

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 ศึกษาอุบัติการณ์ของโรคสเตรปโตคอคโคซิสและรวบรวมเชื้อสเตรปโตคอคคัสในฟาร์มปลานิลของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553

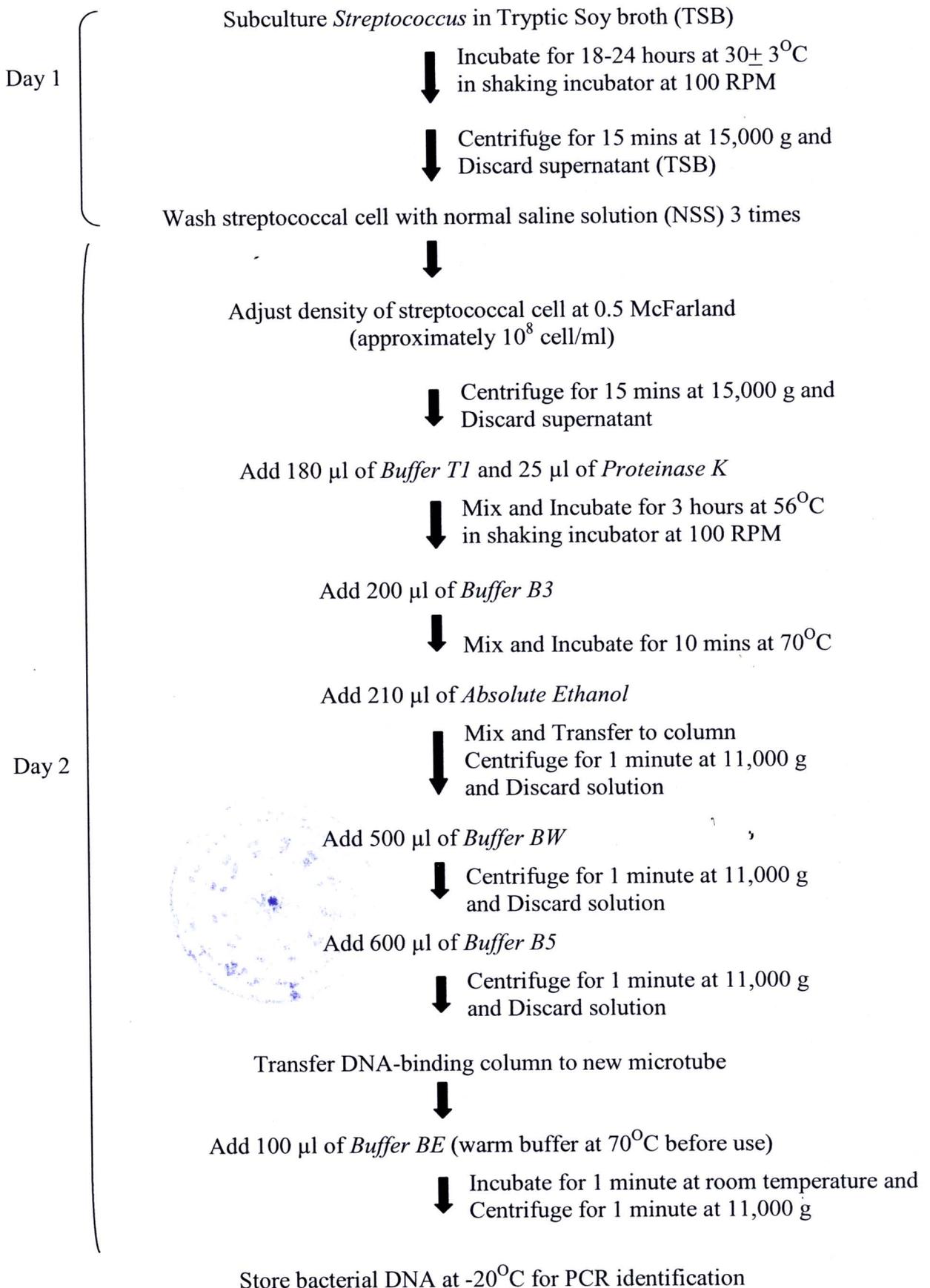
1. วิจัยโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลพิจารณาจากการสังเกตอาการแสดง วิจารณ์ของปลานิลป่วย
2. วิจัยโรคสเตรปโตคอคโคซิสพิจารณาจากลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส
 - 2.1 พิจารณาลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสม
 - 2.2 ตรวจสอบลักษณะเซลล์สเตรปโตคอคคัสจากการย้อมสีแกรม
 - 2.3 ตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์อะตะเลส
3. การตรวจยืนยันชนิดเชื้อทางชีวโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ ตามรายงาน Wongtavatchai และ Maisak (2008)

การสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

1. เพาะเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid®, USA) ที่ผสมเลือด 5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 3 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อแบคทีเรียใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB, Oxoid®, USA) บ่มในเครื่อง shaking incubator อุณหภูมิ 30 ± 3 °C รอบหมุน 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นเชื้อเทียบเท่า 0.5 McFarland standard (10^8 cells/ml) ในสารละลายน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และใส่เชื้อความเข้มข้น 0.5 McFarland standard ปริมาตร 1 ml ลงใน microtube เพื่อนำไปสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรีย
3. ใช้ชุดสกัด DNA ออกจากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (NucleoSpin® ExtractI, MACHEREY-NAGEL, Germany) ตามขั้นตอนที่แนบมาจากผู้ผลิต



ขั้นตอนการสกัด DNA ด้วย DNA-binding spin column (NucleoSpin® Extract I, Germany)



ไพรเมอร์สำหรับยืนยันชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัส ตามรายงาน Wongtavatchai และ Maisak (2008)

ไพรเมอร์ที่จำเพาะเพื่อใช้สำหรับยืนยัน *Streptococcus* spp., *S. agalactiae* และ *S. iniae* (ตารางที่ 3.1) การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ *S. agalactiae* ATCC13813 และ *S. iniae* ATCC29178 ในการอ้างอิง (reference strains)

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์จากรายงานการศึกษาต่างๆ เพื่อใช้สำหรับยืนยันชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัส

ไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptococcus</i> spp.	C1	5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA A-3'	Meiri-Bendek <i>et al.</i> , 2002
	C2	5'-TAC AAC GCA GGT CCA TCT-3'	
<i>S. agalactiae</i>	F1	5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3'	Martinez <i>et al.</i> , 2001
	IMOD	5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3'	
<i>S. iniae</i>	Sin-1	5'-CTA GAG TAC ACA TGT ACT AAG-3'	Zlotkin <i>et al.</i> , 1998
	Sin-2	5'-GGA TTT TCC ACT CCC ATT AC-3'	

ขั้นตอนการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification ตามรายงาน Wongtavatchai และ Maisak (2008)

(1) เตรียมส่วนผสมในการทำ PCR

ประกอบด้วย 10X Tag polymerase buffer (1 mM MgCl₂) 2 µl dNTP (2.5 mM) 1 µl Tag polymerase (2.5 U) 0.5 µl (iNtRON Biotechnology, Inc.), ฟอว์เวิร์ด ไพรเมอร์ (10 µM) 1 µl รีเวิร์ส ไพรเมอร์ (10 µM) 1 µl DNA (50-100 ng/µl) 5 µl (Meiri-Bendek *et al.*, 2002) และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรโดยรวมเท่ากับ 20 µl (iNtRON Biotechnology, Inc.)

(2) ขั้นตอน PCR amplification

นำส่วนผสมที่เตรียมเข้าเครื่อง PCR Thermalcycle (Hybrid, PCRSprint) ขั้นตอน PCR amplification เริ่มต้นด้วย preheating 94 °C เวลา 2 นาที และผ่าน 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน denaturation 94 °C เวลา 20 วินาที ขั้นตอน annealing 56 °C เวลา 10 วินาที และ ขั้นตอน extension 72 °C เวลา 30 วินาที จำนวน 30 รอบ โดยรอบสุดท้ายในขั้นตอน extension 72 °C ใช้เวลา 2 นาที (iNtRON Biotechnology, Inc.)

(3) Gel electrophoresis

นำ PCR product และ 1-kbp DNA ladder (SibEnzyme) ผ่าน 2% agarose gel (Research organics, USA) ในเครื่อง Electrophoresis (Bio-Red, USA) ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และย้อมติดสีด้วย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml (Sigma Algrich Inc., USA) แห้งเป็นระยะเวลา 30 นาที อ่านผล DNA band ของ PCR product ใน 2% agarose gel ด้วยเครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, Germany) และถ่ายภาพภายใต้แสง UV

ส่วนที่ 2 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นปัญหาในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล ภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย

เตรียมเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

เชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลานิลป่วยจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 ตามรายงานส่วนที่ 1 คัดเลือกจำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสเตรปโตคอคคัส และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ (ดังตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 เชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิลป่วยในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 นำมาใช้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสเตรปโตคอคคัส

ตัวอย่าง	วันตรวจตัวอย่าง	จังหวัด	ข้อมูล
ภาคกลาง			
1	08/1/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาพ่อแม่พันธุ์
38	22/3/2553	กาญจนบุรี	ปลาขุนกระชัง
42	29/3/2553	นครปฐม	ปลาขุนบ่อดิน 7-8 เดือน
43	03/4/2553	ราชบุรี	ปลาขุน 4 เดือน
66	06/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 20 กรัม
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ			
44	06/4/2553	ปราจีนบุรี	ปลาขุน
45	10/4/2553	อุบลราชธานี	อายุ 3 เดือน
46	13/4/2553	นครพนม	ปลาขุนกระชัง
ภาคตะวันตก			
26	01/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 35 วัน
59	27/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 58 วัน

PCR primer ที่มีความจำเพาะต่อ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

การตรวจวินิจฉัยระดับชีวโมเลกุล สำหรับเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่ก่อโรครบาดในปลานิล มักพิจารณาการเรียงลำดับเบสในยีน 16S rRNA และยืนยันด้วยยีน *sodA* gene ซึ่งสามารถนำมาแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะระหว่างเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม streptococci และกลุ่ม enterococci (Alber *et al.*, 2004) ยีนทั้ง 2 ชนิดสามารถตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานการศึกษาของ Maisak และคณะ 2010 ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ไพรมเมอร์ตรวจหา ยีน 16S rRNA และยีน *sodA* gene เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ สเตรปโตคอคคัส ตามรายงานการศึกษาของ Maisak และคณะ ปี 2010

ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	PCR product (bp)
<i>16S rRNA gene</i> ¹	JW_16S_F 5'-AAC GGG TGA GTA ACG CGT AG-3' JW_16S_R 5'-TTC ATG TAG GCG AGT TGC AG-3'	1234
<i>sodA_{int} gene</i> ²	JW_sodAF1 5'-TGA TGC TTT AGA GCC ACA ATT TGA T-3' JW_sodAR1 5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3'	512

¹ ไพรมเมอร์ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene จากเชื้อรหัส GenBank accession no. AB002479, AF015927, EF092913, DQ985468, AF335572, AY762259, EU075069

² ไพรมเมอร์ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *sodA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Mn-dependent superoxide dismutase จากเชื้อรหัส GenBank accession no. Z95893, EU661272, Z99176, AM490314

DNA amplification และ sequencing ตามรายงานการศึกษาของ Maisak และคณะ ปี 2010

- ส่วนผสมในการทำ DNA amplification ที่ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 40 μ l ประกอบด้วย genomic DNA 50 ng, Forward primer และ Reverse primer อย่างละ 0.5 μ M (Sigma-Genosys, Singapore), dNTP 250 μ M และ Taq DNA polymerase 1 หน่วย ต่อ 1X amplification buffer (Tris HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM) (iNtRON Biotechnology, USA)
- นำส่วนผสม PCR mixture เตรียมเข้าเครื่อง PCR Thermalcycler (Whatman Biometra®, UK) ขึ้นตอน PCR amplification เริ่มต้นด้วย initial denaturation step อุณหภูมิ 94 °C เวลา 3 นาที และผ่าน 3 ขึ้นตอน คือ ขึ้นตอน denaturation อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที ขึ้นตอน annealing อุณหภูมิ 58 °C เวลา 30 วินาที และขึ้นตอน extension อุณหภูมิ 72 °C เวลา 60 วินาที จำนวน 30 รอบ โดยรอบสุดท้ายในขึ้นตอน extension อุณหภูมิ 72 °C ใช้เวลา 5 นาที
- นำ PCR product ปริมาตร 5 μ l และ 100 bp DNA-ladder (molecular marker) ผ่าน 2% agarose gel ในเครื่อง Electrophoresis (Bio-Rad, USA) และย้อมติดสีด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 5 μ /ml แช่เป็นเวลา 30 นาที และดู band ของ PCR product ภายใต้แสง UV
- สกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วย NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL, Germany) แล้วส่งทำ DNA sequencing ด้วยโปรแกรม biosystems DNA sequencing analysis Software v5.2 และ KB basecaller (the 1st BASE DNA Sequencing, Singapore) เพื่อนำนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไปวิเคราะห์

การวิเคราะห์ DNA Sequence

วิเคราะห์และเปรียบเทียบ DNA sequence ของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากแหล่งระบาดต่างๆ ของประเทศไทย โดยใช้โปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor V.7.0.5.3 และวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยโปรแกรม CLUSTAL V (DNASTAR, Madison, WI)

ขั้นตอนการสกัด Nucleic acid ด้วย DNA-binding spin column (NucleoSpin® Extract II, Germany)

Mix 40 μ l of sample (PCR product) with 80 μ l of *Buffer NT*



Place a column into a collection tube



Centrifuge for 1 minute at 11,000 g and
Discard solution in collection tube

Add 600 μ l of *Buffer NT3*



Centrifuge for 1 minute at 11,000 g and
Discard solution in collection tube

Centrifuge for 2 mins at 11,000 g to remove *Buffer NT3* and dry column



Transfer DNA-binding column to new microtube



Add 20 μ l of *Elution Buffer NE*



Incubate for 1 minute at room temperature and
Centrifuge for 1 minute at 11,000 g

Purified nucleic acid for sequencing

ส่วนที่ 3 การพัฒนาอโตจีนส์วัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

การเตรียมวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิส

3.1 ศึกษาการเตรียมปริมาณเชื้อแบคทีเรียสำหรับเตรียมวัคซีน

3.2 ศึกษาวิธีการเตรียมวัคซีน และทดสอบคุณภาพวัคซีน

3.1 การเตรียมปริมาณเชื้อแบคทีเรียสำหรับเตรียมวัคซีน

เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เชื้อ *Streptococcus agalactiae* แยกจากปลานิลป่วยและตายจากโรคสเตรปโตคอคโคซิส จากแหล่งระบาดต่างๆ ในพื้นที่เพาะเลี้ยงปลานิล ณ เขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก ของประเทศไทย (isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59) โดยพิจารณาจากข้อมูลส่วน phylogenetic analysis (ส่วนที่ 2)

การศึกษากิจกรรมของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในเครื่อง Fermentor เพื่อการผลิตวัคซีน

1. เพาะเชื้อ *S. agalactiae* ลงบน blood agar เพื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์
2. ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (normal saline solution, NSS) เทียบเท่ากับความขุ่นเบอร์ 2 McFarland (ประมาณ $5-6 \times 10^8$ Colony Forming Unit, CFU ต่อ ml) (CLSI, 2002)
3. การทดสอบการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* ในเครื่อง Fermentor Biostat® Bplus, Sartorius stedim biotech, single 2L MO, USA
4. ตรวจสอบปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยการพิจารณาความขุ่น จากเบอร์ McFarland และจำนวนเชื้อมีชีวิต ทุกๆ 2 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง ได้แก่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง

การทดสอบครั้งที่ 1 ศึกษากระบวนการที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส

ใส่เชื้อ 20 ml (ประมาณ $5-6 \times 10^6$ CFU ต่อ ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Broth (TBS) (Oxoid®, USA) ปริมาณ 2 ลิตร ในเครื่อง Fermentor ตั้งระบบเครื่อง โดยกำหนดค่า อุณหภูมิที่ 33°C (ตามการทดลองส่วนที่ 1) ความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 4-7 (Eyngor *et al.*, 2008; Hunolstein *et al.*, 1993; Huser *et al.*, 1983) ความเร็วใบพัดเครื่อง 60 รอบต่อนาที ปริมาณการให้ออกซิเจน 0.6 wm (air volume/media volumn) (Eyngor *et al.*, 2008)

การทดสอบครั้งที่ 2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อหลังจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเลี้ยงใน Fermentor ใส่เชื้อ 15 ml (ประมาณ $5-6 \times 10^6$ CFU ต่อ ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Broth (TBS) (Oxoid®, USA) ปริมาณ 1.5 ลิตร ในเครื่อง Fermentor อุณหภูมิที่ 33°C ความเร็วใบพัดเครื่อง 60 รอบต่อนาที ปริมาณการให้ออกซิเจน 0.6 wm (air volume/media volumn) (ระบบเครื่องเช่นเดียวกับการทดสอบครั้งที่ 1) เพิ่มการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 6-7 ด้วย 2N NaOH และณ ชั่วโมงที่ 6 เติม TSB ปริมาณ 0.5 ลิตร ในเครื่อง Fermentor

การทดสอบครั้งที่ 3 ศึกษาการเพิ่มปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยง

การเติมสารอาหารที่ให้พลังงาน อย่างเช่น น้ำตาลกลูโคสประมาณ 2% ช่วยเพิ่มปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. agalactiae* (Hunolstein *et al.*, 1993; Huser *et al.*, 1983) และเชื้อ *S. iniae* (Eyngor *et al.*, 2008) ในระบบเครื่อง fermentor เพื่อใช้ในการผลิตเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม (large-scale production) เริ่มจากใส่เชื้อ 20 ml (ประมาณ $5-6 \times 10^6$ CFU ต่อ ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Broth (TBS) (Oxoid®, USA) เติม 2% Glucose ปริมาณ 2 ลิตร (Eyngor *et al.*, 2008; Hunolstein *et al.*, 1993; Huser *et al.*, 1983) ในเครื่อง Fermentor อุณหภูมิที่ 33°C ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.2 ปริมาณการให้ออกซิเจน 30% (Huser *et al.*, 1983)

3.2 การเตรียมวัคซีน และทดสอบคุณภาพวัคซีน

วิธีการเตรียมวัคซีนชนิด Formalin Killed Cell (FKC) ประยุกต์วิธีจากรายงาน Maisak และคณะ (2010)

1. เชื้อ *S. agalactiae* แยกจากปลานิลป่วยและตายจากโรคสเตรปโตคอคโคซิส จากแหล่งระบาดต่างๆ ในพื้นที่เพาะเลี้ยงปลานิล ณ เขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก ของประเทศไทย (isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59)
2. เพาะเชื้อ *S. agalactiae* ลงบน blood agar เพื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเชื้อ ได้แก่ การเกิด hemolysis zone รอบโคโลนีเชื้อบน blood agar และคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20STREP
3. ปรับความเข้มข้นเชื้อ *S. agalactiae* ด้วย NSS เท่ากับเบอร์ 2 McFarland (ประมาณ $5-6 \times 10^8$ Colony Forming Unit, CFU ต่อml) (CLSI, 2002)
4. ใส่เชื้อ 20 ml (ประมาณ $5-6 \times 10^6$ CFU ต่อ ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Broth (TBS) (Oxoid®, USA) เติม 2% Glucose ปริมาณ 2 ลิตร ในเครื่อง Fermentor ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.2 อุณหภูมิที่ 33°C ปริมาณการให้ออกซิเจน 30% ความเร็วใบพัดเครื่อง 60 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (Operating instructions summary, Biostat® Bplus, Sartorius stedium biotech, single 2L MO, USA, ภาคผนวก ก)

5. แยกเชื้อ *S. agalactiae* ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge 4-16PK (Sartorius stedium biotech, USA) ที่ความเร็ว 5,500 g เป็นเวลา 20 นาที
6. ทำให้เซลล์ *S. agalactiae* ตายด้วย 3% formalin เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ล้าง formalin ออกด้วย NSS 2-3 ครั้งและปรับความเข้มข้นเท่ากับ 4 McFarland (เชื้อ *S. agalactiae* ประมาณ 1.0×10^9 CFU ต่อ ml บน blood agar)
8. ทดสอบเชื้อตาย ความสะอาดของวัคซีน โดยการเพาะลงบน blood agar เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ทดสอบคุณภาพวัคซีน

การตรวจสอบความปลอดภัยของวัคซีนและการตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันหลังได้รับวัคซีน

1. ปลูกปลาแดงพ่อแม่พันธุ์สายพันธุ์ *Oreochromis niloticus* น้ำหนักประมาณ 120-200 กรัม โดยแบ่งเป็นพ่อแม่พันธุ์ ขนาด 120 g/ตัว จำนวน 1,400 ตัว เลี้ยงในแทงก์ปูนขนาด 225 ตารางเมตร และแม่พันธุ์ ขนาด 210 g/ตัว จำนวน 2,300 ตัว เลี้ยงในขนาด 2.5 ไร่ เลี้ยงในเขตน้ำจืด จังหวัดฉะเชิงเทรา
2. ฉีดวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *S. agalactiae* (isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59) เข้าช่องท้องปลาขนาด 0.2 ml/ตัวปลา (1.0×10^8 CFUต่อตัวปลา) และงดอาหารอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนฉีดวัคซีนต้องวางยาสลบและสามารถควบคุมการฉีดวัคซีนได้
3. หลังจากทำวัคซีน เลี้ยงรวมในบ่อดิน ขนาด 3 ไร่ สังเกตอาการ ความผิดปกติและปลาตายตลอดเวลา 4 เดือน (ในช่วงการใช้งานของพ่อแม่พันธุ์)
4. ให้อาหารและวิตามินตามปฏิบัติของฟาร์ม และมีการควบคุมการติดพยาธิภายนอกด้วยตรวจอย่างสม่ำเสมอและกำจัดด้วยฟอร์มาลิน
5. เก็บข้อมูลและบันทึกผลการศึกษา หลังได้รับวัคซีน ได้แก่
 - 5.1 นับจำนวนปลาตายแต่ละวัน (% mortality; Relative Percent Survival, RPS) ตลอดเวลา 3 เดือน
 - 5.2 ปริมาณไข่เปรียบเทียบกับก่อนและหลังฉีดวัคซีน ตลอดเวลา 3 เดือน
 - 5.3 สุ่มเก็บตัวอย่างเลือด (จำนวน 50-100 ตัว สุ่มรวมทั้งแม่พันธุ์ และ พ่อพันธุ์) เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียในเลือด (โดยเฉพาะเชื้อ Streptococcus และ Aeromonas) และวัดระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีก่อนและหลังการทำวัคซีน
6. การตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีก่อนและหลังการทำวัคซีน
 - 6.1 เก็บตัวอย่างเลือด และแยกส่วนซีรัมเพื่อตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกัน
 - 6.2 การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันในปลา (antibody titer) ด้วยวิธี Direct Agglutination test ตามรายงาน Maisak และคณะ ปี 2010
 - เพาะเชื้อ *S. agalactiae* (isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59) ลงบน blood agar

- เพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TBS) (Oxoid®, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 33 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงโดยปั่นที่ความเร็ว 1,000 g เป็นเวลา 15 นาที ต่อมาล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2 ครั้ง
- ปรับความเข้มข้นเชื้อความขุ่นเท่ากับเบอร์ 0.5 McFarland ใส่ลงใน plate 96 หลุม ปริมาตร 100 µl
- นำตัวอย่างซีรัมปลานิลเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 (two-fold dilution) ด้วย PBS ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1/2 ถึง 1/4096 ปริมาตร 120 µl/หลุม โดยกลุ่มควบคุม เลือกใช้ซีรัมจากปลานิลที่ป่วยด้วยโรค สเตรปโตคอคคัสเป็น positive control และ PBS เป็น negative control
- ผสมเชื้อกับซีรัมและบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง และอ่านผล
 - (+) result : a circular diffuse button with fuzzy edges at the bottom of the well
 - (-) result : a circular compact cell button

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน

1. ปลานิลแดงพ่อแม่พันธุ์สายพันธุ์ *Oreochromis niloticus* น้ำหนักประมาณ 700 g จากบ่อดินขนาด 3 ไร่ ในฟาร์มปลานิล จังหวัดฉะเชิงเทรา ได้รับการฉีดวัคซีนเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (6 เดือน) แบ่งกลุ่มในการศึกษาเป็น 3 กลุ่ม สุ่มเลือก (simple random sampling) จำนวน 10 ตัวต่อบ่อ เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด กว้าง 200 cm ยาว 100 cm และสูง 60 cm ซึ่งสามารถจุน้ำปริมาณ 1.2 ตัน ระบบน้ำเลี้ยงเป็นแบบระบบน้ำล้นซึ่งมีการถ่ายเทน้ำออกตลอดเวลา (สถานที่ทดลอง : หน่วยอายุรศาสตร์สัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จังหวัดนครปฐม) ปรับสภาพปลา ก่อนเริ่มทดลอง เป็นระยะเวลา 7 วัน ในบ่อเลี้ยง

- กลุ่ม A : ปลาที่ได้รับวัคซีน และฉีดเชื้อ *S. agalactiae* isolate no.1 และ 59 จำนวน 20 ตัว
- กลุ่ม B : ปลาไม่ได้รับวัคซีน และฉีดเชื้อ *S. agalactiae* isolate no.1 และ 59 จำนวน 10 ตัว
- กลุ่ม C : ปลาไม่ได้รับวัคซีน และฉีดน้ำเกลือ จำนวน 10 ตัว

หมายเหตุ: *S. agalactiae* isolate no.1 และ 59 เป็นเชื้อชนิดเดียวกับวัคซีนที่ผลิต

2. เตรียมเชื้อ *S. agalactiae* สำหรับ Challenge test โดยใช้เชื้อ 2 isolate คือ isolate no. 1 และ 59 เพาะลงบน blood agar บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง ต่อมารับความเข้มข้นเชื้อเท่ากับเบอร์ 0.5 McFarland แล้วใส่เชื้อ 1 ml (ประมาณ $1-2 \times 10^6$ CFU/ml) ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TBS) (Oxoid®, USA) ปริมาตร 100 ml บ่มใน shaking incubator อุณหภูมิ 33 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นเชื้อสำหรับฉีดปลาเท่ากับ 2×10^9 CFU ต่อ ml
3. ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องปลานิลขนาด 0.3 ml ต่อตัวปลา (6.0×10^8 CFU/ตัวปลา) และควบคุมอาหารอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนฉีดวัคซีนต้องวางยาสลบและสามารถควบคุมการฉีดวัคซีนได้

4. สังเกตอาการ ความผิดปกติและปลาตายตลอดเวลา 4 สัปดาห์ และควบคุมคุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของเสียในน้ำ (แอมโมเนียและไนไตรต์) ตลอดระยะเวลาการทดลอง
5. เก็บข้อมูลและบันทึกผลการศึกษา หลังได้ฉีดเชื้อพิษ ได้แก่ นับจำนวนปลาตายแต่ละวัน (% mortality; Relative Percent Survival, RPS) และเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียในเลือด (โดยเฉพาะเชื้อ Streptococcus และ Aeromonas) รวมทั้งวัดระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีก่อนและหลังฉีดเชื้อทั้ง
6. ปลาตายระหว่างการทดลอง ตรวจวินิจฉัยยืนยันการตายจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสโดยการผ่าชันสูตรซาก เพื่อตรวจลักษณะความผิดปกติภายนอกและรอยโรคของอวัยวะภายใน จนถึงเพาะเชื้อแบคทีเรียจากไต และสมองเพื่อตรวจหาสาเหตุการตายหลังฉีดเชื้อ

