การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจโดยเทคนิค PCR

นิลุบล กิจอันเจริญ[1], ปรียา หวังสมนึก[2], สินีนาฏ ศิริ[3], นงนุช สุวรรณเพ็ง[1]

[1] ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

[3] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

บทนำ

ในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา การเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดในประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างกว้างขวางจากปริมาณการบริโภคที่เพิ่มขึ้น ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) กลายมาเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงและบริโภคกันมากที่สุดในประเทศ นอกจากนั้นยังมีการส่งออกสู่ตลาดต่างปะเทศ จากข้อมูลของ FAO Fishery Information, Data and Statistics Unit, FAO-FIDI (2009) แสดงให้เห็นว่าผลผลิตปลานิลที่ได้จากการเลี้ยงในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2547 นั้นมีปริมาณสูงถึง 97,630 ตัน และมีแนวโน้มที่จะมีการขยายตัวเพื่อการส่งออกซึ่งจะทำรายได้เข้าสู่ประเทศเพิ่มมากขึ้น ในปัจจุบันผลผลิตปลานิลร้อยละ 70 เป็นการบริโภคภายในประเทศ โดยแยกเป็นการบริโภคสดถึงร้อยละ 81 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีนโยบายส่งเสริมการเลี้ยงปลานิลเพื่อการส่งออกเนื่องจากตลาดต่างประเทศให้การยอมรับปลานิลสายพันธุ์จิตรลดาซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบัน รัฐบาลตั้งเป้าหมายว่าในปี พ.ศ. 2553 จะมีผลผลิตประมาณ 300,000 ตัน และมีเป้าหมายการส่งออกอยู่ที่ 50,000 ตัน เพื่อนำมาแทนที่การเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ที่ประสบปัญหา ทั้งภาครัฐและเอกชนให้ความสนใจและร่วมกันกำหนดยุทธศาสตร์เพื่อส่งเสริมการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งออก

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือการเลี้ยงปลานิลเป็นหนึ่งในอาชีพหลักทางการเกษตรของประชาชน แต่ปริมาณผลผลิตที่ได้ยังน้อยกว่าทางภาคกลางอยู่มาก ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการไม่ว่าจะเป็นความแตกต่างทางสภาพภูมิประเทศ การขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเลี้ยง และการ

แก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยง โดยภาพรวมแล้วการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยยังประสบปัญหาหลายประการ ทั้งปัญหาคุณภาพของลูกพันธุ์ที่ไม่คงที่ทำให้การเจริญเติบโตช้า ปัญหาเกษตรกรขาดความรู้ที่ถูกต้องตามหลักวิชาการในการเลี้ยง ปัญหาการเกิดโรคระบาดระหว่างการเลี้ยง และปัญหาราคาอาหารสำเร็จรูปที่ส่งผลให้ต้นทุนการเลี้ยงของเกษตรกรสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตปลานิลโดยรวมของประเทศในปี พ.ศ. 2547 กับปริมาณผลผลิตในปีพ.ศ. 2546 พบว่าลดลงถึง 706 ตัน (FAO Fishery Information, Data and Statistics Unit (FAO-FIDI), 2006) ปัญหาหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ การระบาดของโรคที่เกิดระหว่างการเลี้ยง

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับโรคที่พบในปลานิลมีรายงานค่อนข้างน้อยในประเทศไทย มีเพียงรายงานจากกรามประมง โดยกมลพร (2539) ซึ่งได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับโรคที่เกิดในปลานิลว่ามีสาเหตุหลายประการ โดยมีทั้งที่เกิดจากปรสิต เชื้อรา และแบคทีเรีย สำหรับโรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่สำคัญในปลานิล คือ โรคสเตรปโตคอคโคซิส ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก ในต่างประเทศมีรายงานการระบาดของโรคนี้เช่นกัน (Kitao et al., 1981; Miyazaki et al., 1984; Al-Harbi, 1994; 1996) ในการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยก็ประสบปัญหาจากโรคนี้ การระบาดของโรคแล้วทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อการเลี้ยงปลานิลในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นิลุบล และคณะ, 2545; ธีราภรณ์ และคณะ, 2548; นิลุบล และคณะ, 2549) รวมทั้งในภูมิภาคอื่นทั่วประเทศ โรคนี้เกิดขึ้นเป็นประจำทุกปีและสร้างความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็นอย่างมาก ลักษณะอาการของโรคที่พบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา (Yuasa et al., 1998) สำหรับปลานิลจะมีอาการสีตัวเข้มขึ้น ตาโปน ขุ่นขาว คอดหางบวม มีหนองแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อ (นิลุบล และคณะ, 2545) โรคสเตรปโตคอคโค-ซิสเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในสกุล *Streptococcus* ชนิดที่พบมากการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย คือ *S. agalactiae* (นิลุบล และคณะ, 2545; 2549) สำหรับในต่างประเทศ มีรายงานการพบเชื้อในสกุล *Streptococcus* แต่เป็นชนิด *S. iniae* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของความเสียหายที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงปลานิล และการเลี้ยงปลาอีกหลายชนิดทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเลทั่วโลก (Eldar and Ghittano, 1999; Yuasa et al., 1999) โรคสเตรปโตคอคโคซิสมีรายงานว่าสามารถติดต่อถึงผู้ที่สัมผัสปลาและเกิดบาดแผล (Weinstein et al., 1997) และจากปัญหาความเสียหายจากการระบาดของโรคที่พบในประเทศไทยอย่างต่อเนื่องนั้น ทำให้คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าควรมีการศึกษาเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่พบในปลานิล และหาวิธีในการ

ตรวจวินิจฉัยเพื่อหาสาเหตุอย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลอย่างมาก

วัตถุประสงค์

ในปีนี้เป็นการศึกษาและเก็บข้อมูลเกี่ยวกับสาเหตุการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในปลานิล และการวินิจฉัยโดยวิธีการทางจุลชีววิทยา เพื่อหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นปัญหาสำคัญต่อการเลี้ยงปลานิล เพื่อจะนำไปพัฒนาหาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิค PCR ต่อไป

วิธีการศึกษา

1. พื้นที่ที่ทำการศึกษา

งานวิจัยนี้จะทำการเก็บตัวอย่างจากปลานิลที่เลี้ยงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยจะเก็บจากจังหวัดที่มีการรายงานการตายของปลานิลทั้งปลานิลเล็กที่อนุบาลในบ่อดินและในกระชัง ปลานิลขนาดใหญ่ที่เลี้ยงในกระชัง รวมทั้งสิ้น 11 จังหวัด และมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำพื้นฐาน ดังนี้ อุณหภูมิน้ำ, ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณอัมโมเนียรวม จังหวัดที่ทำการเก็บข้อมูลแสดงไว้ในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 จังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างปลานิลป่วยเพื่อการศึกษา

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล

2.1 สังเกตและบันทึกอาการภายนอกที่พบของปลาที่ป่วย

2.2 ทำการฆ่าตัวอย่างปลาที่สงสัยว่าจะมีการติดเชื้อโดยการตัดบริเวณรอยต่อระหว่างหัวและลำตัว หรือฆ่าโดยการใช้ยาสลบในอัตราที่เกินขนาด (overdose anaesthetized) ยาสลบที่ใช้คือ FA-100 (Nissei, Japan)

2.3 ผ่าเปิดช่องท้องโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) สังเกตความผิดปกติของอวัยวะภายใน

2.4 แยกเชื้อจากอวัยวะภายในบริเวณตับ ม้าม และไต และนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar, BHIA (BBL, France) หลังจากนั้น แยกเชื้อจากสมองและนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHIA ในกรณีที่ตัวอย่างปลามีความผิดปกติที่

บริเวณอื่นร่วมจะทำการเขี่ยเชื้อจากบริเวณนั้นด้วย ซึ่งทุกขั้นตอนจะใช้เทคนิคปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

2.5 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.4 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน หากพบการเจริญของเชื้อ นำมาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการทำ single colony culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHIA

2.6 เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้ทำการศึกษาชนิดและความสามารถในการก่อโรคต่อไป โดยเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB ที่มี 25% glycerol (BDH) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

3.1 ตรวจสอบกลุ่มของแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม (Gram stain) เพื่อทดสอบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบ และทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ catalase และ oxidase

3.2 ศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) โดยใช้ API 20 NE, API 20 E และ API 20 Strep (BioMérieux, France) ตามวิธีการจากคู่มือของทางบริษัทผู้ผลิต

4. **การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย**

4.1 นำปลานิลขนาดประมาณ 50 กรัม มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5x2.5x0.7 เมตร ในอัตราความหนาแน่น 20 ตัว/บ่อ และปรับสภาพให้เข้ากับสภาพการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ระบบน้ำที่ใช้เป็นระบบปิด มีการให้อากาศ และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 1 สัปดาห์ ในอัตรา 25 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรน้ำในบ่อ ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 2 ครั้ง และงดการให้อาหาร 1 วัน ก่อนการทดลอง

4.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่จะทำการศึกษาความสามารถในการก่อโรคมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ใน normal saline ที่ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

4.3 นำเชื้อที่ล้างมาปรับความเข้มข้นเป็น $1x10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าปลาแต่ละตัวในอัตรา 0.1 มิลลิลิตร/ตัว ในการทดลองแต่ละเชื้อจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับกลุ่มควบคุมจะฉีด normal saline

4.4 สังเกตอาการและอัตราการตายของปลาที่ทำการศึกษาเป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างปลาที่เพิ่งตายหรือใกล้ตายมาทดสอบหาสาเหตุการตาย และแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHIA เพื่อยืนยันสาเหตุการตายว่าเกิดจากเชื้อที่ฉีดเข้าไป ไม่ใช่จากสาเหตุอื่น

ผลการศึกษา

1. การศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลานิลที่อนุบาลในบ่อดินและในกระชัง

ตัวอย่างปลานิลที่ป่วยในระบบอนุบาลทั้งในบ่อดินและในกระชังจะมีอาการต่างๆ เช่น ตกเลือด (Hemorrhagic septicemia) ตามบริเวณลำตัว บนแผ่นปิดเหงือก และโคนครีบ บางตัวมีอาการตาโปน (Exophthalmia) ท้องบวมน้ำ (Abdominal dropsy) สีตัวซีดจางเป็นบางส่วน หรือสีตัวเข้มกว่าปกติ ครีบกร่อน เหงือกซีด เนื้อเยื่อเหงือกตายเป็นบางส่วน (ภาพที่ 2 และ 3) การตายของปลาที่อนุบาลในบ่อดินและในกระชังจะคล้ายคลึงกันโดยพบมากในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว

จากการเก็บตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน 177 ตัวอย่าง ในระบบอนุบาลในบ่อดินและในกระชังจากจังหวัดต่างๆ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่ามีตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 84 ตัวอย่าง คิดเป็น 47.4 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างปลานิลที่ป่วยทั้งหมด เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในระบบการอนุบาลลูกปลา คือ *Flavobacterium columnare* พบในตัวอย่างปลาป่วยจำนวน 46 ตัวอย่าง คิดเป็น 56.8 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบจากตัวอย่างปลานิลอนุบาลในบ่อดินและในกระชัง นอกจากนั้น พบเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน 33 ตัวอย่าง คิดเป็น 39.3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Aeromonas sorbriae* ในตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน

ภาพที่ 2 ตัวอย่างปลานิลอนุบาลในกระชังมีอาการตาโปน ครีบกร่อน สีตัวซีดจางเป็นบางส่วน

10 ตัวอย่าง คิดเป็น 11.9 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *A. hydrophila* ในตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 10.7 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 3 ตัวอย่างปลานิลอนุบาลในบ่อดินมีอาการตาโปนท้องบวมน้ำ สีตัวเข้ม

ในกลุ่มปลานิลที่ติดเชื้อพบตัวอย่างปลานิลป่วยที่ติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *F. columnare* และ *S. agalactiae* จำนวน 11 ตัวอย่าง การติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila*

จำนวน 4 ตัวอย่าง การติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. sorbriae* จำนวน 2 ตัวอย่าง และการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *F. columnar*e, *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* จำนวน 1 ตัวอย่าง

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำระหว่างการเก็บตัวอย่างปลานิลป่วยในระบบการอนุบาลทั้งในบ่อดินและในกระชัง พบว่า อุณหภูมิน้ำจะแปรไปตามฤดูกาลโดยอยู่ระหว่าง 20.1-28.9 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในระหว่างที่มีการแพร่ระบาดของโรคนั้น อยู่ระหว่าง 7.2-8.6 และปริมาณอัมโมเนียรวมอยู่ระหว่าง 0-0.2 มิลลิกรัม/ลิตร

2. การศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียในการเลี้ยงปลานิลในกระชัง

ตัวอย่างปลานิลที่ป่วยในการเลี้ยงในกระชังจะมีอาการต่างๆ คล้ายคลึงกับปลานิลที่อนุบาลในกระชัง เช่น มีอาการตกเลือด (Hemorrhagic septicemia) ตามบริเวณลำตัว บนแผ่นปิดเหงือก และโคนครีบ บางตัวมีอาการตาโปน (Exophthalmia) ท้องบวมน้ำ (Abdominal dropsy) ครีบกร่อน เหงือกซีด เนื้อเยื่อเหงือกตายเป็นบางส่วน บางตัวอย่างพบหนอง (abscess) ตามกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 4 และ 5) การแพร่ระบาดของโรคในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังจะพบสูงในช่วงฤดูร้อน และลดต่ำลงในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว

ในการศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในการเลี้ยงปลานิลในกระชัง ทำการเก็บตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน 305 ตัวอย่าง จากจังหวัดต่างๆ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่ามีตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 283 ตัวอย่าง คิดเป็น 92.8 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างปลานิลที่ป่วยทั้งหมด เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในการเลี้ยงปลานิลในกระชัง คือ เชื้อ *S. agalactiae* พบในตัวอย่างปลาป่วยจำนวน 231 ตัวอย่าง คิดเป็น 81.6 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบจากตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง

ภาพที่ 4 ตัวอย่างปลานิลอายุประมาณ 3 เดือน มีหนองที่บริเวณโคนหาง ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae*

และพบเชื้อ *S. iniae* จากตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน 39 ตัวอย่าง คิดเป็น 13.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น พบเชื้อ *A. hydrophila* ในตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 11.3 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *F. columnare* ในตัวอย่างปลานิลป่วยจำนวน 22 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น พบเชื้อ *Escherichia coli* จำนวน 1 สายพันธุ์ และเชื้อ *Edwardsiella tarda* จำนวน 1 สายพันธุ์ ในตัวอย่างปลาป่วยที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง

ในกลุ่มปลานิลที่ติดเชื้อพบตัวอย่างปลานิลป่วยที่ติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* จำนวน 2 ตัวอย่าง การติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *S. iniae* และ *A. hydrophila* จำนวน 10 ตัวอย่าง การติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* จำนวน 5 ตัวอย่าง

ภาพที่ 5 ตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในกระชังมีอาการตาโปน ขุ่นขาว ท้องบวม

และการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *F. columnare*, *S. iniae* และ *A. hydrophila* จำนวน 2 ตัวอย่าง

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำระหว่างการเก็บตัวอย่างปลานิลป่วยในการเลี้ยงปลานิลในกระชัง พบว่า อุณหภูมิน้ำจะแปรไปตามฤดูกาลโดยอยู่ระหว่าง 20.0-29.5 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในระหว่างที่มีการแพร่ระบาดของโรคนั้น อยู่ระหว่าง 7.0-8.2 และปริมาณอัมโมเนียรวมอยู่ระหว่าง 0-0.2 มิลลิกรัม/ลิตร คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่พบมากและมีการติดเชื้อตามกระแสเลือดได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2

3. การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิล

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลที่มีอัตราการตายมากกว่า 10.0 เปอร์เซ็นต์/วัน ในระบบการอนุบาลและการเลี้ยงจริงจะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลแสดงไว้ในตารางที่ 3 สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาสำหรับเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดอยู่ระหว่าง 25.2-27.6 องศาเซลเซียส ยกเว้นเชื้อ *F. columnare* ซึ่งอุณหภูมิระหว่างการทดลองอยู่ที่ 23.8-26.5 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อในสกุล *Streptococcus* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิลป่วยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ลักษณะ	*S. agalactiae*	*Streptococcus iniae*
Voges Proskauer	+	-
Hippurate hydrolysis	+	+
β-glucosidase hydrolysis	-	+
Pyrrolidonyl arylamidase	-	+
α-galactosidase	-	-
β-glucuronidase	-	+
β-galactosidase	-	-
Alkaline phosphatase	+	+
Leucine aminopeptidase	+	+
Arginine dihydrolase	+	-
Acid production from:		
Ribose	+	+
L-arabinose	-	-
D-manitol	-	-
D-sorbitol	-	-

ลักษณะ	*S. agalactiae*	*Streptococcus iniae*
D-lactose	-	-
D-trehalose	+	+
Inulin	-	-
D-raffinose	-	-
Starch	-	+
Glycogen	-	+
Beta HEM	+	+

<u>หมายเหตุ</u> - หมายถึง ผลเป็นลบ (negative)

+ หมายถึง ผลเป็นบวก (positive)

จากการศึกษาพบเชื้อ *A. hydrophila* จำนวน 2 สายพันธุ์ ทำให้อัตราการตายเฉลี่ยสะสมเท่ากับ 100.0 % ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิลป่วยในระบบอนุบาลในกระชัง 1 สายพันธุ์ และแยกได้จากปลานิลป่วยในระบบการเลี้ยง 1 สายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์อื่นของเชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดอัตราการตายเฉลี่ยสะสมต่ำกว่า 40.0 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ สำหรับเชื้อ *S. agalactiae* พบว่ากว่า 65 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างปลาที่เลี้ยงในกระชังมีอัตราการตายมากกว่า 10.0 เปอร์เซ็นต์/วัน ในระบบการเลี้ยงจริง

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิลป่วยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ลักษณะที่ทดสอบ	ผล
Gram stain	+
Cell shape	rod
Oxidase	+
Catalase	+
β−galactosidase	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
Citrate Utilization	+
H2S production	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	+
Indole production	+
Voges Proskauer	+
Gelatinase	+
NO2 production	+
Motility	+
Growth in MacConkey	+
O/F test	+
Fermentation/Oxidation	
D-glucose	+

ลักษณะที่ทดสอบ	ผล
D-manitol	+
Inositol	-
D-sorbitol	-
L-rhamnose	-
D-sucrose	+
D-melobiose	-
Amigdalin	+
L-arabinose	-

หมายเหตุ - หมายถึง ผลเป็นลบ (negative)

\+ หมายถึง ผลเป็นบวก (positive)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิลป่วย

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	**จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ**	**ช่วงอัตราการตายเฉลี่ยสะสม (%)**
<u>ตัวอย่างปลาในระบบอนุบาล</u>		
S. agalactiae	13	21.7-56.7
F. columnare	24	1.7-26.7
A. hydrophila	5	0.0-100.0
A. sorbriae	3	0.0-35.0
<u>ตัวอย่างปลาเลี้ยงในกระชัง</u>		
*S. agalactiae**	25	51.7-68.3
S. iniae	17	30.0-48.3
A. hydrophila	4	6.7-100.0
F. columnare	3	0.0-18.4
E. tarda	1	0.0
E. coli	1	0.0

* ตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ทำให้เกิดอัตราการตายมากกว่า 10.0 เปอร์เซ็นต์/วัน มีจำนวนมากจึงสุ่มสายพันธุ์มาทำการศึกษาทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *S. agalactiae* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ในช่วงฤดูร้อน จะมีความสามารถในการก่อโรคสูงกว่าเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ที่แยกได้ในช่วงฤดูกาลอื่น

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการเก็บตัวอย่างจากปลานิลที่มีการอนุบาลและการเลี้ยงในพื้นที่เขตภาคตะวันออกเฉียง-เหนือ รวมทั้งสิ้น 11 จังหวัด โดยเก็บจากพื้นที่ที่มีการรายงานการตายของปลานิลทั้งในระบบอนุบาลและระบบการเลี้ยงในกระชัง พบว่าในระบบการอนุบาลจะมีปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าในระบบการเลี้ยงในกระชัง ปัญหาที่พบมากในระบบอนุบาล คือ ปัญหาความเสียหายที่เกิดจากปรสิตภายนอก เช่นเดียวกับที่มีรายงานในนิลุบล และคณะ (2545) ในการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างปลานิลป่วยเพื่อจัดลำดับความสำคัญของปัญหาที่เกิด เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค PCR ต่อไปนั้น จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบมีหลายชนิด โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดที่พบมากที่สุดทั้งในระบบอนุบาลและระบบการเลี้ยง คือ เชื้อ *S. agalactiae* เช่นเดียวกับรายงานของนิลุบล และคณะ (2545) และรายงานของนิลุบลและเพ็ญพรรณ (2548) ในการศึกษานี้ เชื้อ *S. iniae* ซึ่งมีรายงานในปลาน้ำจืดและปลาทะเลหลายชนิด (Iida et al., 1986; Eldar et al., 1994;Yuasa et al., 1999) นั้นสามารถแยกได้จากตัวอย่างปลานิลป่วยในระบบการเลี้ยงในกระชังเท่านั้น ไม่พบในระบบการอนุบาลซึ่งเป็นปลานิลขนาดเล็ก และในบางกรณีจะพบการติดเชื้อร่วมกันของแบคทีเรียตั้งแต่ 2 ชนิด ขึ้นไป

เชื้อสกุล *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรายงานการก่อความมากมายทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล (นิลุบล และคณะ, 2545; Hoshina et al., 1958; Kitao et al., 1981; Yuasa et al., 1999) และเป็นปัญหาสำคัญต่อการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย จากข้อมูลของนิลุบล และคณะ (2545) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. agalactiae* พบในปลานิลที่มีขนาดตั้งแต่ 300 กรัม ขึ้นไปนั้น จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อเชื้อชนิดนี้พบในตัวอย่างปลานิลที่มีขนาดเล็กลง คือ ขนาดประมาณ 100-200 กรัม ก็ตรวจพบการติดเชื้อชนิดนี้ เชื้อ *S. agalactiae* มีรายงานการก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตนมโคทำให้แม่วัวเกิดอาการเต้านมอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และมีรายงานการปนเปื้อนในน้ำนม (Jansen, 1970; Keefe et al., 1997) Evans et al. (2002) ได้รายงานว่าพบเชื้อ *S. agalactiae* ในปลาทะเลหลายชนิด อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในปลานิลและสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในโคนมนั้นน่าจะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากในการทดลองศึกษาเปรียบเทียบเชื้อที่แยกได้จากปลานิลกับเชื้อ *S. agalactiae*

สายพันธุ์ NCTC 8181 ซึ่งแยกได้จากโคนมพบว่าเชื้อ *S. agalactiae* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากปลานิลไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโตส (lactose) แตกต่างจากเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ NCTC 8181 ซึ่งสามารถย่อยน้ำตาลแลกโตสได้

จากการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียพบว่าอัตราการตายเฉลี่ยสะสมที่ได้จากในห้องปฏิบัติการจะน้อยกว่าสภาพการเลี้ยงจริง น่าจะเนื่องมาจากการที่สภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการดีกว่าในสภาพการเลี้ยงจริง ทำให้ปลามีความเครียดน้อยกว่า ซึ่ง Ellis (1988) กล่าวว่าสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลให้สัตว์น้ำเกิดความเครียด และหลั่งฮอร์โมน corticosteroids ที่จะมีผลทำให้ภูมิคุ้มกันของปลาลดลง ในการศึกษาพบว่าข้อสังเกตว่า เชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ที่แยกได้ในช่วงฤดูร้อนมีความสามารถในการก่อโรคสูงกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้ในช่วงฤดูกาลอื่น

เชื้อ *F. columnare* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม filamentous bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากในปลาน้ำจืดในเขตอบอุ่นและเขตร้อนหลายชนิด โดยเฉพาะในบ่อดินจะทำให้เกิดความเสียหายอย่างชัดเจน (Ingris et al., 1994; Durborow et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ จากการสังเกตพบว่า *F. columnare* มักทำให้เกิดความเสียหายจะรุนแรงในปลานิลขนาดเล็กหลังการขนย้าย เช่น การเปลี่ยนย้ายบ่อหรือการย้ายลงอนุบาลในกระชัง ซึ่งน่าจะเป็นผลจากความเครียดเช่นเดียวกับที่กล่าวถึงโดย Durborow et al., (1998) ว่าเชื้อชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในระบบการเลี้ยงปกติและภายใต้สภาวะที่ปลาเกดความเครียดจะทำให้รุนแรงยิ่งขึ้น

สำหรับเชื้อ *E. tarda* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในสัตว์น้ำและสัตว์บกหลายชนิดรวมทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Ingris et al., 1994) นั้น สามารถแยกได้จากปลานิลเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นในช่วงที่ทำการศึกษา และไม่สามารถก่อโรคได้ ส่วนเชื้อ *E. coli* ซึ่งจัดเป็นพวก coliform bacteria นั้น พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ทำให้สันนิษฐานว่าในขณะที่เก็บตัวอย่างแหล่งน้ำในบริเวณนั้นน่าจะมีการปนเปื้อนจากของเสียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องน่าจะเข้ามาควบคุมและตรวจสอบระบบการเลี้ยงในพื้นที่นั้น อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ไม่ก่อให้เกิดโรคในปลานิล

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญและควรมีการพัฒนาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยน่าจะเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในกระแสเลือด ที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรง ทำให้อัตราการตายสูง ในที่นี้ คือ *S. agalactiae*, *S. iniae* และ *A. hydrophila* สำหรับ *F. columnare* นั้นการวินิจฉัยโดยการทำ wet mount ก็น่าจะเพียงพอในการยืนยันสาเหตุของโรค

เอกสารอ้างอิง

กมลพร ทองอุไทย. 2539. โรคที่พบในปลานิล. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 49 หน้า.

ธีราภรณ์ มอไธสง, นิลุบล กิจอันเจริญ, เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว และบัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล. 2548. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิล. วารสารวิจัย มข.(ฉบับบัณฑิตศึกษา) 5(1): 50-58.

นิลุบล ยูอาสะ. 2544. โรคปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. เอกสารประกอบการสอนวิชา 118 341 โรคปลาและปรสิตสัตว์น้ำ. ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น. 100 หน้า.

นิลุบล กิจอันเจริญ, ชุติมา หาญจวณิช และนงนุช สุวรรณเพ็ง. 2545. การพัฒนาวิธีการป้องกันรักษาโรคที่เกิดขึ้นกับการเลี้ยงปลานิลในกระชังบริเวณภาคตะวันออกเฉียง- เหนือ. รายงานการวิจัยประจำปี 2545. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 27 หน้า.

นิลุบล กิจอันเจริญ และเพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. 2548. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* สาเหตุของโรคระบาดในปลานิลโดยการใช้เทคนิค PCR. รายงานวิจัยประจำปี 2548. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 37 หน้า.

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

Al-Harbi, A. H. 1996. Susceptibility of five species of tilapia to *Streptococcus* sp. Asian Fisheries Science 9:177-181.

Durborow, R. M., R. L. Thune, J. P. Hawke and A. C. Camus. 1998. Columnaris Disease: A Bacterial Infection Caused by *Flavobacterium columnare*. SRAC Publication No. 479, the United States Department of Agriculture, Cooperative States Research, Education, and Extension Service, USA.

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

Ellis, A. E. 1988. Fish Vaccination. Academic Press, New York.

Evans, J. J., P. H. Klesius, P. M. Gilbert, C. A. Shoemaker, M. A. Al-Sarawi, J. Landsberg, R.Duremdez, A. Al-Marzouk and S. Al-Zenki. 2002. Characterization of beta-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured gilthead seabream, *Sparus auratus* (L) and wild mullet, *Lisa klunzingeri* (Day), in Kuwait. Journal of Fish Diseases 5:505-513.

FAO. 2009. Aquaculture production 2009. In :Yearbooks of Fishery Statistics Summary tables ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-4.pdf . [Accessed Oct 7, 2011].

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

Iida, T., K. Furukawa, M. Sakai and H. Wakayashi. 1986. Non-hemolytic *Streptococcus* isolated from the brain of vertebral deformed yellowtail. Fish Pathogy 21:33-38.

Ingris, V., R. J. Roberts and N. R. Bromage. 1994. Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Science Ltd., Oxford. 312 p.

Janzen, J. J. 1970. Economic losses resulting from mastitis. A review. Journal of Dairy Science 53:1151-1161.

Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Canadian Veterinary Journal 38:429-437.

Kitao, T., T. Aoki and R. Sakoh. 1981. Epizootic caused by β-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. Fish Pathology 15:301-307.

Miyazaki, T., S. Kubota, N. Kaige and T. Miyashita. 1984. A histopathological study of streptococcal disease in tilapia. Fish Pathology 19: 167-172.

Weinstein, M. R., M. Litt, D. A. Kertesz, P. Wyper, D. Rose, M. Coulter, A. McGeer, R. Facklam, C. Ostach, B. M. Willey, A. Borezyk and D. E. Low. 1997. Invasive infection due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. New England Journal of Medicine 337:589-594.

Yuasa, K., N. Kitancharoen, Y. Kataoka and F. A. Al-Murbaty. 1998. *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbit fish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. Journal of Aquatic Animals Health 11:87-93.