การใช้เทคนิค PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

หยาดเพชร โอเจริญ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต
สาขาวิชาวาริชศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ หยาดเพชร โอเจริญ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ดร.อรุณี อหันทริก)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.คเชนทร เฉลิมวัฒน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)
วันที่ ๑ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา

จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำภาคปลาย ปีการศึกษา 2552

และทุนสภาวิจัยแห่งชาติในโครงการการสำรวจทางชีวภาพในสัตว์น้ำเศรษฐกิจตามแนวชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรีและการจัดการความเสี่ยงเบื้องต้นต่อสาร PAHs ในหอยแมลงภู่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผศ.ดร.ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้องตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมงที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* และดร. อรุณี อหันทริก รศ. ดร. คเชนทร เฉลิมวัฒน์ และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบรวมทั้งให้คำแนะนำแก้ไขปรับปรุงวิธีการวิจัยให้มีคุณภาพ

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อณัฐพงศ์ คุณแม่จิตอารีย์ โอเจริญ และคุณสุกานตา ทับเมฆา คุณวิชชุดา ประสาทแก้ว คุณกัญช์ เกล็ดมณี พี่ๆในห้องปฏิบัติการณ์ ที่คอยให้ช่วยเหลือให้กำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

หยาดเพชร โอเจริญ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

50911337: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม.(วาริชศาสตร์)

คำสำคัญ: *Streptococcus agalactiae* / ปลานิล/ ปฏิกิริยาพีซีอาร์

หยาดเพชร โอเจริญ: การใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

(A PCR-BASE METHOD FOR DETECTION OF THE *Streptococcus agalactiae* IN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ปภาศิริ บาร์เนท, Ph.D., ชูตา บุญภักดี, Ph.D. 77 หน้า. ปี พ.ศ. 2553.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์และติดตามการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่เป็นโรคสเตรปโตคอคโคซิส ชนิด *S. agalactiae* ในส่วนของยีน *16S rRNA* โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลป่วย พบว่าเทคนิคพีซีอาร์มีความไวต่อเชื้อ *S. agalactiae* สูงสุดเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.1 นาโนกรัม ในปฏิกิริยา 14 ไมโครลิตร จากนั้นได้พัฒนาวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในส่วนของยีน *16S rRNA* ร่วมกับ *28S rRNA* ที่มีความจำเพาะกับปลานิลเป็นตัวควบคุมภายในเพื่อป้องกันผลตรวจโรคปลอม และเมื่อทดลองตรวจสอบติดตามเชื้อ *S. agalactiae* ในตัวอย่างเลือดของปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง 5 ระดับคือ 0, 1×10^{1}, 1×10^{2}, 1×10^{3}, 1×10^{4}, 1×10^{5} CFU/ml (n=5) ในระยะเวลา 7 วัน พบว่าวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^{1} CFU/ml (60%) ในขณะที่วิธีการเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นพบเชื้อได้ในวันที่ 6 ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^{4} CFU/ml (20%)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

50911337: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc.(AQUATIC SCIENCE)

KEYWORD: *Streptococcus agalactiae* / Tilapia/ PCR

YHARDPETH OCHAROEN: A PCR-BASE METHOD FOR DETECTION OF THE *Streptococcus agalactiae* IN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*). ADVISORY COMITEE: PRAPARSIRI BARNETT, Ph.D., CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D. 77 P. 2010.

This Study focused on sensitivity and detection of *Streptococcus agalactiae* from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by using PCR and culture methods. Genomic DNA, extracted by GF-1 bacterial extraction kit, was used as a template for PCR reaction with *16S rRNA* primers from *S. agalactiae* isolated from moribund tilapia. The result showed a significant rapid detection of *S. agalactiae* when using DNA template 0.1 ng in a 14 µl PCR reaction. Multiplex PCR was also developed using a pair of primers from *16S rRNA* of *S. agalactiae* (F1/IMOD) in combination with specific primers (L99/Oce215R) in the region of *28S rRNA* of tilapia blood. *S. agalactiae* detection in tilapia (I/P) blood samples were divided into five concentration levels: 0, 1×10^{1}, 1×10^{2}, 1×10^{3}, 1×10^{4} and 1×10^{5} CFU/ml (n=5). Within seven days, application of multiplex-PCR assay for rapid detection of *S. agalactiae* in the experimental infected tilapia gave positive reaction on the 1st day post-infection in tilapia at the concentration of 1×10^{1} CFU/ml (60%). In contrast, bacterial culture gave positive reaction on the 6th day at the concentration of 1×10^{4} CFU/ml (20%).

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

สมมติฐานของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

ปลานิล..... 4

โรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococcosis)..... 7

กลุ่มปลาที่ติดเชื้อ (Streptococcus host)..... 7

อาการของโรคและพยาธิสภาพของโรค..... 10

การจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี..... 11

การจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวโมเลกุล..... 12

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 15

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ หน้า

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 18
อุปกรณ์และสารเคมี..... 18
วิธีดำเนินงานวิจัย..... 20
การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 20
การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดลอง..... 20
การเตรียมสัตว์ทดลองในการศึกษาความรุนแรงของ *S. agalactiae*..... 20
การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียที่ทำให้ปลานิลตาย 50%
(Median lethal dose: LD_{50}) 20
การเตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย..... 21
การตรวจสอบทางชีวโมเลกุลด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 21
การโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์..... 22
การทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli*..... 22
การสกัดพลาสมิดลูกผสม..... 22
การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 24
การศึกษาความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์และมัลติเพล็กพีซีอาร์..... 24
การติดตามการปรากฏของเชื้อในเลือดของปลานิลทดลอง..... 27
การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 27
4 ผลการวิจัย..... 28
การยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย..... 28
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ..... 30
ปริมาณของแบคทีเรียที่ทำให้ปลานิลตาย 50% (Median lethal dose: LD_{50})..... 33
ความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 35
ความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์และมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์..... 37
การติดตามและตรวจสอบเชื้อ..... 43
การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 48

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5 วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย..... 49
ความรุนแรงของเชื้อในปลานิล..... 49
ความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 50
การติดตามและตรวจสอบเชื้อ..... 53
สรุปผลการวิจัย..... 55
ข้อเสนอแนะ..... 56
บรรณานุกรม..... 57
ภาคผนวก..... 63
ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 77

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 แสดงชนิดของปลาที่มีการรายงานการติดโรค *Streptococcus* sp..... 8

4-1 อัตราการตายของปลานิลต่อปริมาณเชื้อ 5 ระดับความเข้มข้นและชุดควบคุมที่ 14 วัน... 34

4-2 จำนวนของโคโลนี *S. agalactiae* บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (TSA) จากเลือดของปลานิลที่ได้รับการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ช่องท้อง 5 ระดับ และชุดควบคุม ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7 (หลังการฉีด)..... 44

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ขนาดโตเต็มวัย..... 5

2-2 ปลาชนิดต่างๆที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. iniae* จากธรรมชาติหรือจากการทดลอง..... 9

2-3 แผนภาพแสดงขั้นตอนของ PCR..... 13

2-4 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสของ เชื้อ *S. iniae*..... 16

2-5 ความไวของเทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากน้ำนมวัว..... 17

4-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*..... 28

4-2 แผนภาพผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณยีน *16S rRNA*..... 30

4-3 พลาสมิดสายผสมของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก pGEM-T easy Vector..... 31

4-4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับ
ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ Genbank..... 32

4-5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (S. agalactiae_Ins) กับ *16S rRNA* ของ
เชื้อ *S. agalactiae* สายพันธ์ A909 (Accession no. CP000114.1)..... 33

4-6 ลักษณะพยาธิสภาพภายนอกของปลานิล
ที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณ 1×10^{8} CFU/ml..... 35

4-7 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ L99 และ Occ215R
ต่อเลือดปลานิล..... 36

4-8 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ L99 และ Occ215R
ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*..... 37

4-9 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ F1 และ IMOD
ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*..... 33

4-10 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ L99 และ Occ215R
ต่อเลือดปลานิล 39

4-11 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ L99 และ Oce215R
และ F1 และ IMOD ต่อ *16S rRNA* และ *28S rRNA* พลาสมิดดีเอ็นเอ..... 41

4-12 ผลการทดสอบปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ L99 และ Oce215R
และ F1 และ IMOD ต่อ เลือดปลานิลที่มีเชื้อ *S. agalactiae*..... 42

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4-13 การแสดงผลอิเล็กโฟลิซิสเจลในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ จากตัวอย่างเลือดปลานิลในวันที่ 1 ถึง วันที่7..... 46
4-14 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของการตรวจพบเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ จากตัวอย่างเลือดปลานิลวันที่ 1 ถึง วันที่ 7 41
4-15 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีการไคน์สแควร์ โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์..... 48
4-16 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีการไคน์สแควร์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น..... 48

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University