรคสเตรปโตคอคโคซีส (Dung and Duy, 2013)

โรคสเตรปโตคอคโคซีสเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงในปลา ทั้งปลาน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม โรคชนิดนี้มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม (สุบัณฑิต, 2555) สามารถจำแนกได้หลายกลุ่มโดยอาศัยความแตกต่างของ carbohydrate antigen ที่ผิวเซลล์ (Lancefield., 1933) โดยแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาได้แก่ *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* และ *S. agalactiae*

โรคสเตรปโตคอคโคซีสที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* สร้างปัญหาอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลายชนิดทั่วโลก ล่าสุดมีรายงานการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในกุ้งขาว ปลาซาบะ และปลาเก๋าหยก (Hasson *et al*., 2009; Geng *et al*., 2012; Liu *et al*., 2014) ในปี พ.ศ. 2554 พบการตายของปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันในบ่อดิน ของฟาร์มเลี้ยงปลาบริเวณอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยปลาที่ติดเชื้อมีอาการของโรคสเตรปโตคอคโคซีส ซึ่งพบการระบาดเรื่อยมาจนถึงปี พ.ศ. 2555 และ 2558 การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยโดยใช้วิธีการจำแนกตามตำรา Bergey's Manual of Systematic Bacteriology แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *S. difficilis* (synonym *S. difficile*) ที่แยกได้จากปลาในประเทศอิสราเอลที่มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Eldar *et al*., 1994) ซึ่งต่อมา Vandamme และคณะ (1997) พบว่าแบคทีเรีย *S. difficilis* เป็นแบคทีเรีย *Streptococcus* กรุ๊ป B ซีโรไทป์ Ib นอกจากนี้ Berridge และคณะ (2001) และ Kawamura และคณะ (2005) ยังพบว่าแบคทีเรีย *S. difficilis* และ *S. agalactiae* เป็นชนิดเดียวกัน โดยอาศัยความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน *16s-23s rDNA* และยีน *16s rRNA, gyrb, soda, gyrA* และ *parC* ตามลำดับ

ปัจจุบันสามารถแบ่งแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้เป็น10 ซีโรไทป์ ได้แก่ ซีโรไทป์ Ia Ib และ II ถึง IX โดยอาศัยความแตกต่างขององค์ประกอบของสารโพลีแซคคาไรด์ที่แคปซูล (capsular polysaccharide) (Slotved *et al*., 2007) และมีเพียง 3 ซีโรไทป์ ที่ก่อโรคในปลา ได้แก่ ซีโรไทป์ Ia, Ib และ III (Vandamme *et al*., 1997; Evans *et al*., 2008; Suanyuk *et al*., 2008; Suwannasang *et al*., 2014) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย มีองค์ประกอบของสารโพลีแซคคาไรด์ที่แคปซูลจัดอยู่ในซีโรไทป์ Ib ปัจจุบันมีการรายงานพบแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลาหมอทะเล (*Epinephelus lanceolatus*) ในประเทศออสเตรเลีย (Bowater *et al*., 2012) ปลานิลในประเทศจีน (Li *et al*., 2013) ฮอนดูรัส โคลัมเบีย คอสตา ริก้า และเบลเยี่ยม รวมถึง ปลาโรซีบาร์บ (*Pethia conchonius*) และปลาหมอแคระ (*Mikrogeophagus ramirezi*) ในประเทศออสเตรเลีย (Delannoy *et al*., 2013) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* เพียง 2 ซีโรไทป์ ได้แก่ ซีโรไทป์ Ia และซีโรไทป์ III (Suanyuk *et al*., 2008; Rodkhum *et al*., 2011; Suwannasang *et al*., 2014; Dangwetngam *et al*., 2016) แต่ยังไม่มีรายงานการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในสัตว์น้ำ รายงานฉบับนี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรกของการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกัน ความแตกต่างทางซีโรไทป์ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาป่วยที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ก่อโรคในปลาที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยมีแหล่งที่มาต่างกัน (Suanyuk *et al*., 2008)

ปัจจุบันการใช้เทคนิค multilocus sequence typing (MLST) และ genotyping สามารถแบ่งแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลาออกเป็น 4 กลุ่ม โดยมีหนึ่งกลุ่มที่เป็นแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่แยกได้จากปลาและไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม ST260 และ ST261 ซึ่งแตกต่างกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากมนุษย์ และไม่พบยีนที่

ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ผิวเซลล์ (surface protein genes) หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ (mobile genetic elements) ที่ทำการศึกษา (Delannoy *et al*., 2013) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบยีน *bca* จากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S.agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่คนละกลุ่มกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา ที่ได้จากการศึกษาของ Delannoy และคณะ (2013) การศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการใช้เทคนิค MLST และ genotyping ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจทำให้เข้าใจความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib กับ ปลา สัตว์น้ำชนิดอื่น และมนุษย์ได้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทย ปลาดุกอุย และปลานิลเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III แต่พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยมียีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงแตกต่างกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิล แบคทีเรีย *S. agalactiae* สามารถสร้างปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงได้หลากหลายชนิด ส่งผลให้ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีอาการของโรคแตกต่างกัน ปัจจุบันมีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหลายการศึกษา (Suanyuk *et al*., 2008; Delannoy *et al*., 2013; Kayansamruaj *et al*., 2014) การศึกษาครั้งนี้พบยีน *bca* จากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทุกไอโซเลตที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย รวมทั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Suanyuk*et al*., 2008) ชี้ให้เห็นว่ายีน *bca* อาจมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลา อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบยีน *bac,lmb*, *scpB* และ GBSi1 ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย ชี้ให้เห็นว่ายีนเหล่านี้ไม่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทยและปลาดุกอุย นอกจากนี้การตรวจพบยีน *bca bac* และ GBSi1 ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และยีน *bca* ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เหมือนกับยีนที่ตรวจพบในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลที่ติดเชื้อในประเทศไทยและประเทศเวียดนาม ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และซีโรไทป์ III ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่รายงานไว้โดย Delannoy และคณะ (2013) การตรวจพบยีน *bca* และ *bac* ในแบคทีเรีย *S. agaactiae* ซีโรไทป์ Ia และยีน *bca* ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib และซีโรไทป์ III สนับสนุนการค้นพบของ Delannoy และคณะ (2013) ที่ว่าในแบคทีเรีย *S. agalactiae* จะพบยีน *bac* ร่วมกับยีน *bca* เสมอ และสามารถพบยีน *bca* ได้โดยไม่พบยีน *bac*

ยีน *scpB* และยีน *lmb* ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ C5a-peptidese และ laminin binding protein ตามลำดับ (Granlund *et al*., 2001) การศึกษาครั้งนี้พบยีน *scpB* และยีน *lmb* ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลเท่านั้น ชี้ให้เห็นว่ายีนเหล่านี้อาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III ในปลา การศึกษาครั้งนี้ตรงกับการศึกษาของ Kayansamruaj และคณะ (2014) ที่พบยีน *scpB* และ *lmb* ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III แต่ไม่พบในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia ที่แยกได้จากปลา โดยทั่วไปสามารถตรวจพบยีน *scpB* และ *lmb* ในแบคทีเรีย *Streptococccus* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากมนุษย์ แต่จะพบยีนเหล่านี้เพียง 20-39 เปอร์เซ็นต์ ในแบคทีเรีย *Streptococccus* ที่ก่อโรคในสัตว์ (Franken *et al*., 2001; Dmitriev *et al*., 2002) ระหว่างยีน *scpB* และ *lmb* มักเป็นตำแหน่งที่มียีน *IS1548* หรือ GBSi1 แทรกอยู่ (Al Safadi *et al*., 2010) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบยีน *scpB lmb* และ GBSi1 ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและ

ปลาดุกอุย แต่พบเพียงยีน GBSi1 ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และพบยีน *scpB* และ *lmb* แต่ไม่พบยีน GBSi1 ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิล การศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับยีนที่อยู่ระหว่างยีน *scpB* และ *lmb* ในแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลา จึงมีความจำเป็นและอาจทำให้เข้าใจถึงบทบาทของการยึดเกาะและการบุกรุกของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ต่อเจ้าบ้านได้ดียิ่งขึ้น

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ คลอแรมเฟนิคอล อิริโทรมัยซิน ลินโคมัยซิน และออกซี่เตตร้าซัยคลิน แต่ต้านทานยาปฏิชีวนะ ออกโซลินิค แอซิด และซัลฟาเมธทอกซาโซล/ไตรเมโธพริม คล้ายคลึงกับการรายงานการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาจะละเม็ดขาว (*Pampus argenteus*) ในประเทศคูเวต (Duremdez *et al*., 2004) และแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลในประเทศไทย (Dangwetngam *et al*., 2016) ยาปฏิชีวนะออกโซลินิค แอซิดที่เป็นยาในกลุ่มควิโนโลน การดื้อยาปฏิชีวนะชนิดนี้เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงเป้าหมายและการซึมผ่านของยา รวมทั้งการมี พลาสมิดที่มียีนดื้อยา (Hooper, 2003) การดื้อยาปฏิชีวนะซัลฟาเมธทอกซาโซล/ไตรเมโธพริม หรือเรียกว่า ยาโค-ไตรม็อกซาโซล (co-trimoxazole) เกิดขึ้นได้โดยการขัดขวางการซึมผ่านและ/หรือการขับยาออกจากเซลล์ (efflux pumps) และขัดขวางหรือควบคุมการทำงานของยาโดยเอนไซม์ของแบคทีเรีย (Huovinen, 2001) ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น เอนโรฟลอกซาซิน (Enrofloxacin) และอะมอกซิซิลลิน (Amoxicillin) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย ดังนั้นการทดสอบความไวของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดข้างต้น นับเป็นสิ่งที่น่าสนใจและควรศึกษาต่อไปในอนาคต

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในอวัยวะภายในหลายอวัยวะ เช่น สมอง ตา หัวใจ ไต ตับ และม้าม โดยลักษณะทางพยาธิสภาพที่พบโดยมากคือการมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ เช่น เยื่อหุ้มสมอง เยื่อหุ้มหัวใจ ไตและม้าม เป็นต้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และคณะ (2007) ที่พบว่าโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลานิลที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. iniae* และ *S. agalactiae* ทำให้เยื่อหุ้มหัวใจ เยื่อบุหัวใจ กล้ามเนื้อหัวใจ และสมองอักเสบ

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติของแบคทีเรีย ความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นับเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาหมอไทยและปลาดุกอุย การศึกษาต่อไปเกี่ยวกับพยาธิวิทยาและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาต่อการติดเชื้อ และผลของปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการติดเชื้อแบคทีเรียจึงนับเป็นสิ่งจำเป็น และมีประโยชน์ต่อเกษตรกรเพื่อนำไปพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลาให้มีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไปในอนาคต

บทที่ 4

พยาธิวิทยา การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือด และผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*)

1. บทนำ

โรคสเตรปโตคอคโคซีส (Streptococcosis) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบหนาแน่น โรคชนิดนี้มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม เรียงตัวต่อกันเป็นโซ่ ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ได้หลายกลุ่มโดยอาศัยความแตกต่างของแอนติเจนที่ผิวเซลล์ (Lancefield., 1933) โดยแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาได้แก่ *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* และ *S. agalactiae* ปลาที่ป่วยด้วยโรคชนิดนี้มีอาการเลือดออกบริเวณตาหรืออวัยวะภายใน ลำตัวมีสีคล้ำ ท้องบวม ตาโปน ตาขุ่น ว่ายน้ำควงสว่าน โรคชนิดนี้ส่วนใหญ่เกิดขึ้นแบบเฉียบพลัน (acute) สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ตัวปลาภายใน 48-72 ชั่วโมง และพบการตายภายใน 4-5 วัน หลังจากได้รับเชื้อ หรืออาจเกิดขึ้นในลักษณะเรื้อรัง (chronic) (เฉลิม , 2547) โรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาที่พบในประเทศไทยมีสาเหตุจากแบคทีเรียสองชนิดคือ *S. agalactiae* และ *S. iniae* (Suanyuk *et al*., 2008; Suanyuk *et al*., 2010) โดย *S. agalactiae* เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุด เพราะเป็นสาเหตุหลักของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทย

การศึกษาถึงพยาธิวิทยาของการติดเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ที่เป็นตัวชี้ถึงการแพร่กระจายของโรค นับเป็นสิ่งสำคัญต่อการศึกษาด้านโรคสัตว์น้ำ เนื่องจากช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคในสัตว์น้ำ ความสามารถของตัวเชื้อที่ในการดำรงชีวิตภายนอกตัวสัตว์น้ำ ความสามารถของตัวเชื้อในการก่อโรคในตัวสัตว์น้ำ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมในการก่อโรค (Perera *et al*., 1997) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงพยาธิวิทยา การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือด และผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหมอไทย

2. วิธีการทดลอง

1. การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่สภาวะอุณหภูมิ ความเค็มและความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ โดยเพาะแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 บนอาหารเลี้ยงเชื้อTSA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมหัวเชื้อ (starter) ตามวิธีการของ Al-Harbi (1994) และ Cheng และ Chen (1999) โดยเขี่ยแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (ความเป็นกรด-ด่าง 7.3 ± 0.2 และความเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เจริญแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ

วัดการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Duarte *et al*., 2004) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่เวลา 0 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง และนำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเค็มต่างๆ โดยเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับการศึกษาการเจริญเติบโตที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ โดยถ่ายแบคทีเรียลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.3 ± 0.2 ความเค็ม 0.5 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่เวลา 0 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง และนำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระดับความเค็มต่างๆ

ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ โดยเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับการศึกษาการเจริญเติบโตที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ โดยถ่ายแบคทีเรียที่เจริญแล้วลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ และความเป็นกรด-ด่าง 3 4 5 6 7 8 9 10 และ 11 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่เวลา 0 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง และนำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

2. การศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลาหมอไทยตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 14 วัน

ทดสอบความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ในปลาหมอไทย ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากนเรศและคณะ (2548) โดยเลี้ยงปลาหมอไทยน้ำหนักเฉลี่ย 20.30±1.19 กรัม จำนวน 10 ตัวต่อตู้ ในตู้ทดลองขนาด 50x120x45 เซนติเมตร บรรจุน้ำตู้ละ 150 ลิตร จำนวน 15 ตู้ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที และละลายด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) และปรับให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomize Design) โดยการทดลองประกอบด้วย 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม ฉีดปลาหมอไทยด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline เข้าช่องท้อง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดปลาหมอไทยด้วยสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^1 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ชุดการทดลองที่ 3 ฉีดปลาหมอไทยด้วยสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ชุดการทดลองที่ 4 ฉีดปลาหมอไทยด้วยสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ชุดการทดลองที่ 5 ฉีดปลาหมอไทยด้วยสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^4 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

หลังการติดเชื้อบันทึกอาการและจำนวนปลาหมอไทยที่ตายในแต่ละวันนาน 14 วัน ยืนยันสาเหตุการตายของปลาโดยนำปลาใกล้ตายหรือตายใหม่ๆ มาเพาะเชื้อจาก ตับ ไต และสมอง เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง และจำแนกชนิดเชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมกับชุดทดสอบ API20 STREP นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า LD_{50} โดยคำนวณค่าความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลาที่กำหนด ด้วยโปรแกรม probit analysis (โชคชัย, 2531)

3. การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 โดยใช้ปลาหมอไทยน้ำหนักเฉลี่ย 42.60±3.68 กรัม จำนวน 150 ตัว เลี้ยงในตู้ทดลองขนาด 50x120x45 เซนติเมตร บรรจุน้ำตู้ละ 150 ลิตร จำนวน 6 ตู้ๆ ละ 25 ตัว เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ ชุดทดลองฉีดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ความเข้มข้น $4.80x10^2$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เข้าช่องท้องปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว และชุดควบคุมฉีดสารละลาย PBS (pH 7.4) เข้าช่องท้องปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

เก็บตัวอย่างเลือดปลาหมอไทยเมื่อครบเวลา 0 1 2 3 5 และ 7 วันหลังการติดเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างปลาหมอไทยจำนวน 2 ตัวต่อซ้ำ โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณโคนหาง (caudal vein/artery) ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 25Gx1 นิ้ว นำตัวอย่างเลือดที่ได้ไปศึกษาค่าองค์ประกอบเลือดต่อไปนี้

3.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (Red and white blood cell)

วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014) โดยดูดเลือดที่เจาะได้ด้วย RBC diluting pipette นำมาผสมกับ Yokoyama's solution ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนับเม็ดเลือดด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดที่มีแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X

3.2 ปริมาตรเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น (Hematocrit)

วิเคราะห์ปริมาตรเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น ตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014) โดยนำเลือดที่เจาะจากตัวปลาใหม่ๆ ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และดูดเลือดจากหลอดด้วยหลอดแคปิลลารี่ (Capillaries tube) จำนวน 2 หลอดต่อตัวอย่าง อุดปลายหลอดด้วยดินน้ำมัน นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000-15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำมาคำนวณค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ตามสูตร

$$\text{ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (มิลลิเมตร)}}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (มิลลิเมตร)}} \times 100$$

3.3 ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin)

วิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบินตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014) โดยดูดเลือดที่เจาะใหม่ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย Drabkin's solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นโดยใช้สารละลาย Drabkin's solution เป็น blank

3.4 โปรตีนในซีรั่ม (Serum protein)

วิเคราะห์โปรตีนในซีรั่มตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014) โดยนำซีรั่มปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปราศจากไอออนปริมาตร 990 ไมโครลิตร เติมสารละลาย alkaline copper ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย folin reagent (1:10) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟโปรตีน (standard curve) ที่ใช้ Bovine serum albumin เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.5 การลดลงของไนโตรบลู เตตร้าโซเลียม (Reduction of nitroblue tetrazolium)

วิเคราะห์การลดลงของไนโตรบลู เตตร้าโซเลียมตามวิธีการของ Stasiak และ Baumann (1996) โดยดูดเลือดปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในเพลทก้นแบนแบบ 96 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS (pH7.2) จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายไนโตรบลู เตตร้าโซเลียมความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตรึงเซลล์ด้วยเมทธานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นาน 2-3 นาที ล้างด้วยเมทธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ก่อนดูดสารละลายทิ้ง ตั้งไว้ให้แห้ง เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และสารละลายไดเมธิลซันฟอกไซด์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader

3.6 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme activity)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ตามวิธีการของ Demers และ Bayne (1997) โดยเติมซีรั่มปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในเพลทก้นแบนแบบ 96 หลุม จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.8) ปริมาตร 175 ไมโครลิตร ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) มาคำนวณผลเปรียบเทียบกราฟไลโซไซม์ที่ใช้ Hen white egg lysozyme (Sigma) เป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานผลเป็นปริมาณ ไลโซไซม์ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity)

วิเคราะห์กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม โดยนำเซลล์เม็ดเลือดที่แยกจากไตตอนต้นตามวิธีการของ Chung และ Secombes (1988) ความหนาแน่น $2x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400

ไมโครลิตร ผสมกับลาเท็กบีดในสารละลาย L-15 ความหนาแน่น $2x10^8$ เม็ดต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผสมลาเท็กบีดปริมาตร 200 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นปิดสไลด์แบบกลม (Circular cover slip) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมสี Diff Quick เตรียมเป็นสไลด์ถาวรด้วยสารละลายเปอร์เมาท์ นำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรของ Rengpipat และคณะ (2000) ดังต่อไปนี้

$$\text{Phagocytosis (\%)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จับกินลาเท็กบีด}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Phagocytic index} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จับกินลาเท็กบีด}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด}} \times \frac{\text{จำนวนลาเท็กบีดที่ถูกกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Average number of the bead ingested per cell} = \frac{\text{จำนวนลาเท็กบีดที่เซลล์เม็ดเลือดขาวกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จับกินลาเท็กบีด}}$$

4. การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาหมอไทย

ศึกษาผลของอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่อการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาหมอไทยน้ำหนักเฉลี่ย 46.0±0.24 กรัม โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล (3 อุณหภูมิ: 28.97±0.12, 31.85±0.34 และ 34.07±0.45 องศาเซลเซียส และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 3 ระดับ: 1.73±0.21 3.77±0.14 และ 5.52±0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยเลี้ยงปลาในสภาวะต่างๆนานอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ในถังไฟเบอร์ขนาด 45x60x45 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 60 ลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 10 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ใช้ปลาหมอไทยจำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ ควบคุมอุณหภูมิน้ำโดยใช้ฮีทเตอร์ และควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำโดยการปรับปริมาณอากาศที่ได้รับจากเครื่องให้อากาศและใช้ก๊าซไนโตรเจนแทนที่ก๊าซออกซิเจนในระหว่างการทดลองทำการวัดอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำทุกวันๆ ละ 3 ครั้ง ส่วนชุดควบคุมที่ไม่ติดเชื้อ (negative control) เลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิสูงที่สุด และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ต่ำที่สุดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ระหว่างการทดลองเปลี่ยนถ่ายน้ำปริมาตร 20 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน และวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียปริมาณไนไตรท์ ความเป็นด่างทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ด่างตามวิธีการมาตรฐาน (Boyd and Tucker, 1992; APHA *et al*., 1998)

หลังการเลี้ยงปลานานอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 เข้าช่องท้องปลาหมอไทยความเข้มข้น $3.05x10^2$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ชุดควบคุมฉีดสารละลาย PBS (pH 7.4) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สังเกตอาการและบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน ยืนยันสาเหตุการตายของปลาโดยนำปลาใกล้ตายหรือตายใหม่ๆ มาเพาะเชื้อจากตับ ไต และสมอง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง และจำแนกชนิดเชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมกับชุดทดสอบ API20STREP

5. การทดสอบการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาชนิดอื่น

ทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรียในปลานิล น้ำหนักเฉลี่ย 20.76 ± 0.56 กรัม และปลากะพงขาว น้ำหนักเฉลี่ย 20.59 ± 0.28 กรัม โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญนำมาหมุนเหวี่ยง

แยกเซลล์แบคทีเรีย และละลายด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) ปรับให้ได้ความเข้มข้น $3.50x10^7$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ฉีดเข้าช่องท้องปลาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว จำนวน 30 ตัวต่อชนิด และชุดควบคุมฉีดด้วยสารละลาย PBS จำนวน 30 ตัวต่อชนิด สังเกตอาการและบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน ยืนยันสาเหตุการตายของปลาโดยนำปลาใกล้ตายหรือตายใหม่ๆ มาเพาะเชื้อจาก ตับ ไต และสมอง เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง และจำแนกชนิดเชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมกับชุดทดสอบ API20 STREP

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับการศึกษาองค์ประกอบเลือดปลาหมอไทยทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลที่เป็นอิสระจากกัน (Independent t-test) สำหรับการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาหมอไทย ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลแบบสองทาง (Two-way ANOVA) และแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple-range test โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลสำเร็จรูป SPSS

3. ผลการทดลอง

1. การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่สภาวะอุณหภูมิ ความเค็มและความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ที่สภาวะอุณหภูมิ 25 30 35 40 และ45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* เจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ 25-35 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียเจริญเติบโตได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 13ก)

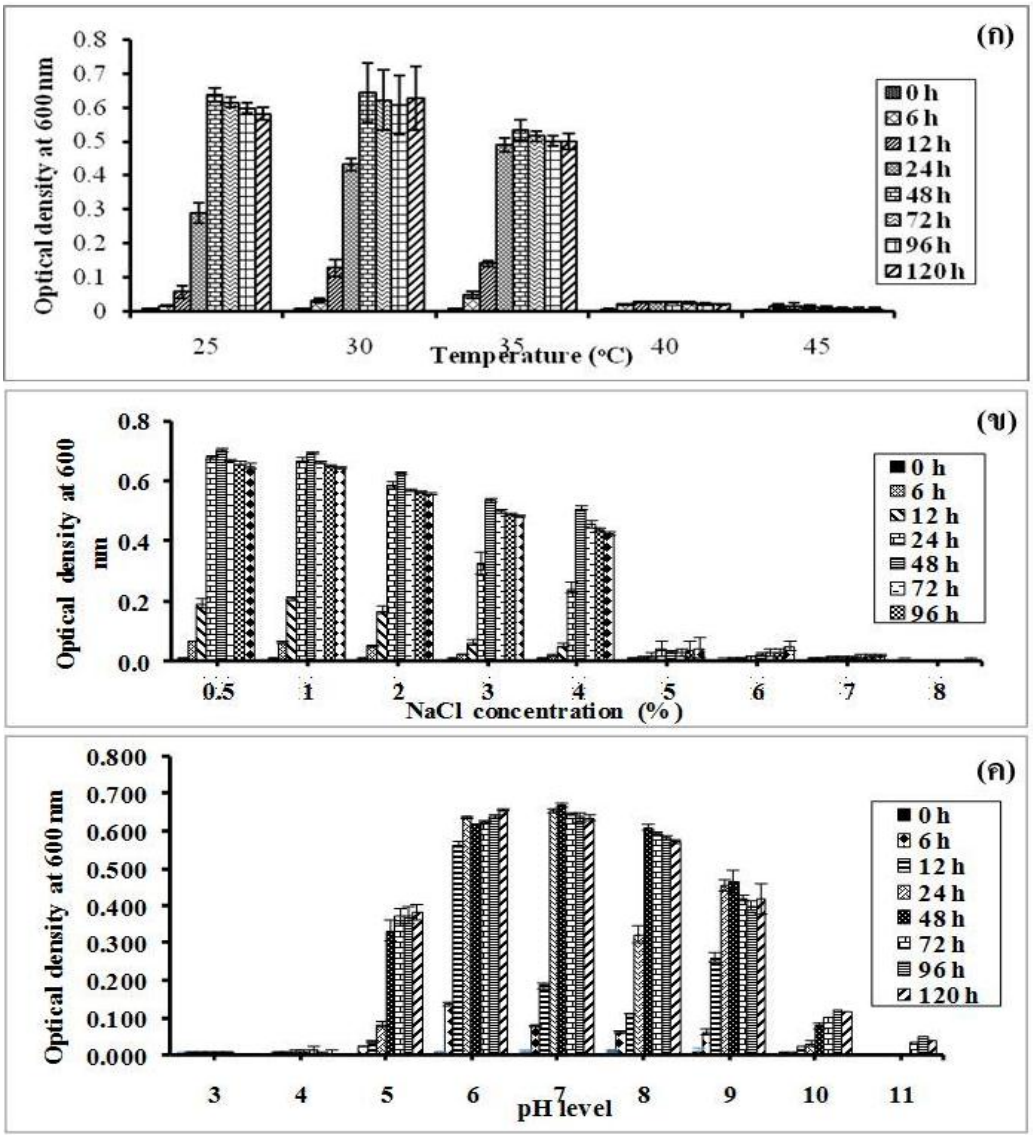
การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ที่ความเค็ม 0.5 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* เจริญเติบโตได้ในความเค็มตั้งแต่ 0.5-4 เปอร์เซ็นต์โดยแบคทีเรียเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ความเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยที่ความเค็ม 5 – 6 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ความเค็ม 7-8 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13ข)

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3 4 5 6 7 8 9 10 และ 11 พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* เจริญเติบโตได้ในความเป็นกรด-ด่าง 5-9 โดยเจริญเติบโตดีที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง 7 แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยที่ความเป็นกรด-ด่าง 10 และ 11และไม่พบการเจริญเติบโตที่ความเป็นกรด-ด่าง 3 และ 4 (ภาพที่ 13ค)

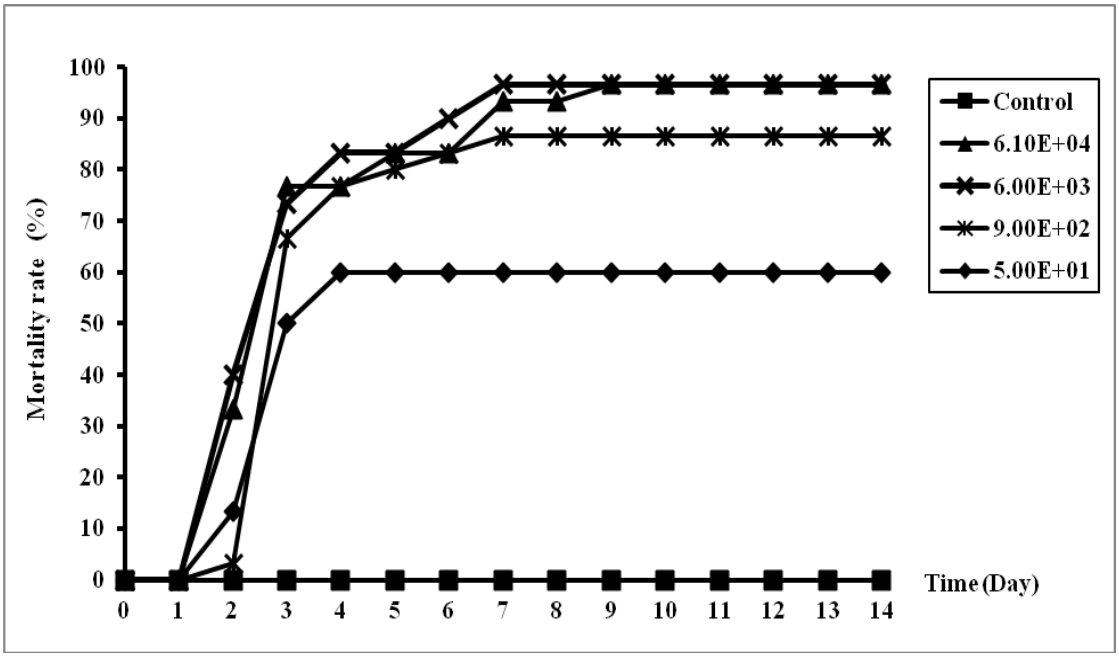
โดยสรุปพบว่าแบคทีเรีย *S.agalactiae* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ และความเป็นกรด-ด่าง 7

2. การศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลาหมอไทยตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 14 วัน

การทดสอบความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ที่ทำให้ปลาหมอไทยตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 14 วัน ไม่พบการตายในปลาหมอไทยที่ฉีดสารละลาย PBS แต่ปลาหมอไทยที่ฉีดแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ความเข้มข้น $6.10x10^4$ และ $6.00x10^3$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตาย 96.66 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาหมอไทยที่ฉีดแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ความเข้มข้น $9.00x10^2$ และ $5.00x10^1$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตาย 86.66 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วันตามลำดับ (ภาพที่ 14) มีค่า LD_{50} ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ $4.5x10^2$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และ $6.3x10^1$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ระหว่างการทดลองพบปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 มีอาการ เซื่องซึม ลำตัวมีสีคล้ำ ตาขุ่น ว่ายน้ำควงสว่าน มีเลือดออกที่รูทวารและเยื่อหุ้มสมอง



ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิ (ก) ความเค็ม (ข) และความเป็นกรด-ด่าง (ค) ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เวลา 0 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 14 อัตราการตายสะสมของปลาหมอไทยที่ได้ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ความเข้มข้นต่างๆ ภายในระยะเวลา 14 วัน

3. การศึกษาองค์ประกอบเลือดปลาหมอไทยที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae*

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 พบว่าปลาหมอไทยที่ติดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยองค์ประกอบเลือดส่วนใหญ่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นปริมาณเม็ดเลือดขาว กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินที่มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S.agalactiae* มีปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลงหลังการติดเชื้อในวันที่ 3 ถึง 7 เช่นเดียวกับปริมาณโปรตีนในซีรั่ม และปริมาณเม็ดเลือดแดงที่มีค่าลดลงในวันที่ 1 5 7 และวันที่ 5 และ 7 หลังการติดเชื้อ ตามลำดับ ในขณะที่ค่าฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 ลดลงจนเข้าสู่สภาวะปกติในวันที่ 2 และ 3 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในวันที่ 5 และ 7 หลังการติดเชื้อ พบการลดลงของค่าไนโตรบลู เตตร้าโซเลียมในวันที่ 1 ถึง 3 และเข้าสู่สภาวะปกติในวันที่ 5 และ 7 ในทางกลับกันพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 7 หลังการติดเชื้อ เช่นเดียวกับปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 5 และ 7 หลังการติดเชื้อ สอดคล้องกับค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมและค่าเฉลี่ยเม็ดบีทที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินของปลาที่ติดเชื้อที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 7 และวันที่ 1 ถึง 3 หลังการติดเชื้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

4. การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาหมอไทย

การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ในปลาหมอไทยพบว่าปลาหมอไทยแสดงพฤติกรรมที่แตกต่างกันไป ภายใต้สภาวะปกติ (ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 5.52 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 28.97 ± 0.12 องศาเซลเซียส) ปลาว่ายน้ำและกินอาหารปกติ เมื่อเลี้ยงปลาภายใต้สภาวะปริมาณออกซิเจนที่ต่ำลง และอุณหภูมิสูงขึ้น ปลามีอาการเซื่องซึม ลอยตัวใกล้ผิวน้ำ หรืออยู่นิ่งบริเวณก้นถัง กินอาหารน้อย หลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 พบว่าปลายอมรับเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 7) โดยพบอัตราการตายสูงสุด (96.67±5.77 เปอร์เซ็นต์) ในปลาที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 1.73±0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 34.07±0.45 องศาเซลเซียส และอัตราการตายต่ำสุด (56.67±5.77 เปอร์เซ็นต์) ในปลาที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 5.52±0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 28.97±0.12 องศาเซลเซียสปลาที่ติดเชื้อมีอาการเลือดออกในสมอง รูทวาร และผิวหนัง การทดลองในครั้งนี้ไม่พบการตายของปลาในชุดควบคุมที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 1.73±0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 34.07±0.45 องศาเซลเซียส และไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย คุณภาพน้ำทั่วไประหว่างการทดลองได้แก่ แอมโมเนียมีค่าเท่ากับ 0.35±0.42 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์มีค่าเท่ากับ 0.24±0.38 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นด่างทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 17.64±11.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเท่ากับ 6.58±0.59 และความเค็มมีค่าเท่ากับ 0 ส่วนในพัน

5. การทดสอบการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาชนิดอื่น

การทดสอบความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ในปลากะพงขาวและปลานิล ไม่พบการตายหรืออาการของโรคในปลากะพงขาวและปลานิลในชุดควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลาย PBS อย่างไรก็ตามพบว่าปลานิลมีอัตราการตายเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน หลังการติดเชื้อ แต่ไม่พบการตายของปลากะพงขาวตลอดการทดลอง (ภาพที่ 15) โดยปลานิลที่ติดเชื้อมีอาการลำตัวสีคล้ำ ตาขุ่นและโปน ว่ายน้ำไม่ปกติ และมีเลือดออกเยื่อหุ้มสมอง

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ

Parameter/Time (day)		0	1	2	3	5	7
Hematocrit (%)	Control	53.09±4.26^{a}	54.66±2.99^{a}	52.08±3.80^{a}	52.61±2.64^{a}	54.37±2.92^{a}	52.51±3.21^{a}
	Treatment	53.46±3.74^{a}	57.51±3.33^{a}	54.96±1.99^{a}	46.05±2.05^{b}	45.66±3.49^{b}	40.06±1.25^{b}
Hemoglobin (g/dl)	Control	15.52±1.41^{a}	15.91±4.39^{a}	16.78±2.15^{a}	15.28±1.18^{a}	16.13±1.52^{a}	15.28±2.10^{a}
	Treatment	16.20±1.82^{a}	21.55±2.26^{b}	16.33±1.02^{a}	15.85±1.85^{a}	13.05±1.58^{b}	12.25±0.82^{b}
Serum protein (mg/ml)	Control	100.00±12.24^{a}	100.12±8.65^{a}	91.08±21.35^{a}	104.80±13.48^{a}	108.33±7.34^{a}	104.40±7.85^{a}
	Treatment	100.28±17.48^{a}	86.04±6.23^{b}	88.89±16.33^{a}	95.73±9.87^{a}	94.44±8.94^{b}	90.00±6.77^{b}
Red blood cell ($\times10^{9}$cell/ml)	Control	5.02±0.48^{a}	5.20±0.36^{a}	5.18±0.78^{a}	5.20±0.39^{a}	5.12±0.31^{a}	4.80±0.42^{a}
	Treatment	5.05±0.16^{a}	5.60±0.40^{a}	5.14±0.70^{a}	4.89±0.63^{a}	3.73±0.47^{b}	3.99±0.33^{b}
White blood cell ($\times10^{7}$cell/ml)	Control	2.94±0.53^{a}	2.50±0.66^{a}	2.39±0.30^{a}	2.47±0.87^{a}	2.92±0.37^{a}	2.85±0.31^{a}
	Treatment	2.94±0.53^{a}	2.44±0.69^{a}	1.84±0.70^{a}	2.11±1.22^{a}	3.89±0.08^{b}	4.58±1.36^{a}
NBT redution(OD)	Control	0.015±0.006^{a}	0.020±0.003^{a}	0.025±0.004^{a}	0.044±0.002^{a}	0.032±0.007^{a}	0.037±0.006^{a}
	Treatment	0.016±0.009^{a}	0.016±0.001^{b}	0.017±0.004^{b}	0.036±0.006^{b}	0.033±0.07^{a}	0.037±0.007^{a}
Lysozyme activity (µg/ml)	Control	13.37±9.90^{a}	13.82±4.00^{a}	13.45±2.61^{a}	14.91±3.73^{a}	14.76±3.40^{a}	14.48±2.93^{a}
	Treatment	13.51±3.42^{a}	14.63±3.03^{a}	19.09±2.82^{b}	24.31±4.11^{b}	35.93±2.39^{b}	32.04±5.15^{b}

*ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ (ต่อ)

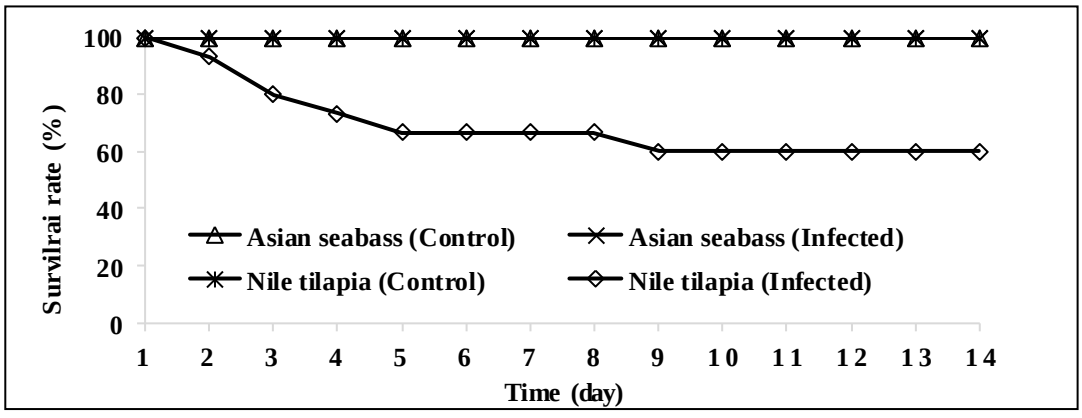
Parameter/Time (day)		0	1	2	3	5	7
Phagocytic activity (%)	Control	12.83±1.03[a]	12.00±0.00[a]	14.00±0.76[a]	10.67±3.06[a]	11.75±2.47[a]	11.67±1.04[a]
	Treatment	12.50±1.00[a]	17.83±3.40[a]	14.67±0.29[a]	16.00±2.83[a]	15.83±5.39[a]	16.50±3.04[a]
Phagocytic index	Control	2.16±0.33[a]	2.14±0.45[a]	2.35±0.46[a]	1.72±0.70[a]	1.75±0.77[a]	1.87±0.32[a]
	Treatment	2.17±0.02[a]	6.06±0.02[b]	4.55±0.28[b]	5.84±2.01[a]	3.67±2.27[a]	3.75±1.07[b]
Average bead per cell (bead/cell)	Control	1.24±0.04[a]	1.26±0.13[a]	1.21±0.09[a]	1.32±0.05[a]	1.33±0.18[a]	1.37±0.13[a]
	Treatment	1.28±0.11[a]	1.65±019[b]	2.11±0.05[b]	1.94±0.11[b]	1.40±0.10[a]	1.38±0.21[a]

*ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 7 อัตราการตายของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำแตกต่างกัน

DO (mg/l)	Temperature (°C)	Mortality (%)
1.73±0.21	28.97±0.12	86.67±5.77
	31.85±0.34	95.00±7.07
	34.07±0.45	96.67±5.77
3.77±0.14	28.97±0.12	76.67±15.28
	31.85±0.34	80.00±17.32
	34.07±0.45	80.00±10.00
5.52±0.21	28.97±0.12	56.67±5.77
	31.85±0.34	83.33±11.55
	34.07±0.45	83.33±5.77
Pooled mean square error		120.59
Mean of main effects		
	1.73±0.21	92.50±7.07[b]
	3.77±0.14	78.89±12.69[a]
	5.52±0.21	75.55±16.66[a]
Temperature (°C)	28.97±0.12	73.33±15.81[x]
	31.85±0.34	86.25±14.07[y]
	34.07±0.45	86.67±10.00[y]
ANOVA: P value		
Temperature		0.027
DO		0.013
Temperature*DO		0.263

*ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)



ภาพที่ 15 อัตราการรอดของปลากะพงขาวและปลานิลหลังติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* นาน 14 วัน

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ที่เป็นตัวชี้ถึงการแพร่กระจายของโรค นับเป็นสิ่งสำคัญต่อการศึกษาด้านโรคสัตว์น้ำ เนื่องจากช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคในสัตว์น้ำ ความสามารถของตัวเชื้อที่ในการดำรงชีวิตภายนอกตัวสัตว์น้ำ ความสามารถของตัวเชื้อในการก่อโรคในตัวสัตว์น้ำ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมในการก่อโรค (Perera *et al*., 1997) การศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ที่แยกได้จากปลาหมอไทยสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-ด่าง ค่อนข้างกว้าง โดยสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ อุณหภูมิปกติ ความเค็มต่ำ และความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง สอดคล้องกับการศึกษาของ Vandamme และคณะ (1997) ที่พบว่าแบคทีเรีย *S. difficilis* เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเช่นกัน

การศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-298 ในปลาหมอไทยพบว่าแบคทีเรียมีความรุนแรงสูง มีค่า 60h-LD_{50} เท่ากับ $4.5x10^{2}$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และ 72h-LD_{50} เท่ากับ $6.3x10^{1}$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีอาการ เซื่องซึมตาโปน ตาขุ่น ท้องบวม เลือดออก และว่ายน้ำผิดปกติ การศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาที่ติดเชื้อมีอาการและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพสอดคล้องกับอาการของปลาป่วยที่พบในธรรมชาติ และใกล้เคียงกับการศึกษาอาการและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซีสที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เคยรายงานไว้ในปลาซีบรีม (*Sparus auratus*) และปลากระบอก (*Liza klunzingeri*) (Evans *et al*., 2002) ปลาจะละเม็ดขาว (Duremdez *et al*., 2004) และปลานิล (Suanyuk *et al*., 2008; Zamri-Saad *et al*., 2010; Abuseliana *et al*., 2011; Suwannasang *et al*., 2014) นอกจากนี้พบว่าปลาหมอไทยที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีการตายในสัปดาห์แรกหลังการติดเชื้อและตายเพียงเล็กน้อยในสัปดาห์ต่อมา คล้ายคลึงกับการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*ซีโรไทป์ III ในปลานิลที่พบว่าปลามีการตายสูงในสัปดาห์แรกหลังการติดเชื้อ (Suwannasang *et al*., 2014) การสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาระหว่างการเก็บตัวอย่างปลาป่วย พบว่าการตายของปลาหมอไทยเกิดขึ้นก่อนปลาดุกอุย สอดคล้องกับการทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาดุกอุยที่พบการตายน้อยมาก (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ทั้งนี้คาดว่าอาจมีปัจจัยอื่นเกี่ยวข้องกับการตายของปลา ดังนั้น การศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการถ่ายทอดเชื้อจากปลาหมอไทยสู่ปลาดุกอุย รวมทั้งผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาดุกอุยนับเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบว่าปลาหมอไทยชุดควบคุมซึ่งไม่มีการติดเชื้อมีองค์ประกอบเลือดเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ฮีโมโกลบิน และปริมาณเม็ดเลือดแดง ใกล้เคียงกับการศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยที่เลี้ยงในกระชังและบ่อดิน (นิรุทธิ์และคณะ, 2548) อย่างไรก็ตามพบว่าปลาหมอไทยที่ติดเชื้อมีปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ฮีโมโกลบิน ปริมาณโปรตีนในซีรั่ม ปริมาณเม็ดเลือดแดง การลดลงของไนโตรบลู เตตร้าโซเลียม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งนี้การลดลงของระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด (innate immunesystem) ส่งผลให้ปลามีความต้านทานโรคน้อยลงและมีอัตราการตายสูงขึ้น การศึกษาครั้งนี้คล้ายคลึงกับรายงานของ Suwannasang และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และ III มีค่าองค์ประกอบเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามแม้ว่าค่าองค์ประกอบเลือดที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีการลดลงเช่นเดียวกับการรายงานของ Suwannasang และคณะ (2014) แต่พบว่าระยะเวลาการลดลงขององค์ประกอบเลือดแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดของปลาและความเข้มข้นเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน

การศึกษาครั้งนี้พบการเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ ปริมาณเม็ดเลือดขาว กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกจับกินต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ในปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib การเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะบางพารามิเตอร์ในปลาระหว่างการติดเชื้อเป็นกลไกการตอบสนองต่อการติดเชื้อ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม ทำให้ปลามีอัตราการรอดเพิ่มขึ้น เอนไซม์ไลโซไซม์เป็นสารน้ำสำคัญที่ทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในตัวเจ้าบ้านโดยเอนไซม์ไลโซไซม์ทำหน้าที่ทำลายพันธะที่เชื่อมต่อระหว่างสาร *N*-acetylmuramic acid และ *N*-acetylglucosamine ที่ผนังเซล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Salton and Ghuysen, 1996) การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ของปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลโซไซม์เป็นสารน้ำที่มีความสำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลา ส่วนกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมเป็นกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ โดยการจับกิน ฆ่า และย่อยจุลินทรีย์แปลกปลอม (Secombes, 1996) การเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณเม็ดเลือดขาว ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกจับกินต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เป็นกิจกรรมสำคัญที่เจ้าบ้านใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม

สิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและอุณหภูมิที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ หากคุณภาพน้ำเสื่อมโทรมและเกิดมลพิษ ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดต่ำลง (สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม, 2555) ทำให้สัตว์น้ำเกิดความเครียด อ่อนแอและยอมรับเชื้อได้ง่ายขึ้น (นเรศ, 2555) การศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาหมอไทยที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำมีอัตราการตายสูง สอดคล้องกับรายงานของ Evans และคณะ (2003) ที่ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่อปริมาณกลูโคสในกระแสเลือด และการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลานิลที่เลี้ยงภายใต้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าปลาที่เลี้ยงภายใต้สภาวะดังกล่าวมีปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้น และพบอัตราการตาย 27 และ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ความเข้มข้น $9.5x10^{1}$ และ $7.5x10^{2}$ ซีเอฟยู ตามลำดับ ภายใต้การขาดออกซิเจน ปลาจะมีความเครียดสูงและยอมรับเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย (Evans *et al*., 2003) อุณหภูมินับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อกิจกรรมของสัตว์เลือดเย็น เช่น ปลา การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์และทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำลดต่ำลง ทำให้เชื้อโรคเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น (นเรศ, 2555) การศึกษาครั้งนี้พบปลาหมอไทยที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงมีอัตราการตายสูงและมีอาการเลือดออกในสมอง รูทวาร และผิวหนัง สอดคล้องกับรายงานของ Rodkhum และคณะ (2011) ที่รายงานว่าอุณหภูมิน้ำมีผลต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia ในปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส มีอัตราการตายสูง และปลาที่ติดเชื้อมีอาการเลือดออกตามผิวหนัง ท้องมาน ไตบวม มีเลือดออกที่ตับและไต

ปลานิลและปลากะพงขาว เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ปัจจุบันมีรายงานการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลานิลและปลากะพงขาวที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. iniae* และ *S. agalactiae* ที่เลี้ยงในหลายประเทศ (Suanyuk *et al*., 2008; Mian *et al*., 2009; Suanyuk *et al*., 2010; Abuseliana *et al*., 2011; Dangwetngam *et al*., 2016) การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิลและปลากะพงขาวในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการตายหรืออาการของโรคในปลากะพงขาว อย่างไรก็ตามพบว่าปลานิลที่ติดเชื้อมีอัตราการตาย 40 เปอร์เซ็นต์ และมีอาการของโรคคล้ายคลึงกับปลาหมอไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถก่อโรคในปลานิลและอาจสร้างปัญหาต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลในอนาคตได้ ดังนั้นการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิลจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและควรศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

การติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

1. บทนำ

ปลาน้ำจืดอยู่คู่วิถีชีวิตของคนไทยมาช้านาน เป็นสัตว์น้ำที่คนไทยนิยมบริโภค เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูก รสชาติดี ปลาน้ำจืดที่คนไทยนิยมบริโภค เช่น ปลาช่อน ปลานิล ปลาสลิด ปลากราย และปลาดุก เป็นต้น ปลาดุกเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี มีรสชาติอร่อย สามารถนำไปแปรรูปหรือทำอาหารได้หลากหลายชนิด ด้วยสาเหตุนี้ทำให้ปลาดุกเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันมากในประเทศไทย การสำรวจจำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาดุกของไทยในปี พ.ศ. 2557 พบว่ามีจำนวนฟาร์มที่เพาะเลี้ยงปลาดุกประมาณ 94,887 ฟาร์ม สามารถผลิตปลาดุกได้ถึง 133,387 ตัน เพื่อใช้สำหรับบริโภคภายในประเทศ และส่งออกไปต่างประเทศในรูปของปลาดุกแช่แข็ง ปลาดุกแห้งไม่รมควัน และปลาดุกมีชีวิต รวมแล้วจำนวน 523.2 ตัน คิดเป็นเงินมูลค่า 51.3 ล้านบาท (สุกัญญา, 2557) สร้างรายได้ให้กับประเทศและเกษตรกรเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามปัญหาและอุปสรรคในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตของปลาดุกมีหลายสาเหตุ ไม่ว่าจะเป็น คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงที่ไม่ดี ทำให้ปลาเจริญเติบโตช้า หรือตาย ผลผลิตที่ได้ต่ำลง รวมทั้งปัญหาด้านโรค ทั้งโรคติดเชื้อแบคทีเรีย และโรคติดเชื้อปรสิต โดยแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาดุก เช่น แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่เป็นสาเหตุของโรค Motile *Aeromonas* Septicemia แบคทีเรีย *Edwardsiella ictaluri* ที่เป็นสาเหตุของโรค Enteric septicemia of catfish และแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* ที่เป็นสาเหตุของโรคคอลัมนาริส และปรสิตที่ก่อโรคในปลาดุก เช่น *Epistylis* sp. ซึ่งเป็นปรสิตเซลล์เดียว ปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ซึ่งเป็นปรสิตภายนอก และ *Trypanosoma* sp. ซึ่งเป็นปรสิตที่พบในกระแสเลือดของปลาดุก (กรรนิการ์ และอาคม, 2537; อภิญญา, 2546; Suanyuk *et al*., 2014) การศึกษาก่อนหน้านี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* จากปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่เลี้ยงร่วมกับปลาหมอไทยในจังหวัดนครศรีธรรมราช แต่เมื่อนำมาทดสอบการก่อโรคในปลาดุกอุย พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทำให้ปลาดุกอุยตายเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้คาดว่าอาจมีปัจจัยอื่นโน้มนำให้เกิดการตายในปลาดุกอุยร่วมด้วย การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพยาธิวิทยาการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับปรสิตปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ในปลาดุกอุย ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการศึกษาพยาธิวิทยาของการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับปรสิตในสัตว์น้ำ และเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลาดุกในประเทศไทย

2. วิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

ลูกปลาดุกอุยขนาดประมาณ 3 นิ้ว ที่มีสุขภาพแข็งแรง และไม่ติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิต ซื้อจากฟาร์มในอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช นำมาเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา ในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 3 ตัน เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดลอยน้ำวันละ 2 มื้อ ให้อากาศตลอดเวลา จนได้น้ำหนักประมาณ 40 กรัม

2. แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU-KSAAHRC-252 ที่แยกได้จากปลาดุกอุยป่วยที่เลี้ยงในอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หรือ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

3. ปรสิตและการติดเชื้อปรสิต

ปรสิตที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ ปลิงใส *Gyrodactylus* sp. แยกได้จากปลาดุกอุย และทำให้ปลาดุกอุยที่เลี้ยงติดปลิงใส โดยแบ่งปลาดุกอุยออกเป็น 2 ถัง จากนั้นใช้ปลาดุกอุยที่ติดปรสิตปลิงใส ใส่ลงไปในถังที่ต้องการจำนวน 1 ถัง เลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์เพื่อให้ปลิงใสที่อยู่ในถังเพิ่มปริมาณ และทำให้ปลาดุกอุยติดปลิงใสทั่วทั้งถัง

4. การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลาดุกอุย

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาจากถังที่ติดปลิงใสและถังที่ไม่ติดปลิงใสจำนวน 6 ตัวต่อถัง นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลาทั้งสองกลุ่มตามพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ฮีโมโกลบิน ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด การลดลงของไนโตรบลู เตตร้าโซเลียม กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ และการจับกินสิ่งแปลกปลอม ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 4

5. การศึกษาพยาธิวิทยาการติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาดุกอุย

5.1 การติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาดุกอุย

ศึกษาการติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาดุกอุยที่มีขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 41.32±0.59 กรัม วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) โดยคัดเลือกปลาดุกอุยจากถังที่ติดปลิงใส และไม่ติดปลิงใส นำมาแยกเลี้ยงในตู้ๆ ละ 20 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ปลาดุกอุยปกติ
ชุดการทดลองที่ 2 ปลาดุกอุยติดแบคทีเรีย *S. agalactiae*
ชุดการทดลองที่ 3 ปลาดุกอุยติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp.
ชุดการทดลองที่ 4 ปลาดุกอุยติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae*

เลี้ยงปลาแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนเริ่มการทดลองเพื่อให้ปลาดุกอุยปรับสภาพเข้ากับการเลี้ยงในตู้ ระหว่างการทดลองทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำต่างๆ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง อัลคาไลนิตี้ แอมโมเนีย และไนไตรท์ตามวิธีการมาตรฐาน Boyd และ Tucker (1992) และ APHA และคณะ (1998)

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU–KSAAHRC-252 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว

13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) จำนวน 3 ครั้ง และละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) ให้ได้ความเข้มข้น 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของปลาดุกอุยปกติและปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. (ชุดการทดลองที่ 2 และ 4) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

สังเกตอาการและบันทึกอัตราการตายของปลาทุกชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน นำปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสมาตรวจนับจำนวนปลิงใสบริเวณเหงือกและผิวหนังก่อนเริ่มการทดลองและหลังการทดลอง ปลาที่ตายในระหว่างการทดลองทุกกลุ่มจะทำการเพาะเชื้อจาก สมอง ตับ และไต เพื่อยืนยันสาเหตุการตายและทำการตรวจนับจำนวนปลิงใสจากปลาที่ตายทุกตัว

5.2 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae*

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตับ ไต สมอง และม้ามของปลาดุกอุยใกล้ตายจากการทดลองติดปลิงใส ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แสดงอาการของโรคชัดเจนมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพตามวิธีการของ Humason (1979) โดยนำมาดองในสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน และเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ นำอวัยวะทั้งหมดมาผ่านขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Automatic Tissue Processor ซึ่งจะผ่านแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จาก 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ แล้วผ่านลงในไอโซโพรพิล และไซลีน และฝังลงในพาราพลาส นำตัวอย่างที่ได้มาตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้มีความหนา 3-5 ไมครอน จากนั้นย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน ตามวิธีการของ Bancroft (1967) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใส

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* PSU–KSAAHRC-252 ตามวิธีการข้อ 5.1 นำไปฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัวดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ปลาดุกอุยติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp.
ชุดการทดลองที่ 2 ปลาดุกอุยติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae*

แยกเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใสด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Xu และคณะ (2007) โดยเก็บปลิงใสจากปลาทั้ง 2 ชุดการทดลอง ในระยะเวลาต่างๆ นาน 7 วัน ใช้กระจกสไลด์ขูดเมือกบริเวณผิวหนังทั้งสองข้างของลำตัวใสในบีกเกอร์ที่เติมน้ำสะอาด ใช้ปิเปตดูดปลิงใสจากบีกเกอร์พร้อมนับจำนวนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 นาที เพื่อทำให้ปลิงใสหยุดการเคลื่อนที่ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (mini-centrifuge) ให้ปลิงใสที่อยู่ในหลอดตกตะกอน ดูดน้ำที่อยู่ในหลอดทิ้ง แล้วฆ่าเชื้อภายนอกตัวปลิงใสด้วยยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสเตรปโตมัยซิน ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 200 ไมโครลิตรโดยเติมลงในหลอด ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ล้างยาปฏิชีวนะออกด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) จำนวน 3 ครั้ง และเติมสายละลาย PBS (pH 7.4) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใช้แท่งบดๆ ปลิง

ใสที่อยู่ในหลอดให้ละเอียด ดูดสารละลายที่ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำการนับและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* นำไปเลี้ยงต่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และยืนยันชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีได้แก่ การย้อมแกรม การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส คาตาเลส และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 STREP (bioMérieux)

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว (One way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการทดลอง

1. ปรสิตปลิงใส

ปลิงใสที่แยกได้จากปลาดุกอุยมีลำตัวสีขาวใส ความยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปลายหน้าสุดแยกออกเป็น 2 แฉก บริเวณโอพีสแฮพเตอร์มีสมอใหญ่อยู่ตรงกลาง 1 คู่ และมีมาร์จินอล ฮุกรอบๆ 16 อัน ซึ่งเป็นปลิงใสที่จัดอยู่ในครอบครัวไจโรเดคไทลิดี้ (Gyrodactylidae) สกุลไจโรเดคไทลัส (*Gyrodactylus* sp.) (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 16 ปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ที่แยกได้จากปลาดุกอุย

2. องค์ประกอบเลือดของปลาดุกอุย

การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. และปลาดุกอุยปกติ พบว่าปลาดุกอุยที่ติดปรสิต มีค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณโปรตีนในซีรั่มต่ำกว่าปลาดุกอุยปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 8) ส่วนค่าองค์ประกอบเลือดอื่นๆ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดขาว การลดลงของ NBT ไลโซไซม์ การจับกินสิ่งแปลกปลอม ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดบีทที่ถูกจับกินต่อเซลล์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ค่าองค์ประกอบเลือดของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. และปลาดุกอุยปกติ

Blood parameters	Parasitic infection	
	No infection	*Gyrodactylus* sp.
Haematocrit (%)	33.48 ± 4.1[a]	27.29 ± 4.0[b]
Haemoglobin (g/dl)	5.85 ± 0.69[a]	4.71 ± 0.82[b]
Red blood cell ($x10^9$ cell/mm^3)	3.05 ± 0.37[a]	2.24 ± 0.47[b]
White blood cell ($x10^7$ cell/mm^3)	3.76 ± 0.87[a]	4.27 ± 0.95[a]
Serum protein (mg/ml)	35.17 ± 3.68[a]	21.55 ± 6.04[b]
NBT reduction	0.011 ± 0.009[a]	0.014 ± 0.012[a]
Lysozyme (µg/ml)	8.28 ± 4.92[a]	9.41 ± 7.54[a]
Phagocytosis (%)	11.00 ± 1.41[a]	9.5 ± 1.73[a]
Phagocytic index	0.03 ± 0.00[a]	0.02 ± 0.005[a]
Average number of the bead ingested per cell	2.41 ± 0.34[a]	2.69 ± 0.05[a]

หมายเหตุ ค่าองค์ประกอบเลือดในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเดียวกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

3. การศึกษาการติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาดุกอุย

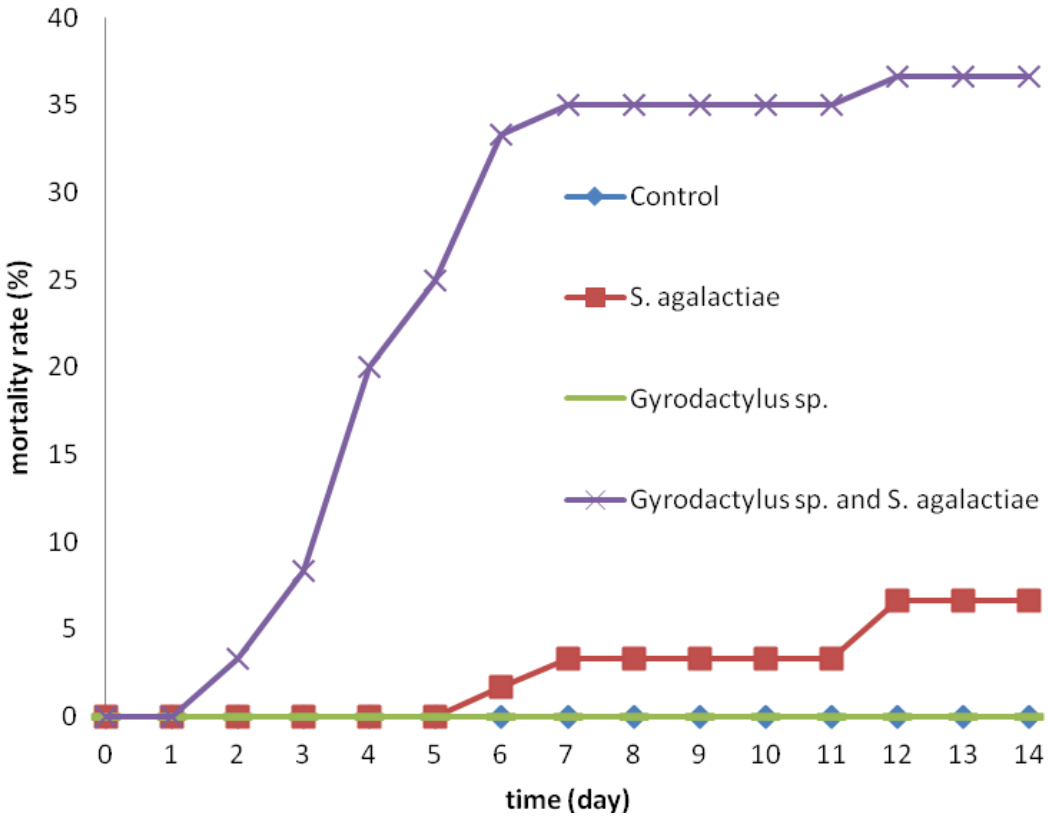
การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. และปลาดุกอุยปกติ พบว่าปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอัตราการตายเฉลี่ยสูงสุดคือ 36.7±12.6 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับปลาดุกอุยที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* เพียงอย่างเดียว ที่มีอัตราการตายเฉลี่ย 6.7±5.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาในกลุ่มที่ติดปลิงใสเพียงอย่างเดียวกับปลาในกลุ่มควบคุมไม่มีการตาย (ตารางที่ 9 และภาพที่ 17) โดยปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอาการว่ายน้ำควงสว่าน มีของเหลวในช่องท้อง ตับซีด ม้ามโต เลือดออกในสมอง มีการขับเมือกมากผิดปกติ ครีบกร่อน และผิวหนังมีสีซีด (ภาพที่ 18) ใกล้เคียงกับปลาดุกอุยที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* เพียงอย่างเดียว ที่มีอาการคล้ายกับปลาที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ยกเว้นการขับเมือกมากผิดปกติ ครีบกร่อน และผิวหนังมีสีซีด การตรวจนับจำนวนปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ในปลาดุกอุย สามารถพบปลิงใสเป็นจำนวนมากบริเวณผิวหนัง และพบปลิงใสเล็กน้อยในเหงือกของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* และปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 10) คุณภาพน้ำระหว่างการทดลองมีค่าออกซิเจนละลายน้ำ 7.01±0.34 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30.14±0.86

องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 6.21±0.93 ค่าอัลคาไลนิตี้ 23.52±16.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าแอมโมเนีย 3.11±2.49 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าไนไตรท์ 1.75±0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 9 อัตราการตายของปลาดุกอุยในแต่ละชุดการทดลอง

Parasitic infection	Challenge	Number dead/total fish	Mortality (%)
T1: No infection	None (N-N)	0/0	0±0[b]
T2: No infection	*S. agalactiae* (N-S)	4/60	6.7±5.8[b]
T3: *Gyrodactylus* sp.	None (G-N)	0/0	0±0[b]
T4: *Gyrodactylus* sp.	*S. agalactiae* (G-S)	22/60	36.7±12.6[a]

หมายเหตุ ค่าองค์ประกอบเลือดในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเดียวกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

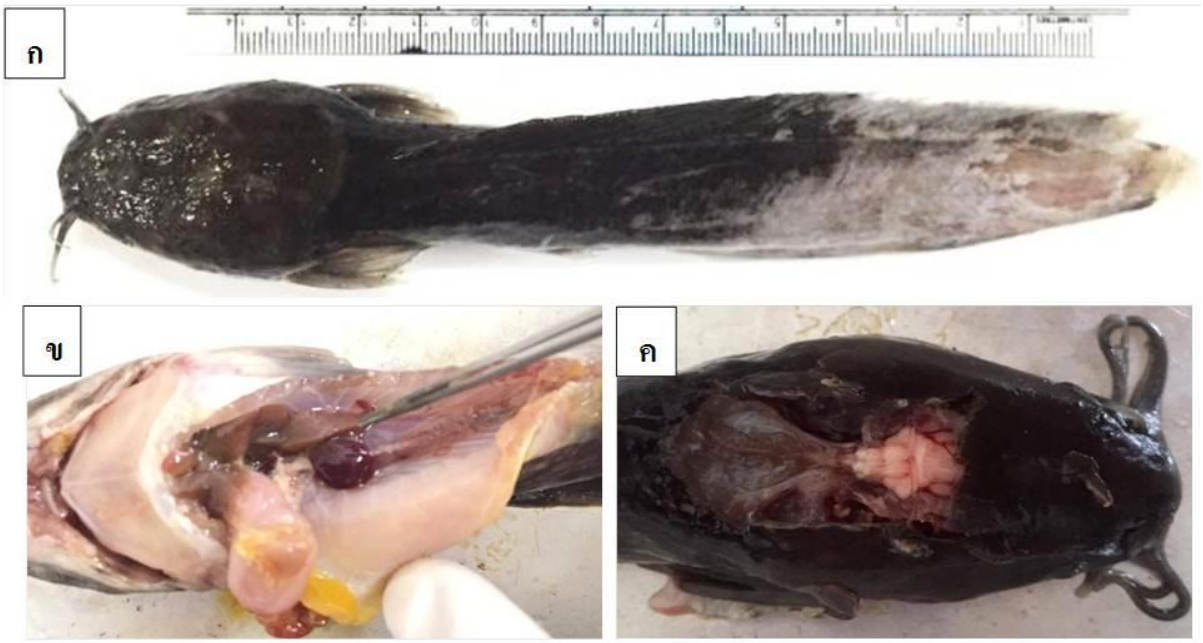


ภาพที่ 17 อัตราการตายสะสมของปลาดุกอุยในแต่ละชุดการทดลอง

ตารางที่ 10 จำนวนปลิงใสที่พบบริเวณผิวหนังและเหงือกของปลาดุกอุยในแต่ละกลุ่ม

Parasitic infection	challenge	Day 0		Day 1-13		Day 14	
		Skin	gill	skin	Gill	Skin	gill
T1: No infection	None (N-N)	0±0	0±0	NA	NA	0±0	0±0
T2: No infection	*S. agalactiae*(N-S)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
T3: *Gyrodactylus* sp.	None (G-N)	9.3±2.1	0±0	NA	NA	1.67±0.58	0±0
T4: *Gyrodactylus* sp.	*S. agalactiae*(G-S)	9.3±2.1	0±0	37.5±29.6	1.1±1.8	5.3±4.5	0±0

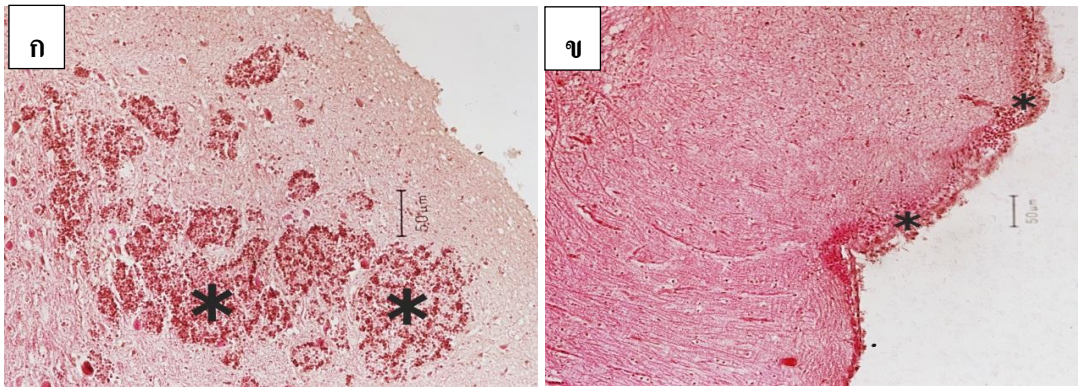
หมายเหตุ NA: not available = ไม่มีตัวอย่าง



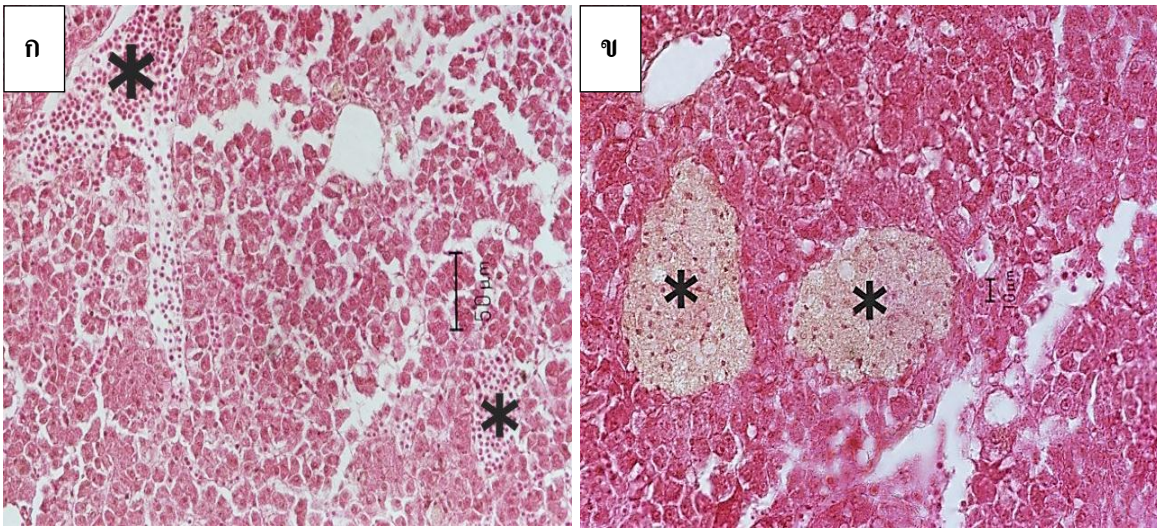
ภาพที่ 18 อาการของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* (ก) ผิวหนังมีสีซีด และครีบกร่อน (ข) ม้ามโต (ค) เลือดออกในสมอง

4. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาดุกอุย

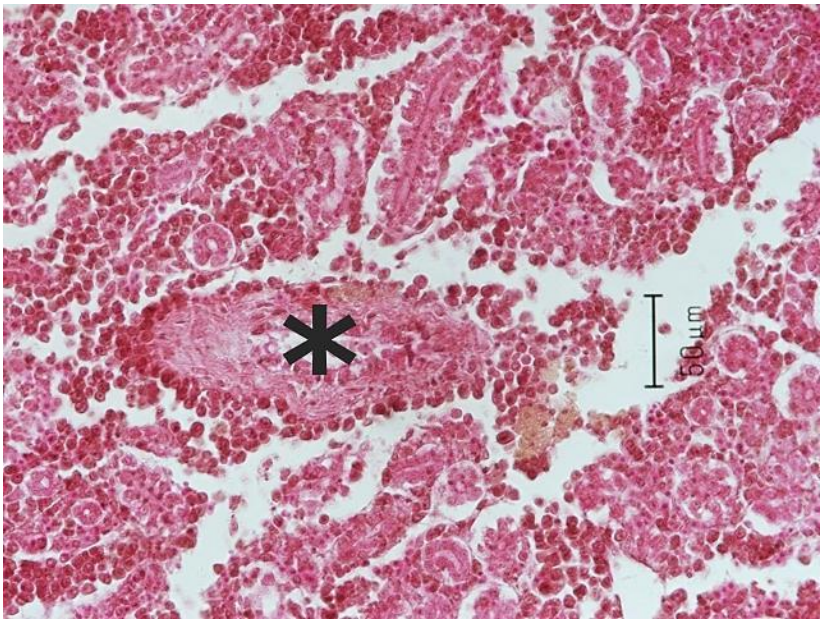
การศึกษาเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่าปลาที่ติดเชื้อมีเลือดออกในสมอง (ภาพที่ 19ก) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) (ภาพที่ 19ข) พบอาการเลือดคั่งภายในตับ (congestion) (ภาพที่ 20ก) และเกิดการแทรกตัวของเมลาโนแมคโครฟาจ (melanomacrophage) ในเนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 20ข) ท่อไตเสื่อมสลายและมีเลือดออกในไต (hemorrhage) (ภาพที่ 21) ส่วนม้ามมีอาการเลือดออกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ (diffuse hemorrhage) (ภาพที่ 22)



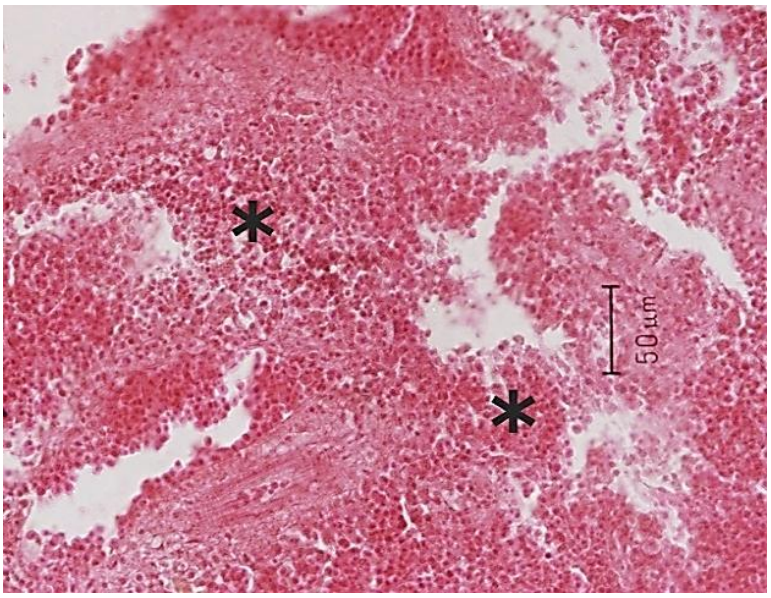
ภาพที่ 19 สมองของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* (ก) เลือดออกในสมอง (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm (ข) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm



ภาพที่ 20 ตับของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* (ก) เลือดคั่งภายในตับ (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm (ข) เกิดการแทรกตัวของเมลาโนแมคโครฟาจในเนื้อเยื่อตับ (ดอกจัน) H&E, bar = 10 µm



ภาพที่ 21 ไตของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* เกิดการเสื่อมสลายของท่อไต (ดอกจัน) และมีเลือดออกในไต H&E, bar = 50 µm



ภาพที่ 22 ม้ามของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอาการเลือดออกกระจายในเนื้อเยื่อ (ดอกจัน) H&E, bar = 50 µm

5. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใส

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลิงใสในปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสเพียงอย่างเดียว และปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่าปลาดุกอุยทั้ง 2 ชุดการทดลองมีจำนวนปลิงใสอยู่ในช่วง 7- 31 ตัวต่อปลาดุกอุย 1 ตัว โดยปลิงใสที่แยกจากปลาดุกอุยทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีจำนวนสูงที่สุดในวันที่ 2 หลังการติดเชื้อ จากนั้นเริ่มลดลงจำนวนลงจนถึงวันที่ 7 (ตารางที่ 11) การทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลิงใสไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใสในปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสเพียงอย่างเดียว แต่พบเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใสในปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังการติดเชื้อ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนปลิงใส และเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใสในระยะเวลาต่างๆ หลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

Time	Fish group			
	Gyrodactylus sp.		*Gyrodactylus* sp.+*S. agalactiae*	
	Number of skin fluke	*S. agalactiae*	Number of skin fluke	*S. agalactiae*
0h	7.0±2.6	-	7.0±2.6	-
12h	12.3±6.8	-	13.3±13.1	-
24h	10.3±3.8	-	18.0±8.2	-
36h	16.0±7.2	-	25.0±11.0	+
48h	31.3±21.5	-	25.6±6.5	+
3day	27.0±13.5	-	20.0±7.1	-
5day	13.7±16.9	-	15.0±7.1	-
7day	14.7±12.8	-	14.5±9.2	-

หมายเหตุ (+) ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลิงใส; (-) ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลิงใส

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

โรคติดเชื้อปรสิตและแบคทีเรียสร้างปัญหาอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยโรคสำคัญที่เกิดจากปรสิตได้แก่ Trypanosomiasis Velvet disease Trichodiniasis และ skin flukes disease (อภิญญา, 2546; ประไพสิริ, 2546) และโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้แก่ Motile *Aeromonas* septicemia Enteric septicemia of catfish และ Columnaris (นเรศ, 2555; ชนกันต์, 2557; Suanyuk *et al*., 2014) นอกจากโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือปรสิตอย่างใดอย่างหนึ่งแล้ว ปัจจุบันยังพบการติดเชื้อร่วมกันของแบคทีเรีย และปรสิต (Xu *et al*., 2007; 2009) ที่ส่งผลให้ปลามีอัตราการตายสูงขึ้น การศึกษาครั้งนี้ทดลองติดเชื้อปรสิต *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลาดุกอุย โดยปลิงใส *Gyrodactylus* sp. เป็นปรสิตที่สร้างปัญหาอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงปลาดุกหลายชนิด รวมทั้งปลาดุกอุย (SEAFDEC/AQD, 1993; Lerssutthichawal, 2008) และโรคสเตรปโตคอคโคซีสที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* เป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างมากในเพาะเลี้ยงปลานิล (Suanyuk *et al*., 2008) ในประเทศไทย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. เปรียบเทียบกับปลาดุกอุยปกติ พบว่าปลาดุกอุยที่ติดปรสิตมีค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง และโปรตีนในซีรั่มต่ำกว่าปลาดุกอุยปกติอย่างมีนัยสำคัญ คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Jeronimo และคณะ (2014) ที่รายงานถึงการลดลงของค่าฮีมาโตคริต ค่าฮีโมโกลบิน และปริมาณเม็ดเลือดแดงในปลาเปคู (*Piaractus mesopotamicus*) ที่ติดปลิงใส *Anacanthorus penilabiatus* ซึ่งเป็นปรสิตในครอบครัวเดกไทโลไจริดี้ โดยการลดลงขององค์ประกอบเลือดของปลาที่ติดเชื้อปรสิต อาจมีสาเหตุจากกลไกการยึดเกาะของปรสิต วงจรชีวิต และจำนวนปรสิต โดยพบว่าจำนวนปรสิตมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลา ซึ่งปลาที่ติดปรสิตจำนวนมากจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดอย่างชัดเจน (Jeronimo *et al*., 2014)

การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ให้กับปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. และปลาดุกอุยปกติ พบว่าปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอัตราการตายเฉลี่ยสูงสุดคือ 36.7 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับปลาดุกอุยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีอัตราการตายเฉลี่ย 6.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสเพียงอย่างเดียวกับปลาในกลุ่มควบคุมไม่มีอัตราการตาย สอดคล้องกับการทดลองของ Xu และคณะ (2009) ที่รายงานถึงอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* ร่วมกับปรสิต *Ichthyophthirius multifiliis* โดยพบว่าปลานิลที่ติดปรสิต *I. multifiliis* และปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* เพียงอย่างเดียวมีอัตราการตายเฉลี่ย 4 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* ร่วมกับติดปรสิต *I. multifiliis* มีอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้นเป็น 88 เปอร์เซ็นต์ และรายงานของ Xu และคณะ (2007) ที่พบว่าการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* ร่วมกับปรสิตปลิงใส *Gyrodactylus niloticus* ในปลานิล ทำให้ปลานิลมีอัตราการตายเฉลี่ยสูงขึ้นเป็น 42.2 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* เพียงอย่างเดียวที่มีอัตราการตาย 6.7 เปอร์เซ็นต์ และปลานิลที่ติดปลิงใส *G. niloticus* เพียงอย่างเดียวไม่พบอัตราการตาย ทั้งนี้สาเหตุการตายที่สูงขึ้นของปลาดุกอุยที่ติดปรสิตร่วมกับแบคทีเรีย เนื่องจากปลิงใสทำให้ปลามีระบบภูมิคุ้มกันลดลง สังเกตได้จากผลองค์ประกอบเลือดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสมีค่าองค์ประกอบเลือดต่ำลงกว่าปลาปกติแสดงให้เห็นว่าปลาที่ติดปรสิตมีความอ่อนแอ นอกจากนี้ปลาที่มีความเครียดสูง และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่ำ จะมีความสามารถในการต้านทานโรคลดลง (Bowers *et al*., 2000) เป็นสาเหตุทำให้การติดเชื้อปลิงใสร่วมกับแบคทีเรียมีความรุนแรงของโรคเพิ่มสูงขึ้น

ปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีการขับเมือกมากผิดปกติ ครีบกร่อน และบริเวณผิวหนังมีสีซีด สอดคล้องกับรายงานของ Mohamed และคณะ (2010) ที่พบว่าปลาดุกรัสเซียวัยอ่อน (*Clarias gariepinus*) ที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. มีครีบกร่อน มีรอยถลอกบริเวณผิวหนัง และมีการขับเมือกมาก เนื่องจากปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่งสารเมือก (goblet cell) ในผิวหนัง และทำให้ปลามีการขับเมือกออกมามากเพราะเมือกเป็นส่วนช่วยปกป้องผิวหนังของปลา ส่วนอวัยวะภายในของปลาที่ติดปรสิตปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบตับมีสีซีด ม้ามโต มีของเหลวในช่องท้อง เลือดออกในสมอง สอดคล้องกับรายงานของ Giordano และคณะ (2010) ที่พบว่าปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอาการว่ายน้ำผิดปกติ เลือดออกบริเวณผิวหนัง มีของเหลวในช่องท้อง ม้ามโต ตับมีสีซีด เช่นเดียวกับ เฉลิม และคณะ (2548) ที่พบว่าปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. มีอาการตาขุ่น มีของเหลวในช่องท้อง สมองเป็นสีชมพู และตับซีด

ปลิงใส *Gyrodactylus* sp. เป็นปรสิตภายนอก ตามปกติแล้วสามารถพบได้ที่บริเวณเหงือก ผิวหนัง และครีบของปลา (Xu *et al*., 2007; Paladini *et al*., 2009) การทดลองครั้งนี้ตรวจนับจำนวนปลิงใสบริเวณผิวหนัง และเหงือกปลาดุกอุยเนื่องจากผิวหนังเป็นพื้นที่ส่วนใหญ่ของปลาดุกอุย และเหงือกเป็น

อวัยวะที่สามารถพบปลิงใสได้บ่อย จึงใช้ทั้งสองบริเวณนี้เป็นตัวแทนในกาตรวจนับจำนวนปลิงใส โดยการตรวจนับจำนวนปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ในปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* และปลาดุกอุยที่ติดปลิงใสเพียงอย่างเดียว พบว่าบริเวณที่พบปลิงใสมีความคล้ายคลึงกับการทดลองของ Elgendy และคณะ (2016) ที่รายงานว่าบริเวณที่สามารถพบปลิงใส *G. anguilla* ในปลาไหลยุโรป (*Anguilla anguilla*) ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ร่วมกับปลิงใส *G. anguilla* คือผิวหนังและเหงือก อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากการทดลองของ Collins และคณะ (2002) และ Vallat และ Berthe (2016) ที่รายงานพบปลิงใส *G. salaris* มากบริเวณครีบ และพบบ้างบริเวณลำตัว เหงือก และปากของปลาแซลมอน ทั้งนี้บริเวณที่พบปรสิตขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของปรสิตแต่ละชนิด รวมทั้งชนิดของตัวเจ้าบ้าน โดยการแพร่กระจายของปรสิตอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ปลาบางชนิดอาจพบปรสิตได้มากบริเวณลำตัว และอาจพบได้น้อยบริเวณเหงือก (Vallat and Berthe, 2016)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่าปลาที่ติดเชื้อมีอาการเลือดออกในสมอง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ มีเลือดคั่งภายในตับ เกิดการแทรกตัวของเมลาโนแมคโครฟาจในเนื้อเยื่อตับ และมีเลือดออกกระจายในม้าม สอดคล้องกับการทดลองของ Alsaid และคณะ (2013) ที่พบว่าม้ามของปลานิลแดงที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* เกิดการเสื่อมสลายของเรดพัลพ์ (red pulp) มีเลือดออกกระจายภายในม้าม เยื่อหุ้มสมองอักเสบและมีเลือดออกในสมอง เนื้อเยื่อตับเกิดช่องว่างภายในเซลล์ มีจำนวนเมลาโนแมคโครฟาจเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนและขนาดของเมลาโนแมคโครฟาจเป็นอาการที่พบได้บ่อยในปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนการเสื่อมสลายของท่อไต และมีเลือดออกในไตยังสอดคล้องกับรายงานของ Laith และคณะ (2017) ที่พบว่าไตของปลานิลที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอาการเลือดออกภายในไต และมีลิ่มเลือดอุดตันในท่อไต

การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลิงใสที่แยกได้จากปลาดุกอุยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังการติดเชื้อ ชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สามารถถ่ายทอดจากปลาดุกอุยสู่ปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ได้ คล้ายคลึงกับการทดลองของ Xu และคณะ (2007) ที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* จากปลิงใส *G. niloticus* ในปลานิลที่ติดแบคทีเรีย *S. iniae* ร่วมกับปลิงใสที่ 24 และ 72 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ทั้งนี้ Xu และคณะ (2007) ยังกล่าวว่าปลิงใสอาจทำหน้าที่เป็นพาหะของเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* เนื่องจากแบคทีเรีย *S. iniae* ที่อยู่ในปลิงใสอาจเข้าสู่ปลาตัวอื่นได้ทางบาดแผลบนผิวหนังที่เกิดจากขอหนามเมื่อปลิงใสเข้าไปเกาะในปลาตัวใหม่

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อปรสิตร่วมกับแบคทีเรียส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงปลาดุกอุย โดยปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. มีค่าองค์ประกอบเลือดต่ำกว่าปลาดุกอุยปกติ ส่งผลให้ปลาดุกอุยที่ติดปลิงใส *Gyrodactylus* sp. ร่วมกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีอัตราการตายที่สูงขึ้น ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดขึ้นกับปลาดุกอุย และเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลาดุกในอนาคต

บทที่ 6

การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล (*Oreochomis niloticus*)

1. บทนำ

ปลานิล *(Oreochromis niloticus)* เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นปลาที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เลี้ยงง่าย และเจริญเติบโตเร็ว การบริโภคปลานิลในประเทศไทยสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของการบริโภคปลาทั้งหมด (Piumsombun, 2003) และมีแนวโน้มการบริโภคที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในปี พ.ศ. 2552 ประเทศไทยได้ผลิตปลานิลได้สูงถึง 221,042 ตัน (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2552) คิดเป็น 42 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดและมีแนวโน้มการส่งออกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี พ.ศ. 2552 มีปริมาณผลผลิตปลานิลส่งออกรวม 14,103 ตัน มูลค่าการส่งออกสูงถึง 1,153 ล้านบาท (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, 2555) ปัจจุบันผลผลิตปลานิลยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด ทำให้การเลี้ยงปลานิลเป็นธุรกิจการเกษตรที่ได้รับความสนใจของประชาชนทั่วไป เนื่องจากปลานิลสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพทั้งในบ่อดินและในกระชัง จึงทำให้เกษตรกรนิยมเลี้ยงปลานิลที่ความหนาแน่นสูงและให้อาหารมากเกินความต้องการ ทำให้ปลาเกิดความเครียด ระบบภูมิคุ้มกันลดลง และยอมรับต่อเชื้อโรคได้ง่ายขึ้น โดยโรคสำคัญชนิดหนึ่งที่มีรายงานพบการระบาดในปลานิล คือ โรคสเตรปโตคอคโคซีส (Streptococcosis) ที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ซึ่งทำความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอย่างมาก โดยโรคสเตรปโตคอคโคซีสระบาดได้ทั้งในปลาที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติ (Baya *et al.,* 1990) และปลาในฟาร์มเพาะเลี้ยง (Hoshina *et al.,* 1958; Perera *et al.,* 1997) สามารถพบการระบาดได้ทั้งในเขตน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม (Evans *et al.,* 2002) ความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นสร้างความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตปลาเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด (Inglis *et al.,* 1993) โดยในประเทศไทยพบการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาบู่ทราย (จิราพร และคณะ, 2529) ปลากะพงขาว (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543; Suanyuk *et al*., 2010) และปลานิล (Suanyuk *et al*., 2008; Dangwetngam *et al*., 2016) โดยแบคทีเรียที่มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus iniae* ในพื้นที่เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ดริญญา และคณะ, 2550) ภาคกลางและภาคใต้ (นเรศ และคณะ, 2548; Suanyuk *et al*., 2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาพบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทยมีเพียง 2 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ Ia และซีโรไทป์ III ในขณะที่ต่างประเทศมีรายงานการติดเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลาหลายชนิด การศึกษาในบทที่ 4 พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib สามารถก่อโรคได้ในปลานิล การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล รวมทั้งและการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันในปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ เพื่อเป็นแนวทางในการรับมือโรค สเตรปโตคอคโคซีส ที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ซึ่งอาจเกิดขึ้นในปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทยในอนาคต

2. วิธีการทดลอง

1. การศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล

ศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิลขนาดน้ำหนัก 36.97±0.46 กรัม วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยการทดลองประกอบด้วย 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม ฉีดปลาด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline เข้าช่องท้อง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดปลาด้วยสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ชุดการทดลองที่ 3 ฉีดปลาด้วยสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ชุดการทดลองที่ 4 ฉีดปลาด้วยสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

บันทึกอาการและจำนวนปลาที่ตายทุกวันๆ ละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน โดยปลาทุกตัวที่ตายจะถูกนำมาแยกเชื้อจากสมอง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อยืนยันสาเหตุการตายจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พร้อมกันนี้ทำการเก็บตัวอย่างปลาใกล้ตายที่แสดงอาการของโรคชัดเจนและนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพตามวิธีมาตรฐาน (Humason, 1979)

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลานิลที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยการสุ่มปลาน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 35 กรัมต่อตัว เลี้ยงในตู้ทดลองละ 25 ตัวต่อซ้ำเพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือดในปลานิลที่ได้เชื้อ *S. agalactiae* โดยแบ่งการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม คือชุดที่ฉีด PBS pH 7.4 (phosphate buffered saline)
ชุดการทดลองที่ 2 ชุดทดลอง คือชุดที่ฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณเชื้อ 3.53×10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

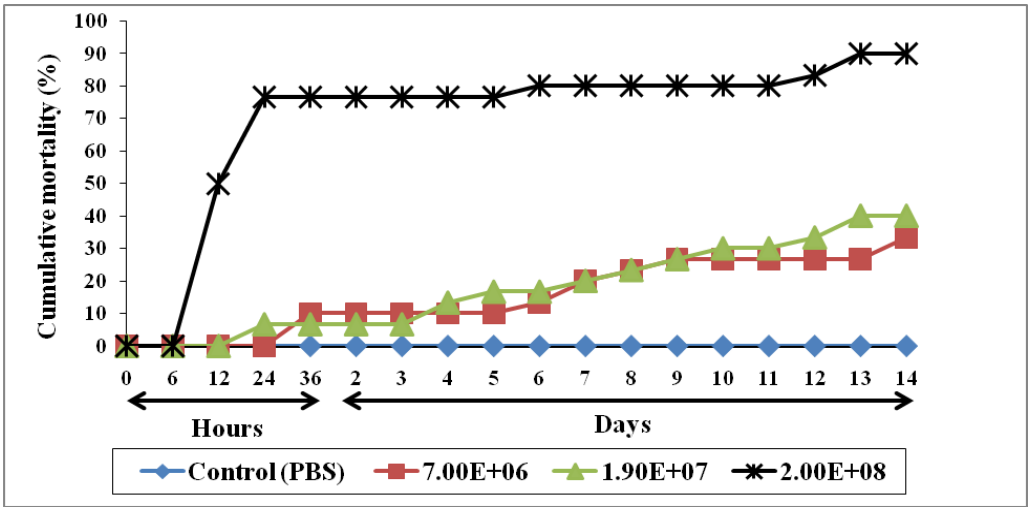
บันทึกอาการและจำนวนปลาที่ตายทุกวันโดยปลาทุกตัวที่ตายจะถูกนำมาแยกเชื้อจากสมอง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อยืนยันสาเหตุการตายจากแบคทีเรีย *S. agalactiae* ส่วนปลาที่เหลือทำการสุ่มเก็บเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกัน ในวันที่ 0, 1, 3, 6 และ 9 หลังการฉีดเชื้อ โดยสุ่มเก็บปลาซ้ำละ 3 ตัว นำมาสลบด้วยน้ำมันกานพลู ก่อนเจาะเลือดจากโคนหาง เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ปริมาณฮีโมโกลบิน ปริมาณโปรตีนในซีรั่ม ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ และการลดลงของไนโตรบลู เตตร้าโซเลี่ยม ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 4

3. ผลการทดลอง

1. การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิล

การศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ibในปลานิลโดยวิธีการฉีดแบคทีเรียความเข้มข้นประมาณ 10^6 - 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวทำให้ปลาตาย 33.33 – 90.00 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน (ภาพที่ 23) โดยปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตายสูงมากในช่วงวันแรก ส่วนปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10^6-10^7 มีอัตราการตายค่อนข้างต่ำในช่วงแรกของการติดเชื้อแต่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังติดเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง การศึกษาอาการของปลาที่ติดเชื้อพบว่าช่วงแรกปลามีอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำเสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำ (ภาพที่ 24) ตาโปนข้างเดียวหรือทั้งสองข้างร่วมกับอาการขุ่นขาวของกระจกตา เลือดออกบริเวณดวงตาและส่วนต่างๆ ของร่างกาย ภายหลังจากการติดเชื้อ 3-4 วัน (ภาพที่ 25) อาการภายในของปลาป่วยพบว่า สมองมีสีชมพู ม้ามโตและตับซีด (ภาพที่ 26)

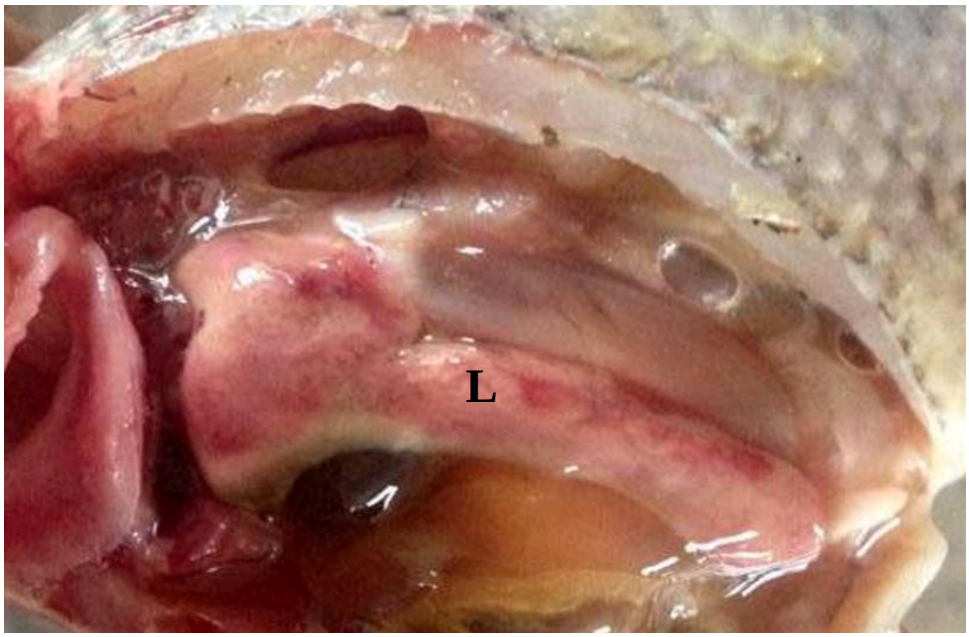
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบการตายเป็นหย่อมๆ (focal necrosis) ของเซลล์ตับ เซลล์ตับเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีการหลุดลอกและมีช่องว่าง ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 27) ตับอ่อนของปลานิลที่ติดเชื้อเสื่อมสภาพและมีจำนวนไซโมเจนแกรนูลลดลง (ภาพที่ 28) เนื้อเยื่อไตมีเลือดออก พบเมลาโนแมคโครฟาจแทรกตัวอยู่ในเนื้อเยื่อ และเกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส (ภาพที่ 29) เนื้อเยื่อม้ามเกิดการสลายตัวของไวท์พัลป์ และมีเมลาโนแมโครฟาจและเม็ดเลือดแทรกตัวเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 30) มีเยื่อหุ้มหัวใจหนาขึ้นและมีเลือดออกกระจายอยู่ทั่วไปบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ (ภาพที่ 31) นอกจากนี้ยังพบเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และเกิดการแทรกตัวของเม็ดเลือดแดงเป็นจำนวนมากบริเวณเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมอง (ภาพที่ 32)



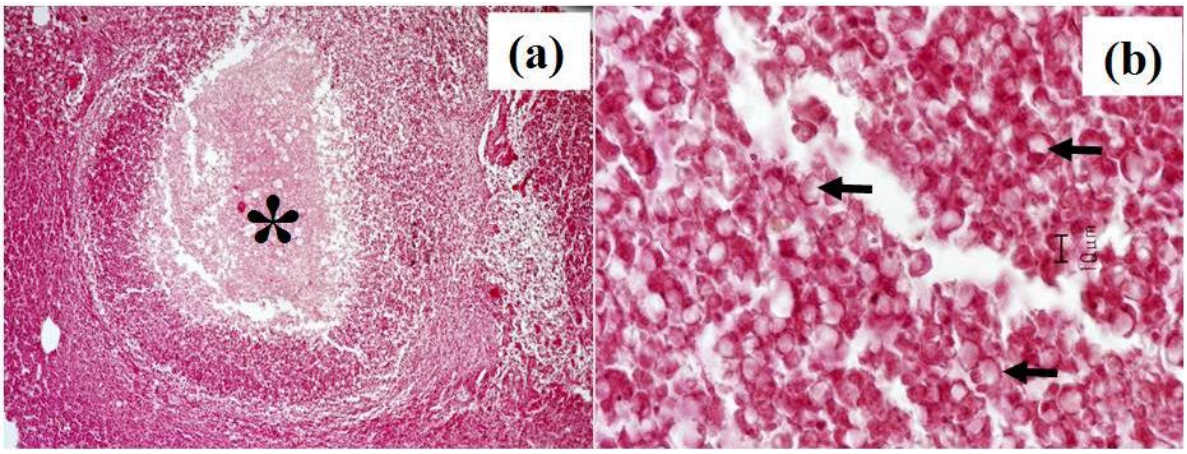
ภาพที่ 23 อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธีการฉีด

ภาพที่ 24 อาการตัวคล้ำของปลานิลภายหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib

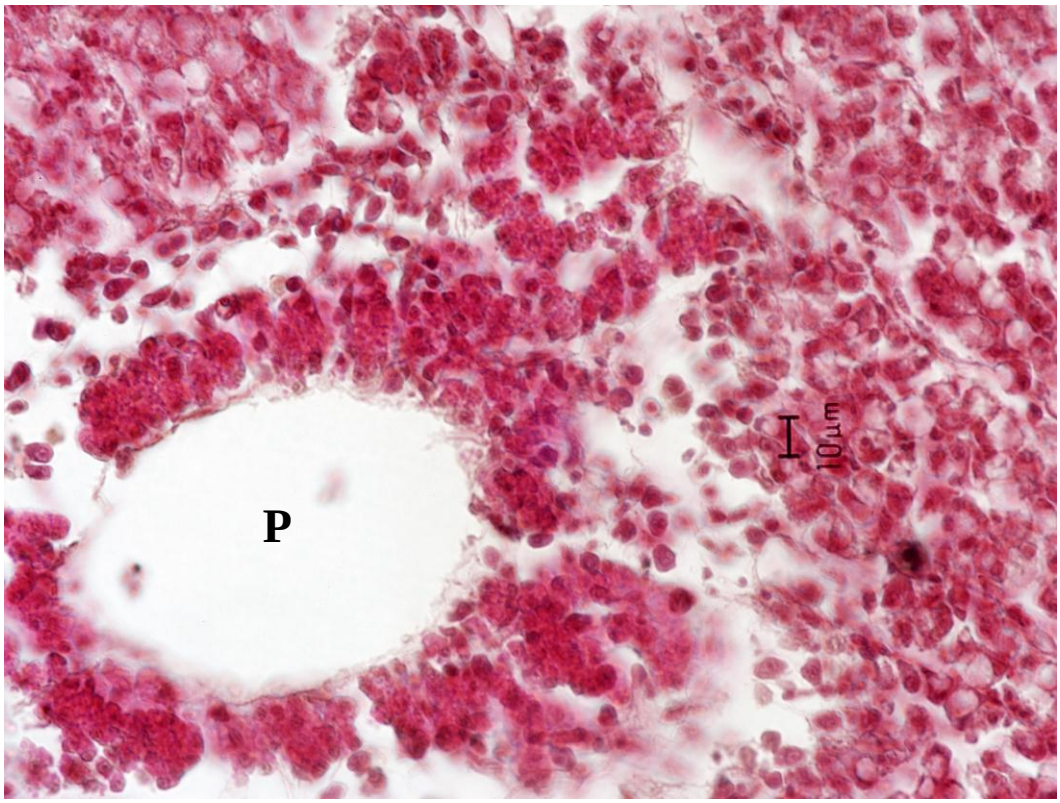
ภาพที่ 25 อาการตาโปนทั้งสองข้างและเลือดออกในตาของปลานิลภายหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib



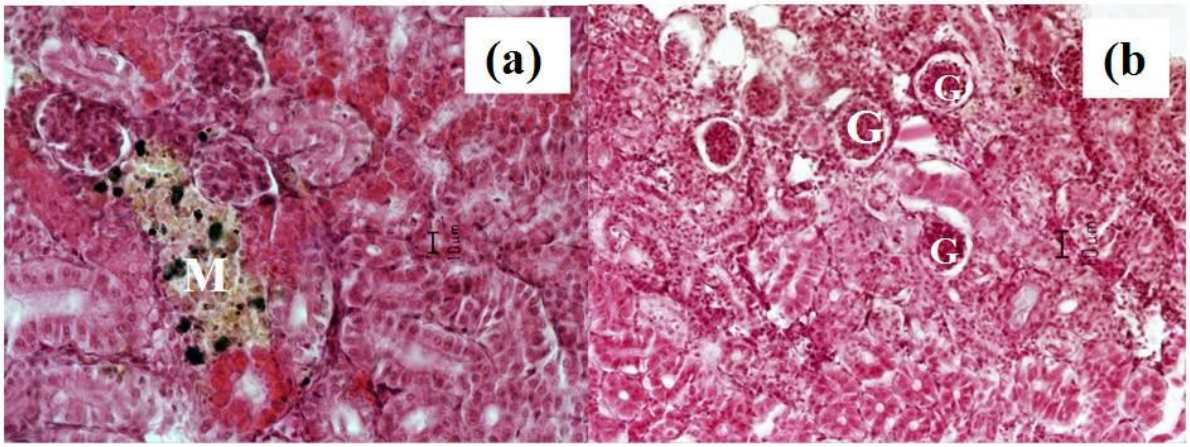
ภาพที่ 26 อาการตับซีด (L) ของปลานิลภายหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib



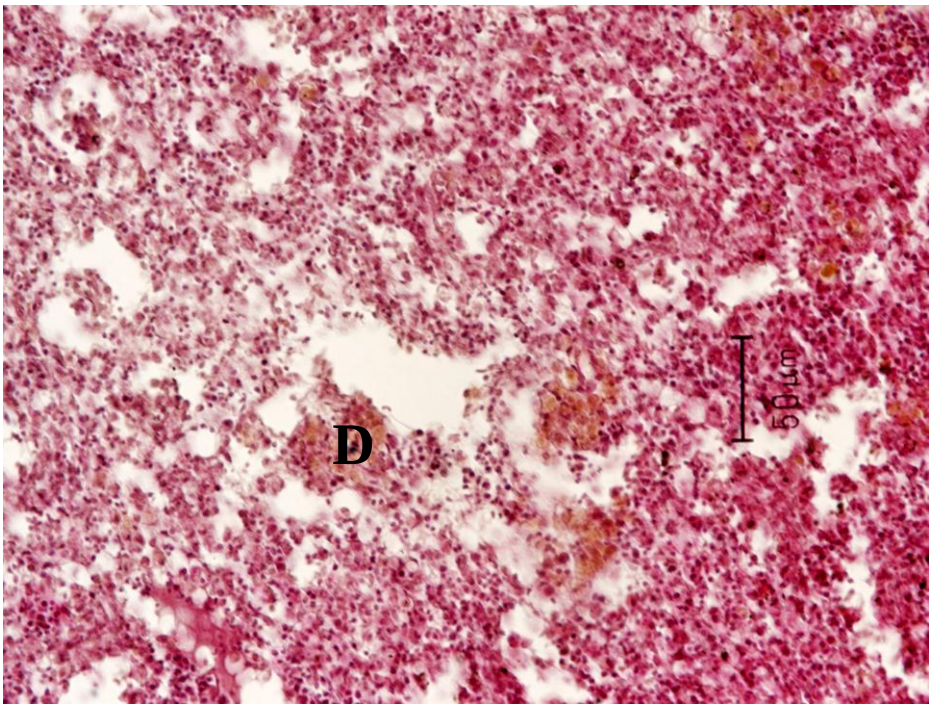
ภาพที่ 27 เนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib (a) แสดงการตายเป็นหย่อมๆ (ดอกจัน) ของเซลล์ตับ (b) แสดงเซลล์ตับเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีการหลุดลอกและมีช่องว่าง (ศรชี้) ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก [H&E, (a) Bar = 100 µm, (b) Bar = 10 µm]



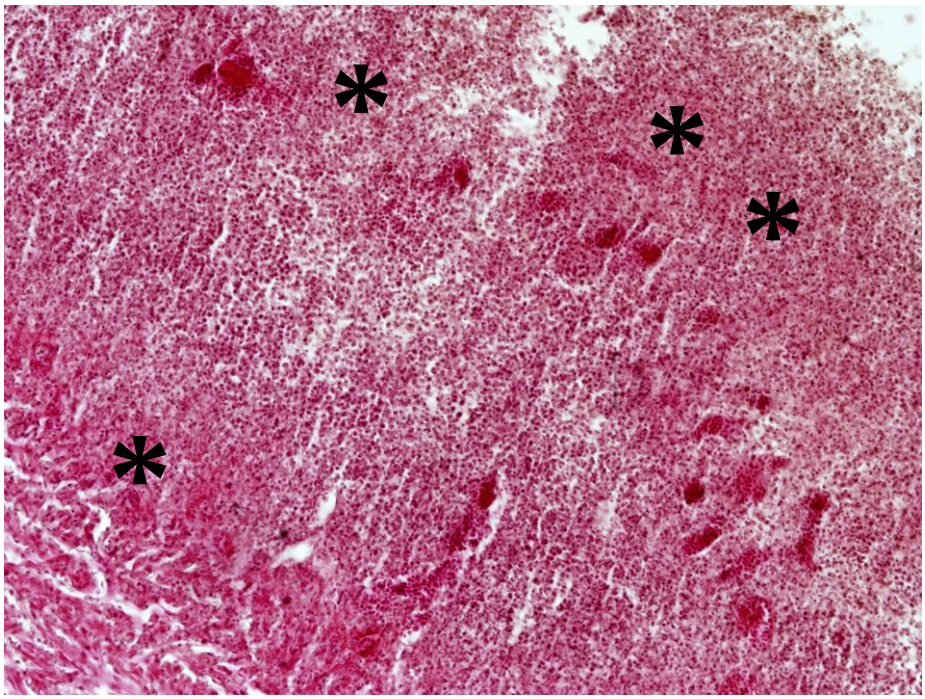
ภาพที่ 28 เนื้อเยื่อตับอ่อน (P) ของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีลักษณะเสื่อมสภาพและมีจำนวนไซโมเจนแกรนูลลดลง (H&E, Bar = 10 µm)



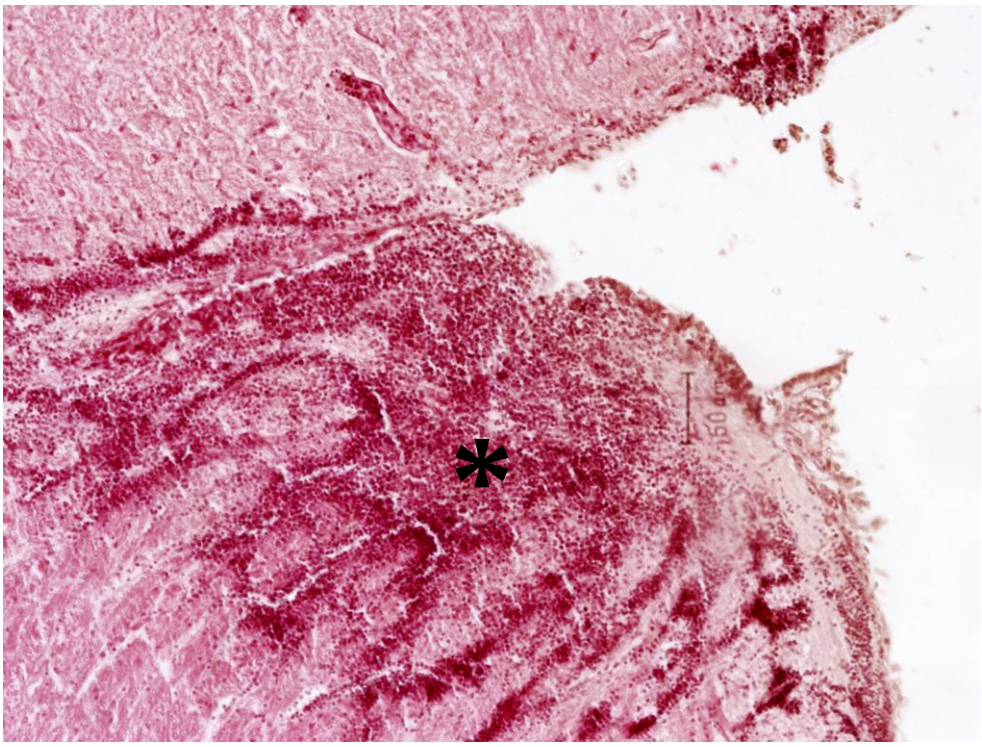
ภาพที่ 29 เนื้อเยื่อไตของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib (a) แสดงเมลาโนแมคโครฟาจ (M) แทรกตัวอยู่ในเนื้อเยื่อ (b) แสดงเกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส (G) (H&E, Bar = 10 µm)



ภาพที่ 30 เนื้อเยื่อม้ามของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib เกิดการสลายตัวของไวท์พัลป์ (D) และมีเมลาโนแมโครฟาจและเม็ดเลือดแทรกตัวเป็นจำนวนมาก (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 31 เนื้อเยื่อหัวใจของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีเยื่อหุ้มหัวใจหนาขึ้นและมีเลือดออก (ดอกจัน) กระจายทั่วไปบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ (H&E, Bar = 100 µm)



ภาพที่ 32 เนื้อเยื่อสมองของปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบและเกิดการแทรกตัวของเม็ดเลือดแดง (ดอกจัน) เป็นจำนวนมากบริเวณเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมอง (H&E, Bar = 50 µm)

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลานิลที่ติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib

การศึกษาองค์ประกอบเลือดในปลานิลหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ของปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ฮีโมโกลบิน ปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ ระหว่างปลานิลในชุดควบคุมและปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib (ตารางที่ 12) โดยปริมาณเม็ดเลือดอัดแน่นของปลาชุดควบคุมมีค่าอยู่ในช่วง 29.89±0.42 – 35.67±2.97 เปอร์เซ็นต์ และปลาติดเชื้อมีค่าอยู่ในช่วง 28.01±3.49 – 33.66±2.15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฮีโมโกลบินของปลาชุดควบคุมมีค่าอยู่ในช่วง 3.89±0.89 – 5.42±1.26 กรัมต่อเดซิลิตร และปลาติดเชื้อมีค่าอยู่ในช่วง 3.31±0.69 - 5.01±1.64 กรัมต่อเดซิลิตร ปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ของปลาชุดควบคุมมีค่าอยู่ในช่วง 0.05±0.00 – 0.06±0.00 และปลาติดเชื้อมีค่าอยู่ในช่วง 0.05±0.00 – 0.06±0.00 และกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ของปลาชุดควบคุมมีค่าอยู่ในช่วง 1.00±0.15 – 1.15±0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปลาติดเชื้อมีค่าอยู่ในช่วง 0.91±0.39 – 1.31±0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาครั้งนี้พบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในซีรั่ม เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวระหว่างปลานิลชุดควบคุม และปลานิลติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยพบว่าในวันที่ 1 หลังการติดเชื้อ ปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มเท่ากับ 48.47±4.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับปลานิลติดเชื้อซึ่งมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มเพียง 40.28±6.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่วันที่ 6 และ 9 หลังการติดเชื้อพบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มของปลานิลติดเชื้อสูงกว่าปลานิลชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยในวันที่ 6 ปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มเท่ากับ 49.11±3.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปลานิลติดเชื้อมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มเท่ากับ 57.01±4.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวันที่

9 ปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มเท่ากับ 46.75±2.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปลานิลติดเชื้อมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มเท่ากับ 54.23±4.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงพบว่าปลานิลที่ติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปลานิลชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในวันที่ 1 หลังการติดเชื้อโดยปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 2.54±0.33 x 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปลานิลติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 2.08±0.42 x10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเม็ดเลือดขาวพบว่าปลานิลที่ติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในวันที่ 6 และวันที่ 9 หลังการติดเชื้อโดยในวันที่ 6 ปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 5.88±1.71 x10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและปลานิลติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 10.4±3.69 x10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวันที่ 9 ปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 5.81±1.26 x10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและปลานิลติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 7.93±0.90 x10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 12)

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความรุนแรงของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ในปลานิลโดยวิธีการฉีดแบคทีเรียความเข้มข้นประมาณ 10^6 - 10^8 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร เข้าช่องท้อง พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวทำให้ปลาตาย 33.33 – 90.00 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib สามารถก่อโรคในปลานิลได้อย่างรุนแรง เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์อื่นๆ เช่นการทดลองของ Suanyuk และคณะ (2008) ที่ทดลองติดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ia และซีโรไทป์ III พบว่าทำให้ปลานิลตาย 37-67 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 7 วัน การศึกษาอาการของปลาที่ติดเชื้อพบว่าเชื้อแสดงให้เห็นความรุนแรงของโรคค่อนข้างเฉียบพลัน โดยจะแสดงอาการของโรคภายในระยะเวลา 14 วัน หลังการฉีดเชื้อโดยปลามีอาการการเซื่องซึม ว่ายน้ำเสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำ ตาโปนข้างเดียวหรือทั้งสองข้างร่วมกับอาการขุ่นขาวของกระจกตา เลือดออกตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งอาการเหล่านี้พบได้ทั่วไปในปลาที่เป็นโรคสเตรปโตคอคโคซีส เช่น จิราพร และคณะ (2529) พบว่าปลาบู่ทรายที่ติดแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. มีอาการตาโปนและขุ่นขาว มีของเหลวปนเลือดขังอยู่ภายในลูกตา พบมีเลือดออกตามซอกเกล็ด ตับและไตบวม ตับมีสีเหลืองซีด มีเลือดออกเป็นแห่ง ๆ การศึกษาในปลากะพงขาวพบว่าปลาที่ป่วยจะมีลำตัวสีคล้ำ พบบาดแผลและมีเลือดออกตามลำตัว ว่ายน้ำช้าและเสียการทรงตัว ว่ายควงสว่านเป็นระยะ ๆ มีอาการตาโปนหนึ่งหรือสองข้าง ท้องบวมมีของเหลวในช่องท้อง อวัยวะภายในเช่น ตับ ม้าม และไต มีอาการอักเสบบวมและมีสีซีด (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543)

การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่างๆ ในปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib พบเซลล์ตับเรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีช่องว่างภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ตับอ่อนของปลานิลที่ติดเชื้อมีจำนวนไซโมเจนแกรนูลลดลง เนื้อเยื่อไตพบเมลาแมคโครฟาจแทรกตัวอยู่ในเนื้อเยื่อ และเกิดการหดตัวของโกลเมอรูลัส ในเนื้อเยื่อม้าม พบว่ามีเมลาโนแมคโครฟาจจำนวนมากแทรกตัวอยู่และเกิดการสลายตัวของไวท์พัล พบมีเลือดออกและมีผนังของเนื้อเยื่อหัวใจที่หนาขึ้น นอกจากนี้ยังพบเยื่อหุ้มสมองอักเสบและเกิดการแทรกตัวของเม็ดเลือด สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบปลาว่ายน้ำผิดปกติหลังการติดเชื้อ โดยโรคสเตรปโตคอคโคซีส มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Pulido *et al*., 2004; Toranzo *et al*., 2005) ส่วนเนื้อเยื่อตับพบช่องว่างภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ขยายตัว ทั้งยังพบเซลล์ตาย ตับจึงมีสีซีดและบวม

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทยหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ที่ระยะเวลาต่างๆ

Parameter/Time (day)		0	1	3	6	9
Hematocrit (%)	**Control**	34.83±0.71[a]	35.67±2.97[a]	32.43±4.75[a]	29.89±0.42[a]	30.35±3.21[a]
	Treatment	33.66±2.15[a]	33.38±3.64[a]	31.40±4.76[a]	29.54±3.93[a]	28.01±3.49[a]
Hemoglobin (g/dl)	**Control**	5.42±1.26[a]	ND	4.56±1.41[a]	4.08±0.52[a]	3.89±0.89[a]
	Treatment	5.01±1.64[a]	ND	4.44±0.81[a]	3.73±0.74[a]	3.31±0.69[a]
Serum Protein (mg/ml)	**Control**	51.09±4.19[a]	48.47±4.73[a]	49.46±4.62[a]	49.11±3.75[a]	46.75±2.05[a]
	Treatment	53.43±1.63[a]	40.28±6.06[b]	49.10±4.15[a]	57.01±4.89[b]	54.23±4.54[b]
Red blood cell ($\times 10^9$ cell/ml)	**Control**	2.12±0.31[a]	2.54±0.33[a]	2.06±0.41[a]	2.33±0.22[a]	1.89±0.32[a]
	Treatment	2.26±0.30[a]	2.08±0.42[b]	1.95±0.36[a]	2.00±0.53[a]	1.91±0.41[a]
White blood cell ($\times 10^7$ cell/ml)	**Control**	5.38±0.61[a]	4.99±1.14[a]	5.19±1.34[a]	5.88±1.71[a]	5.81±1.26[a]
	Treatment	5.55±0.52[a]	6.75±1.93[a]	5.86±1.79[a]	10.4±3.69[b]	7.93±0.90[b]
NBT reduction	**Control**	0.05±0.00[a]	0.06±0.00[a]	0.05±0.00[a]	0.05±0.00[a]	0.05±0.00[a]
	Treatment	0.05±0.00[a]	0.06±0.00[a]	0.05±0.00[a]	0.05±0.00[a]	0.05±0.00[a]
Lysozyme activity (ug/ml)	**Control**	1.15±0.35[a]	1.09±0.29[a]	1.00±0.15[a]	1.00±0.08[a]	1.06±0.46[a]
	Treatment	1.16±0.56[a]	0.91±0.39[a]	1.03±0.25[a]	1.06±0.18[a]	1.31±0.49[a]

ND = not detect

ระบบเลือด (circulatory system) เป็นระบบการทำงานที่มีความสำคัญในการลำเลียงสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกายเพื่อให้ปลาสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบเลือดพบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีความผิดปกติของระบบใดระบบหนึ่งของร่างกาย การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลานิลที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เวลา 0, 1, 3, 6 และ 9 วันไม่พบการเปลี่ยนแปลงของฮีมาโตคริต และฮีโมโกลบิน แต่พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 หลังจากได้รับเชื้อ และกลับเข้าสู่สภาวะปกติในวันที่ 3 และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 6 และ 9 ทั้งนี้เนื่องจากปลามีการปรับตัวได้จากการติดเชื้อในระยะแรก การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดแดงพบว่าปลาที่ติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดแดงลดลงในวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าปลาไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับการทดลองของเฉลิม (2547) รายงานพบว่าปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. มีปริมาณเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรก การศึกษาครั้งนี้พบว่าเม็ดเลือดขาวของปลาที่ติดเชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 6 และ 9 อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าปลาสามารถสร้างภูมิต้านทานโรคได้ในช่วงเวลาดังกล่าว

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib สามารถก่อโรคและสร้างความรุนแรงโดยลดระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลานิล การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยสำคัญที่สร้างความรุนแรงให้กับแบคทีเรียชนิดนี้ และการใช้วัคซีนในการป้องกันการเกิดโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรศึกษาเพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 7

สรุป

แบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* เป็นแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก รายงานฉบับนี้นับเป็นครั้งแรกของการแยกแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุยที่เลี้ยงร่วมกันในภาคใต้ของประเทศไทย ปลาที่ติดเชื้อแสดงอาการของโรคสเตรปโตคอคโคซีสหลายแบบ ได้แก่ เซื่องซึม ตาโปน ตาขุ่น น้ำขังในช่องท้อง เลือดออก และว่ายน้ำผิดปกติ การศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาหมอไทยและปลาดุกอุย มีความรุนแรงสูง สามารถก่อโรคในปลาโดยส่งผลกระทบโดยตรงต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมค่อนข้างกว้าง สามารถก่อโรคและสร้างความรุนแรงได้ดีในปลาที่เลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่น้ำมีอุณหภูมิสูง และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ อีกทั้งสามารถก่อโรคได้รุนแรงขึ้นเมื่อปลามีการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วย การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถก่อโรคได้ในปลานิลซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยได้

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ Ib ส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงปลาหมอไทย ปลาดุกอุย และปลานิลในประเทศไทย ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นับเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทยอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, จรีพร เรืองศรี และนพรัตน์ แท่นมาก. 2549. โรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn.) และการผลิตวัคซีนต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส. รายงานวิจัย. สำนักงบประมาณ.

กรมควบคุมมลพิษ. 2554. คู่มือสำหรับผู้ประกอบการในการจัดทำแนวทางการจัดการน้ำเสีย น้ำทิ้ง และของเสีย จากการประกอบกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 49 หน้า.

กรรนิการ์ กาญจนชาตรี และอาคม วังเมือง. 2537. การศึกษาโรคของปลาดุกบิ๊กอุยและคุณสมบัติของน้ำในบ่อคอนกรีตกลมของจังหวัดภูเก็ต. วิทยาลัยชุมชนภูเก็ต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 43หน้า.

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2558. สถิติประมงแห่งประเทศไทย. สืบค้นจาก www. fisheries.go.th/it-stat/. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558.

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542. เรื่องของปลา. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.

คณิต ชูคันหอม. 2543. การเลี้ยงปลาดุก. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ดริญญา จันทวรรณ, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ. 2550. การศึกษาชนิดและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลานิล, หน้า. 204 - 211. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง.

จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุณยรัตผลิน และกิจการ ศุภมาตย์. 2529. *Streptococcus* sp. แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในปลาบู่ทราย. วารสารสงขลานครินทร์ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 8: 329-332.

เฉลิม หวันหมาน. 2547. โรคสเตรฟโตคอคโคซีสและการประยุกต์ใช้วัคซีนในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

เฉลิม หวันหมาน, ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง และกิจการ ศุภมาตย์. 2548. โรคสเตรฟโตคอคโคซีสในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). วารสารสงขลานครินทร์ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27: 75-86.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. 2531. การใช้ไมโครคอมพิวเตอร์ประมาณค่าความเป็นพิษของสารเคมีที่มีต่อสัตว์น้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3: 25-28.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2557. ตำราวิชา ชป 322 โรคสัตว์น้ำ. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นเรศ ช่วนยุก. 2555. เอกสารประกอบการสอน วิชาโรคสัตว์น้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 86 หน้า

นเรศ ช่วนยุก, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร คงประดิษฐ์ และกิจการ ศุภมาตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วารสารสงขลานครินทร์ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27: 307-319.

นฤมล อัศวเกศมณี. 2549. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. โครงการตำราวิชาการราชภัฏเฉลิมพระเกียรติเนื่องในวโรกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงครองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี. 168 หน้า.

นิรุทธิ์ สุขเกษม, จรีพร เรืองศรี และกิจการ ศุภมาตย์. 2548. การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลาหมอไทย. วารสารสงขลานครินทร์ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี27: 419-424.

ประไพสิริ สิริกาญจน. 2546. ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พิชัย สมบูรณ์วงศ์. 2551. การเลี้ยงปลาดุก. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

เยาวนิตย์ ดนยดล, สถาพร ดิเรกบุษราคม และเพ็ญศรี เมืองเยาว์. 2543. คุณสมบัติของเชื้อและการเกิดโรคจากเชื้อ β-hemolytic *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2543. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 11 หน้า.

เรืองไร โตกฤษณะ, กุลภา กุลดิหลก, กุลภา บุญชูวงศ์, เบญจวรรณ คงขน และธันย์ดารา มะวงศ์ไว. 2558. สถานภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไทยในบริบทของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน. สถาบันคลังสมองของชาติและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 128 หน้า.

วิทย์ ธารชลานุกิจ, เวียง เชื้อโพธิ์หัก, ประวิทย์ สุรนีรนาถ และอุทัยรัตน์ ณ นคร. 2530. การเพาะเลี้ยงปลาดุก. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์สารสนเทศกรมประมง. 2552. สถิติการประมง ปี 2552. กรมประมง. ค้นจากhttp://www.fisheries.go.th/it-stat /yearbook/

สุกัญญา พิมมาดี. 2557. สถานการณ์ปลาดุก ปี 2557. ส่วนเศรษฐกิจการประมง สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง.

สถาพร ดิเรกบุษราคม และเยาวนิตย์ ดนยดล. 2530. โรคระบาดที่เกิดจาก non-hemolytic *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2530. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 2555. โครงการยกระดับมาตรฐานฟาร์มปลานิลเพื่อการส่งออก. ค้นจาก http://www.fisheries.go.th/ freshwater/web3

สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2555. คู่มือวิชาการ เรื่องแนวทางการประกอบกิจการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพประเภท การเลี้ยงสัตว์น้ำ. สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. 124 หน้า.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เทคนิคและวิธีดำเนินการ. กรุงเทพฯ; ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. 291 หน้า.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2555. การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม วงศ์ไมโครคอคเคซีอี และสเตรปโตคอคเคซีอี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิญญา ส่งประดิษฐ์. 2546. การผลิตวัคซีนและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Trypanosoma* sp. ในปลาดุกพันธุ์ผสม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 92 หน้า.

Abuseliana, A. F., Daud, H. H. M., Aziz, S. A., Bejo, S. K. and Alsaid, M. 2011. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). Journal of Animal and Veterinary Advances10: 914–919.

Al-Harbi, A. H. 1994. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus x O. aureus*) in Saudi Arabia. Aquacuture 128: 195-201.

Al Safadi, R., Amor, S., Hery-Arnaud, G., Spellerberg, B., Lanotte, P., Mereghetti, L., Gannier, F., Quentin, R. and Rosenau, A. 2010. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS*1548* in *scp*B-

lmb intergenic region. PLoS One 5:e10794.

Alsaid, M., Daud, H. H. M., Mustapha, N. M., Bejo, S. K., Abdelhadi, Y. M., Abuseliana, A. F. and Hamdan, R. H. 2013. Pathological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences: 70-73.

Angka, S. L., Lam, T. J. and Sin, Y. M. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 130: 103–112.

APHA, AWWA, WEF. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF), Washington DC.

Austin, B. and Austin, D. A. 1987. Bacterial fish pathogens : Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood, Chichester, UK.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Short Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 836 p.

Bancroft, J. D. 1967. Histochemical Techniques. London: Butterworths.

Baron, M. J., Filman, D. J., Prophete, G. A., Hogle, J. M. and Madoff, L. C. 2007. Identification of a glycosaminoglycan binding region of the alpha C protein that mediates entry of group B streptococci into host cells. Journal of Biological Chemistry 282: 10526–10536.

Baya, A. M., Lupiani, B., Hetrick, F. M., Roberson, B. S., Lukacovic, R., May, E. and Poukish, C. 1990. Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. Journal of Fish Diseases 13: 251–253.

Beckmann, C., Waggoner, J. D., Harris, T. O., Tamura, G. S. and Rubens, C. E. 2002. Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. Infection and Immunity 70: 2869–2876.

Berner, R., Ruess, M., Bereswill, S. and Brandis, M. 2002. Polymorphisms in the cell wall-spanning domain of the C protein β-antigen in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates are caused by genetic instability of repeating DNA sequences. Pediatric Research 51: 106–111.

Berridge, B. R., Fuller, J. D., De Azavedo, J., Low, D. E., Bercovier, H. and Frelier, P. F. 1998. Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae*16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. Journal of Clinical Microbiology 36: 2778–2781.

Berridge, B. R., Bercovier, H. and Frelier, P. F. 2001. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile*16S–23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. Veterinary Microbiology. 78: 165–173.

Bidet, P., Brahimi, N., Chalas, C., Aujard, Y. and Bingen, E. 2003. Molecular characterization of serotype III group B *Streptococcus* isolates causing neonatal meningitis. The Journal

of Infectious Diseases 188: 1132–1137.

Bowater, R. O., Forbes-Faulkner, J., Anderson, I. G., Condon, K., Robinson, B., Kong, F., Gilbert, G. L., Reynolds, A., Hyland, S., McPherson, G., O'Brien, J. and Blyde, D. 2012. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. Journal of Fish Diseases 35: 173-186.

Bowers, J. M., Mustafa, A., Speare, D. J., Conboy, G. A., Brimacombe, M., Sims, D. E. and Burka, J. F. 2000. The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. Journal of Fish Diseases 23: 165-172.

Boyd, C. E. and Tucker, C. S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquacuture. Alabama Aqricuture Experiment Station, Auburn University, Alabama.

Bromage, E., Thomas, A., and Owens, L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Diseases of Aquatic Organisms 36: 177–181.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition. The Williams and Wilkins company. Baltimore. USA. 1268 p.

Chen, C. Y., Chao, C. B. and Bowser, P. R. 2007. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-infected tilapia. Bulletin of the European Association of Fish Pathologist 27: 2-9.

Cheng, W. and Chen, J. C. 1999. Effect of cultivation broth pH, temperature and NaCl concentration on virulence of an *Enterococcus*-like bacterium to the giant greshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Diseases of Aquatic Organisms 36: 233-237.

Chung, S. and Secombes, C. J. 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology 88: 539-544.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 184 pp.

Collins, C. M., Mo, T. A., Buchmann, K. and Cunningham C. O. 2002. Diagnosis of *Gyrodactylus* (Monogenea; Platyhelminthes) infecting salmonid fish in northern Europe. Fisheries Research Services Report.

Dangwetngam, M., Suanyuk. N., Kong, F. and Phromkunthong, W. 2016. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from infected cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand: Nine-year perspective. Journal of Medical Microbiology 65: 247–254.

Delannoy, C. M. J., Crumlish, M., Fontaine, M. C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M. P., Turnbull, J. F. and Zadoks, R. N. 2013. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. BMC Microbiology 13: 41.

Demers, N. E. and Bayne, C. J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Development Comparative Immunology 21: 363-373.

Dmitriev, A., Shakleina, E., Tkáciková, L., Mikula, I. and Totolian, A. 2002. Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci. Folia Microbiologica. 47: 291–295.

Dmitriev, A., Tkáciková, L., Suvorov, A., Kantíková, M., Mikula, I. and Totolyan, A. 1999. Comparative genetic study of group B streptococcal strains of human and bovine origin. Folia Microbiologica 44: 449–453.

Dodson, S. V., Maurer, J. J. and Shotts, E. B. 1999. Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. Journal of Fish Diseases 22: 331-336.

Domënech, A., Fernandez-Garayzabal, J. F., Pascual, C., Garcia, J. A., Cutul, M. T., Moreno, M. A., Collins, M. D. and Dominguez, L. 1996. *Streptococcus* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. Journal of Fish Diseases 19: 33-38.

Duarte, R. S., Miranda, O.P., Bellei, B. C., Brito, M. A. V. P. and Teixeia, L. M. 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. Journal of Clinical Microbiology 42: 4214-4222.

Dung, T. T. and Duy, N. K. 2013. Multiple streptococcal species infection in farmed climbing perch *Anabas testudineus* in Vietnam. In: Asian Pacific Aquaculture 2013, World Aquaculture Society. Ho Chi Minh City.

Duremdez, R., Al-Marzouk, A., Qasem, J. A., Al-Harbi, A. and Gharabally, H. 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. Journal of Fish Diseases 27: 307–310.

Eldar, A., Bejerano, Y. and Bercovier, H. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Current Microbiology 28: 139–143.

Eldar, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine againt *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology 56: 175 -183.

Elgendy, M. Y., Kenawy A. M. and El-Deen A. E. N. 2016. *Gyrodactylus anguillae* and *Vibrio vulnificus* infections affecting cultured eel, *Anguilla anguilla*. Comunicata Scientiae 7: 1-11.

Evans, J. J., Bohnsack, J. F., Klesius, P. H., Whiting, A. A., Garcia, J. C., Shoemaker, C. A. and Takahashi, S. 2008. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. Journal of Medical Microbiology 57: 1369–1376.

Evans, J. J., Klesius, P. H., Gilbert, P. M., Shoemaker, C. A., Al Sarawi, M. A., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A. and Al Zenki, S. 2002. Characterization of β-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. Journal of Fish Diseases 25: 505–513.

Evans, J. J., Shoemaker, C. A. and Klesius, P. H. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. Aquacuture 189: 197-210.

Evans, J. J., Shoemaker, C. A. and Klesius, P. H. 2003. Effects of sublethal dissolved oxygen susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Aquatic Animal Health 15: 202-203.

Foo, J. T. W., Ho, B. and Lam, T. J. 1985. Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. Aquaculture 49: 185-195.

Franken, C., Haase, G., Brandt, C., Weber-Heynemann, J., Martin, S., Lämmler, C., Podbielski, A., Lütticken, R. and Spellerberg, B. 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. Molecular Microbiology 41: 925–935.

Geng, Y., Wang., K. Y., Huang, X. L., Chen, D. F., Li, C. W., Ren, S. Y., Liao, Y. T., Zhou, Z. Y., Liu, Q. F., Du, Z. J. and Lai, W. M. 2012. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. Transboundary and Emerging Diseases 59: 369–375.

Giordano, L. G. P., Muller, E. E., Freitas, J. C. D. and Silva, V. G. D. 2010. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 87-92.

Granlund, M., Michel, F. and Norgren, M. 2001. Mutually exclusive distribution of IS*1548* and GBSi1, an active group II intron identified in human isolates of group B streptococci. Journal of Bacteriology 183: 2560–2569.

Hardie, J. M. 1986. Genus Streptococcus Rosenbach 1884. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G., eds.). p. 1043-1047. Williams & Wilkins. Baltimore.

Hasson, K. W., Wyld, E. M., Fan, Y., Lingsweiller, S. W., Weaver, S. J., Cheng, J. and Varner, P. W. 2009. Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: a new emerging bacterial disease of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms 86: 93–106.

Hooper, D. C. 2003. Mechanisms of quinolone resistance. In: Quinolone Antimicrobial Agents. Hooper, D. C. and Rubinstein, E. (eds). 41–67 p.Washington, DC: American Society of Microbiology Press.

Hoshina, T., Sano, T. and Morimoto, Y. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. Journal of the Tokyo University of Fisheries 44: 57-68.

Humason, G. L. 1979. Animal Tissue Techniques. San Francisco: W.H. Freeman and Company 661 p.

Huovinen, P. 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clinical Infectious Diseases 32: 1608–1614.

Inglis, V., Roberts, R. J. and Bromage, N. R. 1993. Bacterail Disease of Fish. New York: Academ Press.

Jain, B., Tewari, A., Bhandari, B. B. and Jhala, K. M. 2012. Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. Veterinarski arhiv 82: 423–432.

Jeronimo, G. T., Padua, S. B., Bampi, D., Goncalves, E. L. T., Garcia, P., Ishikawa, M. N. and Martins M. L. 2014. Haematological and histopathological analysis in South American fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). Brazilian Journal of Biology 74: 1000-1006.

Kawamura, Y., Itoh, Y., Mishima, N., Ohkusu, K., Kasai, H. and Ezaki, T. 2005. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficillis* Eldar *et al*. 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 961-965.

Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I. and Rodkhum, C. 2014. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 26: 488–495.

Kitao, T. 1993. Streptococcal infections. *In* Inglis, V., R. J. Roberts, and N. R. Bromage (eds), Bacterial Disease of Fish, Academic Press, p. 196-210.

Kusuda, R., Komatsu, I. and Kawai, K. 1978. *Streptococcus* sp. isolated from an epizootic of culture eels. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish 44: 295 - 298.

Laith, A., Ambak, M. A., Hassan, M., Sheriff, S. Md., Nadirah, M., Draman, A. S., Wahab, W., Ibrahim, W. N. W., Aznan, A. S., Jabar, A. and Najiah, M. 2017. Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary World:101-111.

Lancefield, R. C. 1933. A serological differentiation of human and other group of streptococci. The Journal of Experimental Medicine 59:441-158.

Lerssutthichawal, T. 2008. Diversity and distribution of external parasites from potentially cultured freshwater fishes in Nakhonsithammarat, southern Thailand, pp. 235-244. *In* Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Li, L., Wang, R., Liang, W., Gan, X., Huang, T., Huang, Y., Li, J., Shi, Y., Chen, M. and Luo, H. 2013. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China. Veterinary Microbiology 167: 719-724.

Liu, L., Li, Y. W., He, R. Z., Xiao, X. X., Zhang, X., Su, Y.L., Wang, J. and Li, A. X. 2014. Outbreak of

Streptococcus agalactiae infection in Barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China. Journal of Fish Diseases 37: 1067–1072.

Martinez, G., Harel, J. and Gottschalk, M. 2001. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. Canadian Journal of Veterinary Research 65: 68–72.

Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M. and Figueiredo, H. C. P. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Veterinary Microbiology 136: 180-183.

Mohamed A. M., Ismaiel M. M., Kenawy A. M. and El-Ghany O. A. A. 2010. Impact of experimental infection with *Gyrodactylus* species on the density of skin mucus in fries of catfish (*Clarias gariepinus*) with emphasis on the pathological changes. Global Veterinaria 4: 67-73.

Nguyen, H. T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K. 2001. Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus.* Fish Pathology 36: 40-41.

Nguyen, H. T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K. 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. Aquaculture 205: 7-17.

Paladini, G., Cable, J., Fioravanti, M. L., Faria, P. J., Cave, D. D. and Shinn, A. P. 2009. *Gyrodactylus orecchiae* sp. n. (Monogenea: Gyrodactylidae) from farmed populations of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in the Adriatic Sea. Folia Parasitologica 56: 21-28.

Pelacios, M. A., Zamora, M. J., Velazquez, J., Zamora, E. and Duran, A. 1993. Vaccination against *Streptococcus* spp.: Laboratory and field trials results. Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica. 5: 7-10.

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

Perera, R. P., Johnson, S. K., Collins, M. D. and Lewis, D. H. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* hybrids. Journal of Aquatic Animal Health 6: 335-340.

Piumsombun, S. 2003. Analysis of demand for fish consumed at home in Thailand. Fisheries Gazette 56: 113–121.

Plumb, J. A. 1994. Health maintenance of cultured fish: Principal Microbial Disease.CRC press, Inc, U.S.A.

Pulido, A., C. Iregui, J. Figueroa and P. Klesius. 2004. Streptococcosis in cultured Tilapia (*Oreochromis* spp.) in Columbia. Revista AquaTic 20: 97-106.

Rahman, M. M., Ferdowsy, H., Kashem, M. A. and Foysal, M. J. 2010. Tail and fin rot disease of Indian major carp and climbing perch in Bangladesh. Journal of Biological Sciences 10: 800-804.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium

(*Bacillus* S11). Aquaculture 191: 271-288.

Rodkhum, C., Kayansamruaj, P. and Pirarat, N. 2011. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype Ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The Thai Journal of Veterinary Medicine 41: 309–314.

Sakai, M. Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1995. Efficacies of combined vaccine for *Vibrio anguillarum* and *Streptococcus* sp. Fisheries Science 61 : 359 -360.

Sakai, M., Kubota, R., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1987. Vaccination of rainbow truot, *Salmo gairdneri* against beta-haemolytic Streptococcal disease. Nippon Suisan Gakkaishi 53: 1373 - 1376.

Salton, M.R.J. and Ghuysen, J.M. 1959. The structure of di- and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and *Streptomyces* F1 enzyme and the $\beta(1\rightarrow4)$ *N*-acetylhexosaminidase activity of these enzymes. Biochimica et Biophysica Acta 36; 552-554.

SEAFDEC/AQD. 1993. Catfish culture. Aqua Farm News 11: 1-23.

Secombes, C. J. 1996. The Non-specific immune system: cellular defenses. In: The Fish Immune System: Organism, Pathogens and Environment. Iwama, G., Nakanishi, T. (eds).San Diego: Academic Press.

Shoemaker, C. A., Evens, J. J. and Klesius, P. H. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 188: 229-253.

Slotved, H. C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S. and Gilbert, G. L. 2007.Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. Journal of Clinical Microbiology 45: 2929–2936.

Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., Schnitzler, N., Lütticken, R. and Podbielski, A. 1999. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. Infection and Immunity 67: 871–878.

Stasiak, A. S. and Baumann, C. P. 1996. Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis. Fish and Shellfish Immunology 6: 537-539.

Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L. and Supamattaya, K. 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? Aquaculture 284: 35–40.

Suanyuk, N., Rogge, M., Thune, M., Watthanaphiromsakul, M., Champhat, N. and Wiangkun, W. 2014. Mortality and pathology of hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell), associated with *Edwardsiella ictaluri* in southern Thailand. Journal of Fish Diseases 37: 385-395.

Suanyuk, N., Sukkasame, N., Tanmark, N., Yoshida, T., Itami, T., Thune, RL., Tantikitti, C. and Supamattaya, K. 2010. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates*

calcarifer) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. Songklanakarin Journal of Science and Technology 32: 341–348.

Suwannasang, A., Dangwetngam, M., Issaro, A., Phromkunthong, W. and Suanyuk, N. 2014. Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Songklanakarin Journal of Science and Technology36: 499–506.

Suwannasang, A., Suanyuk, N., Issaro, A., Phromkunthong, W., Tantikitti, C., Itami, T., Yoshida, T. 2017. Growth, immune responses and protection in Nile tilapia Oreochromis niloticus immunized with formalin-killed *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia and III vaccines. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 39: 429-437.

Teska, J. D. and Shotts, E. B. 1994. Non-haemolytic group B Streptococci from humans, fish and frogs. Biomedical Letters 199: 195 - 201.

Toranzo, A.E., B. Magarinos and J.L. Romalde. 2005. A review of the main bacterial fish disease in mariculture systems. Aquaculture 246: 37-61.

Vallat, B. and Berthe, F. 2016. OIE - Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office international des epizooties, France.

Vandamme, P., Devriese, L. A, Pot, B., Kersters, K. and Melin, P. 1997. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic group B, type Ib *Streptococcus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 47: 81–85.

Wattanutchariya, S. 1982. Economic analysis of *Clarias* culture in Thailand. Kasetsart Journal of Social Sciences 3: 68-77.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697–703.

Xu, D. H., Shoemaker C. A. and Klesius, P. H. 2007. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Diseases 30: 233-238.

Xu, D. H., Shoemaker C. A. and Klesius, P. H. 2009. Enhanced mortality in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following coinfections with ichthyophthiriasis and streptococcosis. Diseases of Aquatic Organisms 85: 187-192.

Zamri-Saad, M., Amal, M. N. A. and Siti-Zahrah, A. 2010. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. Journal of Comparative Pathology 143: 227–229.