บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่เลี้ยงได้ทุกสภาพในภูมิภาคต่างๆ ของไทยและแพร่หลายทั่วโลกทั้งทวีปเอเชีย อัฟริกาและอเมริกาโดยเฉพาะในเขตประเทศร้อนชื้น เนื่องจากเป็นปลาที่เติบโตเร็วและนิยมบริโภค (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544; Wongtavatchai *et al.*, 2008) เมื่อพิจารณาศักยภาพการผลิตสัตว์น้ำจืดของประเทศไทยในปัจจุบัน ได้แก่ ปลาดุก ปลาช่อน ปลานิล และกุ้งก้ามกราม จำนวนการผลิตโดยรวมประมาณ 250,000 ตันต่อปี โดยเฉพาะปลานิลสามารถผลิตได้ปริมาณ 200,000 ตันต่อปี พบว่าปริมาณการผลิตเพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2551) และสามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดผู้บริโภคและตลาดส่งออก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และทวีปยุโรป (กรมสินค้าส่งออก, 2548) โดยประเทศไทยจัดอยู่ในลำดับ 5 หรือ 6 ของโลกในการผลิตปลานิลสูงสุด (World aquaculture, 2005; Wongtavatchai *et al.*, 2008) จากการพัฒนาระบบการเลี้ยงให้เป็นระบบอุตสาหกรรมในปัจจุบันเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดผู้บริโภคและตลาดส่งออก ผู้เลี้ยงส่วนใหญ่จึงเร่งเพิ่มกำลังการผลิตต่อหน่วยพื้นที่โดยการปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นมากขึ้นรวมทั้งขาดการจัดการและระบบการป้องกันโรคเข้าฟาร์มไม่เป็นมาตรฐานของอุตสาหกรรมการผลิต เป็นผลให้สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงมีสภาวะที่ไม่เหมาะสม นำไปสู่ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและการระบาดของโรคที่รุนแรงภายในฟาร์ม เป็นต้นเหตุการณ์สูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรม การผลิตและส่งผลต่อสุขภาพผู้บริโภคโดยได้รับเชื้อผ่านทางปลาได้ (Wongtavatchai *et al.*, 2008)

โรคติดเชื้อที่พบได้ในปลานิลเพาะเลี้ยง เช่น โรคจากปรสิต แบคทีเรีย ริกเกตเซีย เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคติดเชื้อในปลานิลที่เพาะเลี้ยง คือ เชื้อสเตรปโตคอคคัส พบว่าก่อโรครุนแรงและเป็นต้นเหตุของการสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลทั่วโลก (Evans *et al.*, 2000) สาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซิสเกิดจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสเตรปโตคอคไคซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมและต่อกันเป็นสายยาว (cocci chain) (Songer and Post, 2005; Talaro and Talaro, 1996; Wongtavatchai *et al.*, 2008) จัดอยู่ใน family Streptococcaceae และ genus Streptococcus เป็นกลุ่มที่ก่อโรคในคนและสัตว์ คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ได้แก่ ไม่สามารถสร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่เคลื่อนที่ (non motile) เป็นแบคทีเรียที่อยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถย่อยน้ำตาลได้หลายชนิดและผลิตกรดแลกติก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่สามารถสร้างเอนไซม์เพอรอคซิเดส (peroxidase) ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ต้องอาศัยโฮสต์ (parasitic form) ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้อจึงเจริญเติบโตได้ยากในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (Wongtavatchai *et al.*, 2008) การเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสมักเป็นผลเนื่องมาจากปลาเกิดความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม หรือการเปลี่ยนแปลงการจัดการอย่างกะทันหัน ความหนาแน่นในการเลี้ยงสูง การจับปลา และคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม โดยเฉพาะในประเทศไทยที่มีอุณหภูมิของน้ำในช่วงฤดูร้อนสูงถึง

30 องศาเซลเซียส ทำให้ปลาในบ่อเกิดความเครียด โดยเฉพาะลูกปลามีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่าปลารุ่นหรือปลาขุน นอกจากนี้อุณหภูมิน้ำประมาณ 30 ^{o}C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะต่อการคงอยู่และเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมนอกตัวปลา (Yanong and Floyed, 2006; Wongtavatchai *et al.*, 2008) โรคสเตรปโตคอคโคซิสทำให้เกิดอัตราการตายในปลาที่เพาะเลี้ยงสูงมากกว่า 50 % ช่วงเวลา 3-7 วัน หลังจากติดเชื้อ ถ้ามีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงอาจพบอัตราการตายสูงประมาณ 80-100 % (Yanong and Floyed, 2006; Wongtavatchai *et al.*, 2008) แต่การเกิดโรคส่วนใหญ่มักพบแบบเรื้อรัง ปลามีอัตราการเจริญเติบโตลดลงจากการกินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหารทำให้ระยะเวลาการเลี้ยงยาวนานขึ้นและผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน สภาพซากไม่สมบูรณ์ มีตำหนิ ไม่มีความสด เก็บได้ไม่นาน ปลาที่เป็นโรคเรื้อรังจะอ่อนแอและมักตายระหว่างการขนส่งและปริมาณเชื้อที่ตกค้างอยู่ในเนื้อปลามีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อปลา เป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก (Americulture, 1999)

อาการที่พบในปลาติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสแตกต่างกันไปขึ้นกับอายุปลา และการจัดการฟาร์ม อย่างไรก็ดี การเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสมักเป็นผลเนื่องมาจากปลาเกิดความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม หรือการเปลี่ยนแปลงการจัดการอย่างกะทันหัน ความหนาแน่นในการเลี้ยงสูง การจับปลา และคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำต่ำ แอมโมเนียหรือ ไนไตร์ตสูง เป็นต้น การเกิดความเครียดทำให้ภูมิคุ้มกันโรคของปลาลดลงเนื่องจากผลของความเครียดกระตุ้นต่อมใต้สมอง (hypothalamic-pituitary-interrenal axis) ให้ระดับปริมาณคอทิซอล (cortisol) ในเลือดสูงขึ้นและมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต ระบบสืบพันธุ์ และเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อมากขึ้น (Yanong and Floyed, 2006; Wildgoose, 2001) สำหรับประเทศไทยซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำในช่วงฤดูร้อนสูงถึง 30 ^{o}C ทำให้ปลาในบ่อเกิดความเครียด โดยเฉพาะลูกปลามีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่าปลารุ่นหรือปลาขุน นอกจากนี้อุณหภูมิน้ำประมาณ 30^{o}C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะต่อการคงอยู่และเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมนอกตัวปลา (Yanong and Floyed, 2006) ลักษณะอาการแสดงและรอยโรคในปลาป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส โดยอาการแสดง ได้แก่ ลักษณะการว่ายน้ำผิดปกติ (spiraling หรือ spinning) อ่อนแรง (lethargy) กินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหาร (anorexia) สีตามลำตัวเข้ม (melanosis) สูญเสียการทรงตัว (imbalance movement) ตาโปนอาจพบหนึ่งหรือสองข้าง (exophthalmos; pop-eye) กระจกตาขุ่น (corneal opacity) แผลหลุมตามตัว (ulceration) และจุดเลือดออกทั่วร่างกายโดยเฉพาะบริเวณรอบ ๆ ตา เหงือก ครีบและกระพุ้งแก้ม (operculum) (Edward, 2000; Yanong and Floyed, 2006) รอยโรคภายในร่างกาย ได้แก่ ม้ามมีขนาดใหญ่และบวม จุดเลือดออกที่อวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ตับ ไต ม้ามและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (diffuse visceral hemorrhage) สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) บริเวณช่องท้องและผนังลำไส้พบของเหลวสีน้ำเลือด ปลาที่มีอาการแบบเฉียบพลันอาจตายทันทีโดยไม่แสดงอาการหรือรอยโรคที่ชัดเจน (Edward, 2000; Yanong and Floyed, 2006)

การตรวจวินิจฉัยยืนยันการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานั้น ตัวอย่างที่นำมาตรวจควรเก็บปลาที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคมาเปรียบเทียบผลการตรวจ กรณีตัวอย่างเป็นปลาที่ยังมีชีวิตจะเก็บตัวอย่างจากรอยโรค เช่น บริเวณที่เกิดหนองหรือเจาะเลือด ส่วนตัวอย่างที่ตายถ้าปลามีขนาดเล็กมากอาจเก็บตัวอย่างทั้งตัวแต่ถ้าปลามีขนาดใหญ่จะพิจารณาการเก็บอวัยวะเป้าหมาย คือ ไตและสมอง (Yanong and Floyed, 2006; Wongtavatchai *et al.*, 2008) การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส พิจารณาจากคุณสมบัติของเชื้อ (Wongtavatchai *et al.*, 2008) ได้แก่ การตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส การตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา (immunological test) และการตรวจวินิจฉัยระดับชีวโมเลกุล (molecular technique)

การตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือด เพาะในสภาวะที่มีออกซิเจนมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-1 มิลลิเมตร พื้นผิวเรียบ โค้งมน มีลักษณะคล้ายเมือกเหนียวๆ สีขาว (dull white) และกึ่งโปร่งแสงหรือทึบแสง อาจพบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงหรือไม่พบรอบๆ โคโลนีของเชื้อ ส่วนโคโลนีของเชื้อที่เพาะในสภาวะไม่มีออกซิเจนแต่มีส่วนผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 10 % พบว่าเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสทุกชนิดโตได้ดีโดยโคโลนีมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อยและเห็นการแตกตัวของ เม็ดเลือดแดงชัดเจนมากกว่าที่เพาะในสภาวะที่มีออกซิเจน (Edward, 2000; Stokes and Ridgway, 1980; Talaro and Talaro, 1996; Wongtavatchai *et al.*, 2008) ลักษณะทางชีวเคมี (biochemical test) เริ่มจากทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกลักษณะกลม (gram positive coccus) อย่างเช่น สแตปฟิโลคอคคัส (Staphylococcus) ไมโครคอคคัส (Micrococcus) และ เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส โดยเชื้อสแตปฟิโลคอคคัสและไมโครคอคคัส สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส แต่เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส โดยนำเชื้อทดสอบกับ 3 % ไฮโดรเจนเปอรอคไซด์ ถ้าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสจะพบฟองแก๊สเกิดขึ้น (Stokes and Ridgway, 1980; Wongtavatchai *et al.*, 2008) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ มีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ซึ่งปัจจุบันมีชุดทดสอบและสามารถระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส โดยใช้หลักการทดสอบทางชีวเคมี เช่น API 20STREP เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยระดับชีวโมเลกุล (molecular technique) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงสำหรับตรวจหาชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่ก่อโรคระบาดในปลานิลอย่างจำเพาะโดยพิจารณาการเรียงลำดับเบสใน 16sRNA gene ซึ่งเป็นยีนที่พบทั่วไปในแบคทีเรียเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อ genomic DNA ของแบคที่เรียสเตรปโตคอคคัสแต่ละชนิดแล้วนำมาทำ PCR assay (Gibello *et al.*, 2005; Zlotkin *et al.*, 1998) หรือการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี DNA fingerprinting ด้วยการใช้ restriction enzyme ตัดใน sequence ของเชื้ออย่างจำเพาะร่วมกับการใช้ probe สามารถตรวจหาชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย สเตรปโตคอคคัส นอกจากนี้วิธีการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลสามารถประยุกต์ใช้ในการสำรวจระบาดวิทยา (Wongtavatchai *et al.*, 2008) หลักการของวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่โพลิเมอเรส

(Polymerase Chain Reaction, PCR) คือ การเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อแบคทีเรียแบบทวีคูณจนมีจำนวนมากพอที่จะตรวจพบได้ โดยใช้ไพรเมอร์ ในปฏิกิริยา ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การสกัด DNA 2) การเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะในการชันสูตรโรคสเตรปโตคอคโคซิส 3) เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน PCR สำหรับการชันสูตร (Wongtavatchai *et al.*, 2008) การสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิสโดยการใช้สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์ lysozyme และ proteinase K ในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย แยกส่วน DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยสาร phenol/chloroform/isoamyl alcohol หรือ DNA-binding spin column โดยปริมาณ DNA จากเซลล์แบคทีเรียเมื่อผ่านขั้นตอนการสกัดมีความแตกต่างกันในแต่ละวิธีการ (Wongtavatchai *et al.*, 2008) จากการศึกษาก่อนหน้าสามารถตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ เป็น sequence ที่สร้างจาก 16sRNA gene ได้แก่ ไพรเมอร์ C1 : 5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA A-3' และ C2 : 5'-TAC AAC GCA GGT CCA TCT-3' ระบุเป็น genus Streptococcus ให้ PCR product ที่ความยาว 207 bp (Meiri-Bendek *et al.*, 2002; Wongtavatchai *et al.*, 2008) ไพรเมอร์ F1 : 5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3' และ IMOD : 5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3' ระบุว่าเป็น species *Streptococcus agalactiae* ให้ PCR product ที่ความยาว 220 bp (Martinez *et al.*, 2001; Wongtavatchai *et al.*, 2008) และไพรเมอร์ Sin-1 : 5'-CTA GAG TAC ACA TGT ACT AAG-3' และ Sin2 : 5'- GGA TTT TCC ACT CCC ATT AC-3' ระบุว่าเป็น species *Streptococcus iniae* ให้ PCR product ที่ความยาว 300 bp (Zlotkin *et al.*, 1998; Wongtavatchai *et al.*, 2008) ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างไพรเมอร์จากรายงานการศึกษาอื่นๆ สำหรับการชันสูตรชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสอย่างจำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนต่างๆ นอกจากนั้น ยังมีการพิจารณาลำดับเบสใน Superoxide dimutase A encoding gene ในเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus phocae* (Alber *et al.*, 2004) เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* เชื้อแบคทีเรีย *S. pneumoniae* และเชื้อแบคทีเรีย *S. pyogenes* โดยสามารถระบุเป็น genus Streptococcus ได้ (Poyart *et al.*, 1995)

การวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของยีน (Molecular characterization) สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic system) เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของแบคทีเรียและตำแหน่งในอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (Alber *et al.*, 2004; Sulultana *et al.*, 1998) การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมจากยีนนั้นสามารถนำมาพัฒนาเครื่องมือในการวินิจฉัยและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้ (Eldar *et al.*, 1997) โดย homologous gene สามารถใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากมีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดและสายพันธุ์ สำหรับ homologuous gene ที่นิยมใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส ได้แก่ 16S rRNA, 23S rRNA และ 16S-23S rRNA intergenic spacer region (Alber *et al.*, 2004) แต่อย่างไรก็ตามยีนเหล่านี้มีความเปลี่ยนแปลงของระดับพันธุกรรมที่ต่ำ (Chatellier *et al.*, 1998; Sulultana *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2001) การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้ออาจแสดงผลไม่ชัดเจนจึงควรเลือกยีนอื่นๆ ที่

จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษา ตัวอย่างเช่น Superoxide dismutase A encoding gene และ *cpn*60 encoding chaperonin gene สามารถใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการที่จำเพาะของเชื้อ สเตรปโตคอคคัสร่วมกับ homologuous gene (Alber *et al.*, 2004)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างไพรเมอร์สำหรับตรวจระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

primer		gene	sequences	PCR product (base pair)	References
C1	*Streptococcus spp.*	16S	5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA A-3'	207	Meiri-Bendex *et al.*
C2		rDNA	5'-TAC AAC GCA GGT CCA TCT-3'		2002
Str1	*Streptococcus spp.*	*tuf*	5'-GTA CAG TTG CTT CAG GAC GTA TC-3'	197	Picard *et al.*,
Str1			5'-ACG TTC GAT TTC ATC ACG TTG-3'		2004
V1	*S.agalactiae*	16S	5'-TTT GGT GTT TAC ACT AGA CTG-3'	120	Meiri-Bendex *et al.*
V2		rDNA	5'-TGT GTT AAT TAC TCT TAT GCG-3'		2002
F1	*S.agalactiae*	16S	5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3'	220	Martinez *et al.*,
IMOD		rDNA	5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3'		2001
II-F	*S.agalactiae*	*cps2K*	5'-GCT TCA GTA AGT ATT GTA AGA CGA TAG-3'	397	Poyart *et al.*,
II-R			5'-TTC TCT AGG AAA TCA AAT AAT TCT ATA GGG-3'		2007
IV-F	*S.agalactiae*	*cps4N*	5'-GGT GGT AAT CCT AAG AGT GAA CTG T-3'	578	Poyart *et al.*,
IV-R			5'-CCT CCC CAA TTT CGT CCA TAA TGG T-3'		2007
V-F	*S.agalactiae*	*cps5O*	5'-GAG GCC AAT CAG TTG CAC GTA A-3'	701	Poyart *et al.*,
V-R			5'-AAC CTT CTC CTT CAC ACT AAT CCT-3'		2007
VI-F	*S.agalactiae*	*cps6I*	5'-GGA CTT GAG ATG GCA GAA GGT GAA-3'	487	Poyart *et al.*,
VI-R			5'-CTG TCG GAC TAT CCT GAT GAA TCT C-3'		2007
VII-F	*S.agalactiae*	*cps7M*	5'-CCT GGA GAG AAC AAT GTC CAG AT-3'	371	Poyart *et al.*,
VII-R			5'-GCT GGT CGT GAT TTC TAC ACA-3'		2007
aga F	*S.agalactiae*	23S	5'-AAC AGC CTC GTA TTT AAA ATG ATA GAT TAA C-3'	866	Kawata *et al.*,
ady R		rDNA	5'- TCCTACCATGACACTAATGTGTC-3'		2004
dltS-F	*S.agalactiae*	*dltS*	5'-AGG AAT ACC AGG CGA TGA ACC GAT-3'	952	Poyart *et al.*,
dltS-R			5'-TGC TCT AAT TCT CCC CTT ATG GC-3'		2007
Sin-1	*S.iniae*	16S	5'-CTA GAG TAC ACA TGT ACT (AGCT) AAG-3'	300	Zlotkin *et al.*,
Sin-2		rDNA	5'-GGA TTT TCC ACT CCC ATT AC-3'		1998
LOX-1	*S.iniae*	*lctO*	5'-AAA GGG AAA TCG CAA GTG CC-3'	870	Mata *et al.*,
LOX-2			5'-ATA TCT GAT TGG GCC GCT TAA-3'		2004

การจัดการความเสี่ยงโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยงต้องมีองค์ประกอบร่วมกัน โดยประกอบด้วยการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อการปฏิบัติเพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคและลดการสูญเสีย ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวินิจฉัยโรค ได้แก่ การวินิจฉัยอาการทางคลินิกและจุลพยาธิวิทยา การเพาะเชื้อแบคทีเรีย และการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล นอกจากนั้นวิธีการอื่นๆ ที่ประกอบกับการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ การคัดเลือกสายพันธุ์ปลานิลที่ทนต่อโรคสเตรปโตคอคโคซิส การใช้ยาฆ่าเชื้อเพื่อควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลูกปลานิล การใช้ยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค อย่างไรก็ตาม พบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพเป็นวิธีการจัดการความเสี่ยงที่ฟาร์มเลี้ยงปลานิลปฏิบัติในปัจจุบันแต่การใช้ยาต้านจุลชีพจำเป็นต้องมีการทดสอบความไวของเชื้อต่อชนิดยาต้านจุลชีพก่อนนำมาใช้เนื่องจากเชื้ออาจเกิดการดื้อยาทำให้ไม่ได้ผลการรักษาและทำให้ยาตกค้างในเนื้อปลา ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรค (WHO Technical Report Series, 1999; Wongtavatchai *et al*., 2008) การป้องกันโรคควรเน้นในเรื่องการจัดการร่วมกับการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงปลาให้เหมาะสม (Wildgoose, 2001) ได้แก่ การเลี้ยงในปริมาณความหนาแน่นที่เหมาะสมและฆ่าเชื้อลูกปลาก่อนนำมาเลี้ยง การจัดการอื่นๆ เช่น การพักบ่อและเตรียมบ่อด้วยการใส่ยาฆ่าเชื้อและตากบ่อก่อนเลี้ยงปลานิลในชุดถัดไป การจัดการสุขศาสตร์การเลี้ยงและระบบการป้องกันโรคเข้าฟาร์ม เช่น การจัดการคุณภาพน้ำ ทำความสะอาดสิ่งแวดล้อมรอบๆ บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงปลา ตรวจวินิจฉัยปลาที่นำเข้ามาใหม่ก่อนลงเลี้ยงรวมในบ่อ นอกจากนี้การพิจารณาใช้วัคซีนป้องกันโรคร่วมกับการจัดการอาจเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดปัญหาจากการใช้ยาต้านจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wildgoose, 2001; Wongtavatchai *et al*., 2008)

ปัจจุบันเริ่มมีการพัฒนาการผลิตวัคซีนในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่าลูกปลานิลที่ไม่ได้ทำวัคซีนมีมูลค่าการสูญเสียต่อการผลิตสูงกว่าลูกปลาที่ผ่านการทำวัคซีน นอกจากนี้โรคสเตรปโตคอคโคซิสยังมีผลกระทบต่อปลาเพาะเลี้ยงขนาดสำหรับส่งขาย โดยพบอัตราการตายสูงประมาณ 4,000 ตัวต่อวันในการระบาดของโรคอย่างรุนแรงจากการไม่ทำวัคซีนตั้งแต่เริ่มแรก (Americulture, 1999; Wongtavatchai *et al*., 2008) ดังนั้นการทำวัคซีนช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสและช่วยลดการแสดงอาการ ลักษณะร่างกายที่ผิดปกติจากการติดเชื้อและอัตราการตาย เป็นต้น แต่ผลของการใช้วัคซีนยังมีข้อบ่งชี้ในเรื่องของการป้องกันโรคจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันในแต่ละท้องที่หรือประเทศที่มีการระบาด ขนาดลูกปลาที่เริ่มให้วัคซีน และวิธีการให้วัคซีน เป็นต้น (Evans *et al*., 2004; Klesius *et al*., 2000; Wongtavatchai *et al*., 2008)

การผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องระบุปัจจัยความรุนแรง (virulence factor) ของเชื้อก่อโรคเพื่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อต้านโรคติดเชื้อต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม แอนติเจน (antigen) ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ peptide antigen และ non-peptide antigen ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียจากเชื้อ *Vibrio anguillarum* *V.ordalii* และ *V.salmonicida* นำมาผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อวิบริโอในปลามาเป็นระยะเวลายาวนาน จากรายงานการศึกษาของ Gudding และคณะ

ปี 1999 กล่าวว่า ส่วนประกอบหรือสารต่างๆ ที่ผลิตขึ้นมาจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น เอนไซม์ capsular polysaccharide หรือ lipopolysaccharide (LPS) เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด สำหรับก่อความรุนแรงของโรค เช่น *Pasteurella piscicida*, *S. agalactiae*, *S.iniae* เป็นต้น สามารถนำมาผลิตวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อในปลาเพาะเลี้ยงของประเทศต่างๆ เช่น Turbot Rainbow Trout หรือปลานิล โดยส่วนใหญ่วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำมักเป็นแบบ inactivated vaccine โดยใช้สารเคมีนิยมใช้สารฟอร์มาลินสำหรับยับยั้งความรุนแรงและไม่ทำลายโครงสร้างของแอนติเจนของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Formalin Killed Cell, FKC) (Gudding *et al.*, 1999) สำหรับ Extracellular product (ECP) สามารถยับยั้งความรุนแรงด้วยความร้อนหรือสารเคมี เช่น ฟอร์มาลิน ฟีนอล ซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรคเมื่อฉีดเข้าในสัตว์ทดลอง ตัวอย่างเช่น การยับยั้งความรุนแรงของแอนติเจนในเชื้อ *Vibrio cholera* โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C นาน 15 และ 30 นาที หรือฟีนอล 0.4 % ต้ม 65 ^{o}C นาน 60 นาที หรือฟอร์มาลิน 0.4 % ต้ม 65 ^{o}C นาน 60 นาที เป็นต้น (Cryz *et al.*, 1982) ส่วนเชื้อ *S.agalactiae* และ *S.iniae* ใช้ฟอร์มาลิน 3 % แช่ที่อุณหภูมิ 4^{o}C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดฟอร์มาลินและสกัดโปรตีนที่ต้องการด้วยชุดกรองที่กำหนดขนาดโปรตีนอย่างจำเพาะ (Evan *et al.*, 2004)

ชนิดของวัคซีนที่ใช้ในการควบคุมโรคสเตรปโตคอคโคซิสปลานิลมักเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อ *S. iniae* เช่น Formalin Killed *Streptococcus iniae* vaccine, Modified-killed *S. iniae* ประกอบด้วยเซลล์แบคทีเรียและ Extracellular product (Evans *et al.*, 2004) ส่วนวัคซีนควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อ *S. agalactiae* เช่น Formalin Killed whole cells ของ *S.agalactiae* และมี Extracellular product (ECP) ผสมรวมในวัคซีน (Evans *et al.*, 2004; Pasnik *et al.*, 2005) ไม่นิยมพัฒนา Modified live vaccine ของเชื้อ *S.agalactiae* และ *S.iniae* เพราะอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพคน (Evans *et al.*, 2004) นอกจากนี้การผลิตวัคซีนจำเป็นต้องพิจารณาถึงวิธีการผลิตปริมาณมาก (large scale) เพื่อตอบสนองต่อการนำไปใช้ระดับอุตสาหกรรมสำหรับป้องกันโรคติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส โดยนำระบบเครื่อง fermentor เข้ามาใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อ *Streptococcus agalactiae* (Huser *et al.*, 1983; Hunolstein *et al.*, 1993) และเชื้อ *S. iniae* (Eyngor *et al.*, 2008)

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตและผลการใช้ออโตจีนัสวัคซีนในการควบคุมป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิลขุน น้ำหนักตัว 200 g ฉีดวัคซีนชนิด Formalin Killed Cell (FKC) เข้าช่องท้องปริมาณ ขนาด 6.0 X 10^{8} CFU/ตัวปลา และช่วง 10 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีน ปลาได้รับการฉีดเชื้อชนิดเดียวกับวัคซีนเข้าช่องท้อง (1.5 X 10^{8} CFU/ตัวปลา) พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม อัตราการรอด 0-10% การตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส ด้วยวิธี Direct Agglutination test จากเซรั่มปลานิลขุนที่ผ่านการฉีดวัคซีน พบว่าก่อนได้รับวัคซีน ปลาทุกกลุ่มศึกษามีระดับภูมิคุ้มกัน ประมาณ 0.564-0.752 และหลังจากปลาได้รับวัคซีนเป็นเวลา 3, 5, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ มีการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (Maisak *et al.*, 2010)

ตารางที่ 2.2 รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เซลล์แบคทีเรียส่วนประกอบหรือสารต่างๆ ที่ผลิตขึ้นมาจากเชื้อแบคทีเรียในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคในปลา

Bacteria	Species	Reasons	References
S. iniae	Tilapia	- Antigenic composition of whole cell in vaccine : induced protective antibody response -Protection of streptococcosis : Combined vaccine (whole cell and extracellular product, ECP) > whole cell vaccine	Klesius *et al.*, 2000
S. iniae	Trout	- Protective protein in whole cell with intraperitoneal (IP) injection	Eldar *et al.*, 1997
S. agalactiae	Tilapia	- Whole cell vaccine and Combine vaccine : induced protective antibody response - Combine vaccine : enhanced the antigenic properties of vaccine	Evan *et al.*, 2004
S. difficile	Tilapia	- Protection of streptococcosis : Whole cell vaccine > ECP vaccine	Eldar *et al.*, 1995
Enterococcus	Turbot	- Effectiveness of bacterin (Whole bacterial cell vaccine) with IP injection > immersion	Toranzo *et al.*, 1995
A. salmonicida	Salmond	- IP injection with bacterin vaccine : acceptable level of protection	Gudding *et al.*, 1999
A. salmonicida	Salmond	- Complex antigen in whole cell vaccine stimulated specific antibody response 42-48 days after vaccination.	Grontvedt and Espelid, 2004