ความต้านทานโรคและการค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

Disease Resistance and Identification of Immune Genes Related to Streptococcosis Resistance in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

อนงค์ นิ่มละมัย[1*] ปิยะพงค์ โชติพันธุ์[1] สถาพร ดิเรกบุษราคม[1] และสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี[1]

Anong Nimlamai[1*] Piyapong Chotipuntu[1] Sataporn Direkbusarakom[1] and Suwit Wuthisuthimethavee[1]

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

*Corresponding author, e-mail: anongni@gmail.com

บทคัดย่อ

การทดสอบความต้านทานโรคและการค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล ในปลาชุดที่ 1 ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อปลานิลขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 8.56±4.37 กรัม พบว่าจำนวนแบคทีเรีย 2.43×10^4 CFU/ml ทำให้ประชากรปลานิลที่ใช้ในการทดสอบตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ในระยะเวลา 14 วัน ในปลาชุดที่ 2 ทดสอบการต้านทานโรค โดยฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 2.43×10^4 CFU/ml ที่ปลาขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 9.74±8.16 กรัม จำนวน 8 แหล่งๆ ละ 100 ตัว สังเกตอาการของปลาทดลองเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ปลานิลที่มาจากแหล่งต่างกันมีอัตรารอดต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือ ปลานิลจากฟาร์ม TF1, TF5, TF2, TF6, TF3, TF4, TF7 และ TF8 มีอัตรารอดเท่ากับ 82.80±0.38 %, 77.40±0.42 %, 76.00±0.43 %, 68.40±0.48 %, 61.00±0.49 %, 31.00±0.47 %, 16.80±0.38 % และ 10.10±0.30 % ตามลำดับ จากนั้นจึงนำตัวอย่างปลาที่ได้จากการทดลองชุดนี้ไปตรวจหายีนที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสด้วยเทคนิค PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) โดยเลือกกลุ่มที่มีอัตรารอดตายมากที่สุด 2 แหล่ง และมีอัตรารอดตายน้อยที่สุด 2 แหล่ง ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาสกัด genomic DNA แล้วทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์จำเพาะของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า PCR product ของยีน 11 ชนิด ได้แก่ BPI/LBP, TCRα, MHC class IIβ, NOD1, transferrin, IgM heavy chain, CD8, TCRβ, IL8, granzyme และ hepcidine มีขนาดเท่ากับ 121, 148, 207, 207, 209, 300, 395, 407, 408, 447 และ 488 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP) พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างปลากลุ่มตายและกลุ่มรอดตายของยีน BPI/LBP, TCRα, MHC class IIβ, NOD1, transferrin, IgM heavy chain, CD8, TCRβ, IL8 และ hepcidine ไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในยีน granzyme การศึกษาครั้งนี้ คาดว่า granzyme เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์

กับการต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล และระดับความต้านทานโรคจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มประชากร

คำสำคัญ: ปลานิล โรคสเตรปโตคอคโคซิส ความต้านทานโรค ยีน

Abstract

Streptococcosis resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was tested by intramuscular injection of *Streptococcus agalactiae* into 8.56±4.37 g fish. Fish mortality was counted 14 days after injection. The LD_{50} was obtained at 2.43×10^4 CFU/ml. The bacteria at the concentration of 2.43×10^4 CFU/ml was then injected into the fish of an average weight of 9.74±8.16 g. The tested fish were obtained from 8 different stations each of 100 fishes. The result showed that fish of different sources exhibited different degree of disease resistance in term survival rate ($P<0.05$). The survival rates were observed at 82.80±0.38 %, 77.40±0.42 %, 76.00±0.43 %, 68.40±0.48 %, 61.00±0.49 %, 31.00±0.47 %, 16.80±0.38 % and 10.10±0.30 % in fish from stations TF1, TF5, TF2, TF6, TF3, TF4, TF7 and TF8, respectively. Gene related to diseases resistance by PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) was then investigated using the experimental fish from the previous study. A total of 40 fishes from the stations of 2 highest mortalities and 2 highest survival rates were used for genomic DNA extraction. The genomic DNA was then extracted and subjected to polymerase chain reaction (PCR) using specific primers of the immune genes. The PCR products of 11 immune genes were observed including BPI/LBP, TCR α, MHC class II β, NOD1, transferrin, IgM heavy chain, CD8, TCR β, IL8, granzyme and hepcidine with the sizes of 121, 148, 207, 207, 209, 300, 395, 407, 408, 447 and 488 base pairs, respectively. The differences of DNA band were examined on nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using single strand conformation polymorphism (SSCP) technique. It was found that bands of 10 genes showed no difference in pattern including BPI/LBP, TCR α, MHC class II β, NOD1, transferrin, IgM heavy chain, CD8, TCR β, IL8 and hepcidine. But the pattern of granzyme gene showed different bands. Granzyme gene may be related to streptococcosis resistance in Nile tilapia. Disease resistance to streptococcosis of the fish varies according among population.

Keywords: Nile tilapia, streptococcosis disease, disease resistance, gene

คำนำ

ปัจจุบันปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญที่สุดต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยโดยในปี 2554 มีปริมาณการส่งออก 11,911 ตัน มูลค่า 748 ล้านบาท (Fishco, 2013: online) ซึ่งมีมูลค่ามากที่สุดถ้าเทียบกับสัตว์น้ำจืดชนิดอื่น เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย ขยายพันธุ์รวดเร็ว เป็นที่ต้องการของตลาด ประกอบกับหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนมีการส่งเสริม พัฒนาระบบการเลี้ยง รวมทั้งปรับปรุงสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง จนปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอาชีพหลักกันเป็นจำนวนมากจนกลายเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เมื่อการเลี้ยงปลานิลมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นพร้อมๆ กับการเพิ่มกำลังการผลิตของเกษตรกรจึงส่งผลถึงสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้ปลานิลเกิดความเครียด อ่อนแอ และติดเชื้อได้ง่ายขึ้น โดย Kitancharoen *et al.* (2003) รายงานว่าตั้งแต่ปี 2543 ประเทศไทยต้องพบกับปัญหาการระบาดของโรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococcosis) อย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดความเสียหายในการเลี้ยงปลานิลอย่างมาก ซึ่งโรคสเตรปโตคอคโคซิสเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยปลาที่ติดเชื้อจะแสดงอาการว่ายน้ำไร้ทิศทาง ตาโปน ตามีสีขาวขุ่นเพียงข้างเดียวหรือทั้งสองข้าง สีตัวเข้ม ตกเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือกและฐานครีบ และทยอยตายในที่สุด ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพเพียงพอ

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาเกิดจากกลไกและกิจกรรมต่างๆ มากมายรวมทั้งการทำงานของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ยีน BPI/LBP ซึ่งเป็น antimicrobial peptide สามารถกำจัดได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Nam *et al.*, 2010) ยีน TCRα และ TCRβ เป็นกลุ่มของโปรตีนบนผิวของ T cell ทำหน้าที่ในการจดจำและจับกับแอนติเจน (Miracle *et al.*, 2001) ยีน MHC class IIβ เป็นยีนที่แสดงความเป็นแอนติเจน ทำให้ helper T cells สามารถจดจำหรือแยกแอนติเจนแปลกปลอมได้ (Yu *et al.*, 2010) ยีน NOD1 เป็น cytoplasmic pattern recognition receptor (PRR) สามารถจับได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ (Park *et al.*, 2012) ยีน transferrin ช่วยลดการติดเชื้อ กระตุ้นการทำงานของแมกโครฟาจ (macrophage) ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Sahoo *et al.*, 2009) ยีน IgM heavy chain ทำหน้าที่ในการจดจำเซลล์สิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจงและก่อให้เกิดผลในการทำลายแอนติเจนนั้น (Cui *et al.*, 2010) ยีน CD8 หรือ killer cells มีหน้าที่ทำลายเซลล์ที่ผิดปกติหรือเซลล์ที่ติดเชื้อจุลชีพ (Toda *et al.*, 2011) ยีน IL8 กระตุ้นการทำงานของ neutrophil T-lymphocyte และ basophil (Wangkahart *et al.,* 2008) ยีน granzyme ถูกสร้างมาจาก cytotoxic T lymphocyte เมื่อ cytotoxic T lymphocyte พบว่าเซลล์มีความผิดปกติ หรือเซลล์นั้นเป็นสิ่งแปลกปลอมก็จะปล่อยเอนไซม์ที่ชื่อว่า perforin และ granzyme มากำจัดสิ่งแปลกปลอม โดย granzyme ก็จะแพร่เข้าไปในเซลล์และกระตุ้นให้เกิดการทำลายเซลล์ในกระบวนการ apoptosis (Zelinskyy *et al.*, 2004) และยีน hepcidine เป็น antimicrobial peptide ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่สำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย มีการหลั่งออกมาจากตับในขณะที่มีการอักเสบ (Hsieh *et al.*, 2010)

เทคนิค PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) เป็นการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และเป็นเทคนิคที่สามารถเห็นความแตกต่างจาก

ลำดับเบสที่ต่างกันเพียงเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในซิ้นดีเอ็นเอ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบระดับความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคในกลุ่มประชากรของปลา และเพื่อค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคชนิดนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมปลาทดลอง

นำปลานิลที่ปลอดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* น้ำหนักประมาณ 10 กรัม จากหน่วยงานสังกัดกรมประมงและฟาร์มปลาเอกชนจำนวน 8 ชุด ได้แก่ ปลานิลจากจังหวัดอยุธยา (TF1, TF2) ปทุมธานี (TF3) เพชรบุรี (TF4) อุตรดิตถ์ (TF5) บุรีรัมย์ (TF6) และชุมพร (TF7, TF8) เลี้ยงในกระชังขนาด 1.5 × 3.0 เมตร ซึ่งแขวนกระชังไว้ในบ่อดิน โดยก่อนที่จะนำปลามาทดสอบ จะย้ายปลาจากกระชังมาเลี้ยงไว้ในตู้ทดลองขนาด 30 ลิตร เพื่อปรับให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพการทดลองเป็นเวลา 7 วัน โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง

2. การยืนยันชนิดของเชื้อ *S. agalactiae*

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* บริสุทธิ์สายพันธุ์ ST36 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยการนำโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาย้อมสีแกรม และศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มาตรวจสอบยีนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* คือ F1 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ IMOD (5'-ACCAACATGTGT TAATTACTC-3') (Martinez *et al*., 2001)

3. การเตรียมเชื้อ *S. agalactiae*

เหนี่ยวนำความรุนแรงของเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา18-24 ชั่วโมง นำมาละลายในน้ำที่มีเกลือผสมอยู่ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าการดูดกลืนแสง (OD) เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วฉีดเชื้อเข้าสู่ตัวปลานิลบริเวณกล้ามเนื้อ (intramuscular injection) ใต้โคนครีบหลัง และทำการแยกเชื้อจากปลาที่ตายนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน จากนั้นฉีดกลับเข้าสู่ตัวปลาใหม่อีก 2 ครั้ง แล้วนำเชื้อที่ได้ครั้งสุดท้ายละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำเชื้อเริ่มต้นที่ได้มาเจือจางให้ลดลง 10 เท่า (ten-fold serial dilution) แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยวิธี drop plating techniques (Collins and Lyne, 1976)

4. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50})

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^2 – 10^7 CFU/ml ในแต่ละระดับความเข้มข้นนำไปฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังของปลานิลในปริมาณที่เท่ากันทุกกลุ่ม คือ 0.2 มิลลิลิตร/ตัว รวมทั้งกลุ่มควบคุมฉีด

ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว ทดสอบกับปลานิลที่มีน้ำหนักเฉลี่ย8.56±4.37 กรัม ในตู้กระจกขนาด 30 ลิตร บันทึกข้อมูลการตายของปลาแต่ละวัน และนำข้อมูลมาคำนวณหาค่า LD_{50} ที่ระยะเวลา 14 วัน ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

5. การทดสอบความต้านทานโรคของปลานิล 8 แหล่ง

นำปลานิลชุดละ 100 ตัว ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 9.74±8.16 กรัม ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น LD_{50} เข้าทางกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร สังเกตอาการของปลาทดลองเป็นเวลา 14 วัน โดยปลาตัวที่ตายทุกตัวจะบันทึกวันที่ตาย ชั่งน้ำหนัก และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนปลาตัวที่รอดตายหลังจากฉีดเชื้อ 14 วัน นำไปแช่ในน้ำแข็งเพื่อทำให้ตายแบบไม่ทรมาน ทำการชั่งน้ำหนัก เก็บเนื้อเยื่อสมองของปลาที่ตายและรอดตายจากการทดลองนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์การติดเชื้อ

6. การค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสด้วยเทคนิค PCR-SSCP

ใช้ปลาจากแหล่งที่มีอัตรารอดตายมากที่สุด 2 แหล่ง และมีอัตรารอดตายน้อยที่สุด 2 แหล่ง โดยในปลาแต่ละแหล่งแบ่งเป็นปลาตายและปลารอดตายอย่างละ 10 ตัวอย่าง โดยเก็บเนื้อเยื่อสมองนำมาสกัด genomic DNA ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Wuthisuthimethavee (1999) ทำการยืนยันการติดเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F1 และ IMOD (Martinez *et al*., 2001) และใช้เทคนิค DNA pooling เพื่อลดจำนวนตัวอย่างโดยใช้ genomic DNA ของปลานิล 5 ตัวอย่าง รวมเป็น 1 pool แล้วนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์จำเพาะของยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล (Table 1) และนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยเทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP) โดยดูความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอบน nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต

Table 1 Primers of immune genes

Gene	Primer sequences (5′⟶ 3′)	Product size (bp)	References
BPI/LBP	GACCGTCAACGTGATGGCCCCGGT CTTTGTTGGCCTCTATGCTGGAGAG	121	Caipang *et al*., 2008
TCRα	TCATCAAAATCCAGGAAAACCTCCAGA CAGTCGCTGCAGCAGAGGAGAT	148	Taylor *et al*., 2005
NOD1	CCTTACACCCTGACCCCACC CTTTTTCCCCCCTCTCTCTTTC	207	Li *et al*.,2012
Granzyme	ACGTCGCTGATACCTGTCAAG ATGTGGTGGACTAGCCAAGTG	447	Janganan *et al*., 2009

Table 1 Primers of immune genes (continue)

Gene	Primer sequences (5′⟶3′)	Product size (bp)	References
Hepcidine	CGTTCAGTGTTGCAGTTGCAG GCAGCAAACTCCACAGATACC	488	Baoprasertkul *et al.*, 2009
MHC class IIβ	ATCTCGGGTGATCCTCCTCT TGGCAAGTTAGAAGGGATGG	207	GenBank access no. JN967618.1
Transferrin	TACCGAAGGTAACGGTCCAG GATGCGGACCACCTTACTGT	209	GenBank access no. DQ272465.1
IgMheavy chain	CCACTGGCCTGAAAGAGAAG TTTTTATTTTCCGCCGTGAC	300	GenBank access no. GQ871499.1
CD8 beta chain	ATCAGCCCTGAGAGCAGTGT CCCAGGATCATAGTGGATGG	395	GenBank access no.XM003450386.1
TCRβ	ATCACCAGCAGGCTGAGAGT CACGCTGTAGACGACCTTGA	407	GenBank access no. HM162889.1
IL8	TTTAGCGCTTCAGGCTTCAT GTGGGAGTTGGGAAGAATCA	408	GenBank access no. GQ355864.1

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan‘ s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

1. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50})

จากการยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ตามลักษณะสัณฐานวิทยา และการเตรียมเชื้อ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวครีม กลมนูน ขอบเรียบ โคโลนีมีขนาด 0.5 - 1 มิลลิเมตร สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ โดยจะเกิดวงใสรอบโคโลนี และเมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่าติดสีน้ำเงินอมม่วงของสีคริสตัลไวโอเลต ซึ่งเป็นสีแกรมบวก โดยเซลล์มีลักษณะกลมมีทั้งที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ อยู่เป็นคู่ แต่ส่วนใหญ่มักต่อกันเป็นสายโซ่สั้นๆ เมื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์พบว่าเชื้อมีความเข้มข้น 4.84×10^7 CFU/ml และจากการตรวจเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ได้ PCR product ที่ 220 คู่เบส และผลการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อที่ทำให้ปลานิลตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ที่ระยะเวลา 14 วัน มีค่าเท่ากับ 2.43×10^4 CFU/ml

2. การทดสอบความต้านทานโรคของปลานิล 8 แหล่ง

จากการทดสอบความต้านทานโรค ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 2.43 x 10^4 CFU/ml ของปลานิล 8 แหล่งคือ TF1, TF2, TF3, TF4, TF5, TF6, TF7 และ TF8 พบว่า อัตรารอดเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 82.80±0.38, 76.00±0.43, 61.00±0.49, 31.00±0.47, 77.40±0.42, 68.40±0.48, 16.80±0.38 และ 10.10±0.30 % ตามลำดับ ($P<0.05$) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สามารถแบ่งอัตรารอดของปลานิลออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีอัตรารอดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ปลานิลชุด TF1, TF2, TF3, TF5 และ TF6 และกลุ่มที่มีอัตรารอดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ปลานิลชุด TF4, TF7 และ TF8 และยังพบว่าน้ำหนักตัวมีผลต่ออัตราการรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยปลานิลกลุ่มตายและรอดตายมีค่าเท่ากับ 7.01±13.35 กรัม และ11.61±2.94 กรัม ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Survival rates of Nile tilapia (obtained from different sources) after 14 days of injection with 2.43 x 10^4 CFU/ml *Streptococcus agalactiae.*

Source	Survival rate (%)	Average weight of dead fish (g)	Average weight of surviving fish (g)
TF1	82.80±0.38^{a}	5.10±4.72^{a}	10.65±0.92^{a}
TF2	76.00±0.43^{ab}	7.39±5.69^{ab}	11.29±1.90^{a}
TF3	61.00±0.49^{b}	6.60±2.86^{ab}	11.15±3.95^{a}
TF4	31.00±0.47^{c}	7.17±1.35^{ab}	10.34±1.14^{a}
TF5	77.40±0.42^{ab}	7.20±3.95^{ab}	10.06±1.05^{a}
TF6	68.40±0.48^{ab}	7.07±2.89^{ab}	10.77±2.54^{a}
TF7	16.80±0.38^{cd}	8.59±0.78^{b}	14.15±2.13^{b}
TF8	10.10±0.30^{d}	6.98±1.35^{ab}	14.51±4.37^{b}
Average	-	7.01±13.35	11.61±2.94

Note: Different letters within columns (a, b, c, d) show significant statistical differences ($p<0.05$)

3. การค้นหายีนระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิส

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน พบ PCR product ของยีน BPI/LBP, TCRα, MHC class IIβ, NOD1, transferrin, IgM heavy chain, CD8, TCRβ, IL8, granzyme และ hepcidine ขนาด 121, 148, 207, 207, 209, 300, 395, 407, 408, 447 และ 488 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค SSCP เพื่อดูความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มปลาตายและกลุ่มปลารอดตายบน nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) พบว่าแถบดีเอ็นเอของยีน

BPI/LBP, TCRα, MHC class IIβ, NOD1, transferrin, IgM heavy chain, CD8, TCRβ, IL8 และ hepcidine ไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในยีน granzyme (Figure 1)

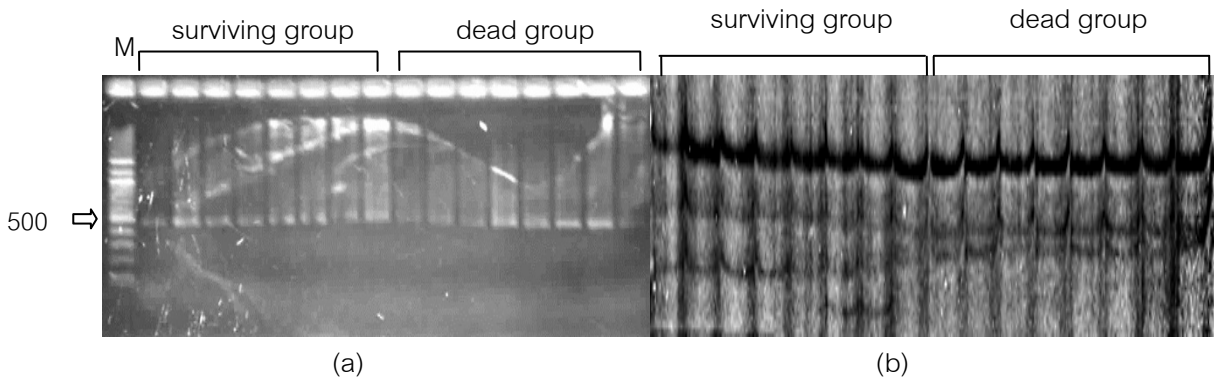

Figure 1 (a) PCR product of granzyme gene in 1% agarose gel with the size of 447 bp. (M = 100 bp DNA ladder)

(b) DNA patterns of granzyme gene of surviving group and dead group on nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

สรุปและวิจารณ์ผล

1. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50})

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในครั้งนี้สอดคล้องกับข้อมูลของ Inglis *et al.* (1993) ที่ระบุว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวครีม กลมนูน ขอบเรียบ โคโลนีมีขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร อีกทั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่ม beta-haemolytic streptococci เนื่องจากสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนค่า LD_{50} จากผลการทดลองครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 2.43×10^4 CFU/ ml ใกล้เคียงกับรายงานของ Wanman (2004) ที่รายงานว่าค่า LD_{50} ของปลากะพงขาวน้ำหนักเฉลี่ย 4.97±1.24 กรัม ที่ระยะเวลา 14 วัน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง มีค่าเท่ากับ 1.937×10^3 CFU/ml นอกจากนี้ Amal *et al.* (2008) พบว่าค่า LD_{50} ของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ส่งผลให้ปลานิลแดงและปลานิล GIFT ที่มีน้ำหนัก 85-100 กรัม ตายภายใน 24 ชั่วโมง คือ 3.0×10^{10} CFU/ml และ 3.0×10^7 CFU/ml ตามลำดับ Patterson *et al.* (2012) พบว่าจากการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เข้าช่องท้องของปลาม้าลายมีค่า LD_{50} เท่ากับ 10^2 CFU/ml ในขณะที่การฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อมีค่า LD_{50} เท่ากับ 10^4 CFU/ml ซึ่งความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ฉีดเข้าช่องท้องมักมีค่าต่ำกว่าที่ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ อาจเป็นเพราะว่าการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องจะทำให้เชื้อไปสู่อวัยวะเป้าหมายได้รวดเร็วกว่าการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อ

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อฉีดเชื้อในความเข้มข้น 2.43×10^4 CFU/ml เข้าทางกล้ามเนื้อให้กับปลานิลที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 9.74±8.16 กรัม พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลกลุ่มตายมีค่าน้อยกว่าปลานิลกลุ่มรอดตาย ชี้ให้เห็นว่าปลาที่มีขนาดใหญ่กว่ามีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดีกว่าปลาที่มีขนาดเล็กซึ่งมีอายุเท่ากัน สอดคล้องกับรายงานของ John and Larry (2011: online) ที่พบว่าปลาที่มีขนาดเล็กหรือปลา วัยอ่อนจะได้รับผลกระทบจากเชื้อโรคมากกว่าปลาที่มีขนาดใหญ่หรือโตเต็มวัย ความรุนแรงของเชื้ออาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง ในการศึกษาของ Suanyuk *et al*. (2005) โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เข้าช่องท้องของปลานิลแดงแปลงเพศ ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 89.54±18.12 กรัม จำนวน 4 ไอโซเลต พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่มีความรุนแรงสูงที่สุดมีค่า LD_{50} ที่ 10 วัน เท่ากับ 36 CFU/ml ส่วนเชื้อบริสุทธิ์ที่มีความรุนแรงน้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.2×10^7 CFU/ml ซึ่งความรุนแรงของเชื้อที่แตกต่างกันอาจเกิดจากชนิดและขนาดของปลาทดลองที่แตกต่างกัน และความรุนแรงของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่แตกต่างกันอาจเกิดจากช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างเชื้อ รวมถึงอวัยวะที่แยกเชื้อได้แตกต่างกันจึงส่งผลถึงความรุนแรงของเชื้อที่แตกต่างกันด้วย

2. การทดสอบความต้านทานโรคของปลานิลต่างกลุ่มประชากร

การศึกษาครั้งนี้พบความแตกต่างของอัตรารอดอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปลาจากกลุ่มประชากรที่ต่างกัน คืออัตรารอดตั้งแต่สูงสุด 82.80±0.38 เปอร์เซ็นต์ (จากจังหวัดอยุธยา) ถึงต่ำสุด 10.10±0.30 เปอร์เซ็นต์ (จากจังหวัดชุมพร) ชี้ให้เห็นว่าปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิส อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่อาจบอกได้ว่าปลานิลจากแหล่งใดมีความต้านทานโรคได้ดีกว่าแหล่งใดเพราะแหล่งที่มาไม่ได้เป็นตัวกำหนดกลุ่มประชากร ลักษณะของปลาที่ตายส่วนใหญ่มีอาการคือ ลำตัวมีสีดำคล้ำ เคลื่อนที่ช้า หรือลอยตัวนิ่งบริเวณพื้นของตู้ทดลอง ตกเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือก และมีอัตราการตายมากที่สุดระหว่างวันที่ 1 - 3 หลังจากการฉีดเชื้อซึ่งถือเป็นลักษณะการตายอย่างเฉียบพลัน (Acute) แม้ว่าปลานิลบางตัวจะไม่แสดงอาการป่วยภายนอกซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rasheed *et al*. (1984) ที่พบว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. ทำให้ปลาบุลมินเนาบางตัวตายโดยไม่แสดงอาการภายนอก

3. การค้นหายีนระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิส

จากการทดสอบด้วยเทคนิค SSCP พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในยีน granzyme เพียงยีนเดียว โดยแถบดีเอ็นเอในปลากลุ่มที่รอดตายและปลาตายแตกต่างกันชัดเจนแสดงว่าปลากลุ่มที่รอดตายมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งแตกต่างไปจากปลากลุ่มตาย แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเกิดความแตกต่างขึ้นตรงตำแหน่งใด ดังนั้นจึงควรมีการหาลำดับเบสของปลาทั้ง 2 กลุ่ม แล้วนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส และจากผลการทดสอบด้วยเทคนิค SSCP มักจะพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏเป็น 2 แถบ ซึ่งเป็นโฮโมไซกัส (homozygous) หรือ 4 แถบ ซึ่งเป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) (Barroso *et al.*, 1998) การศึกษาครั้งนี้คาดได้ว่า granzyme เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

คำขอบคุณ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

เอกสารอ้างอิง

Amal, A.M.N., Nur-Nazifah, M., Siti-Zarah, A., Sabri, M.Y. and Zamri-Saad, M. 2008. Determination of LD_{50} for *Streptococcus agalactiae* infections in red tilapia and gift. 8th International symposium on tilapia in aquaculture. 1245-1251.

Baoprasertkul, P., Somridhivej, B. and Somsiri, T. 2009. Expression of immune related genes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after infection of *Streptococcus agalactiae*. Research report. The Thailand Research Fund. Bangkok. 33 p. [in Thai]

Barroso, A., Dunner, S. and Canon, J. 1998. Technical note: detection of bovine kappa-casein variants A, B, C and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Journal of Animal Science. 76: 1535–1538.

Caipang, C.M.A., Hynes, N., Puangkaew, J., Brinchmann, M.F. and Kiron, V. 2008. Intraperitoneal vaccination of Atlantic cod, *Gadus morhua* with heat-killed *Listonella anguillarum* enhances serum antibacterial activity and expression of immune response genes. Fish and Shellfish Immunology. 24: 314-322.

Collins, C.H. and Lyne, P.M. 1976. Microbiological Method. 4*th*ed. Butterworth. Boston. USA.524 p.

Cui, M., Zhang, Q., Yao, Z., Zhang, Z., Zhang, H., and Wang, Y. 2010. Immunoglobulin M gene expression analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge. Fish and Shellfish Immunology. 29: 1060-1065.

Fishco.fisheries.go.th. The impact of European debt crisis with tilapia products. [Online] Available from http://fishco.fisheries.go.th /fisheconomic /Doc/ fishnews_136.pdf [2013, March 1]

Hsieh, J.C., YuPa, C. and Chen, J.Y. 2010. Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. Fish and Shellfish Immunology. 29: 430-439.

Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. 1993. Bacterial disease of fish. New York: Academic Press.

Janganan, A., Areechon, N. and Srisapoome, P. 2009. Molecular characterization and expression analysis of complementary DNA (cDNA) encoding granzyme gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) . Proceedings of 47th Kasetsart University annual conference: Fisheries .19-29. [in Thai]

John, A.P. and Larry, A.H. 2011. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. [Online] Available from http://books.google.co.th/books?id=zrn8QVr48iAC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false [2013, June 20]

Kitancharoen, N., Hanjawanit, C. and Suwanapeng, N. 2003. Developing of prevention and treatment for diseases occuring in cage-cultured tilapia in the northeast area. Research report. Khon Kaen University. Khon Kaen. 26 p. [in Thai]

Li, M., Wang, Q., Lu, Y., Chen, S., Li, Q. and Sha, Z. 2012. Expression profiles of NODs in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and channel catfish hemorrhage reovirus. Fish and Shellfish Immunology. 33: 1033-1041.

Martinez, G., Harel, J. and Gottschalk, M. 2001. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. [Short communication]. The Canadian Journal of Veterinary Research. 65: 68–72.

Miracle, A.L., Anderson, M.K., Litman, R.T., Walsh, C.J., Luer, C.A., Rothenberg, E.V. and Litman, G.W. 2001. Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. International Immunology. 13: 567-580.

Nam, B.H., Ahn, K.J., Kim, Y.O., Kong, H. J., Kim, W.J., Kim, H.S., Lee, H.J. and Kim, K.K. 2010. Molecular cloning and characterization of LPS-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein (LBP/BPI) from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 133: 256-263.

Park, S.B., Hikima, J.I., Suzuki, Y., Ohtani, M., Nho, S.W., Cha, I.S., Jang, H.B., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. and Jung, T.S. 2012. Molecular cloning and functional analysis of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Developmental and Comparative Immunology. 36: 680-687.

Patterson, H., Saralahti, A., Parikka, M., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., Rounioja, S. and Ramet, M. 2012. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. Developmental and Comparative Immunology. 38: 447-455.

Rasheed, V. and Plumb, J.A. 1984. Pathogenicity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. In Gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). Aquaculture. 37: 97-105.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. Simple method of estimating fifty percent endpoint. American Journal of Hygiene. 27: 493-497.

Sahoo, P.K., Mohanty, B.R., Kumari, J., Barat, A. and Sarangi, N. 2009. Cloning nucleotide sequence and phylogenetic analyses and tissue-specific expression of the transferrin gene in *Cirrhinus mrigala* infected with *Aeromonas hydrophila*. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases. 32: 527–537.

Suanyuk, N., Kanghear, H., Khongpradit, R. and Supamattaya, K. 2005. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Songklanakarin Journal of Science and Technology. 27: 307-319. [in Thai]

Taylor, I.S., Adam, B., Veverkova, M., Tatner, M.F., Low, C., Secombes, C. and Birkbeck, T.H. 2005. T-cell antigen receptor genes in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish and Shellfish Immunology. 18: 445-448.

Toda, H., Yabu, T., Shiba, H., Moritomo, T., and Nakanishi, T. 2011. Evaluating antigen-specific cytotoxicity of CD8+ T cells in fish by granzyme B-like activity. Veterinary Immunology and Immunopathology. 141: 168-172.

Yu, S., Ao, J. and Chen, X. 2010. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II α and β genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Molecular Biology Reports. 37: 1295-1307.

Wangkahart, E., Areechon, N. and Srisapoome, P. 2008. Molecular Cloning, characterization and expression analysis of a cDNA encoding interleukin-8 (IL-8) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Proceedings of 46th Kasetsart University annual conference: Fisheries. 22-32. [in Thai]

Wanman, C. 2004. Streptococcosis and its application of vaccine in Seabass (*Lates calcarifer* Bloch). Master's Thesis. Prince of Songkla University. Songkla. 169 p. [in Thai]

Wuthisuthimethavee, S. 1999. DNA marker technologies for biodiversity study in shrimp. Master's Thesis. Kasetsart University. Bangkok. 101 p.

Zelinskyy, G., Balkow, S., Schimmer, S. Schepers, K., Simon, M.M. and Dittmer, U. 2004. Independentroles of perforin, granzymes and fas in the control of friend retrovirus infection. Virology. 330: 365-374.