บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ปลานิล

2.1.1. ความเป็นมาของปลานิล

ปลานิลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis notilucus* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Cichlidae มีชื่อสามัญว่า Nile tilapia ปลานิลเป็นปลาพื้นเมืองในทวีปแอฟริกา และลุ่มแม่น้ำจอร์แดน พบทั่วไปตามห้วยหนอง คลองบึงของประเทศซูดาน (Philippart & Ruwet, 1982) และเข้ามาสู่ประเทศไทยในปี 2508 โดยเจ้าชาย อากิฮิโต มกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่นได้จัดส่งปลานิล 50 ตัว ทูลเกล้า ฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวต่อมาพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงมอบหมายให้กรมประมงเป็นผู้เผยแพร่ส่งเสริมให้มีการเลี้ยงปลานิล เพาะพันธุ์แจกราษฎร และปล่อยลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ (ปิยฉัตร ภมรสูตร, 2551) ปัจจุบันสามารถพบปลานิลได้ในแหล่งน้ำทั่วทุกภาคของประเทศ ปลานิลเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว มีความทนทานต่อโรค สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีและแพร่ขยายพันธุ์ได้ง่ายทั้งในที่เลี้ยงและแหล่งธรรมชาติ สามารถกินอาหารได้หลากหลายชนิด (พลชาติ ผิวเณร, คงภพ อำพลศักดิ์, ถาวร จีนหมิก, และชมพูนุท มรรคทรัพย์, 2547)

2.1.2. อนุกรมวิธานของปลานิล (Nelson, 2006)

Phylum: Chordata

Class: Actinopterygii

Order: Perciformes

Family: Cichlidae

Genus: *Oreochromis*

Species: *O. niloticus*

ปลานิลถูกจัดอยู่ในแฟมิลี่ Cichlidae ซึ่งประกอบด้วย 3 จีนัส คือ *Oreochromis*, *Sarotherodon* และ*Tilapia* ซึ่งแบ่งตามพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของแต่ละจีนัสกล่าวคือ จีนัส *Tilapia* จะมีการสร้างรัง และพฤติกรรมการดูแลตัวอ่อนภายในรัง แต่จะไม่มีการอมไข่ไว้ในปาก ขณะที่จีนัส *Sarotherodon* และ *Oreochromis* จะมีการอมไข่ที่ได้รับการผสมภายในปาก ซึ่งทั้งสองจีนัสมีความแตกต่างกันคือจีนัส *Sarotherodon* ทั้งตัวผู้และตัวเมียจะอมไข่ภายในปาก แต่จีนัส *Oreochromis* เฉพาะตัวเมียเท่านั้นที่อมไข่ภายในปาก (Thomas & Michael, 1999)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปลานิล เกษตรกรจึงสามารถเลี้ยงในน้ำกร่อยได้

2.1.5. ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

เนื่องจากคุณสมบัติที่สำคัญของปลานิลที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมและมีรสดี ปลานิลจึงเป็นที่นิยมบริโภคและเลี้ยงกันแพร่หลายกันทั่วโลกทั้งในทวีปเอเชียและอัฟริกา โดยเฉพาะในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนเพื่อใช้ทดแทนปลาเนื้อขาวชนิดอื่น ๆ ปลานิลจัดเป็นสัตว์น้ำที่มีผลผลิตมากเป็นอันดับ 9 ของผลผลิตสัตว์น้ำทั่วโลกที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง ทวีปเอเชียเป็นแหล่งผลิตใหญ่ของปลานิลคิดเป็นปริมาณ 80% ของผลผลิตทั้งหมด ประเทศจีนมีผลผลิตปลานิลสูงสุดร้อยละ 35 รองลงมาได้แก่ อินโดนีเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลานิลมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทั่วโลก เนื่องจากตลาดในสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และทวีปยุโรปขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สหรัฐอเมริกาเป็นประเทศที่มีการนำเข้าและบริโภคปลานิลอันดับหนึ่งของโลก ปลานิลจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลานิลในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณ 99,729 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,247.162 ล้านบาท ไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลานิลเพียงร้อยละ 5 ของผลผลิตทั้งหมด ฉะนั้นการเพาะเลี้ยงปลานิลในไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจากตลาดปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (สืบพงศ์ ฉัตรมาลัย และคณะ, 2549)

2.1.6. ปัญหาในการเพาะเลี้ยงปลานิล

การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วเนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่นิยมของผู้บริโภคเป็นอย่างมากทำให้ปัจจุบันเปลี่ยนไปเป็นแบบเชิงพาณิชย์มากขึ้นมีการขยายรูปแบบและพื้นที่การเลี้ยงซึ่งมีทั้งการเลี้ยงในบ่อดินและในกระชังตามแหล่งน้ำธรรมชาติจากการขยายตัวของการเลี้ยงทำให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคติดตามมา (ธีราภรณ์ มอไทสง, นิลุบล กิจอันเจริญ, เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดียว, และบัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล, 2548) เนื่องจากปัจจุบันผลผลิตปลานิลยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จึงเร่งเพิ่มกำลังการผลิตต่อหน่วยพื้นที่โดยมีการปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นมากในกรณีนี้หากฟาร์มใดขาดการจัดการที่ดีจะเป็นผลให้สิ่งแวดล้อมในบ่อไม่เหมาะสมทำให้ปลาเกิดความเครียดเป็นสาเหตุให้เกิดโรคได้ง่ายซึ่งโรคของปลานิลที่สามารถพบบ่อยอันมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียดังนี้ (กรมประมง, 2545)

1) *Flexibacter columnarae*

พบในปลานิลที่เลี้ยงน้ำจืด โรคนี้มักพบในช่วงที่อากาศมีการเปลี่ยนแปลงกะทันหัน ในช่วงอากาศเย็น ในช่วงฝนตกหนัก และหลังจากการขนย้ายปลา ปลาที่พบว่ามีอาการตัวด่างมักตายในเวลาอันรวดเร็ว ถ้าไม่รีบทำการรักษาทันทีปลาจะตายหมดบ่อภายใน 24-48 ชั่วโมง

2) *Aeromonas* sp.

ปลาจะมีอาการดกเลือดตามตัว ท้องบวมมีเลือดปน น้ำเหลืองในช่องท้อง หรือมีแผลหลุม

3) *Streptococcus sp.*

ปลาจะมีอาการดาขุ่น และมีอาการดาบอดหรือตกเลือดในลูกตา

2.2. โรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococcosis)

2.2.1. สาเหตุของโรค

โรค Streptococcosis ส่งผลต่อปลาทั้งในธรรมชาติและปลาจากการเพาะเลี้ยงทั่วโลก (Garcia, Klesius, Evans, & Shoemaker, 2008) และมีการแพร่ระบาดซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียหายทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (Romalde & Toronzo, 1999) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดซึ่งคุณสมบัติชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ย้อมติดสี ม่วงหรือน้ำเงินในการย้อมสีแกรม (Yanong & Floyd, 2002)

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียมีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่หรือสายสั้น ๆ แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวมักพบเป็น สายยาว ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6-1μm เจริญได้ดีทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ทดสอบคาตาเลส (catalase) ให้ผลเป็นลบ (กิจการ สุภมาตย์ และคณะ, 2529) เชื้อ Streptococcus ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคของปลา สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ alpha-haemolytic, beta-haemolytic และ non- haemolytic (Romalde & Toronzo, 1999) ตามลักษณะการทำลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรีย β-Hemolysis จะเป็นการทำลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์รอบ ๆ โคโลนี ขณะที่ α-hemolysis จะเกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงบางส่วนจึงทำให้เห็นบริเวณรอบ ๆ โคโลนี เป็นสีเขียว ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง ขณะที่กลุ่มที่ไม่มีการทำลายเม็ดเลือดแดงจะอยู่ในกลุ่ม γ-hemolytic (Patterson, 1996)

2.2.2. กลุ่มปลาที่ติดเชื้อ

มีรายงานการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาหลายชนิดโดยพบทั้งในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม ดังตารางที่ 2-1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของปลาที่มีการรายงานการติดโรค *Streptococcus* sp.

ชนิดของปลา	อ้างอิง
Golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*)	(Robinson & Meyer, 1966)
Zebra danios (*Brachydanio rerio*)	(Ferguson, Morales, & Ostland, 1994)
Pcal danios (*Brachydanio albolineatus*)	(Ferguson et al., 1994)
White cloud mountain minnow (*Tanichthys albonubes*)	(Ferguson et al., 1994)
Rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*)	(Ferguson et al., 1994; Eldar, Bejanaro, & Bercovier, 1994)
Tilapia (*Oreochromis niloticus*)	(Pereira, Mian, Oliveira, Benchetrit, Costa, & Figueiredo, 2010)
Tilapia (*Sarotherodon* niloticus)	(Miyazaki ,Kubota, & Miyashita,1984)
Catfish (*Ictalurus punctatus*)	(Shoemaker, Camus, Bailiff, Steigerwalt, Morey, & Carvalho, 2007)
Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)	(Aoki, Takami, & Kitao, 1990)
Ayu (*Plecoglossus altivelis*)	(Romalde et al., 1999; Baeck, Kim, Gomez, & Park, 2006)
Japanese eel (*Anguilla japonica*)	(Romalde et al., 1999; Baeck et al., 2006)
Menhaden (*Brevoortia patronus*)	(Romalde et al., 1999; Baeck et al., 2006)
Striped mullet (*Mugil cephalus*)	(Romalde et al., 1999; Baeck et al., 2006)
Bluefish (*Pomatonus saltatrix*)	(Romalde et al., 1999; Baeck et al., 2006)
Striped bass (*Morone saxatilis*)	(Romalde et al., 1999; Baeck et al., 2006)
Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)	(Romalde et al., 1999; Baeck et al., 2006)
Turbot (*Scophthalmus maximus*)	(Romalde et al., 1999)
Sheepshead minnow	(Garcia et al., 2004)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรค streptococcosis ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. agalactiae* มีรายงานการทั่วโลกทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล โดยมีรายงานการพบในปลาโลมาปากขวด Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) (Evans et al., 2006) ปลา seabream ในฟาร์มเพาะเลี้ยงและ ปลา mullet จากในธรรมชาติ (Liza klunzingeri) ในประเทศคูเวต (Evans et al., 2002) ปลานิล St. Peter (Tilapia) (Eldar, Bejerano, & Bercovier, 1994) และรายงานการพบเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. iniae* ในโลมาและปลาชนิดต่าง ๆ จากธรรมชาติหรือการติดเชื้อจากการทดลอง (ภาพที่2-2) (Evans, Pasnik, Klesius, & Ablani, 2006)

Table 1 Dolphin and fish hosts naturally or experimentally infected with *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae and both *S. iniae* and *S.agalactiae* ‡* from freshwater or estuarine and marine environments.**

Freshwater	Estuarine/Marine	
Amazon dolphin (*Inia geoffrensis*)	Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)*	
Cichlidae	**Ariidae**	**Sciaenidae**
Blue tilapia (*Oreochromis aureus*)	Sea catfish (*Arius felis*)*	Red drum (*Sciaenops ocellatus*)
Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*)	**Carangidae**	Spot (*Leiostomus xanthurus*)*
Tilapia hybrid (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)‡*	Yellowtail (*Seriola quinqueradita*)‡*	Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)*
Red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*)‡*	**Clupeidae**	Silver trout (*Cynoscion nothus*)*
Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) ‡*	Gulf menhaden (*Brevoortia patronus*)*	Sea trout (*Cynoscion regalis*)*
Tilapia spp. unspecified (*Oreochromis spp.*)*	**Fundulidae**	Common mackerel (*Scomber japonicus*)
Red Tilapia tetrahybrids (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis* x *O. niloticus* x *O. aureus*)*	Gulf killifish (Fundulus grandis)*	Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*)
Centrarchidae	**Dasyatidae**	**Serranidae**
Bluegill (*Lepomis macrochirus*)*	Stingray (*Dasyatis sp.*)*	Brown spot grouper (*Epinephelus coioides*)
Green sunfish (*Lepomis cyanellus*)*	**Haemulidae**	European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)
Cyprinidae	Grunt (*Haemulidae sp.*)	
Sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*)*	Black margate (*Anisotremus sp.*)	**Siganidae**
Red-tail Black shark (*Epalzeorhynchos bicolor*)	Lined piggy (*Pomadasys jubelini*)	Marbled spinefoot (*Siganus rivulatus*)
Rainbow shark (*Epalzeorhynchos erythrurus*)	**Kyphosidae**	Dusky spinefoot (*Siganus fuscescens*)
Golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*)*	Bermuda sea chub (*Kyphosus sectatrix*)	Whitespotted spinefoot (*S. canaliculatus*)
Zebrafish (*Danio rerio*)	**Latidae**	
Moronidae	Barramundi (*Lates calcarifer*)	**Sparidae**
Hybrid striped bass/ Sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*)	**Lutjanidae**	Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) ‡*
Mugilidae	Snapper (*Ocyurus chrysurus*)	Pinfish (*Lagodon rhomboids*)*
Gray mullet (*Mugil cephalus*)	**Moronidae**	**Stromateidae**
Plecoglossidae	Striped bass (*Morone saxatilis*)*	Silver pomfret (*Pampus argenteus*)*
Ayu (*Plecoglossus altivelis*)	**Mugilidae**	**Synodontidae**
Salmonidae	Borneo grouper (*Liza macrolepis*)	Lizard fish (*Synodus variegates*)
Amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus* var. *macrostomus*)	Klunzingeri mullet (*Liza klunzingeri*)*	
Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)‡*	Striped mullet (*Mugil cephalus*)*	
Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)	**Paralichthyidae**	
Terapontidae	Japanese/ Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)	
Jade Perch/Barcoo grunter (*Scortum barcoo*)	**Pomatomidae**	
Ictaluridae	Bluefish (*Pomatomus saltatrix*)*	
Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ‡*	**Scaridae**	
	Parrot fish (*Sparisoma aurofrenatum*)/ (*S. viride*)	

ภาพที่ 2-2 ปลาชนิดต่าง ๆ ที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. iniae* จากธรรมชาติหรือจากการทดลอง (Evans, Klesius, & Shoemaker, 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบโรค Streptococcosis ครั้งแรกในปี 2529 ในปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmoratus*) โดย กิจการ สุภมาตย์ และคณะ (2529) รายงานการพบเชื้อในปลาบู่ทรายเป็นชนิด Alpha heamolytic streptococcus และนเรศ ช่วนยุก และคณะ (2548) สามารถแยกเชื้อ *S. agalactiae* ได้จากปลานิล (*Oreochromis notilucus*) ที่เลี้ยงในกระชัง และในบ่อดิน จังหวัดสุราษฎร์ธานีได้ นอกจากนี้ Maisak, Patamalai, Amonsin, and Wongtavatchai (2008) รายงานการพบเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

2.2.3. อาการของโรค และพยาธิสภาพ

ปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยทั่วไปจะมีอาการคล้ายคลึงกันแต่จะมีความแตกต่างกันบ้างก็ขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด เช่น ชนิดของปลา ปริมาณเชื้อที่ได้รับ และช่องทางการได้รับเชื้อของปลา อาการโดยทั่วไปของปลาที่ได้รับเชื้อ คืออาการตาโปน (exophthalmia) และอาการตกเลือด (haemorrahage) บริเวณซี่เหงือก และมีการคั่งของเม็ดเลือดแดงที่บริเวณฐานครีบพบอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) เยื่อหุ้มช่องท้องอักเสบ (peritonitis) และยังมีอาการเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) อีกด้วย (Neely, Pfeifer, & Caparon, 2002)

Evans et al. (2002) ได้ศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *S. agalactiae* ในปลากระบอก (mullet) และปลาซีบรีม (seabream) พบการแสดงพฤติกรรมผิดปกติของปลา คือ การว่ายน้ำควงสว่าน ลอยตัวอยู่ที่ผิวน้ำ เกิดความผิดปกติของตา ตาขุ่น โปน และมีอาการตกเลือดภายในลูกตา มีการตกเลือดบริเวณกล้ามเนื้อ บริเวณปลาและปลายจมูก แผ่นปิดเหงือกและครีบ พบว่ามีปลาบางตัวไม่แสดงลักษณะอาการภายนอก แต่มีอาการตกเลือดภายในและ การคั่งของของเหลวในช่องท้อง

การทดลองชักนำให้มีการติดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ได้จากปลาโลมาปากขวด (bottlenose dolphin) ในปลานิล โดยการฉีดเข้าที่ช่องท้องพบว่า ภายหลังจาก 6 วันที่ทำการทดลอง พบว่าปลามีความผิดปกติทางพฤติกรรม และไม่ทานอาหาร สีปลามีการเปลี่ยนแปลง และเป็นสาเหตุของการตายของปลานิล 90 เปอร์เซ็นต์ (Evans et al., 2006)

Garcia et al. (2008) ได้ทำการทดลองชักนำให้มีการดิดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ได้จากวัว ในปลานิลกลุ่มละ 10 ตัว พบว่า เชื้อ *S. agalactiae* ไอโซเลตจากวัวนั้นไม่มีความสามารถที่จะก่อโรคได้ในปลานิล

ดริญญา จันทวรรณ, นนทวิทย์ อารีย์ชน, และประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ (2550) พบว่า เชื้อ *S. agalactiae* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิของปลานิล สภาพในเนื้อเยื่อตับ ไต และ ม้าม โดยพบ melanomacrophage กระจายอยู่ มีเม็ดเลือดขาวแทรกตัวอยู่เป็นจำนวนมาก มีเลือดออกภายในเนื้อเยื่อ (haemorrhage) เซลล์ตับเกิดการเสื่อม (vacuolar degeneration) และตาย สมองและเยื่อหุ้มสมองเกิดการอักเสบ (meningo- encephalitis)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นเรศ ช่วนยุก และคณะ (2548) จากการศึกษาการชักนำให้การติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลแดงแปลงเพศ โดยฉีดเข้าที่ช่องท้องปริมาณ $10^1 - 10^8$ cfu พบว่าทำให้ปลาตาย 20-90 % ปลาที่ติดเชื้อส่วนใหญ่แสดงอาการให้เห็นภายใน 7 วัน แต่ก็มีบางตัวที่ไม่มีอาการภายนอกของโรคปรากฏให้เห็น อาการผิดปกติของปลานิลแดงแปลงเพศที่แสดงให้เห็นคือ ลำตัวสีซีด ท้องบวม ตาโปนและขุ่นข้างหนึ่งหรือสองข้าง ปลาจะมีอาการเซื่องซึมลอยอยู่ที่ผิวน้ำ เสียการทรงตัว ว่ายน้ำแบบควงสว่านและตายในที่สุด อวัยวะภายในมีการติดเชื้อจะมีม้ามโต ตกเลือดและมีของเหลวในช่องท้อง และตับมีสีซีด ค่าองค์ประกอบของเลือดเช่น ฮีมาโตคริต พาสมาโปรตีนและปริมาณเม็ดเลือดมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในปลาที่ใกล้ตาย และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบการอักเสบของเนื้อเยื่อและการเกิดกรานูโลมาของอวัยวะที่ติดเชื้อ

3. การจำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.1. การย้อมสีแกรม (Bartholomew & Mittwer, 1952)

เทคนิคการย้อมแกรมเทคนิคพื้นฐานเบื้องต้นในการจัดจำแนก เทคนิคย้อมแกรมเป็นการแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ตามลักษณะของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ขั้นแรกแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบจะถูกย้อมติดสี Crystal violet และ Iodine จะสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นแอลกอฮอล์จะล้างสี Crystal violet ออกไปพร้อมกับชั้นไขมันของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ เมื่อย้อมสีอีกครั้งด้วยสี Safranin O ทำให้ผนังเซลล์ที่เหลือติดสีแดงชมพู ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงินม่วงจาก Crystal violet เนื่องจากผนังเซลล์ไม่ได้ถูกทำลายโดยแอลกอฮอล์

3.2. Catalase test (คู่มือปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์, 2547)

ใช้แยกแบคทีเรียในกลุ่มของเชื้อ *Staphylococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. เนื่องจากเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) ให้เป็นน้ำและออกซิเจนดังสมการ

$$2H_2O \longrightarrow 2H_2O + 2\,O_2$$

3.3. Haemolysis test (คู่มือปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์, 2547)

เชื้อ Streptococcus sp. มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 แบบดังนี้

I. β-hemolysis เป็นการสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ทำให้เกิดลักษณะใสอยู่รอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย

2. α-hemolysis เป็นการสลายเม็ดเลือดแดงในอาหารเพียงบางส่วนทำให้เกิดลักษณะสีเขียวรอบโคโลนี

3. γ-hemolysis ไม่มีการสลายเม็ดเลือดแดงจึงไม่พบการเปลี่ยนแปลง

3.4. Bacitracin susceptibility test

(คู่มือปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์, 2547)

ใช้แยกเชื้อในกลุ่ม Streptococcus กลุ่ม A ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความไวต่อสาร bacitracin ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง Streptococcus กลุ่ม A กับ beta-haemolytic streptococcus ได้

3.5. Optochin test (คู่มือปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์, 2547)

ใช้แยกเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* เนื่องจากสาร optocin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. pneumoniae* ได้แต่ไม่สามารถยับยั้ง alpha-haemolytic *Streptococci* ได้

3.6. CAMP test (Smith, 2007)

เป็นการทดสอบเพื่อแยก Group B streptococci โดยอาศัยคุณสมบัติพิเศษของเชื้อชนิดนี้คือสามารถให้ CAMP factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถแพร่ กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวดเร็ว ทนต่อความร้อน และสามารถทำปฏิกิริยาเสริมฤทธิ์กับ beta - toxin จาก S.aureus ซึ่งมีผลให้เม็ดเลือดแดงแกะและเม็ดเลือดแดงวัว แตกอย่างรวดเร็ว

4. การจำแนกเชื้อ *S.agalactiae* ทางชีวโมเลกุล

4.1 หลักการและความรู้พื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์

Polymerase Chain Reaction (PCR) มีรายงานครั้งแรกใน American Society of Human Genetics Conference ในปี 1985 โดย Karry Mullis จากนั้นได้มีการปรับปรุงกรรมวิธี และการดัดแปลงให้เกิดเทคนิคชั้นสูง และการประยุกต์ใช้ประโยชน์ อย่างกว้างขวาง หลักการพื้นฐานของพีซีอาร์มีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้ มีความสามารถที่จะเพิ่มจำนวนยีนได้หลายล้านเท่าโดยการเพิ่มปริมาณยีนในหลอดทดลอง(in vitro) โดยหลักการที่ นำดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้เพิ่มขึ้น (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536) หลักการพื้นฐานของพีซีอาร์ตั้งต้นจาก

4.1.1 ดีเอ็นเอ สำหรับใช้เป็นต้นแบบ (DNA Templatc) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (Double Stranded DNA) หรือ สายเดี่ยว (Single Stranded DNA)

4.1.2 ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอตั้งต้น จะเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ

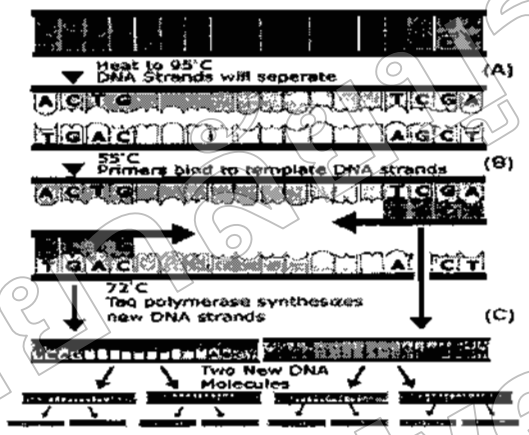
4.1.3 นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP dCTP dGTP และ dTTP

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่

4.1.4 บัฟเฟอร์ และเกลือ $MgCl_2$ และ KCl ที่เหมาะสม การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นเมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหมุนเวียนอยู่ ณ อุณหภูมิ 3 ขั้นตอนคือ Denaturation, Annealing และ Extension

4.1.5 เอนไซม์โพลีเมอเรส (Enzyme Polymerase)



ภาพที่ 2-3 แผนภาพแสดงขั้นตอนของ PCR

(ที่มา: http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04etta/background/dna/dna.html)

4.2. ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

4.2.1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่เกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double helix) แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว (two single stands) อยู่เป็นอิสระทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

4.2.2. Annealing ไพรเมอร์ทั้ง 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับปลาย 3' (3'-end) ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละสายเข้าไปจับที่บริเวณนิวคลีโอไทด์คู่สมบนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing site) จะเกิดขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส

4.2.3. Extention เป็นขั้นตอนการเพิ่มขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์และขยายขนาดจากทิศทาง 5' ไป 3' โดยเอนไซม์ taq polymerase (วัชรี อัตตทิพพหลคุณ, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.3 เทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ (Multiplex PCR)

เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานโดยสามารถเพิ่มขยายหลาย ๆ target ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันแต่ละคู่ไพรเมอร์ต้องออกแบบไม่ให้เป็นคู่สม (complement) กัน และผลผลิตจากวิธีการพีซีอาร์ต้องมีขนาดต่างกันเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรริซิส ได้ข้อจำกัดของเทคนิคนี้ต้องปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้สามารถเพิ่มขยายทุก ๆ target ดีเอ็นเอได้ประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน (วัชรี อัตตทิพพหลคุณ, 2536)

4.4 เครื่อง Themocycler

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำพีซีอาร์ซึ่งถูกประดิษฐ์เป็นครั้งแรกในปี 1986 ในปัจจุบัน เครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัท ผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนักระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25-40 รอบจะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีการอะกาโรสอิเล็กโทรโฟลิซิสเจล (Agarose Gel Electrophoresis) (ความรู้พื้นฐานทางพีซีอาร์, ม.ป.ป.)

4.5. วิธีการอะกาโรสอิเล็กโทรโฟลิซิสเจล(Agarose Gel Electrophoresis)

อะกาโรส (Agarose) เป็นสายพอลิเมอร์ ของ D-galactose และ 3,6-anhydro-L-galactose เมื่อเตรียมแผ่นเจลโดยต้มสารละลายอะกาโรสในบัฟเฟอร์แล้วเทลงในถาดเตรียมเพื่อให้แข็งตัวเมื่อเย็นจะได้เจลที่มีรูพรุนใหญ่ จึงใช้แยกสารที่มีขนาดใหญ่ เช่นกรดนิวคลีอิกซึ่งขนาดรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส (เมื่อความ เข้มข้นสูงรูพรุนจะเล็กลง) เมื่อให้สนามไฟฟ้าที่ pH ธรรมชาติ (natural pH) โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะมีประจุลบ และเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยความเร็วที่ขึ้นกับขนาดโมเลกุล (molecular size) และโครงรูป (conformation) กรดนิวคลีอิกขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่ และถ้าขนาดเท่ากันแต่มีรูปร่างต่างกันจะมีอัตราเร็วต่างกัน โดยลำดับของความเร็วในการเคลื่อนที่ของแต่ละรูปแบบของกรดนิวคลีอิก
พบว่า supercoiled DNA > linear double stranded DNA > circular DNA

บัฟเฟอร์ที่ใช้ คือ Tris acetate (TAE) Tris borate (TBE) และ Tris phosphate (TPE) ที่ความเข้มข้น 50 mM pH 7.5-8.0 และมี EDTA เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ DNase ส่วนสีที่ใช้ย้อมเป็น fluorescent compound (aromatic cation) ที่จับกับ double stranded DNA โดยเข้าไปแทรกตัว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(intercalate) อยู่ระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกัน เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เมื่อฉายแสงยูวีจะให้ fluorescence มองเห็นเป็นแถบของดีเอ็นเอเรืองแสง

2.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 การจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณสมบัติของโคโลนี

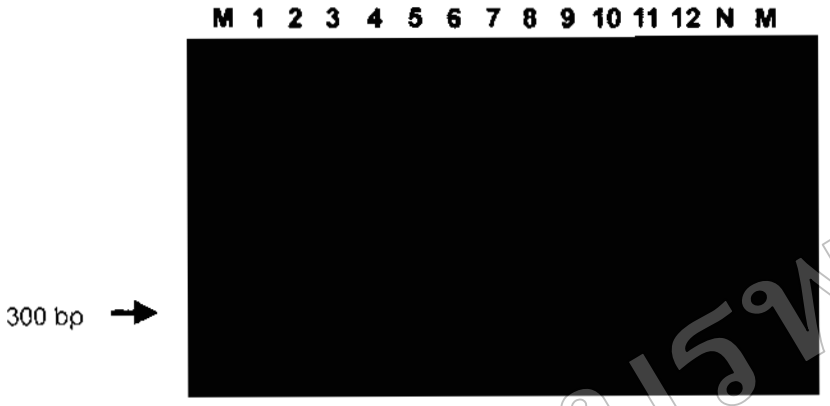
เชื้อ Streptoccocus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เป็นสาเหตุของโรค Streptococcosis ในสัตว์น้ำ สำหรับในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยง เชื้อ streptococcus ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1957 ที่ฟาร์มปลา rainbow trout ในประเทศญี่ปุ่น จากนั้นก็ได้มี การแพร่กระจายของเชื้อในวงกว้างทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน

Robinson and Meyer (1966) ได้ทำการทดลองแยกแบคทีเรียที่สกัดได้จากดับของปลาดุก (catfish) และเขี่ยเชื้อใน trypic soy agar (TSA) และใช้การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้การตรวจสอบ คาร์โบไฮเดรต 14 ชนิด เพื่อจำแนกว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรีย streptococcus การวิเคราะห์และจำแนกชนิดของแบคทีเรีย แต่การตรวจสอบโดยวิธีทางชีวเคมียังไม่สามารถจำแนกเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังไม่สามารถแยกเชื้อ *Streptococcus* sp.และ *Lactococcus* sp. ออกจากกันได้อีกด้วยต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการการแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ โดยวิธีทางชีวเคมี ซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็นกลุ่ม ๆ ของแบคทีเรียได้ถึงระดับสกุลของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการแยกแบคทีเรียในขั้นต้นเพื่อทำการระบุชนิดต่อไป (Holt, Krieg, Sneath, Stanley, & Williams, 1994)

2.2.2. การจำแนกเชื้อด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

การตรวจและแยกเชื้อ Streptococcus มีการพัฒนาให้มีความสามารถในการจำแนกได้เพิ่มขึ้นโดยใช้วิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) และออกแบบ primer ที่มีลำดับเบสสั้น ๆ ประมาณ 8-12 เบส Primer p14 (5′GATCAAGTCC) และเมื่อนำมาแยก DNA โดยวิธี electrophoresis จะทำให้เกิด แถบ DNA ที่มีขนาดไม่เท่ากันในแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าปรากฏแถบ DNA ขนาด 750 คู่เบส ทำให้สามารถจำแนกเชื้อ streptococcus กลุ่ม A ได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น (Neeman, Kellcr, Barzilai, Korenman, & Sela, 1998)

การแยกแบคทีเรียกลุ่ม Streptococcus โดยเทคนิค PCR และทำโการออกแบบ specific primers จากบริเวณ 16S DNA [5′CTAGAGTACACATGTACT(AGCT)AAG-3′] และ (5′-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3′) ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อในกลุ่ม Streptococcus ซึ่งทำให้ได้แถบ DNA ที่มีขนาด 300 คู่เบส ปรากฏในเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* (ภาพที่ 2-3) (Zlotkin, Hershko, & Eldar, 1998)



ภาพที่ 2-4 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 300 คู่เบสของ เชื้อ *S. iniae* (Zlotkin et al., 1998)

Klesius et al. (2006) ได้พัฒนาการวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วโดยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี้ ใช้ตรวจสอบเชื้อ *S. iniae* วิธีการหลากหลายวิธีได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้การตรวจสอบเป็นไปได้อย่างรวดเร็วมีความแม่นยำมากขึ้นกว่าการตรวจสอบโดยวิธีทางชีวเคมีและการใช้สัณฐานวิทยาแบบเดิม โดยการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลรวมถึงวิธีการทางดีเอ็นเอและการพัฒนา randomly amplified polymorphic DNA หรือ RAPD วิธีการ restriction fragment length polymorphism RFLP วิธีการ amplified fragment length polymorphism (AFLP) และการหาลำดับเบสของจีโนมทั้งหมดของเชื้อเป็นต้น

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ Polymerase chain reacttion (PCR) เริ่มมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางไพรเมอร์จำเพาะที่มาจากชิ้นส่วนของยีนหรือดีเอ็นเอประสบความสำเร็จในการจำแนกเชื้อ *S. iniae* และ เชื้อ *S. agalactiae* ที่ติดเชื้อในปลา (Mata et al., 2004) โดยเป้าหมายของไพรเมอร์ที่มีการศึกษาคือ *16S rRNA, 23S rRNA* และ *16S-23S rRNA* intergenic spacer, DNA gyrase, superoxide dismutase และ lactate oxidase genes พีซีอาร์และการหาลำดับเบสของจีโนม DNA-DNA hybridisation ถูกใช้ในการจำแนกเชื้อ *S. agalactiae*

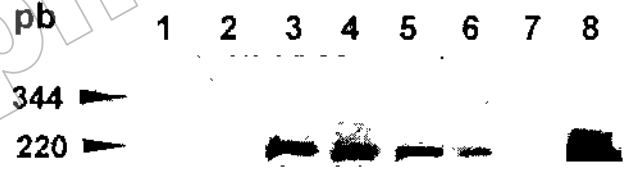
นิลุบล กิจอันเจริญ และคณะ (2548) ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในปลานิลที่เป็นโรคสเตรปโตคอคโคซิส ไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบ คือ Fstrep และ Rstrep ซึ่งออกแบบจากลำดับเบสส่วน *16S rDNA* ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้ฐานข้อมูลใน NCBI homepage และการจัดลำดับเบสจาก ClustalW โดยใช้เชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ ATCC 29177 และ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ KU 48021 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิล โดยวิธี standard phenol-chloroform นำมาทดสอบกับไพรเมอร์ Fstrep และ Rstrep ที่สร้างขึ้น

ผลการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ทั้งสองที่ออกแบบมาจากส่วนของ 16S rDNA ความจำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* เมื่อใช้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Fstrep และ Rstrep 5.0 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ Annealing ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจำนวนรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 29 รอบ สามารถสังเคราะห์ได้ดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาดประมาณ 350 คู่เบส ในการนำไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นนี้มาทดสอบความจำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลที่เป็นโรคสเตรปโตคอคโคซิส ในจำนวน 36 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากที่ต่าง ๆ พบว่าเฉพาะ *S. agalactiae* ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดที่ต้องการ และมีความแตกต่างกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบในปลานิลซึ่งนำมาทดสอบเปรียบเทียบกัน

Matinaze, Harel, and Gottschalk (2001) ได้มีการพัฒนาวิธีการที่จำเพาะในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากน้ำนมของวัว โดยวิธีการนี้ใช้เทคนิคทางพีซีอาร์โดยการใช้ ไพรเมอร์ที่จำเพาะและ ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ จาก *16S rRNA* พิสูจน์ตรวจโดยใช้ 147 ไอโซเลตของ *S. agalactiae* จากวัวและมนุษย์ และอีก 17 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อ *S. agalactiae* ในการทดสอบพบว่าเทคนิคพีซีอาร์นี้มีความจำเพาะสูงสามารถตรวจพบเชื้อในปริมาณน้อยสุดคือ 100 cfu/ml (ภาพที่ 2-4)



ภาพที่ 2-5 แผนภาพแสดงความไวของเทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากน้ำนมวัว ปริมาณต่ำสุดคือ 100 cfu/ml (ช่องที่ 6) (Matinaze et. al., 2001)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University