การติดเชื้อสเตรปโตค็อคคัสหรือโรคสเตรปโตค็อคโคซีส (Streptococcosis) เป็นโรคหรือการติดเชื้อหลักที่พบในการเลี้ยงปลานิลในระดับฟาร์มของประเทศไทย สาเหตุหลักที่พิสูจน์แยกได้จากโรคนี้คือแบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตค็อคคัสได้แก่ สเตรปโตค็อคคัส อินนิเอ้ (*Streptococcus iniae*) และสเตรปโตค็อคคัส อะกาแลคติเอ้ (*Streptococcus agalactiae*) การศึกษาวิจัยนี้มุ่งเน้นที่ *S. iniae* ในเรื่องของการตรวจสอบวินิจฉัย การพิสูจน์เชื้อ ลักษณะของเชื้อ กระบวนการก่อโรคของเชื้อ และอณูพันธุศาสตร์ของ *S. iniae* *S. iniae* จำนวน 10 ไอโซเลท (Isolates) ถูกแยกได้จากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ติดเชื้อจากฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี และปราจีณบุรี โดยขอเรียกชื่อเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท เป็น SiniaeCU1-10 ซึ่งเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทนี้ถูกแยกและพิสูจน์โดยวิธีมาตรฐานโดยดูจากลักษณะปรากฏและคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ รวมทั้งจากวิธีการทางอณูชีววิทยาคือวิธีปฏิกิริยาลูโซ่โพลี่เมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primers) ที่จำเพาะกับลำดับเบสของยีนแลคเตท ออกซิเดส (lactate oxidsae gene, *lct*O gene) ของ *S. iniae* นอกจากนี้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี่เมอเรสแบบมัลติเพลก (Multiplex PCR) ก็ได้นำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *S. iniae* และ *S. agalactiae* ในคราวเดียวกัน เพื่อประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์เชื้อเมื่อมีการติดเชื้อแบบผสมเกิดขึ้น (Mixed infection) ซึ่งการติดเชื้อแบบผสมนี้ทำให้ยุ่งยากต่อการพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้สร้างจีโนมิก ดีเอ็นเอ ไลบรารี่ (Genomic DNA library) ของเชื้อ *S. iniae* ขึ้น โดยใส่ชิ้นดีเอ็นเอชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1-2 กิโลเบส (1-2 kb) เข้าไปไว้ในพลาสมิด pUC118 ไลบรารี่ได้ถูกตรวจสอบและวิเคราะห์โดยการหาลำดับเบสของยีนที่ถูกใส่ไว้ในพลาสมิดโดยวิธีการ Sequencing จนถึงวันนี้พลาสมิดจากไลบรารี่จำนวน 198 โคลน (clones) ได้ถูกหาลำดับเบสของยีนที่ใส่ไว้และนำมาวิคราะห์หาความเหมือนหรือต่างจากข้อมูลของจุลชีพอื่นๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI database ข้อมูลของลำดับเบสของท่อนดีเอ็นเอที่ได้ถูกจำแนกตามลักษณะของหน้าที่ของยีนได้เป็น 17 จำพวก (categories) จากข้อมูลทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์พบยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค (virulence-related genes) จำนวน 12 ยีน ได้แก่ hemolysin streptolysin S, Phosphoglucomutase, M-like protein (*sim*A), C5a peptidase (*scp*I), Fibriogen binding protein, and capsule operon จากผลการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์จีโนม (Genome analysis) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคและกระบวนการก่อโรคของ *S. iniae* อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยละเอียดในส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคและกระบวนการก่อโรคของ *S. iniae* ต่อไป

229438

Project Code : MRG5080209
Project Title : Molecular genetic analysis of *Streptococcus iniae* for study of pathogenesis of fish streptococcosis
Investigator : Channarong Rodkhum
Department of Veterinary Microbiology
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
E-mail address : Channarong.R@chula.ac.th
Project Period : July 2, 2007 to July 2, 2009

Streptococcus infection or streptococcosis is the major disease of farmed Tilapia in Thailand. The common causative agents of streptococcosis isolated from farmed Tilapia in Thailand are *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*. *S. iniae* causes meningoencephalitis and death in aquatic animal species and also has been identified as an emerging human pathogen producing fulminant soft tissue infection. This study was focused on *S. iniae* in diagnosis, characteristics, pathogenesis and molecular genetic. Ten (10) isolates of *S. iniae* were isolated from farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Supanburi province, Kanchanaburi province and Prachinburi province of Thailand named SiniaeCU1-10. They were identified by both conventional biochemical method and polymerase chain reaction (PCR) with primers specific to lactate oxidase gene (*lct*O gene) of *S. iniae*. Further more, the multiplex PCR were developed for simultaneous detection and differentiation of *S. iniae* and *S. agalactiae* since Nile Tilapia in Thailand usually infected by both species either alone or mixed infection. The genomic DNA library of *S. iniae* strain SiniaeCU1 was constructed by using plasmid pUC118. The plasmid library was determined and analyzed the sequence by whole genome random sequencing procedure. To date, approximately 198 clones of plasmid genomic libraries have been randomly sequenced and subjected to homology search by BLAST algorithm. The nucleotide sequences were classified into 17 broad functional categories. Furthermore, we identified 12 potential virulence-related genes including hemolysin streptolysin S, Phosphoglucomutase, M-like protein (*sim*A), C5a peptidase (*scp*I), Fibriogen binding protein, and capsule operon. The results reveal that genome analysis is a powerful method for identify of genes involved in virulence and pathogenesis of *S. iniae*. The information obtained from this study can be applied for study of virulence and pathogenesis of *S. iniae*.