บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1. การศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล

5.1.1. ปริมาณเชื้อของ *S. agalactiae* ต่อความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิล

จากการศึกษาความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยการฉีดเข้าช่องท้องในปลานิลขนาดน้ำหนัก 7.77±1.87 กรัม มีค่า LD_{50} ที่ 14 วัน ของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีค่าเท่ากับ 2.51×10^{6} CFU/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานของ นภดล ศุกระกาญจน์ และคณะ (2548) ในการทดลองฉีดเข้าช่องท้องปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ที่มีขนาดใหญ่น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus sp.* มีค่า LD_{50} ที่ 14 วัน เท่ากับ 6×10^{6} CFU/ml โดยปลานิลที่ติดเชื้อส่วนใหญ่แสดงอาการของโรคภายใน 14 วัน และจากรายงานของ เฉลิม หวันหมาน และคณะ (2549) ในการศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ซึ่งเขี่ยเชื้อจากปลากะพงขาวที่ป่วย ในจังหวัดสงขลา และสตูล โดยการฉีดเข้าช่องท้องของปลากะพงขาวน้ำหนักเฉลี่ย 4.97±1.24 กรัม มีค่า LD_{50} ที่ 14 วัน เท่ากับ 1.937×10^{3} CFU/ml และในการรายงานของ Garcia et al. (2008) ได้ทดลองฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่เขี่ยได้จากน้ำนมวัว ในช่องท้องปลานิล ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *S. agalactiae* จากวัวไม่มีความสามารถก่อโรคได้ในปลานิลและหลังการฉีด 24 ถึง 48 ชั่วโมงไม่สามารถเขี่ยเชื้อจากปลานิลได้ จากผลการศึกษาจากหลายแหล่งชี้ให้เห็นถึงเชื้อ *Streptococcus* sp. มีการก่อโรคและการตายในปลาที่แตกต่างขึ้นอยู่กับความรุนแรงของแต่ละสายพันธุ์รวมถึงชนิดและอายุของปลาเช่นกัน

5.1.2. ลักษณะอาการของปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae*

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าอาการของโรคที่ปรากฏให้เห็นในปลานิลที่ถูกฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ในการทดลองปลาที่ติดเชื้อมีการแสดงลักษณะอาการภายนอก จะสังเกตเห็นอาการแสดงออกภายใน 2 ถึง 3 วันหลังการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* และเกิดการตายภายใน 7 วัน ปลานิลมีอาการเซื่องซึม ตาโปนขุ่น หนึ่งหรือทั้งสองข้างมีอาการว่ายน้ำลอยหัวอยู่บริเวณผิวน้ำ เสียการทรงตัว ว่ายน้ำแบบควงสว่านและตายในที่สุด และอาการภายในคือมีตับม้ามโต มีสีซีด มีเลือดออกและมีของเหลวในช่องท้อง และพบปลาบางตัวตายโดยไม่แสดงอาการภายนอก ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rasheed et al. (1984) พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp.ทำให้ปลาบุลมินเนา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(*Fundulus grandis* Baird & Girard) มีอาการซึมลอยอยู่บริเวณผิวน้ำและมีการว่ายน้ำแบบควงสว่าน ตาโปนและมีเลือดออกบริเวณตาและยังพบว่าปลาบางตัวตายโดยไม่แสดงอาการภายนอก และสามารถแยกเชื้อจากปลาตายได้ และจากการรายงานของ Duremdez et al. (2004) พบว่าการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลา Silver pomfret (*Pampus argenteus*) ปลาจะมีอาการตกเลือดบริเวณผิวตัว ตาโปน ขุ่น มีเลือดออกที่ไหน อวัยวะภายในมีการเปลี่ยนแปลงคือตับโตและมีเลือดคั่งในไตและม้าม พบของเหลวสะสมในกระเพาะอาหารลำไส้และช่องท้องและจากรายงานของนิลุบล กิจอันเจริญ และเพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว (2550) พบว่าปลานิลที่ติดโรคสเตรปโตคอคโคซิสจากจังหวัดมุกดาหาร กาฬสินธุ์และขอนแก่น มีอาการเซื่องซึม ลอยตัวนิ่งที่ผิวน้ำ ลำตัวมีสีเข้มเกือบดำ มีอาการตกเลือดตามลำตัว และ โคนคีบหาง และครีบหางบวมมีเลือดปนหนองไหลอยู่ภายใน

5.2. ความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์

5.2.1. ความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae*

จากการศึกษาครั้งนี้ในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์เชื้อ *S.agalactiae* ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA โดยทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบแตกต่างกัน 8 ระดับในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F1 และ IMOD คือ 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.0001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* น้อยที่สุดในปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 คู่เบส มีความชัดเจน และจากการรายงานของ Matinaze et al. (2001) พบว่า ความเข้มข้น ที่เหมาะสมที่สุด คือ 6.25 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ SS615 น้อยที่สุดในปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 220 คู่เบส มีความชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ นิลุบล กิจอันเจริญ และคณะ (2552) ในการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์เชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ ATCC 29177 ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA โดยทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบแตกต่างกัน 4 ระดับในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Fstrep และ Rstrep คือ 1.25, 2.5, 5.0 และ 7.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุด คือ 1.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ ATCC 29177 น้อยที่สุดในปฏิกิริยาพีซีอาร์และทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 351 คู่เบส มีความชัดเจน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2.2. ความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อพลาสมิด *16S rRNA* ของเชื้อ *S. agalactiae*

จากการศึกษาครั้งนี้ในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์เชื้อ *S.agalactiae* ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA โดยทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบแตกต่างกัน 9 ระดับในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F1 และ IMOD คือ 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัมตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.00000001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* น้อยที่สุดในปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 194 คู่เบส มีความชัดเจนและจากการรายงานของ Matinaze et al. (2001) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.25 พิโคกรัมต่อไมโครลิตรที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ SS615 น้อยที่สุดในปฏิกิริยาพีซีอาร์และทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 คู่เบส มีความชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ นิลุบล กิจอันเจริญ และคณะ (2552) ในการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์เชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ ATCC 29177 ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ *16S rDNA* โดยทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบแตกต่างกัน 4 ระดับในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Fstrep และ Rstrep คือ 1.25, 2.5, 5.0 และ 7.5นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุด คือ 1.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ ATCC 29177 น้อยที่สุดในปฏิกิริยาพีซีอาร์และทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 351 คู่เบส มีความชัดเจน

5.2.3. ความไวของปฏิกิริยาต่อเลือดของปลานิลในส่วนของยีน *28S rRNA*

เพื่อตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากเลือดปลานิล การศึกษาครั้งนี้จึงต้องหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการศึกษาปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์ การออกแบบสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมของเลือดปลานิลจะแบ่งปริมาณของเลือดปลานิลแตกต่างกันออกเป็น 9 ระดับในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ L99 และ Oce215R เพื่อสกัดเลือดปลานิลจำนวน 10 ไมโครลิตร และเมื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 24.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และใช้ปริมาณ 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัม ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุดคือดีเอ็นเอปริมาณ 0.1 นาโนกรัม เป็นความเข้มข้นของเลือดน้อยที่สุดในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเลือดปลานิลมีขนาดประมาณ 150 คู่เบสมีความชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอพลาสมิดมีความไวสูงกว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำดีเอ็นเอพลาสมิดมาเป็น positive control ในปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2.4. ความไวของปฏิกิริยาต่อพลาสมิด *28S rRNA*

เพื่อตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากเลือดปลานิล การศึกษาครั้งนี้จึงต้องหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการศึกษาปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์ การออกแบบสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมของเลือดปลานิลจะแบ่งปริมาณของพลาสมิด *28S rRNA* แตกต่างกันออกเป็น 9 ระดับในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OceL99 และ ใช้ปริมาณ 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัมตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุดคือดีเอ็นเอปริมาณ 0.000001 นาโนกรัม เป็นความเข้มข้นของพลาสมิด *28S rRNA* น้อยที่สุดในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเลือดปลานิลมีขนาดประมาณ 150 คู่เบสมีความชัดเจน

5.2.5. ความไวของปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์ต่อพลาสมิดยีน *28S rRNA* และ 16S rRNA

เพื่อตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากเลือดปลานิล การศึกษาครั้งนี้จึงต้องหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการศึกษาปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์ การออกแบบสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมของเลือดปลานิลจะแบ่งปริมาณของเลือดปลานิลแตกต่างกันออกเป็น 9 ระดับในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ L99 และ Oce215R โดยใช้ไพรเมอร์ F1 และ IMOD โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัม ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุดคือดีเอ็นเอปริมาณ 0.000001 นาโนกรัม เป็นความเข้มข้นของดีเอ็นเอพลาสมิดน้อยที่สุดในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีขนาดประมาณ 194 และ 150 คู่เบสมีความชัดเจน

5.3. ความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *16S rRNA* ต่อปลานิล

จากการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ *16S rRNA* คือ F1 และ IMOD ไพรเมอร์คู่นี้ออกแบบโดยใช้ของ (Matinaze et al., 2001) ต่อเลือดของปลานิลจากผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ *16S rRNA* ไม่จำเพาะกับดีเอ็นเอจากเลือดของปลานิล และ ผลการศึกษาของไพรเมอร์ *28S rRNA* ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ไม่สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขึ้นจากการทำพีซีอาร์เช่นกัน จากผลการศึกษาการใช้ไพรเมอร์ *16S rRNA* เพื่อตรวจเชื้อ *S. agalactiae* ยืนยันความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD ซึ่งมีความสอดคล้องกับการรายงานของ Matinazc ที่ทำการออกแบบ ไพรเมอร์จากนิวคลีโอไทด์ *16S rRNA* จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ 1) F1 และ IMOD 2) F1 และ ING 3) F1 และ ING4 และนำมาทดสอบกับแบคทีเรียทั้ง18 ชนิด ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae, Escheichia coli, Enterobacter cloacae, Salmonella enteriditis, Listeria*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

monocytogenase, Staphylococcus epidermis, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus aureus Lactobacillus acidophilus, Corynebacterium bovis Bacillus cereus, Enterococcus faecalis, S. dysgalactiae, S. porcinus, S. bovis, S. uberis, S. zooepidemicus และ *S. agalactiae* โดยที่คู่ไพรเมอร์ F1 และ ING4 จำเพาะกับแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Listeria monocytogenase, S. dysgalactiae, S. porcinus, S. uberis* และ *S. agalactiae* และคู่ไพรเมอร์ F1 และ ING จำเพาะกับแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *S. bovis, S. agalactiae* ไพรเมอร์ทั้งสองคู่นี้ จึงไม่เหมาะสมในการใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย , *S. agalactiae* เนื่องจากไม่สามารถจำแนกออกจาก *Streptococcus* ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD นับได้ว่ามีความจำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* ชนิดเดียวเท่านั้น ไพรเมอร์คู่นี้จึงมีความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลทดลองครั้งนี้ได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Matinaze ใช้ในการตรวจ *S. agalactiae* ในน้ำนมดิบ ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอ ประมาณ 220 คู่เบส (Matinaze et al., 2001)

5.4. การตรวจเชื้อ *S. agalactiae* ในเลือดปลานิลทดลอง

5.4.1. การตรวจเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้แยกเชื้อแบคทีเรียจากเลือดปลานิลทดลองที่ฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ในช่องท้องที่ความเข้มข้น 1×10^{1},1×10^{2}, 1×10^{3}, 1×10^{4} และ 1×10^{5} CFU/ml โดยการสุ่มปลากลุ่มละ 5 ตัว ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังการฉีด และสังเกตโคโลนีบนอาหาร TSA บ่มในอุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมงผลการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างเลือดของปลานิลที่ฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 ไม่พบโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* หลังการเพาะเชื้อ ทุกกลุ่มทดลอง และเริ่มพบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในกลุ่มปลานิลหลังการรับเชื้อ 1×10^{4} CFU/ml ในวันที่ 6 เพียง 1 ตัวอย่าง (จำนวน 138 โคโลนี) ซึ่งปลานิลตัวอย่างที่ตรวจมีลักษณะอาการภายนอกโดยพบว่ามีลำตัวสีเข้มขึ้น และมีอาการท้องบวมน้ำ พร้อมกับพบในวันที่ 7 ด้วยอีก 1 ตัวอย่าง (จำนวน 8 โคโลนี) ซึ่งปลานิลมีลักษณะลำตัวสีเข้ม มีอาการว่ายน้ำผิดปกติ ซึ่งในวันที่ 7 ยังพบการเจริญของโคโลนี จากกลุ่ม 1×10^{5} จำนวน 2 ตัวอย่าง(จำนวน 3 และ 7 โคโลนี ตามลำดับ) ที่ตรวจมีลักษณะอาการภายนอกโดยพบว่ามีลำตัวสีเข้มและมีอาการท้องบวมน้ำ และตัวอย่างที่ตายไม่พบอาการผิดปกติภายนอก แต่พบความผิดปกติภายในคือมีตับมีสีซีด และมีของเหลวขังอยู่ในช่องท้อง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ นิลุบล กิจอันเจริญ และคณะ (2552) ในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อในกลุ่ม *Streptococci* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในห้องปฏิบัติการนั้นค่อนข้างยุ่งยากเนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตช้าบนอาหารทั่วไปแบบ TSA และใช้เวลาประมาณ 2 วันจึงสามารถเห็นโคโลนีบนอาหารจานเพาะเชื้อได้อย่างชัดเจน ดังนั้นเมื่อศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติบางประการของเชื้อที่จะช่วยในการจัดจำแนกชนิดเช่นการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงในปลา

ของเชื้อชนิดนี้ซึ่งต้องบ่งชี้สามารถทำลายเม็ดเลือดเป็นแบบ β-heamolysis แต่จะเห็นผลไม่ชัดเจน อาจทำให้เกิดความสับสนและอ่านผลว่าเป็นแบบ α-heamolysis ได้ นอกจากนี้ยังมีพัฒนาการแยกเชื้อ *S. iniae* จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจำเพาะคือ thallium acetate-oxolinic acid-blood (TAOAB) ซึ่งสามารถแยกเชื้อในกลุ่ม *Streptococcus* sp. โดยทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำและจากตัวอย่างตะกอนจากบ่อเลี้ยงปลา *japanese flounder* (Paralichthys olivaceus) รวมถึงอวัยวะส่วนต่าง ๆของปลา *japanese flounder* ได้แก่ สมอง ตับ และ เมือกที่ผิวตัว โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง (Nguyen et al., 2002) อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและทดสอบผลทางชีวเคมีทำให้การวินิจฉัยการเกิดโรคในปลาจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *S. agalactiae* ใช้เวลานานเกินไป ทำให้ไม่สามารถทำการรักษาโรคปลาได้ทันก่อนการตายเกิดขึ้น

5.4.2. การตรวจเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ในการศึกษาครั้งนี้ ตรวจสอบโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R ซึ่งมีความจำเพาะกับ *28S rRNA* ของปลานิลเป็น internal control และใช้คู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* พบว่าในปลานิลทดลองฉีดเชื้อ 1×10^{1} ถึง 1×10^{5} ในปลานิลกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อปริมาณ 1×10^{1} CFU/ml ตรวจพบ 60% (จากจำนวน 5 ตัว) ภายใน 24 ชั่วโมง และในปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 10^{2} CFU/ml ถึง 10^{5} CFU/ml ตรวจพบเชื้อ 80 เปอร์เซ็นต์ (จากจำนวน 5 ตัว) ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (จากจำนวน 5 ตัว) และสามารถตรวจพบเชื้อ *S. agalactiae* ในทุกกลุ่มความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ในปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ช่องท้อง 1×10^{1} CFU/ml มีค่าเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ และในกลุ่ม 1×10^{2} ถึง 1×10^{5} CFU/ml ตรวจพบเชื้อ *S. agalactiae* ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาของ Yazeed and Ibrahem (2009) ที่ทำการติดตามการตรวจเชื้อ *Edwardsiella tarda* ในปลานิลและปลาดุก (*Clarias gariepinus*) โดยการฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อ (Intramuscular) และ การฉีดเข้าช่องท้องและติดตามเชื้อจากการสกัดดีเอ็นเอจากตับและไต และตรวจโดยวิธีการพีซีอาร์ สามารถตรวจพบเชื้อ *E. tarda* จาก ปลาดุก และปลานิล ได้ในวัน 4 และ 7 ตามลำดับ

5.4.3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากผลการศึกษาครั้งนี้ ศึกษาความสัมพันธ์ความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ถูกฉีดเข้าช่องท้องปลานิลชุดทดลองระดับความเข้มข้น 1×10^{1},1×10^{2}, 1×10^{3}, 1×10^{4} และ 1×10^{5} CFU/ml ปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* ที่สูงขึ้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างปลาชุดทดลองสูงขึ้นโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 0 CFU/ml ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สถิติ ระหว่างความสัมพันธ์ความเข้มข้นปริมาณของเชื้อที่ถูกฉีดเข้าช่องท้องปลานิล ต่อเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อโดยวิธีการตรวจเชื้อในอาหารเพาะเชื้อแบบแข็ง โดยพบว่าปริมาณเชื้อที่สูงขึ้นมีผลต่อแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการตรวจพบเชื้อสูงขึ้นด้วย

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากการศึกษาพบว่าปลานิลที่ศึกษา LD_{50} ที่ 14 วัน ของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีค่าเท่ากับ 4.18×10^5 CFU/ml ปลานิลแสดงอาการป่วยคือเซื่องซึม ตาโปนขุ่น หนึ่งหรือทั้งสองข้างมีอาการว่ายน้ำลอยหัวอยู่บริเวณผิวน้ำ เสียการทรงตัว ว่ายน้ำแบบควงสว่านและตายในที่สุด และพบอาการภายในคือมีตับม้ามโต มีสีซีด มีเลือดออกและมีของเหลวในช่องท้อง

2. ความเข้มข้นในการสังเคราะห์ของดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อ *S.agalactiae* ที่เหมาะสมในส่วนของ *16S rDNA* โดยทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบแตกต่างกัน 8 ระดับในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ F1 และ IMOD คือ 100, 10, 0.1, 0.01, 0.001,0.0001 และ 0.00001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *S. agalactiae* น้อยที่สุดคือ 0.0001นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดประมาณ 200 คู่เบส มีความชัดเจน

3. การตรวจสอบวิธีพีซีอาร์โดยใช้ คู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD พบว่ามีความจำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* และการใช้ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R พบว่ามีความจำเพาะกับ *28S rRNA* ของเลือดปลานิล ที่ใช้เป็น internal control เพื่อจะใช้ตรวจสอบโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

4. การตรวจสอบจากวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในปลานิล ที่ถูกฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณ1×10^1 CFU/ml พบว่า ภายใน 24 ชั่วโมงตรวจพบ 60% และในปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 1×10^2 CFU/ml ถึง 1×10^5 CFU/ml ตรวจพบเชื้อ 80 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบเชื้อ ในทุกกลุ่มการทดลองตลอด 7 วันทำการทดลอง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการพบเชื้อในกลุ่ม 1×10^1 CFU/ml เท่ากับ 80% และ ในกลุ่มอื่น ๆ สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้ง 100% โดยผลการทดสอบไคน์แสคว์พบว่าความเข้มข้นสูงขึ้นของเชื้อที่ฉีดในปลานิลมีผลต่อเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการตรวจพบเชื้อสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่อการตรวจโดยวิธีการการเพาะเชื้อในอาหารแบบแข็ง (TSA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลจากธรรมชาติและปลาชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานระบาดวิทยาของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในประเทศไทย

2. ควรมีการศึกษาพัฒนาไพรเมอร์ในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. iniae* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบแพรระบาดในปลานิลในประเทศไทย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ตรวจเพียงเชื้อ *S. agalactiae* เท่านั้นบางครั้งในการตรวจอาจไม่เพียงพอในการวินิจฉัยเชื้อที่ก่อโรคในปลานิลได้

3. ควรมีการศึกษาพัฒนาการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธีการพัฒนาเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น เทคนิค Dot blot ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสะดวกและง่ายกว่าการตรวจด้วยเทคนิคทางพีซีอาร์ แม้จะมีความไวน้อยกว่าพีซีอาร์ เพื่อเป็นการตรวจสอบเชื้อในขั้นต้นก่อนที่จะตรวจผลโรคโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

4. ควรอบรมและให้ความรู้เกษตรกรเกี่ยวกับโรคสเตรปโตคอคโคซิสเพื่อประโยชน์ในการจัดการดูแลฟาร์ม และบ่อเพาะเลี้ยง เพื่อลดปัญหาแพร่ระบาดของโรค และลดความเสียหายที่จะเกิดในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University