

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### ส่วนที่ 1 ศึกษาอุบัติการณ์ของโรคสเตรปโตคอคโคซิสและรวบรวมเชื้อสเตรปโตคอคคัสในฟาร์มปลานิลของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553

##### 1. วินิจฉัยโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลพิจารณาจากการสังเกตอาการแสดง วิจารณ์ของปลานิลป่วย

ในช่วงการศึกษาการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล ช่วงปี พ.ศ. 2553 พบอาการและรอยโรคสอดคล้องกับรายงานการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2551 (Wongtavatchai and Maisak, 2008) โดยอาการดังกล่าวมักพบชัดเจนในปลาเต็มวัย ได้แก่ ลักษณะการว่ายน้ำผิดปกติ (spiraling หรือ spinning) กินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหาร (anorexia) สีตามลำตัวเข้ม (melanosis) สูญเสียการทรงตัว (imbalance movement) ตาโปนอาจพบหนึ่งหรือสองข้าง (exophthalmos; pop-eye) กระจกตาขุ่นมัว (corneal opacity) แผลหลุมตามตัว (ulceration) และจุดเลือดออกทั่วร่างกายโดยเฉพาะบริเวณรอบๆ ตา เหงือก ครีบ กระพุ้งแก้ม และรูทวาร เป็นต้น วิจารณ์ภายในของโรคสเตรปโตคอคโคซิส ได้แก่ พบของเหลวในช่องท้อง อาจมีลักษณะใส หนืด หรือปนเลือด (serosanguinous) ตับขยายใหญ่ สีซีด ม้ามขยายใหญ่ มีสีดำเข้ม ผนังลำไส้ด้านนอกมีเลือดคั่งและบวม น้ำ จุดเลือดออกที่ตับ ตา ม้ามและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (diffuse visceral hemorrhage) บางตัวอาจพบอาการหรือรอยโรคไม่ชัดเจน

##### 2. วินิจฉัยโรคสเตรปโตคอคโคซิสพิจารณาจากลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

การวินิจฉัยเชื้อสเตรปโตคอคคัสทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ได้แก่ การเพาะแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อไตในปลานิลป่วยที่สงสัยเกิดจากโรคสเตรปโตคอคโคซิสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้อมสีแกรมและทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อ ตามรายงานการศึกษา Maisak และคณะ ปี 2007 พบว่า

(1) โคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสมหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 33 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดเล็กเสี้ยนผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร พื้นผิวเรียบ โด่งมน สีขาว (dull white) และทึบแสง พบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) โดยเห็นส่วนใสรอบๆ โคโลนี

(2) เซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมขนาด 0.5 ไมครอนและการจัดเรียงของเซลล์ต่อกันเป็นสายยาวเหมือนสร้อยลูกปัด

(3) เชื้อสเตรปโตคอคคัสไม่มีคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase





1.1

1.2

#### รูปที่ 4.1 วิการภายนอกของโรคสเตรปโตคอคโคซิส

4.1.1 สีตามลำตัวเข้ม (melanosis) ตาโปนอาจพบหนึ่งหรือสองข้าง (exophthalmos; pop-eye) จุดเลือดออกทั่วร่างกายโดยเฉพาะบริเวณรอบๆ ตา เหงือก ครีบ กระพุ้งแก้ม กระจกตาขุ่นมัว (corneal opacity)

4.1.2 ท้องบวมขยายใหญ่ (ascites) จุดเลือดออกรอบๆ รูทวาร



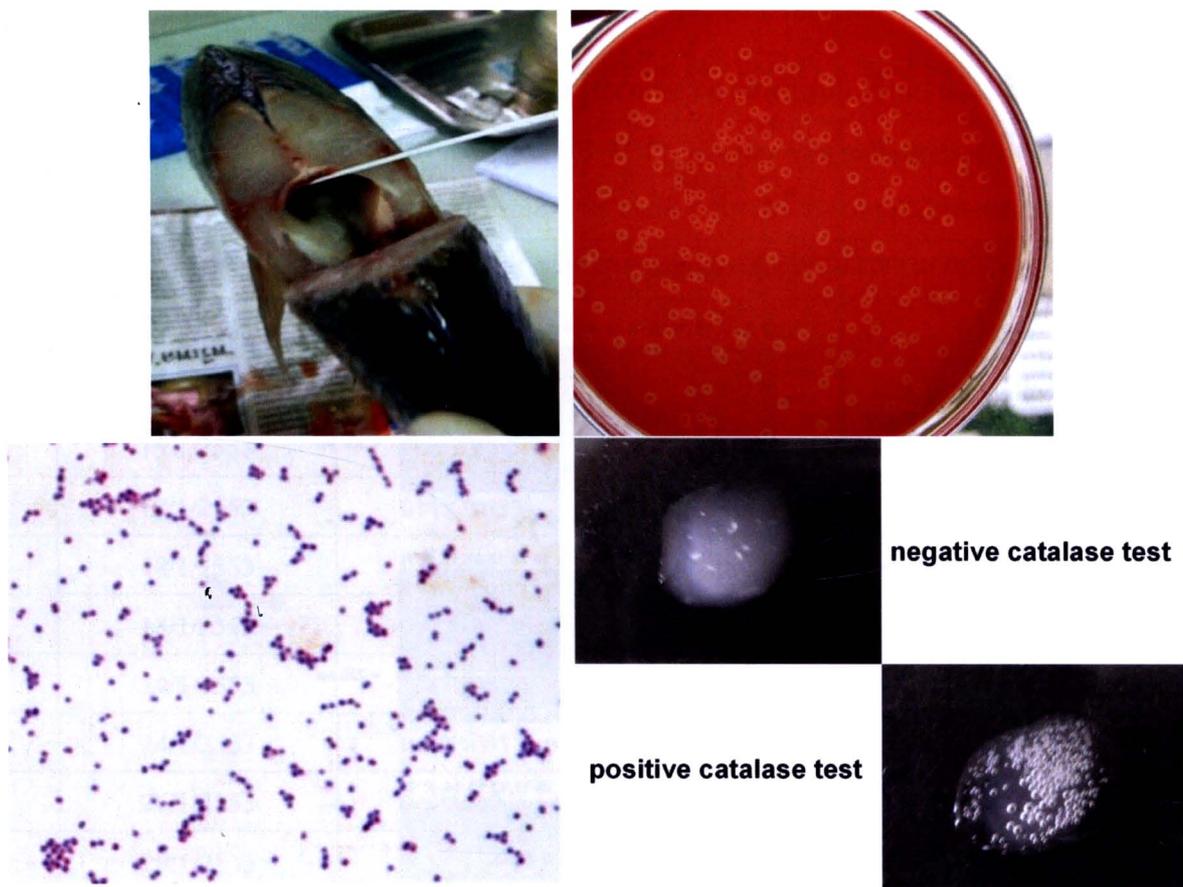
2.1

2.2

#### รูปที่ 4.2 วิการภายในของโรคสเตรปโตคอคโคซิส

4.2.1 ของเหลวในช่องท้อง ลักษณะใส หนืด (serosanguinous)

4.2.2 สีเนื้อเยื่อตับซีดและมีจุดเลือดออก ม้ามขยายใหญ่และสีดำเข้ม พผนังลำไส้ด้านนอกมีจุดเลือดและบวม



3.1 | 3.2

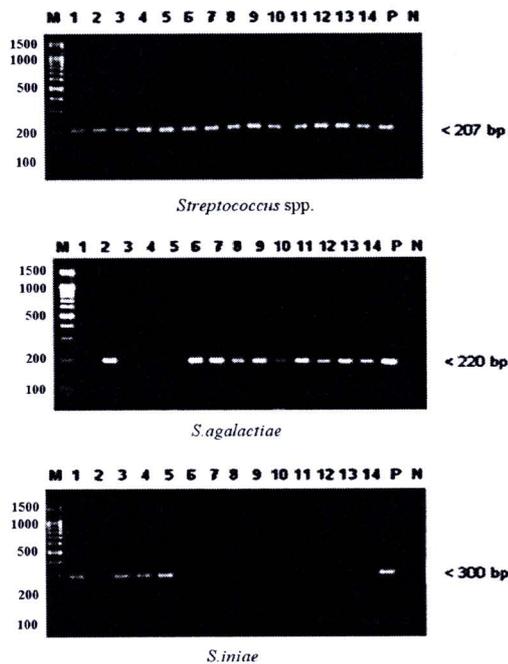
3.3 | 3.4

รูปที่ 4.3 การวินิจฉัยเชื้อสเตรปโตคอคคัสทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น (ตามวิธีตรวจในรายงานการศึกษา Maisak และคณะ ปี 2007)

- 4.3.1 การเพาะแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อไตในปลาที่สงสัยเกิดจากโรคสเตรปโตคอคคัสโคซิสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 4.3.2 โคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสม ลักษณะเป็นจุด (pin point) สีขาว (dull white) ทึบแสง และพบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) โดยเห็นส่วนในใสรอบๆ โคโลนี
- 4.3.3 เชลล์สเตรปโตคอคคัสติดสีแกรมบวก (สีม่วง) ลักษณะกลมขนาด 0.5 ไมครอนและเชลล์เรียงต่อกันเป็นสายยาวเหมือนสร้อยลูกปัด
- 4.3.4 เชื้อสเตรปโตคอคคัสไม่มีคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase จึงไม่พบฟองอากาศหลังใส่ 3%  $H_2O_2$

### 3. การตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR

การตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR โดยไพรเมอร์ C1 และ C2 ระบุเป็น genus *Streptococcus* spp. ขนาด 207 เบสแพร์ ไพรเมอร์ F1 และ IMOD ระบุเป็น species *S. agalactiae* ขนาด 220 bp และไพรเมอร์ Sin-1 และ Sin-2 ระบุเป็น species *S. iniae* ขนาด 300 bp แสดงตัวอย่างการอ่านผลตามรายงาน Wongtavatchai และคณะ ปี 2008 รูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ตัวอย่างการอ่านผลตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR ตามรายงาน Wongtavatchai และคณะ ปี 2008 โดยขนาดของ molecular marker เท่ากับ 100 bp (ช่อง M); ช่อง P คือ positive control (*S. agalactiae* ATCC 13813 และ *S. iniae* ATCC29178); ช่อง N คือ negative control (น้ำกลั่น)

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างปลาส่งตรวจจากฟาร์มที่สงสัยการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสฟิการมาจากอาการแสดง วิกการรอยโรค การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นและการยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธี PCR ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่าง	วันตรวจตัวอย่าง	จังหวัด	ข้อมูล	Confirmative identification with PCR
1	08/1/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาพ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
2	09/1/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาอายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
3	15/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 25 วัน	<i>S. agalactiae</i>
4	15/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 28 วัน	<i>S. agalactiae</i>
5	18/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 35 วัน	<i>S. agalactiae</i>
6	18/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 20 วัน	<i>S. agalactiae</i>
7	18/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
8	24/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 15 วัน	<i>S. agalactiae</i>
9	24/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
10	26/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 14 วัน	<i>S. agalactiae</i>
11	26/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 9 วัน	<i>S. agalactiae</i>
12	26/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 19 วัน	<i>S. agalactiae</i>
13	30/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 16 วัน	<i>S. agalactiae</i>
14	30/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
15	30/1/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 19 วัน	<i>S. agalactiae</i>
16	05/2/2553	ฉะเชิงเทรา	ไข่ปลา	<i>S. agalactiae</i>
17	05/2/2553	เชียงใหม่	บ่อแปลงเพศ	<i>S. agalactiae</i>
18	05/2/2553	ฉะเชิงเทรา	พ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
19	08/2/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 10 วัน	<i>S. agalactiae</i>
20	08/2/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 3-5 วัน	<i>S. agalactiae</i>
21	17/2/2553	ฉะเชิงเทรา	พ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
22	17/2/2553	ฉะเชิงเทรา	พ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
23	20/2/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 12 วัน	<i>S. agalactiae</i>
24	20/2/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
25	20/2/2553	เพชรบุรี	อายุ 40 วัน	<i>S. agalactiae</i>

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างปลาส่งตรวจจากฟาร์มที่สงสัยการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสพิจารณาจากอาการแสดง วิการรอยโรค การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นและการยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธี PCR ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่าง	วันตรวจตัวอย่าง	จังหวัด	ข้อมูล	Confirmative identification with PCR
26	01/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 35 วัน	<i>S. agalactiae</i>
27	01/3/2553	เพชรบุรี	แปลงเพศพร้อมขาย	<i>S. agalactiae</i>
28	06/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
29	06/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 40 วัน	<i>S. agalactiae</i>
30	06/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 33 วัน	<i>S. agalactiae</i>
31	11/3/2553	เพชรบุรี	ไข่ระยะที่ 1	<i>S. agalactiae</i>
32	11/3/2553	เพชรบุรี	ไข่ระยะที่ 3	<i>S. agalactiae</i>
33	11/3/2553	เพชรบุรี	ไข่ระยะที่ 4	<i>S. agalactiae</i>
34	11/3/2553	เพชรบุรี	ไข่ระยะที่ 5	<i>S. agalactiae</i>
35	19/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 54 วัน	<i>S. agalactiae</i>
36	19/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 83 วัน	<i>S. agalactiae</i>
37	19/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 25 วัน	<i>S. agalactiae</i>
38	22/3/2553	กาญจนบุรี	ปลาขุนกระชัง	<i>S. agalactiae</i>
39	22/3/2553	กาญจนบุรี	ปลาขุนบ่อดิน	<i>S. agalactiae</i>
40	25/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 63 วัน	<i>S. agalactiae</i>
41	25/3/2553	เพชรบุรี	อายุ 31 วัน	<i>S. agalactiae</i>
42	29/3/2553	นครปฐม	ปลาขุนบ่อดิน 7-8 เดือน	<i>S. agalactiae</i>
43	03/4/2553	ราชบุรี	ปลาขุน 4 เดือน	<i>S. agalactiae</i>
44	06/4/2553	ปราจีนบุรี	ปลาขุน	<i>S. agalactiae</i>
45	10/4/2553	อุบลราชธานี	อายุ 3 เดือน	<i>S. agalactiae</i>
46	13/4/2553	นครพนม	ปลาขุนกระชัง	<i>S. agalactiae</i>
47	15/4/2553	ฉะเชิงเทรา	พ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
48	15/4/2553	ฉะเชิงเทรา	พ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
49	15/4/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
50	15/4/2553	ฉะเชิงเทรา	อายุ 15 วัน	<i>S. agalactiae</i>

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างปลาส่งตรวจจากฟาร์มที่สงสัยการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสฟิจาณาจากอาการแสดง วิจารณ์โรค การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นและการยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธี PCR ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่าง	วันตรวจตัวอย่าง	จังหวัด	ข้อมูล	Confirmative identification with PCR
51	15/4/2553	ฉะเชิงเทรา	คัดเป็นพ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
52	15/4/2553	ฉะเชิงเทรา	พ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
53	18/4/2553	สมุทรปราการ	บ่อแปลงเพศ	<i>S. agalactiae</i>
54	21/4/2553	เพชรบุรี	บ่อแปลงเพศ	<i>S. agalactiae</i>
55	21/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 29 วัน	<i>S. agalactiae</i>
56	21/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 27 วัน	<i>S. agalactiae</i>
57	21/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 33 วัน	<i>S. agalactiae</i>
58	21/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 41 วัน	<i>S. agalactiae</i>
59	27/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 58 วัน	<i>S. agalactiae</i>
60	27/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 26 วัน	<i>S. agalactiae</i>
61	27/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 40 วัน	<i>S. agalactiae</i>
62	27/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 40 วัน	<i>S. agalactiae</i>
63	27/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 30 วัน	<i>S. agalactiae</i>
64	27/4/2553	เพชรบุรี	อายุ 27 วัน	<i>S. agalactiae</i>
65	06/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 2 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
66	06/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 20 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
67	06/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาอนุบาล (ปลาแดง)	<i>S. agalactiae</i>
68	06/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาอนุบาล1 (ปลานิล)	<i>S. agalactiae</i>
69	06/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาอนุบาล2 (ปลานิล)	<i>S. agalactiae</i>
70	12/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 2 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
71	12/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 3 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
72	12/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 10 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
73	12/5/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 20 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
74	10/6/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำ 1 น้ำหนัก 0.5 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
75	10/6/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาช้ำน้ำหนัก 10 กรัม	<i>S. agalactiae</i>

**ตารางที่ 4.1** ตัวอย่างปลาส่งตรวจจากฟาร์มที่สงสัยการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสพิจารณาจากอาการแสดง วิจารณ์โรค การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นและการยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธี PCR ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่าง	วันตรวจตัวอย่าง	จังหวัด	ข้อมูล	Confirmative identification with PCR
76	10/6/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาชำน้ำหนัก 0.5 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
77	10/6/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาชำน้ำหนัก 3 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
78	10/6/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาชำน้ำหนัก 10 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
79	30/6/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาชำน้ำหนัก 10 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
80	20/7/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาใหม่นำเข้าฟาร์ม	<i>S. agalactiae</i>
81	03/8/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาชำน้ำหนัก 3 กรัม	<i>S. agalactiae</i>
82	08/8/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาพ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>
83	04/9/2553	ฉะเชิงเทรา	ปลาพ่อแม่พันธุ์	<i>S. agalactiae</i>

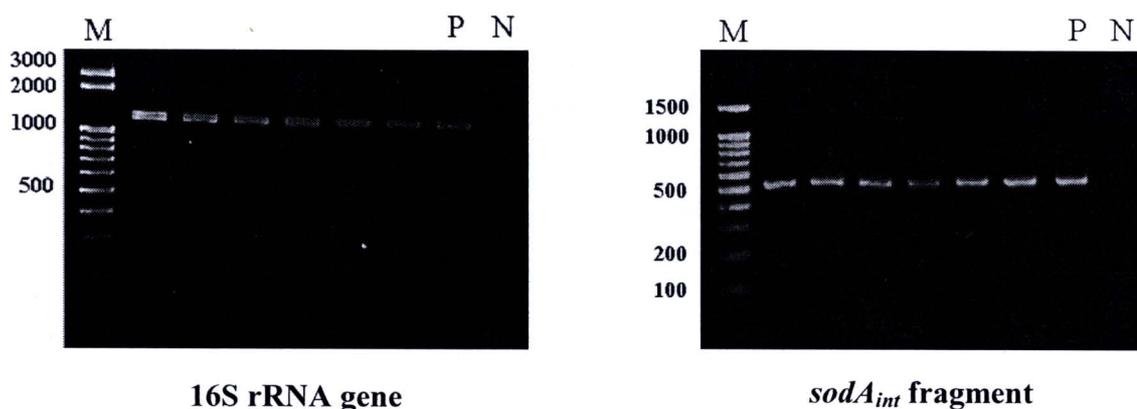
## ส่วนที่ 2 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นปัญหาในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย

### ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *S. agalactiae*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ *S. agalactiae* ก่อโรคในฟาร์มปลานิลของประเทศไทย

PCR determination of 16S rRNA gene และ *sodA<sub>int</sub>* fragment

ผลการตรวจหาชิ้น 16S rRNA เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส และ *sodA<sub>int</sub>* fragment encoding superoxide dismutase A เพื่อแยกแยะความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เชื้อ (strain variation) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่เพาะแยกได้จากปลานิลป่วยในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตกของประเทศไทย ช่วงการระบาดของโรค ในปี พ.ศ. 2553 โดย PCR product จากชิ้น 16S rRNA และ *sodA<sub>int</sub>* fragment เท่ากับ 1,234 และ 512 bp ตามลำดับ (รูปที่ 4.5)



**รูป 4.5** PCR product ของชิ้น 16S rRNA (1,234 bp) และ *sodA<sub>int</sub>* fragment (512 bp) จากเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่งเพาะแยกได้จากปลานิลป่วย (ขนาดของ molecular marker เท่ากับ 100 bp (ทางซ้ายมือ); ช่อง P คือ positive control (*S. agalactiae* ATCC 13813); ช่อง N คือ negative control (น้ำกลั่น))

Sequence determination และ similarity analysis ของยีน 16S rRNA และ *sodA<sub>int</sub>* fragment

Sequence determination และ similarity analysis ของยีน 16S rRNA

ผลการศึกษาจากเชื้อ *S. agalactiae* 10 สายพันธุ์ ที่เพาะแยกได้จากฟาร์มปลานิลในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2553 มี DNA sequence ของยีน 16S rRNA เหมือนกัน (100% sequence identity) และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *S. agalactiae* ที่เพาะแยกได้จากปลาชนิดอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงในประเทศต่างๆ (GenBank accession no. EU622516 และ EF092913, ตารางที่ 4.2) พบว่ามีความใกล้เคียงร้อยละ 100

ตารางที่ 4.2 ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากเชื้อ *S. agalactiae* ที่ได้จากปลานิลในประเทศไทย ปลาชนิดอื่นๆ และเชื้อมาตรฐาน

		Percent Identity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Divergence	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	1	isolate 1.seq
	2	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	2	isolate 26.seq
	3	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	3	isolate 38.seq
	4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	4	isolate 42.seq
	5	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	5	isolate 43.seq
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	6	isolate 44.seq
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	7	isolate 45.seq
	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	8	isolate 46.seq
	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.5	9	isolate 59.seq
	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.9	99.9	99.5	10	isolate 66.seq
	11	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0	99.9	97.7	11	<i>S. agalactiae</i> EF092913.seq
	12	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	100.0	98.1	12	<i>S. agalactiae</i> EU622516.seq
	13	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	100.0	13	<i>S. agalactiae</i> AB002479.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			

Note : isolate 1, 26, 38, 42, 43, 44, 45, 46, 59, 66 from Thai cultured tilapia; EF092913, isolated from aquatic animal in China; EU622516, isolated from tilapia in China; AB002479, isolated from human in USA (ATCC13813)

### Sequence determination และ similarity analysis ของยีน *sodA<sub>int</sub>* fragment

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *sodA<sub>int</sub>* fragment ความยาวประมาณ 512 bp พบว่าเชื้อ *S. agalactiae* ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่ได้จากปลานิลในฟาร์มเพาะเลี้ยงของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 มีความเหมือนกัน (100% sequence homology) แสดงดังตารางที่ 4.3 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *sodA<sub>int</sub>* จากเชื้อ *S. agalactiae* แปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนของ Mn-SOD และนำไปเปรียบเทียบกับ Mn-SOD จากสายพันธุ์อ้างอิง ATCC13813 (GenBank accession no. CAB09346) (รูปที่ 4.6) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลานิลมีความเหมือนกันเกือบ 100% และเกี่ยวข้องอย่างชัดเจนกับโปรตีน Mn-SOD (manganese-dependent superoxide dismutase)

**ตารางที่ 4.3** ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sodA<sub>int</sub>* ของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ได้จากปลานิลในประเทศไทย และสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC13813

		Percent Identity												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Divergence	1	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	1	isolate 1.seq
	2	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	2	isolate 26.seq
	3	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	3	isolate 38.seq
	4	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	4	isolate 42.seq
	5	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.1	5	isolate 43.seq
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	98.1	6	isolate 44.seq
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	94.2	7	isolate 45.seq
	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	94.2	8	isolate 46.seq
	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	96.5	9	isolate 59.seq
	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	96.5	10	isolate 66.seq
	11	1.5	1.5	1.6	1.6	1.9	1.9	1.7	1.7	1.8	1.8	■	11	S.agalactiae Z95893.seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

**Note :** SA JW10 isolated from Mukdahan; SA JW13 isolated from Nakornpanum; SA JW16 isolated from Nakornpathom; SA JW19 isolated from Kanchanaburi; SA JW22 isolated from Petchaburi; SA JW25 isolated from Chachoengsao; Z95893, isolated from human in USA (ATCC13813)

รูปที่ 4.6 Multiple sequence alignment ของ manganese-dependent superoxide dismutase (Mn-SOD) แสดงลำดับกรดอะมิโนจากข้อมูล sequencing ของเชื้อ *S. agalactiae* *sodA<sub>int</sub>* fragment (CAB09346, isolated from human in USA type strain of *S. agalactiae* ATCC13813)

	..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50
isolate 1	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 26	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 38	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 42	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 43	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 44	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 45	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 46	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 59	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
isolate 66	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADVSQIPEDI
CAB09346	HIDAETMTLH HDKHHATYVA NANAAL <del>E</del> KHP EIGEDLEALL ADISQIPEDI
Clustal Co	***** ***** ***** ***** *:* *****
	..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80                  90                  100
isolate 1	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 26	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 38	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 42	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 43	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 44	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 45	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 46	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 59	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
isolate 66	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDINATF GSFEDFKA <del>A</del> F
CAB09346	RQAVINNGGG HLNHALFWEL MSPEETQISQ ELSEDI <del>L</del> ATF GSFEDFKA <del>A</del> F
Clustal Co	***** ***** ***** :*****:* *****
	..... ..... ..... ..... .....
	110                  120                  130                  140                  150
isolate 1	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 26	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 38	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 42	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 43	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 44	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 45	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 46	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 59	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
isolate 66	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGLDVWEH
CAB09346	TAAATGRFGS GWAWLVVNAE GKLEVLSTAN QDTPIMEGKK PILGL <del>I</del> ----
Clustal Co	***** ***** ***** ***** *****
	..... ..... ..
	160
isolate 1	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
isolate 26	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
isolate 38	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
isolate 42	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
isolate 43	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
isolate 44	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
isolate 45	AYYLN <del>Y</del> RNVR PN
isolate 46	AYYLN <del>Y</del> RNVR PN
isolate 59	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
isolate 66	AYYLN <del>Y</del> RNVR P-
CAB09346	----- ---
Clustal Co	

Note: Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Pro (P), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W), Tyr (Y)

### Phylogenetic analysis

การวิเคราะห์ phylogenetic analysis ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA ความยาวประมาณ 1,234 bp) และ *sodA<sub>int</sub>* fragment ความยาวประมาณ 512 bp ของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่เพาะแยกได้จากปลาชนิดปลวย (รูปที่ 4.7 และ 4.8) บ่งชี้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทุกสายพันธุ์ ที่เพาะแยกได้จากปลาชนิดปลวยและสายพันธุ์อ้างอิง ของยีน 16S rRNA และ *sodA<sub>int</sub>* fragment ไม่แตกต่าง (ตารางที่ 4.5 และ 4.6) และความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ระหว่างเชื้อ *S. agalactiae* เปรียบเทียบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ ตามตารางที่ 4.6 มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 97 (ตารางที่ 4.4) ในขณะที่ *sodA<sub>int</sub>* fragment มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 75 (ตารางที่ 4.6) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *sodA<sub>int</sub>* fragment สามารถนำไปประยุกต์ใช้พัฒนาการตรวจวินิจฉัยแยกแยะเชื้อ *S. agalactiae* ออกจากเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ ได้

**ตารางที่ 4.4** เชื้อมาตรฐานเฉพาะส่วนยีน 16S rRNA และ *sodA<sub>int</sub>* จากฐานข้อมูลในระบบ GenBank เพื่อใช้วิเคราะห์ phylogenetic analysis

<i>Streptococcus</i> sp.	16S rRNA		<i>sodA<sub>int</sub></i>	
	Reference no.	GenBank accession no.	Reference no.	GenBank accession no.
<i>S. agalactiae</i>	ATCC13813	AB002479	ATCC13813	Z95893
<i>S. dysgalactiae</i> supsp. <i>dys.</i>	ATCC43078	AB002485	dys. No. 110	AB334741
<i>S. dysgalactiae</i> supsp. <i>equi.</i>	NCFB1356	AB008926	equisimilis No. 125	AB334742
<i>S. iniae</i>	ATCC29178	AF335572	ATCC29178	Z99176
<i>S. porcinus</i>	ATCC43138	AB002523	ATCC43138	Z99177
<i>S. canis</i>	ATCC43498	AB002483	ATCC43496	Z99175
<i>S. pyogenes</i>	ATCC12344	AB002521	ATCC12344	Z95915
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	ATCC43079	AB002516	AZB-01	AB334743
<i>S. suis</i>	NCTC10234	AF009477	ATCC43765	Z95920
<i>S. salivarius</i>	NCDO 1779(T)	X58320	ATCC7073	Z95916
<i>S. bovis</i>	NCDO 597(T)	X58317	ATCC33317	Z95896
<i>S. constellatus</i>	ATCC27823	Z69041	ATCC27823	Z95897

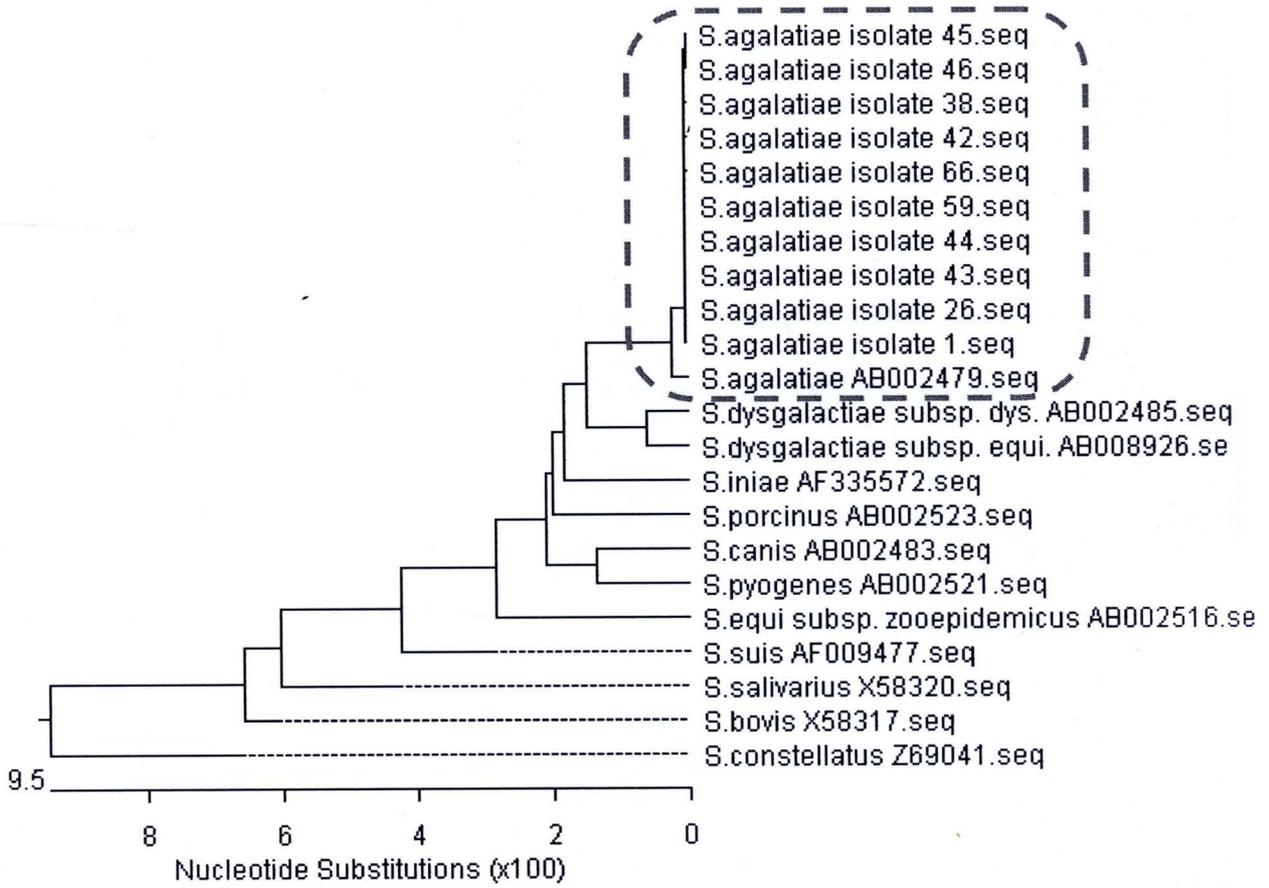
ATCC; American Type Culture Collection

NCFB; The National Collection of Food Bacteria

NCTC; The National Collection of Type Cultures

NCDO; The National Collection of Dairy Organisms

รูปที่ 4.7 Phylogenetic tree จากการเรียงและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สำหรับเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลานิลป่วย ในช่วงปี พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ

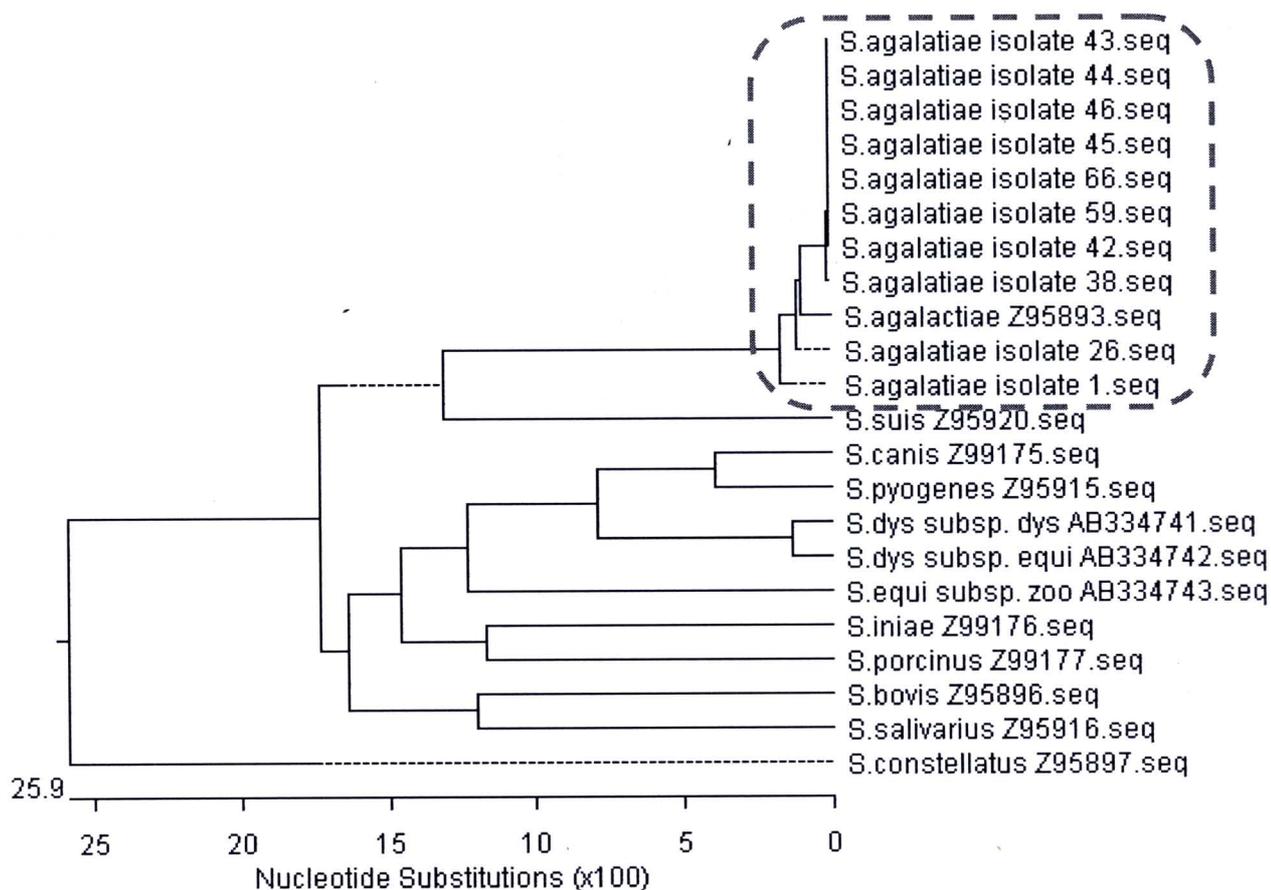


ตารางที่ 4.5 ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลาชนิดในประเทศไทย ช่วงปี

พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ

		Percent Identity																						
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	1
0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	2
0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	3
0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	4
0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	5
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	6
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.1	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.3	99.5	7
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.0	89.8	96.4	97.1	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.3	99.5	8
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	9
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	91.4	94.1	89.8	96.4	97.2	93.4	95.7	95.6	96.4	89.1	94.4	99.5	10
5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	91.0	91.0	82.4	90.6	87.1	91.0	90.9	91.1	92.2	91.5	92.4	91.7	11
5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.7	84.1	94.9	95.0	93.2	94.6	95.5	96.1	90.3	93.3	93.0	93.0	12
9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	5.0	13.9	82.2	83.8	83.4	67.7	82.2	82.8	78.3	83.8	84.1	84.1	13
3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	6.1	4.8	15.0	98.2	92.1	96.1	95.9	96.2	90.9	93.4	94.9	94.9	14
2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	5.5	4.4	11.1	1.2	91.3	95.2	95.5	93.2	86.1	93.3	94.2	94.2	15
6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	5.5	5.3	12.8	6.6	5.7	93.7	93.4	91.7	90.6	91.9	91.7	91.7	16
3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	5.7	5.1	12.2	3.5	3.7	5.8	95.9	95.0	89.8	93.8	95.6	95.6	17
4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	5.2	4.5	14.9	3.7	3.9	4.7	3.9	94.8	91.1	94.8	94.7	94.7	18
3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	4.4	2.7	10.7	3.2	2.9	5.1	4.5	3.9	91.4	94.8	93.1	93.1	19
7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	3.4	6.3	8.0	5.9	6.6	5.8	6.8	5.4	4.8	91.7	90.0	90.0	20
5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	4.2	6.3	13.3	6.2	5.9	6.5	6.0	4.8	4.7	4.8	93.8	93.8	21
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	4.8	5.5	10.0	3.8	2.7	6.7	3.8	4.0	3.9	6.7	5.1	5.1	22
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	22	22	

รูปที่ 4.8 Phylogenetic tree จากการเรียงและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sodA<sub>int</sub>* fragment สำหรับเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลานิลป่วย ในช่วงปี พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ



ตารางที่ 4.6 ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sodA<sub>int</sub>* fragment จากเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลาใน ประเทศไทย ในช่วงปี พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ

		Percent Identity																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Divergence	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	75.2	72.8	74.8	77.2	56.9	69.8	76.7	77.2	76.2	79.7	78.2	1	
	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	75.2	72.8	74.8	77.2	56.9	69.8	76.7	77.2	76.2	79.7	78.2	2	
	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	74.0	71.4	74.0	76.0	55.1	68.4	77.0	76.0	75.0	78.6	77.6	3	
	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.5	74.0	71.4	74.0	76.0	55.1	68.4	77.0	76.0	75.0	78.6	77.6	4	
	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.1	68.3	68.3	73.1	70.1	54.1	64.2	70.1	69.4	68.7	71.6	76.1	5	
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.1	68.3	68.3	73.1	70.1	54.1	64.2	70.1	69.4	68.7	71.6	76.1	6	
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	94.2	66.9	66.9	70.6	68.6	53.9	62.1	67.9	68.6	66.9	68.9	74.4	7	
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	94.2	66.9	66.9	70.6	68.6	53.9	62.1	67.9	68.6	66.9	68.9	74.4	8	
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	96.5	68.3	67.6	72.2	69.7	54.6	63.7	69.0	69.7	68.0	70.4	75.7	9	
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	96.5	68.3	67.6	72.2	69.7	54.6	63.7	69.0	69.7	68.0	70.4	75.7	10	
	1.5	1.5	1.6	1.6	1.9	1.9	1.7	1.7	1.7	1.8	1.8	72.6	71.7	73.1	71.5	69.1	66.2	71.7	71.3	70.8	74.5	74.7	71.1	11	
	27.4	27.4	28.4	28.4	32.9	32.9	32.5	32.5	32.5	34.3	34.3	30.3	72.0	70.3	68.7	68.1	66.2	68.0	68.5	70.6	77.5	70.3	70.3	12	
	27.4	27.4	28.4	28.4	32.9	32.9	32.5	32.5	32.5	32.1	32.1	29.6	30.7	30.7	64.1	84.8	82.4	80.2	78.9	74.0	92.2	74.0	67.8	13	
	29.5	29.5	30.6	30.6	29.9	29.9	30.4	30.4	30.4	29.4	29.4	30.7	31.6	40.0	66.0	66.3	62.1	66.9	69.2	66.7	70.3	71.5	71.5	14	
	22.4	22.4	23.2	23.2	29.9	29.9	29.8	29.8	29.8	29.9	29.9	28.8	33.4	16.2	38.2	96.2	75.6	77.2	72.4	72.4	86.7	72.0	65.7	15	
	24.7	24.7	25.9	25.9	33.2	33.2	32.8	32.8	32.8	33.0	33.0	29.7	32.8	17.9	36.4	2.6	74.0	77.0	71.4	71.4	84.7	71.9	64.8	16	
	31.8	31.8	33.1	33.1	38.9	38.9	38.5	38.5	38.5	38.3	38.3	36.0	36.7	20.8	43.6	26.4	27.7	71.7	69.4	77.0	79.3	72.4	71.0	17	
	25.1	25.1	25.3	25.3	31.7	31.7	33.0	33.0	33.0	32.1	32.1	29.9	35.2	22.8	35.3	24.9	23.8	31.2	33.2	23.3	74.9	71.0	71.3	18	
	24.5	24.5	25.4	25.4	32.2	32.2	33.0	33.0	33.0	32.7	32.7	31.0	33.7	27.6	33.0	30.5	30.1	33.2	23.3	77.0	79.3	74.5	66.7	19	
	24.6	24.6	25.5	25.5	32.2	32.2	31.9	31.9	31.9	31.5	31.5	30.2	31.3	7.8	38.2	14.1	14.9	23.6	22.7	27.2	74.5	66.7	66.7	20	
	22.0	22.0	22.8	22.8	30.0	30.0	28.9	28.9	28.9	29.5	29.5	26.9	23.9	28.2	31.6	29.6	29.0	33.3	30.1	32.1	32.1	27.6	73.3	73.3	21
	23.0	23.0	23.8	23.8	24.5	24.5	25.4	25.4	25.4	24.3	24.3	26.2	30.9	35.9	30.3	38.0	37.4	35.2	31.4	31.6	36.7	26.0	26.0	22	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	22			

### ส่วนที่ 3 การพัฒนาออคิโนัสวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคคัสในปลา

#### 3.1 การเตรียมปริมาณเชื้อแบคทีเรียสำหรับเตรียมวัคซีน

การเจริญของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในเครื่อง Fermentor เพื่อการผลิตวัคซีน

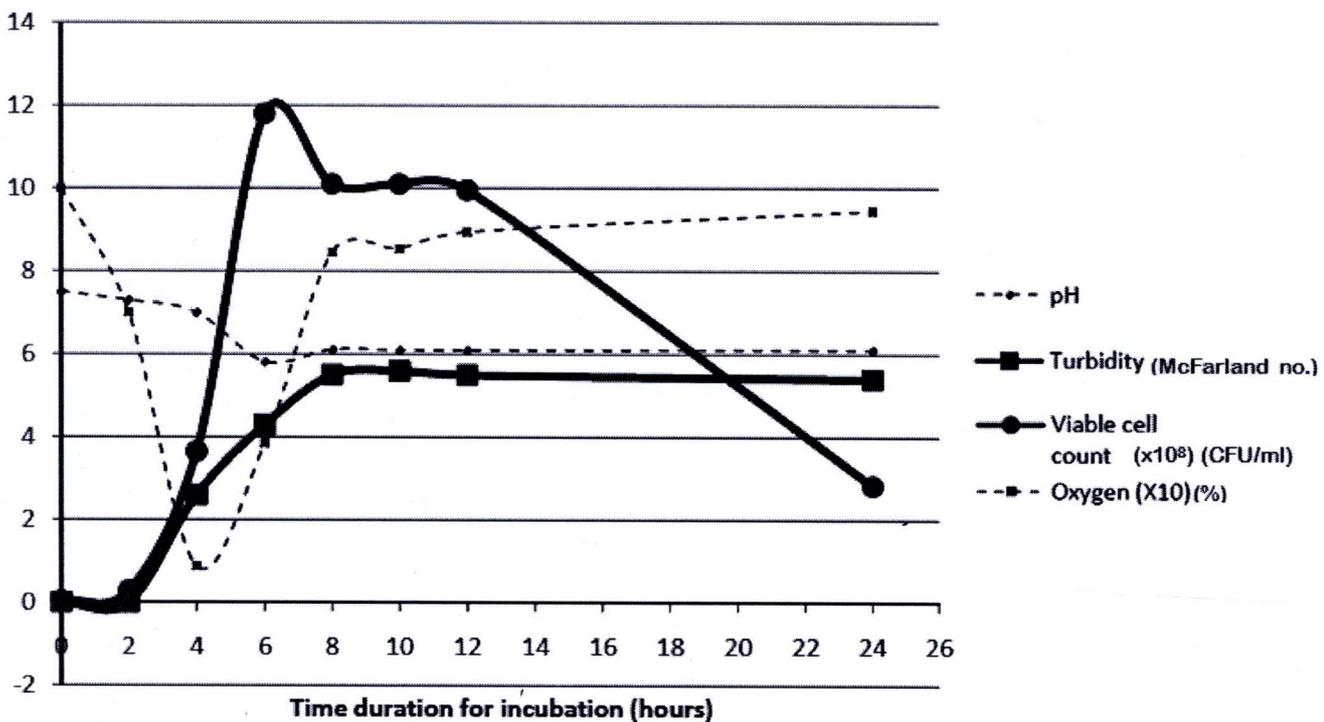
ระบบเครื่องที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส

ปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเริ่มต้นเชื้อที่  $10^6$  CFU ต่อ ml พบว่า ค่าความขุ่นเชื้อ *S. agalactiae* เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสูงสุดที่ 8 ชั่วโมง (McFarland เบอร์ 5.5,  $1.5 \times 10^9$  CFU/ml) และคงที่ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มเลี้ยง แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* ที่มีชีวิต พบว่าเพิ่มขึ้นทุกๆ 10 เท่า ต่อการบ่มเลี้ยงทุกๆ 2 ชั่วโมง และปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* เริ่มเพิ่มขึ้น 1,000 เท่า ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และคงที่มาถึง 12 ชั่วโมง ( $1.0 \times 10^9$  CFU/ml) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 พบว่าปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* ลดลง 10 เท่า

เมื่อพิจารณาระบบการทำงานของเครื่องที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณการใช้ออกซิเจน พบว่า ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการบ่มเพาะเชื้อ *S. agalactiae* ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มลดลงจาก 7.5 เหลือ 5.82 และตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ค่าความเป็นกรด-ด่าง คงที่เท่ากับ 6.1 (ตารางที่ 4.7) จากผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่า ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มมีสภาพความเป็นกรด ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อสภาพมีชีวิตของเซลล์ *S. agalactiae* จากรายงานการศึกษา กล่าวว่า เชื้อสเตรปโตคอคคัสในสัตว์น้ำ อย่างเช่น *S. iniae* ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 6-7 (Zhou *et al.*, 2008) ดังนั้นการทดสอบครั้งที่ 2 จึงใช้สารปรับความเป็นกรด คือ 2N NaOH เพื่อปรับสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นกลาง (pH 6-7) เป็นการช่วยคงสภาพการมีชีวิตและคุณภาพของเซลล์แบคทีเรีย สำหรับปริมาณการใช้ออกซิเจนของเชื้อ *S. agalactiae* พบว่าในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการบ่มเชื้อ ปริมาณออกซิเจนลดลงเรื่อยๆ จนเข้าใกล้ศูนย์ ซึ่งเกิดขึ้นควบคู่ไปกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ลดลง จากผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่า ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการบ่มเลี้ยงเชื้อ *S. agalactiae* เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) โดยใช้สารอาหารและออกซิเจนในการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.9) เมื่อผ่านช่วง 6 ชั่วโมงเป็นต้นไปเชื้อเริ่มมีการเจริญเติบโต (stationary phase) ดังนั้นการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตให้เพิ่มขึ้นและยังคงอยู่ในช่วง log phase

ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.9 ปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบระบบครั้งที่ 1

Time for incubation	Time duration (hours)	pH in media	Oxygen in media (%)	Total Streptococcal cell	
				Turbidity (McFarland no.)	Viable cell count x 10 <sup>6</sup> (CFU/ml)
8.30	0	7.50	100.0	0.00 (0/0/0)	4.03 (3.75/4.3)
10.30	2	7.30	70.0	0.00 (0/0/0)	29 (28/30)
12.30	4	7.00	8.8	2.60 (2.6/2.6/2.6)	365 (400/330)
14.30	6	5.82	38.5	4.30 (4.3/4.4/4.3)	1180 (1130/1230)
16.30	8	6.11	84.5	5.50 (5.5/5.5/5.5)	1010 (1020/1000)
18.30	10	6.10	85.4	5.60 (5.6/5.6/5.6)	1010 (1020/1000)
20.30	12	6.10	89.6	5.50 (5.5/5.5/5.5)	995 (990/1000)
8.30	24	6.11	94.5	5.40 (5.4/5.4/5.4)	283 (285/280)



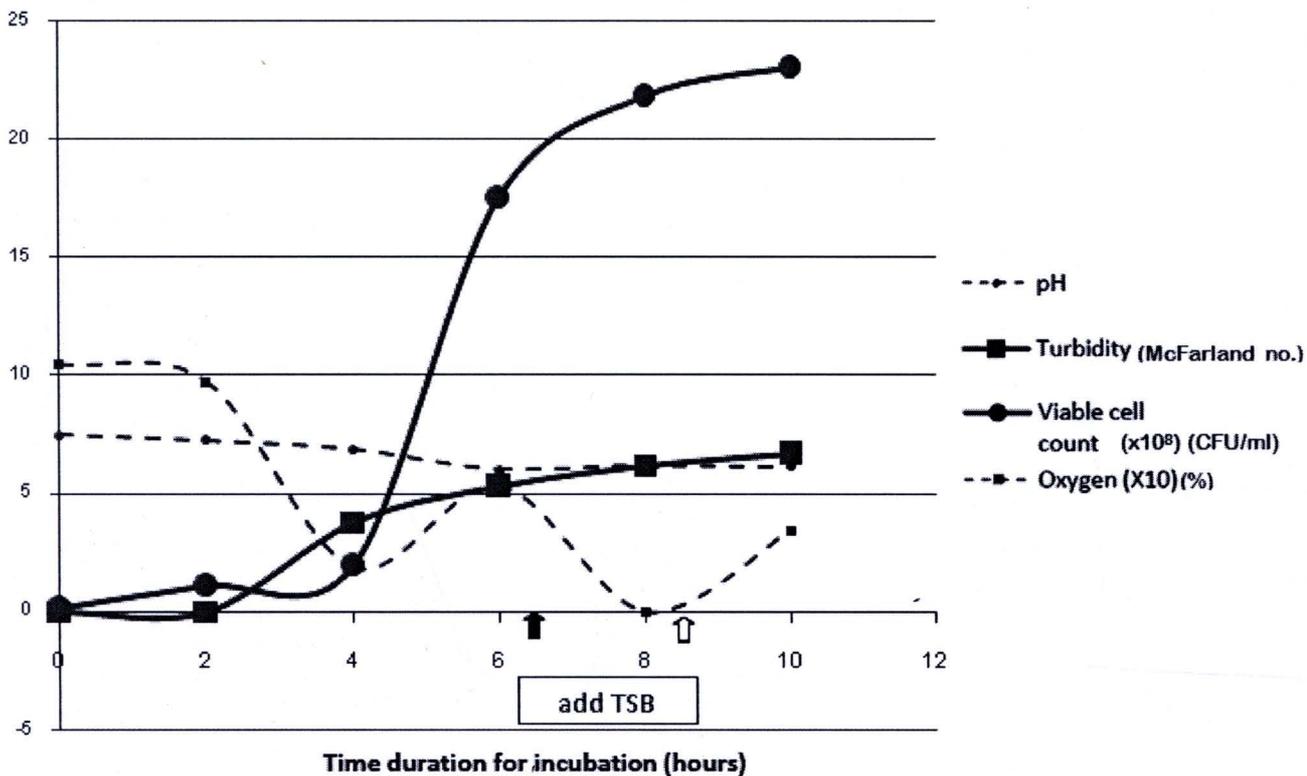
### การเจริญเติบโตของเชื้อหลังจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเลี้ยงใน Fermentor

ปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* ในช่วงบ่มเพาะเลี้ยง มีค่าความขุ่นเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากชั่วโมงที่ 6-10 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปในเครื่อง fermentor (รูปที่ 4.10) เนื่องจากการทดสอบครั้งที่ 1 เชื้อ *S. agalactiae* เพิ่มจำนวนจนถึงชั่วโมงที่ 6 (log phage) และคงที่ช่วง 6-12 ชั่วโมง (stationary phage) อาจเนื่องมาจากอาหารในการบ่มเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลงจนหมด ดังนั้นการเพิ่มสารอาหารเข้าไป ในช่วง 6-10 ชั่วโมงจึงมีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* (log phage) ภายในระบบเครื่อง

เมื่อพิจารณาระบบการทำงานของเครื่องพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีการควบคุมให้อยู่ในช่วง 6-7 ด้วยสาร 2N NaOH โดย 6 ชั่วโมงแรกของการบ่มเพาะเชื้อ *S. agalactiae* เริ่มลดลงจาก 7.5 เหลือ 6.0-6.1 และชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 10 ค่าความเป็นกรด-ด่าง คงที่เท่ากับ 6.15 (ดังตารางที่ 4.8) ซึ่งเป็นการช่วยคงสภาพการมีชีวิตและคุณภาพของเซลล์แบคทีเรีย สำหรับปริมาณการใช้ออกซิเจน พบว่าในช่วง 8 ชั่วโมงแรกของการบ่มเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณออกซิเจนลดลงเรื่อยๆ จนเข้าใกล้ศูนย์ และหลังจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึง 8 ปริมาณออกซิเจนค่อยๆ เพิ่มขึ้นอยู่ประมาณ 34.4%

ตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.10 ปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง จากการทดสอบระบบครั้งที่ 2

Time for incubation	Time duration (hours)	pH in media	Oxygen in media (%)	Total Streptococcal cell	
				Turbidity (McFarland no.)	Viable cell count $\times 10^6$ (CFU/ml)
9.00	0	7.50	104.6	0.00 (0/0/0)	11.5 (13/10)
11.00	2	7.28	97.4	0.00 (0/0/0)	110 (110)
13.00	4	6.87	18.8	3.80 (3.8/3.8/3.8)	194.5 (289/100)
15.00	6	6.04	53.3	5.30 (5.3/5.3/5.3)	1750 (1800/1700)
17.00	8	6.18	0.0	6.20 (6.2/6.2/6.2)	2180 (2180)
19.00	10	6.16	34.4	6.70 (6.7/6.7/6.7)	2303 (2110/2900/1900)



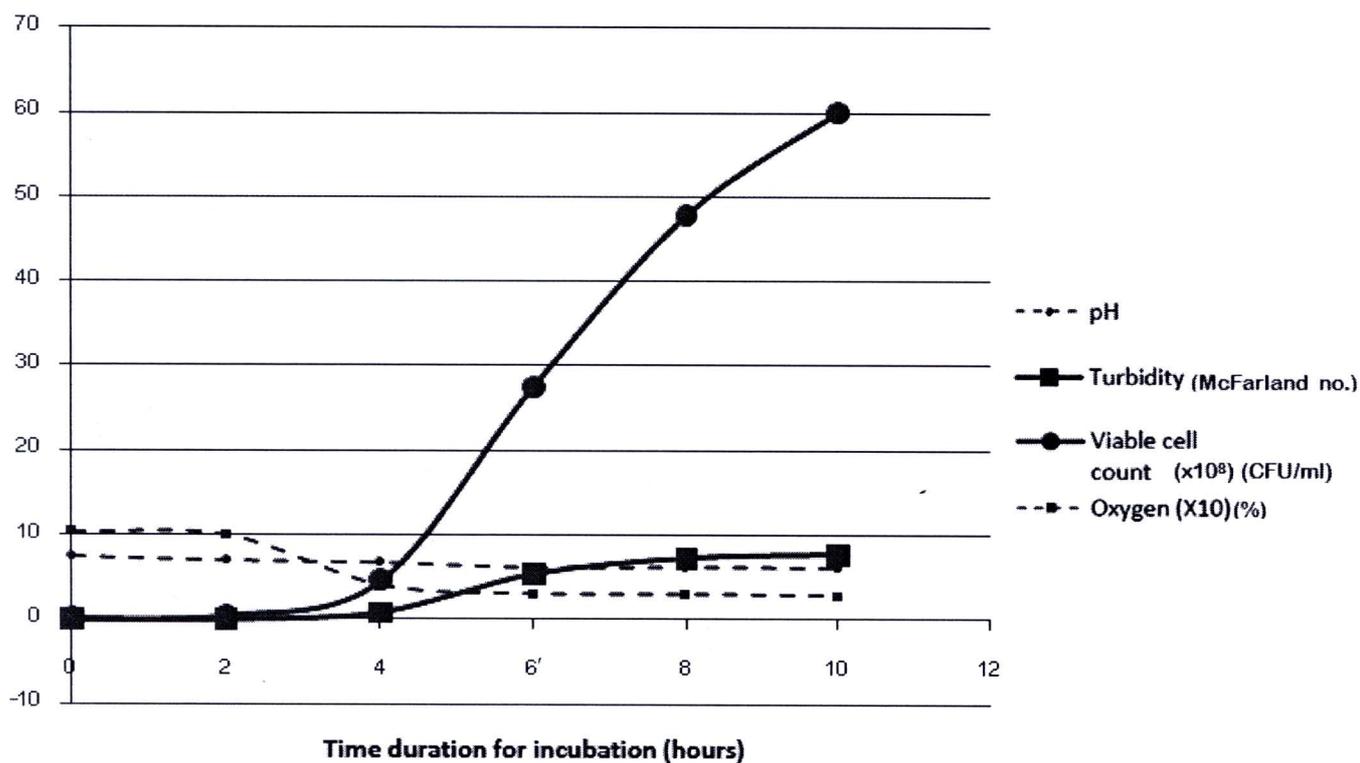
## การเพิ่มปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยง

การเพิ่มสารอาหารที่ให้พลังงาน อย่างเช่น Glucose มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเชื้อ *S. agalactiae* มากขึ้น ในการทดสอบครั้งนี้จึงเพิ่ม 2% Glucose ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีค่าความขุ่นเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสูงสุดที่ 10 ชั่วโมง (รูปที่ 4.11) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hunolstein *et al.* (1993) กล่าวว่าเชื้อ *S. agalactiae* มีการใช้พลังงานจากน้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตของเชื้ออย่างรวดเร็ว 5-10 ชั่วโมง (log phage) และเชื้อ *S. agalactiae* เริ่มเพิ่มจำนวนอย่างคงที่ (stationary phage) สำหรับระบบการทำงานของเครื่อง fermentor พบว่าในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการบ่มเพาะเชื้อ *S. agalactiae* ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มลดลงจาก 7.5 เหลือ 6.1 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง คงที่เท่ากับ 6.10 และปริมาณการใช้ออกซิเจน พบว่าหลังจากบ่มเชื้อมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ จนชั่วโมงที่ 4 มีค่าคงที่ประมาณ 30% (ตารางที่ 4.9)

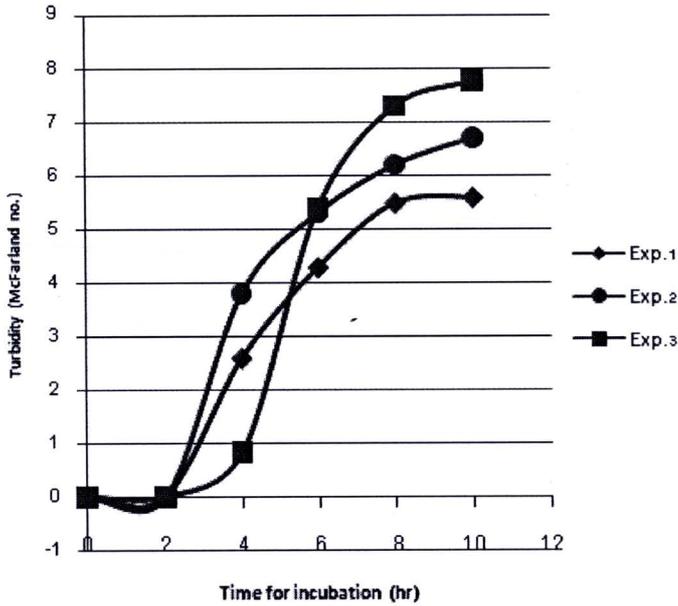
ตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.11 ปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบระบบครั้งที่ 3

Time for incubation	Time duration (hours)	Stirr (rpm)	pH in media	Oxygen in media (%)	Total Streptococcal cell		Note
					Turbidity (McFarland no.)	Viable cell count $\times 10^6$ (CFU/ml)	
8.30	0	19	7.50	104.5	0 (0/0/0)	7.35 (6.64/7.00/8.40)	
10.30	2	19	7.01	100.6	0 (0/0/0)	47.4 (45.7/49)	
12.30	4	19	6.77	48.2	0.83 (0.8/0.8/0.9)	457 (414/500)	
14.30	6	316	6.16	30.0	5.40 (5.4/5.4/5.4)	2750 (2400/3100)	
16.30	8	322	6.23	29.6	7.30 (7.3/7.3/7.3)	4780 (4550/5000)	
18.30	10	300	6.15	27.9	7.77 (7.7/7.8/7.8)	6000 (6800/5000)	
8.30	24	200	6.05	84.1	8.63 (8.5/8.7/8.7)	TCL*	Dark brown in media

\*TCL - too low to be continued

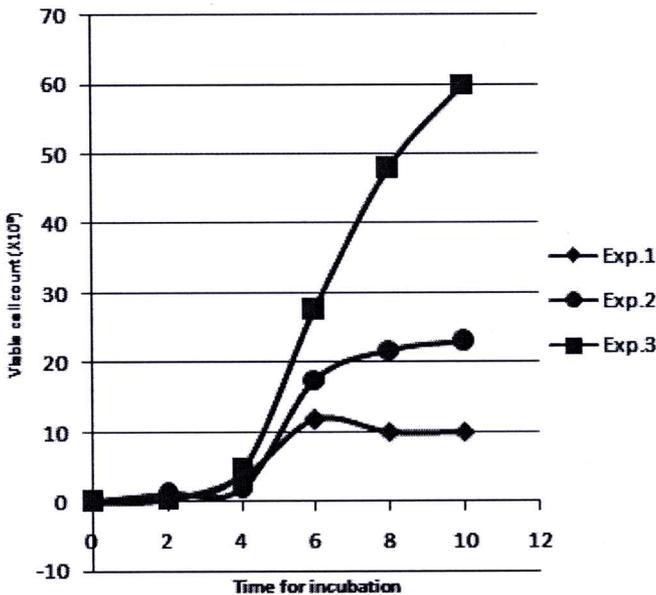


รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อ *S. agalactiae* ในการทดสอบระบบเครื่อง fermentor ครั้งที่ 1, 2 และ 3



Time for incubation	Time duration (hours)	Turbidity		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
8.30	0	0	0	0
10.30	2	0	0	0
12.30	4	2.6	3.8	0.83
14.30	6	4.3	5.3	5.4
16.30	8	5.5	6.2	7.3
18.30	10	5.6	6.7	7.77

รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบเชื้อมีชีวิต (viable cell count) ของเชื้อ *S. agalactiae* ในการทดสอบระบบเครื่อง fermentor ครั้งที่ 1, 2 และ 3



Time for incubation	Time duration (hours)	Viable cell count		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
8.30	0	0.04	0.115	0.07
10.30	2	0.29	1.1	0.474
12.30	4	3.65	1.945	4.57
14.30	6	11.8	17.5	27.5
16.30	8	10.1	21.8	47.8
18.30	10	10.1	23.03	60

การเปรียบเทียบการทดสอบระบบเครื่อง fermentor ที่เหมาะสมต่อการบ่มเลี้ยงเชื้อ *S. agalactiae* เพื่อนำไปใช้ผลิตวัคซีน พบว่าการทดสอบครั้งที่ 3 มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเริ่มต้นเชื้อที่  $10^6$  CFU/ml บ่มเพาะเป็นเวลา 10 ชั่วโมง เชื้อ *S. agalactiae* เพิ่มขึ้น 1,000 เท่า ได้ปริมาณเชื้อสุดท้าย  $6 \times 10^9$  CFU/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบทั้ง 3 ครั้ง พบว่าปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* มีชีวิตเพาะเลี้ยงในเครื่อง fermentor ครั้งที่ 3 เพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่า (ปริมาณเชื้อมีชีวิต เท่ากับ  $6.0 \times 10^9$  CFU/ml) มากกว่าการทดสอบครั้งที่ 1 (ปริมาณเชื้อมีชีวิต เท่ากับ  $1.0 \times 10^9$  CFU/ml) และ 3 เท่า (ปริมาณเชื้อมีชีวิต เท่ากับ  $2.3 \times 10^9$  CFU/ml) มากกว่าการทดสอบครั้งที่ 2 ดังรูปที่ 4.12 (เปรียบเทียบความขุ่นเบอร์ McFarland) และรูปที่ 4.13 (เปรียบเทียบเชื้อมีชีวิต) โดยคุณภาพเชื้อจากการทดสอบทั้ง 3 ครั้งสม่ำเสมอโดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนี เช่น ขนาดโคโลนีเท่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบจากการเพาะเลี้ยงใน conventional incubator เจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ และมี hemolysis zone ชัดเจน เซลล์เชื้อ *S. agalactiae* กลม ขนาด 0.5 ไมครอน และเรียงต่อเป็นสายยาว ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 เชื้อ *S. agalactiae* บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง

- (1) ขนาดโคโลนีเท่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบจากการเพาะเลี้ยงใน conventional incubator (ขนาดประมาณ 0.1-0.2 cm) การเจริญเติบโตสม่ำเสมอ และ hemolysis zone ชัดเจน
- (2) เซลล์แบคทีเรียกลม ขนาด 0.5  $\mu\text{m}$  และเรียงต่อเป็นสายยาว

## การทดสอบคุณภาพวัคซีน

### ความปลอดภัยของวัคซีน

การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนชนิดเชื้อตายที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ *S. agalactiae* (isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59) ฉีดเข้าช่องท้องปลานิลแดงพ่อแม่พันธุ์ น้ำหนักตัว 120-200 g ปริมาณ 0.2 ml (ขนาด  $2.0 \times 10^8$  CFUต่อตัวปลา) อัตราการรอดหลังจากฉีดวัคซีนและเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 3 เดือน ประมาณ 99.54% (ปลาตายประมาณ 17 ตัว จากทั้งหมด 3,700 ตัว) โดยส่วนใหญ่พบปลาตายหลังจากทำวัคซีนในช่วงเดือนแรก ซึ่งอาจเกิดจากความบอบช้ำหลังจากการทำวัคซีนร่วมกับการติดพยาธิภายนอก เมื่อพิจารณาปริมาณไข่ (g) ในการเก็บแต่ละครั้ง พบว่ามากกว่า 1,000 g และไม่แตกต่างกับก่อนฉีดวัคซีน (ตารางที่ 4.10) โดยตลอดการศึกษามีการให้อาหารและวิตามินตามปฏิบัติงานของฟาร์ม และมีการควบคุมพยาธิภายนอกโดยสุ่มตรวจเดือนละ 2-3 ครั้งและกำจัดออกด้วยฟอร์มาลินขนาด 25 ppm ควบคุมคุณภาพน้ำตลอดการศึกษา จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่าวัคซีนไม่มีผลกระทบต่อตัวปลาโดยอัตราการรอดเกือบ 100% และปริมาณไข่ในแม่พันธุ์ไม่แตกต่างจากก่อนฉีดวัคซีน

### การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน

#### 1. ระดับภูมิคุ้มกันหลังได้รับวัคซีน

ระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Direct Agglutination test จากซีรัมพ่อแม่พันธุ์ปลานิลแดง น้ำหนักตัว 120-210 g ผ่านการฉีดวัคซีนเชื้อตาย พบว่าก่อนได้รับวัคซีน ปลา มีระดับภูมิคุ้มกัน  $0.710 \pm 0.416$  และหลังจากได้รับวัคซีนเป็นเวลา 3, 6, 10, 14, 18, 22 และ 24 สัปดาห์ มีการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะมากกว่าก่อนฉีดวัคซีน (ตารางที่ 4.11) เมื่อเปรียบเทียบผลการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันที่ฉีดวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจาก *S. agalactiae* ในปลานิลแดง (ข้อมูลปัจจุบัน) และปลานิลดำ (ข้อมูลในรายงาน Maisak และคณะ ปี 2010) หลังได้รับวัคซีนที่ 3, 6 และ 10 สัปดาห์ พบว่ามีการตอบสนองที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนฉีดวัคซีน และมีรูปแบบระดับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหลังได้รับวัคซีนใกล้เคียงกันในปลานิลทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 4.14)

ตารางที่ 4.10 ประเมินความปลอดภัยของวัคซีน : จำนวนปลานิลแดงพ่อแม่พันธุ์ (น้ำหนักตัว 120-200 กรัม) รอดชีวิต และปริมาณไข่จากแม่พันธุ์ปลานิลแดง (น้ำหนักตัว 210 กรัม) ภายหลังจากได้รับวัคซีนเชื้อตายผลิตจากเชื้อ *S. agalactiae* (isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59)

อัตราการรอดชีวิต (Survival rate)

สัปดาห์หลังทำวัคซีน	จำนวนปลาตาย
จำนวนปลาทั้งหมด (ตัว)	3,700
2	9
4	8
6	0
8	0
10	0
12	0
14	0
16	0
จำนวนปลาตาย (ตัว)	17
จำนวนปลารอด (ตัว)	3,683
อัตราการรอด (%)	99.54

ปริมาณไข่จากแม่พันธุ์ปลานิลแดง

สัปดาห์	ปริมาณไข่ (กรัม)
ก่อนฉีดวัคซีน	
2	2,577
4	3,807
หลังทำวัคซีน	
2	4,419
4	3,610
6	3,846
8	4,458
10	6,573
12	6,290

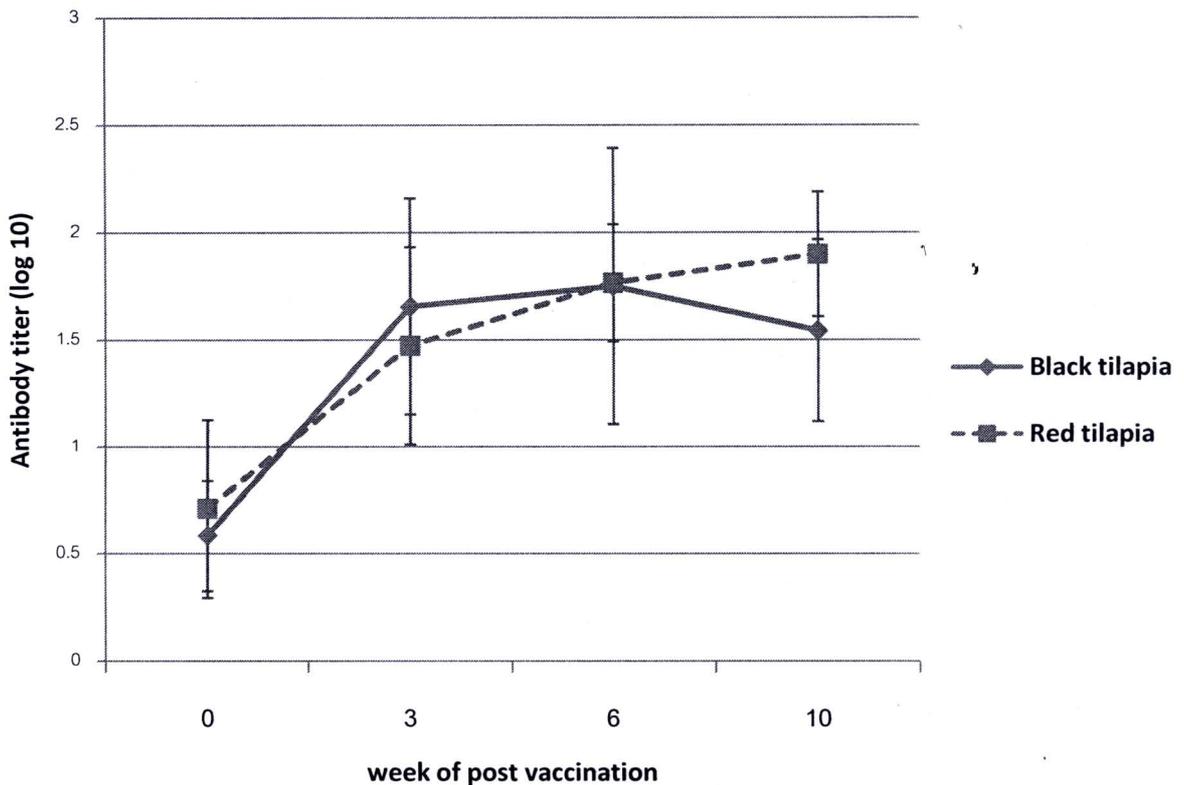
ตารางที่ 4.11 ระดับแอนติบอดี (antibody titer) ตรวจสอบด้วยวิธี Direct Agglutination test จากซีรัมของปลานิลแดง และปลานิลดำที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *S. agalactiae*

กลุ่มทดลอง	Antibody titer by direct agglutination test (log10)					
	0 wk	3 wk	6 wk	8 wk	10 wk	12 wk
Black tilapia*	0.583±0.257	1.655±0.503	1.749±0.643	1.655±0.677	1.542±0.424	1.184±0.551
Red tilapia	0.710±0.416	1.472±0.461	1.765±0.272	ND	1.898±0.290	ND
	14 wk	18 wk	22 wk	24 wk		
Black tilapia*	ND**	ND	ND	ND		
Red tilapia	1.714±0.555	0.840±0.370	1.051±0.465	0.900±0.740		

\* ข้อมูลระบบภูมิคุ้มกัน (antibody titer) ของ Black tilapia ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Direct Agglutination test มาจากรายงาน Maisak *et al.* (2010)

\*\* ND - not done

รูปที่ 4.15 การเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีของปลานิลแดงและปลานิลดำ ขนาดประมาณ 200 กรัม หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อตายเป็นเวลา 0, 3, 6 และ 10 สัปดาห์ ด้วยวิธี Direct Agglutination test



## 2. การทดสอบการป้องกัน โรคหลังฉีดวัคซีนด้วยการฉีดเชื้อทับ

พ่อแม่พันธุ์ปลานิลแดง หลังฉีดวัคซีน เข้าช่องท้อง เป็นเวลา 24 สัปดาห์ เมื่อฉีดเชื้อทับ (เชื้อ *S. agalactiae* ชนิดเดียวกับวัคซีน) เข้าช่องท้องและเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับวัคซีน มีอัตราการรอด (60%) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน (10%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 4.12, รูปที่ 4.16) ควบคุมการทดลอง (internal control) ด้วยปลานิลที่ผ่านการฉีดวัคซีนมาเป็นเวลา 24 สัปดาห์และฉีดน้ำเกลือแทนการฉีดเชื้อทับ พบว่าอัตราการรอด 100% แสดงว่าสถานที่การทดลองและการจัดการต่างๆ ได้แก่ คุณภาพน้ำ และการให้อาหาร ไม่มีผลกระทบต่อผลการทดลองครั้งนี้ นอกจากนี้ปลาตายส่วนใหญ่ที่ตายหลังจากฉีดเชื้อทับ พบจุดเลือดบริเวณโคนกรีบ กระพุ้งแก้ม ท้องบวมและพบน้ำในช่องท้อง ม้ามบวม ลำไส้บวม น้ำ มีจุดเลือดออกที่เนื้อเยื่อตับ ภาวะอาหาร ลำไส้ และสมอง เมื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ พบเชื้อสเตรปโตคอคคัสจากเนื้อเยื่อไตและสมอง

ระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* จากซีรัมพ่อแม่พันธุ์ปลานิลแดงที่รอดชีวิตหลังจากฉีดเชื้อทับ พบว่าปลานิลที่ผ่านการฉีดวัคซีนเป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ และหลังจากฉีดเชื้อพิษทับ 2 สัปดาห์ ปลา มีระดับภูมิคุ้มกัน  $3.010 \pm 0.630$  และ 3 สัปดาห์ ระดับภูมิคุ้มกัน  $3.080 \pm 0.690$  ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นเป็น 3 เท่าก่อนฉีดเชื้อทับ ( $0.900 \pm 0.535$ ) โดยปลาที่ผ่านการฉีดวัคซีนและรอดชีวิตหลังฉีดเชื้อทับ ไม่พบการติดเชื้อในระบบเลือด (จากการตรวจเชื้อในเลือดปลา)

ตารางที่ 4.12 ประเมินความต้านทานต่อโรคสเตรปโตคอคคโคซิสหลังจากได้รับวัคซีนแล้วเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (6 เดือน) จำนวนปลารอดชีวิตหลังจากฉีดเชื้อสเตรปโตคอคคัส ( $6 \times 10^8$  เซลล์ต่อตัวปลา) เข้าช่องท้อง (กลุ่ม A : ปลาวัคซีน และฉีดเชื้อ *S. agalactiae* isolate no.1 และ 59; กลุ่ม B : ปลาไม่ได้ฉีดวัคซีน และฉีดเชื้อ *S. agalactiae* isolate no.1 และ 59; กลุ่ม C : ปลาไม่ได้ฉีดวัคซีน และฉีดน้ำเกลือ)

กลุ่มทดลอง	สัปดาห์	จำนวนปลาตาย		
		A	B	C
	1	-	4	-
	2	7	4	-
	3	-	-	-
	4	1	1	-
จำนวนปลาเริ่มต้น		20	10	10
จำนวนปลาตาย		8	9	0
จำนวนปลารอด**		12	1	10
อัตราการรอด (% RPS)*		60	10	100

**รูปที่ 4.16** อัตราการรอดในปลาที่ผ่านการฉีดวัคซีนมาแล้วเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (6 เดือน) และฉีดเชื้อที่ขนาด  $6 \times 10^8$  เซลล์ต่อตัวปลา เข้าช่องท้อง แล้วเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 28 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉีดวัคซีน (กลุ่ม A : ปลาวัคซีน และฉีดเชื้อ *S. agalactiae* isolate no.1 และ 59; กลุ่ม B : ปลาไม่ได้ฉีดวัคซีน และฉีดเชื้อ *S. agalactiae* isolate no.1 และ 59; กลุ่ม C : ปลาไม่ได้ฉีดวัคซีน และฉีดน้ำเกลือ)

