สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุป

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลทั่วโลกมีการเจริญเติบโตและพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องขึ้นเรื่อยๆ เพื่อลดการจับสัตว์น้ำทางธรรมชาติและตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามการเพิ่มกำลังการผลิตโดยเพาะเลี้ยงอย่างหนาแน่นทั้งในแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ ลำคลอง หรือบนพื้นที่ทางการเกษตรมักประสบปัญหาโรคระบาดตามมา โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสก่อให้เกิดโรคระบาดรุนแรงในปลานิลทำให้เกิดการสูญเสียต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงเนื่องจากอัตราการตายที่สูง จากการสำรวจการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจาก *S. agalactiae* (จากรายงานการศึกษาส่วนที่ 1) ดังนั้นการควบคุมและป้องกันโรคระบาด อย่างเช่น โรคสเตรปโตคอคโคซิส โดยการพัฒนาและการใช้วัคซีนเป็นวิธีปฏิบัติที่นิยมเลือกใช้ในหลายๆ ประเทศที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำให้มีความต้านทานต่อโรคระบาด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามก่อนการพัฒนาวัคซีนจำเป็นต้องศึกษาสายสัมพันธ์ของเชื้อสเตรปโตคอคคัส (การศึกษาส่วนที่ 2) เพื่อคัดเลือกเชื้อจากแต่ละแหล่งที่มีการระบาดใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดย การจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียทาง phylogenetic system เป็นวิธีหนึ่งที่หลายๆ รายงานเลือกนำไปศึกษา (Alber *et al.*, 2004; Sulultana *et al.*, 1998) ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในการศึกษานี้ จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง โดย phylogenetic system ส่วนใหญ่เลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับ 16S rRNA ซึ่งยีนดังกล่าวนิยมนำไปใช้ตรวจระบุเชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิดทางพันธุกรรม รวมถึงเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส นอกจากนี้ยีน *sodA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิต superoxide dismutase A ($sodA_{int}$ fragment) เริ่มมีการนำมาใช้ศึกษาการตรวจระบุชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุล (Alber *et al.*, 2004) ดังนั้นในการศึกษาจึงพิจารณาเลือกยีนทั้ง 2 ชนิด ซึ่งขนาด PCR products ของ 16S rRNA gene ประมาณ 1,234 bp และ $sodA_{int}$ fragment ประมาณ 512 bp เพื่อตรวจหา DNA sequence ของ PCR products สำหรับศึกษา phylogenetic analysis โดย Kawamura *et al.* (1999) ให้ข้อมูลสนับสนุนว่าขนาด PCR product ตั้งแต่ 400 bp เพียงพอสำหรับการนำไปศึกษาหาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อทางชีวโมเลกุล

การศึกษาวิวัฒนาการและการจัดจำแนกชนิด สายพันธุ์ของเชื้อสเตรปโตคอคคัสด้วย 16S rRNA gene พบในหลายๆ รายงาน ได้แก่ การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *S. phocae* จากปลาแซลมอน (Atlantic salmond) (Gibello *et al.*, 2005), *S. iniae* จากปลา (Kvitt and Colorni, 2004), *S. agalactiae* จากมนุษย์และวัว (Sukhnannand *et al.*, 2005), เชื้อสเตรปโตคอคคัสกลุ่ม mitis จากมนุษย์ (Kawamura *et al.*, 1999) เป็นต้น จากผลการศึกษา พบว่าบางส่วนของ 16S rRNA gene sequence จากเชื้อ *S. agalactiae* จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่แยกจากปลานิลป่วยในแหล่งระบาดต่างๆ ของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคกลาง มี DNA sequence เหมือนกัน 100% และเทียบเคียงเหมือนกับเชื้อมาตรฐานที่มีรายงานในปลาชนิดอื่นๆ จากผลการศึกษา

ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า 16S rRNA gene sequence ของเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลานิลป่วยในแหล่งระบาดต่างๆ ของประเทศไทย มีความเหมือน (DNA similarity) กับเชื้อมาตรฐานเกือบ 100% โดย Stackbrandt and Goebel (1994) รายงานว่าการวิเคราะห์ความเหมือน DNA (DNA similarity) ด้วย 16S rRNA sequence ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียต่างๆ พิจารณาระดับความเหมือน DNA sequence ตั้งแต่ร้อยละ 97 Song และคณะ (2003) ให้ข้อมูลสนับสนุนว่าการวิเคราะห์ความเหมือน DNA (DNA similarity) ด้วย 16S rRNA gene sequence เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการ จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียต่างๆ (bacterial phylogenetic analysis) และตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ (detection of clinical isolates) ที่ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง เนื่องจาก 16S rRNA gene sequence มีตำแหน่งเป้าหมายและลักษณะผันแปรทางชีวโมเลกุล (molecular target and variable regions) ที่แสดงความจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ซึ่งเป็นเครื่องมือจำเป็นหนึ่งในการนำไปศึกษา (Weisburg *et al.*, 1991)

ยีนอื่นๆ ได้แก่ บางส่วนของ *sodA* gene ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต superoxide dismutase A ($sodA_{int}$ fragment) เริ่มมีการนำมาใช้ตรวจระบุชนิดเชื้อทางชีวโมเลกุลและ phylogenetic analysis ของแบคทีเรียแกรมบวก (Goh *et al.*, 1998; Poyart *et al.*, 2000) ได้แก่ การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* จากปลาเพาะเลี้ยง (Nomoto *et al.*, 2008) *Streptococcus* จากมนุษย์ (Hoshino *et al.*, 2005) และ *S. agalactiae* (Poyart *et al.*, 2001) นอกจากนี้ $sodA_{int}$ fragment สามารถนำมาใช้ออกแบบ oligonucleotide primers ที่จำเพาะเพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส (Alber *et al.*, 2004) เป็นต้น จากผลการศึกษา พบว่าบางส่วนของ $sodA_{int}$ fragment sequence จากเชื้อ *S. agalactiae* จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่แยกจากปลานิลป่วยในเขตแหล่งระบาดต่างๆ ของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 มี DNA sequence ใกล้เคียงเกือบ 100% และเทียบเคียงกับเชื้อมาตรฐานมากกว่า 98.4% โดย Smith และ Doolittle (1992) ให้ข้อมูลสนับสนุนว่า superoxide dismutases (SODs) เป็น metalloenzyme ซึ่ง MnSOD และ FeSOD มักพบในสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียต่างๆ และยีนดังกล่าวอาจพบความผันแปรจากวิวัฒนาของเชื้อตั้งต้น โดยส่วนใหญ่ MnSOD นิยมใช้ตรวจระบุและจัดจำแนกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Nakayama, 1992) โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคคัส (Kawamura *et al.*, 1999)

การเปรียบเทียบวิวัฒนาการและการจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์ของเชื้อสเตรปโตคอคคัสด้วย 16S rRNA gene และบางส่วนของ *sodA* gene ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต superoxide dismutase A ($sodA_{int}$ fragment) ใน phylogenetic tree จากเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลานิลป่วยจากแหล่งระบาดต่างๆ ของประเทศไทย กับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ พบว่าเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกจากปลานิลในไทยจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *S. agalactiae* อย่างชัดเจน โดยไม่พบความแตกต่างจากแหล่งระบาดต่างๆ ในประเทศไทย และแยกออกจากกลุ่มเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ DNA sequence จาก $sodA_{int}$ fragment สามารถจำแนกเชื้อสเตรปโตคอคคัส โดยเฉพาะ *S. agalactiae* ได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบกับ phylogenetic tree จาก 16S rRNA gene ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานของ Kawamura และคณะ (1999) โดยผลการศึกษาดังกล่าวนำมาประยุกต์วิธีการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกและตรวจระบุชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่รวดเร็วและแม่นยำ และจากการจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์ของเชื้อสเตรปโตคอคคัสด้วย 16S rRNA gene และบางส่วนของ *sodA* gene ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต

superoxide dismutase A ($sodA_{int}$ fragment) พบว่าโครงสร้าง phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ DNA sequence จาก 16S rRNA gene และ $sodA_{int}$ fragment สามารถแยกเชื้อ *S. agalactiae* ออกจากกลุ่มเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของ DNA sequence จาก 16S rRNA gene และ $sodA_{int}$ fragment จาก 10 สายพันธุ์ที่แยกจากแหล่งระบาดต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก

วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *S. agalactiae* ผ่านการคัดเลือกเชื้อด้วยการศึกษาสายสัมพันธ์ของเชื้อ *S. agalactiae* ในแหล่งการระบาดต่างๆ ของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างทั้งทางพันธุกรรม (genotype) จึงสุ่มเลือกเชื้อในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก โดยใช้ isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59 มาทดสอบผลิตวัคซีนใช้ในปลานิล พบว่ามีความปลอดภัยโดยมีความปลอดเชื้อหลังจากตรวจสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสม 5% และปลอดภัยต่อตัวปลาที่ฉีดวัคซีน โดยไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพจากปริมาณไข่ในแม่พันธุ์ที่ได้รับในแต่ละสัปดาห์ ไม่แตกต่างจากก่อนฉีดวัคซีน (reproductive performance) และอัตราการรอดเกือบ 100% ในช่วงเวลา 4 เดือนหลังฉีดวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆ รายงานการศึกษา ได้แก่ ปลาเทราท์อัตราการรอดหลังจากทำวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิส ประมาณ 91.7% (Akhlaghi *et al.*, 1996) และปลานิล 100% (Shelby *et al.*, 2002) เมื่อพิจารณาระดับภูมิคุ้มกันที่จำเพาะหลังฉีดวัคซีนเชื้อตาย พบว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (0.564-0.752) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 และสูงอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 เดือน ระดับภูมิคุ้มกันเริ่มกลับสู่ระดับปกติตั้งแต่เดือน 4 จนถึงเดือนที่ 6 (พิจารณาจาก antibody titer ก่อนฉีดวัคซีน) นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของ antibody titer ในปลานิลแดง และปลานิลดำ หลังได้รับวัคซีนที่ 3, 6 และ 10 สัปดาห์ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้กำหนดโปรแกรมการทำวัคซีน (vaccination program) หรือการฉีดวัคซีนซ้ำครั้งที่ 2 (booster vaccination) ได้ (Pasnik *et al.*, 2005) Elder และคณะ ปี 1995 ให้เหตุผลว่าวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง humoral factor เช่น แอนติบอดี (antibody) คอมพลิเมนท์ (complement) และการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ lysozyme ในร่างกายปลา ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญช่วยในขบวนการกำจัดและทำลายเชื้อแบคทีเรียในร่างกาย (bactericidal activity) และสอดคล้องกับผลการตรวจพบระดับภูมิคุ้มกัน (antibody titer) ที่สูงกว่าก่อนได้รับวัคซีน ด้วยวิธี Direct agglutination test

ประสิทธิผลในการป้องกันการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลที่ผ่านการฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน ด้วยการฉีดเชื้อพิษทับ (เชื้อ *S. agalactiae* ชนิดเดียวกับวัคซีน) สังเกตความผิดปกติและนับจำนวนปลาตายต่อเนื่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ฉีดวัคซีนเชื้อตายมีอัตราการรอด (60%) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน (10%) โดยระดับภูมิคุ้มกันที่จำเพาะในการป้องกันการติดเชื้อ *S. agalactiae* (protctive antibody level) สูง 3 เท่า ในช่วง 2-3 สัปดาห์ ก่อนฉีดเชื้อทับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Evans และคณะ (2004) โดยพบอัตราการรอดสูงในปลานิลที่ผ่านการฉีดวัคซีนเชื้อตายของเชื้อ *S. agalactiae* หรือ *S. iniae* เข้าช่องท้อง หลังจากฉีดเชื้อพิษทับ และร่างกายปลามีการตอบสนองด้วยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดเชื้อพิษที่ฉีดเข้าร่างกายอย่างจำเพาะ (protective antibody)