การติดเชื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ด้วย *Streptococcus agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก

Infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae* by Nares and Gills Inoculation

ศยามล รักศรี[1] รัชต์ ขัตติยะ[2] ศุกลรัตน์ บุญยยาตรา[2] และ ฏิลก วงศ์เสถียร[2*]

Sayamon Raksri[1] Rutch Khattiya[2] Sukolrat Boonyayatra[2] and Dilok Wongsathein[2*]

[1]หลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

[2]ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

[1]Graduate Program in Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50100

[2]Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50100

*Corresponding author: dilok.w@cmu.ac.th

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ *Streptococus agalactiae* ในปลาสามารถเกิดขึ้นได้จากการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำเข้าสู่ร่างกายปลาส่งผลให้ปลามีการป่วยและตายได้ การศึกษานี้เพื่อหาความเป็นไปได้ของการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลโดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก ปลานิลที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 30 ตัว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ในแต่ละการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มการทดลอง จำนวนปลา 10 ตัว/ตู้ และกลุ่มควบคุม จำนวนปลา 5 ตัว/ตู้ โดยทำการให้เชื้อด้วยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 3.5 x 10^7 CFU/ml เป็นเวลา 1 นาที ส่วนกลุ่มควบคุมทำการให้สารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl ด้วยวิธีการเดียวกัน สังเกตอาการ รอยโรคและอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างจากไต ส่วนหน้า ม้าม ตาและสมองของปลาที่ตายและรอดชีวิตทั้งหมด เพื่อยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและเทคนิคพีซีอาร์ จากผลการทดลองพบอัตราการตายในวิธีการให้ทางจมูก 10% แต่ไม่พบอัตราการตายในวิธีการให้ทางเหงือก พบการติดเชื้อของปลาที่รอดชีวิตด้วยวิธีการให้ทางจมูก 44.4% และวิธีการให้ทางเหงือก 100% ซึ่งปลาป่วยเริ่มแสดงอาการวันที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อ คือ สีผิวเข้ม ลอยตัวผิวน้ำ และ/หรือม้ามโต การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าจมูกและเหงือกอาจเป็นช่องทางหนึ่งที่สามารถทำให้ปลานิลเกิดการติดเชื้อ *S. agalactiae* ได้

คำสำคัญ: การติดเชื้อ วิธีการให้ทางจมูก วิธีการให้ทางเหงือก *Streptococcus agalactiae* ปลานิล

Abstract

Streptococcus agalactiae has been identified as a fish pathogen and could be transmitted through the water causing the morbidity and mortality. This study was conducted to demonstrate the potential *S. agalactiae* infection in Nile tilapia by nares and gills inoculation. Nile tilapia (n=30) were divided into 2 groups. The individual group (10 fish in each group) were inoculated into the nares or gills of each fish with 0.1 ml of bacterial concentration of 3.5 x 10^7 CFU/ml for 1 min. Five control fish

in each group were inoculated with sterile 0.9% normal saline solution in a similar manner. Clinical signs, lesions and mortality were monitored daily for 14 days post-inoculation. Samples from anterior kidney, spleen, eye and brain of all dead and surviving fish were confirmed by bacteriological and PCR techniques. The results showed the mortality of 10% and 0% in nares and gills inoculations, respectively. The percent infection was 44.4% and 100% in nares and gills inoculations, respectively. Moribund fish showed darkening skin, surface swimming and/ or splenomegaly at day 2 post-inoculation. The results of this study demonstrated that the nares and gills may be a potential route of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia.

Keywords: Infection, Nares inoculation, Gills inoculation, *Streptococcus agalactiae*, Nile tilapia

คำนำ

ปัจจุบันโรค Streptococcosis ในปลาเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นโรคระบาดที่พบได้ทั้งแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม (Evans *et al*., 2002) และมักพบในปลาหลายชนิดที่อยู่ในเขตอบอุ่นและร้อนชื้น (Evans *et al*., 2006) ในประเทศไทยพบการติดเชื้อครั้งแรกในปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmorata*) (Kasornchan *et al*., 1986) และมีรายงานการระบาดหนักทั่วภูมิภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะฤดูร้อน ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Streptococcus iniae* และ *Streptococcus agalactiae* ที่พบในปลานิล ปลานิลแดง ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (Kayansamruaj *et al*., 2014; Suanyuk *et al*., 2010) ซึ่งก่อความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ปลาเจริญเติบโตช้า คุณภาพผลผลิตลดลง และมีอัตราการตายสูงถึง 75% (Maisak *et al*., 2008) โดยปลาที่ติดเชื้อจะแสดงอาการและรอยโรคคือ ว่ายน้ำผิดปกติ สูญเสียการทรงตัว ลำตัวสีเข้ม ตาขุ่น/โปน มีของเหลวในช่องท้อง ม้ามโตและตับซีด (Ingils *et al*., 1993: Plumb, 1999; Austin and Austin, 2007)

การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคนั้นจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ การจัดการฟาร์ม ความหนาแน่นในการเลี้ยง คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม รวมไปถึงการเข้าก่อโรคของเชื้อในช่องทางต่างๆ และยังมีความเป็นไปได้ว่าช่องทางการเข้าก่อโรคของเชื้อเข้าสู่ปลาส่งผลให้ปลามีการติดเชื้อ ป่วยและตายได้ ซึ่งการติดเชื้อในธรรมชาติเกิดจากการปนเปื้อนในน้ำและแพร่ผ่านเข้าสู่ร่างกายทางช่องทางต่างๆ ของปลาได้โดยตรง Evans และคณะ (2000) รายงานว่ามีการติดเชื้อ *S. iniae* โดยวิธีการให้เชื้อทางจมูกในปลากะพงและปลานิล มีอัตราการตายถึง 98.3% และ 28.3% ตามลำดับ ซึ่งการติดเชื้อ *S. iniae* ยังสามารถพบในปลากะพงมีอัตราการตายสูงถึง 100% จากการให้เชื้อเข้าทางเหงือก (McNulty *et al*, 2003) นอกจากนี้มีการศึกษาการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการแช่ในปลานิล พบอัตราการตาย 10% (Soto *et al*., 2016) และวิธีการผสมเชื้อกับอาหารให้ทางปากในปลาหมอทะเล พบการติดเชื้อได้ถึง 100% (Delamare-Deboutteville *et al*., 2015) จากการศึกษาดังกล่าวมีความเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจจะเข้าก่อโรคสู่ปลาในช่องทางต่างๆได้เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยและการติดเชื้ออาจมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเชื้อ ชนิดของปลา สิ่งแวดล้อมหรือช่องทางการเข้าก่อโรคของเชื้อ ด้วย

เหตุนี้ทางผู้วิจัยเห็นถึงความสำคัญของการศึกษาหาความเป็นไปได้ของการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล โดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก เพื่อเข้าใจถึงช่องทางการติดเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวและสามารถเป็นแนวในการศึกษาการติดเชื้อ *S. agalactiae* ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*) เพศผู้ สายพันธุ์ จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ย 18.3±2.13 กรัม ความยาวเฉลี่ย 7.94±0.32 เซนติเมตร จำนวนปลาทั้งหมด 30 ตัว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก ในแต่ละการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มการทดลอง จำนวนปลา 10 ตัว/ตู้ และกลุ่มควบคุม จำนวนปลา 5 ตัว/ตู้ ทำการสุ่มปลาตรวจเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา โดยปลาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 43.7x38.8x45 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 44 ลิตร เลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ความหนาแน่นในการเลี้ยง 4.16 กรัม/ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำโดยการวัดอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำทุกวัน ทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ทุกๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง 14 วัน

การเตรียมเชื้อ *S. agalactiae*

เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลแดงป่วยด้วยโรค Streptococcosis ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผ่านการจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาทางจุลชีววิทยา จำแนกกลุ่มของเชื้อด้วยชุดทดสอบ Lancefield serogrouping test ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20 STREP และยืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ (bacterial passage) และทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ตาย 50% (LD_{50}) โดยการฉีดเข้าช่องท้องปลา (intraperitoneal injection) จากนั้นเตรียมเชื้อ *S. agalactiae* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เจือจางด้วยสารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Miles & Misra method (Miles *et al*., 1938) ได้ความเข้มข้นของเชื้อ 3.5×10^7 CFU/ml

การศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

การให้เชื้อโดยวิธีทางจมูก

สลบปลาโดยใช้น้ำมันกานพลูความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นให้เชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 3.5×10^7 CFU/ml ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร หยอดเข้าจมูกด้วย syringe กับ catheter ขนาด 24Gx3/4" ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีกด้าน (ปริมาตรและระยะเวลาทั้งหมดเป็น 0.1 มิลลิลิตร, 1 นาที) ส่วนกลุ่มควบคุมให้สารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl ด้วยวิธีการเดียวกัน

การให้เชื้อโดยวิธีทางเหงือก

สลบปลาและเปิดแผ่นปิดเหงือก จากนั้นให้เชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น $3.5x10^7$ CFU/ml ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร โดยการหยดเชื้อลงเหงือกด้วย auto pipette ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีกด้าน (ปริมาตรและระยะเวลาทั้งหมดเป็น 0.1 มิลลิลิตร, 1 นาที) ส่วนกลุ่มควบคุมให้สารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl ด้วยวิธีการเดียวกัน

สังเกตอาการ รอยโรคและบันทึกข้อมูลปลาตาย จากนั้นเก็บตัวอย่างจากไตส่วนหน้า ม้าม ตา และสมองของปลาที่ตายและรอดชีวิตทั้งหมด ยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาในแต่ละอวัยวะ และเทคนิคพีซีอาร์ด้วยการรวมตัวอย่าง (pool sample) โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะของเชื้อ *S. agalactiae* คือ V1 (5'-TTTGGTGTTTACACTAGACTG-3') และ V2 (5'-TGTGTTAATTACTCTTATGCG-3') ขั้นที่ 1 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ขั้นที่ 2 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ตามลำดับ (ทำขั้นที่ 2 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 3 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนสุดท้ายบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Meiri-Bendek *et al*., 2002)

การศึกษาครั้งนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง เพื่องานวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ใบอนุญาตที่ S20/2560 และ ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงาน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่รับ CMUIBC0560004

ผลการวิจัย

การติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูก

ผลทดลองพบอาการและรอยโรค คือ ลำตัวสีเข้ม ลอยตัวผิวน้ำ และ/หรือม้ามโต (Figure 1) ปลาเริ่มแสดงอาการป่วยในวันที่ 2 และตายในวันที่ 5 หลังได้รับเชื้อ จำนวน 1 ตัว จากการเก็บตัวอย่างจากของปลาตาย พบเชื้อที่ไตส่วนหน้า ม้าม ตา และสมอง จากการยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและเทคนิคพีซีอาร์ มีอัตราการตาย 10% ส่วนการเก็บตัวอย่างจากปลาที่รอดชีวิตพบการติดเชื้อจากการเก็บตัวอย่างได้จากสมอง คิดเป็น 33.3% จากการยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและ 44.4% จากเทคนิคพีซีอาร์ (Table 1, Figure 2) ส่วนกลุ่มควบคุมไม่พบอัตราการตาย อาการ รอยโรค และการติดเชื้อ ภายในระยะเวลาการทดลอง 14 วัน

Figure 1 Splenomegaly of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia for 14 post inoculation

Table 1 Bacteriology and PCR results from sampled fish of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia by nares inoculation

Technique	Nares inoculation			
	No. of positively dead fish/total fish	% Mortality	No. of positively surviving fish/total survival fish	% Infection
Bacteriology	1/10	10	3/9	33.3
PCR	1/10	10	4/9	44.4

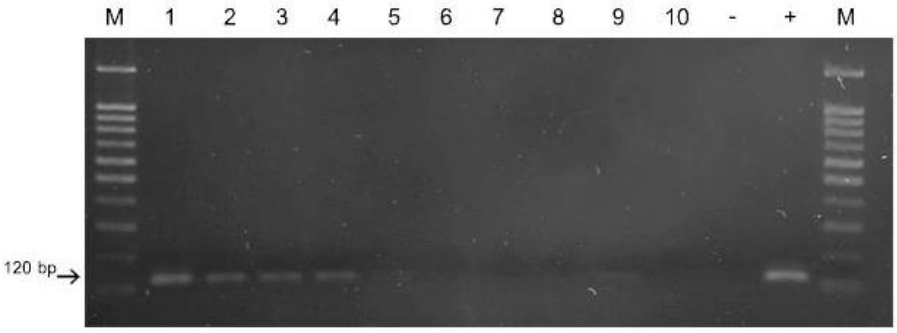

Figure 2 PCR product of *S. agalactiae* detection in Nile tilapia tissue by nares inoculation (M: 100 bp marker, Lane 1: organs of dead fish, Lane 2-10: organs of survival fish, - : negative control, + : positive control), The results of positively *S. agalactiae* yielded a single 120-bp product (Lane 1-4 and 9)

การติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางเหงือก

อาการและรอยโรคที่พบมีลักษณะคล้ายคลึงกับการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูก ปลาเริ่มแสดงอาการป่วยในวันที่ 2 แต่ไม่พบอัตราการตาย (0%) จากการเก็บตัวอย่างจากปลาที่รอดชีวิตไม่สามารถยืนยันเชื้อได้ด้วยวิธีจุลชีววิทยาแต่พบการติดเชื้อ 100% จากการยืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Table 2, Figure 3) ส่วนปลาในกลุ่มควบคุมไม่พบอัตราการตาย อาการ รอยโรค และการติดเชื้อ ภายในระยะเวลาการทดลอง 14 วันเช่นกัน

Table 2 Bacteriology and PCR results from sampled fish of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia by gills inoculation

Technique	Gills inoculation			
	No. of positively dead fish/total fish	% Mortality	No. of positively surviving fish/total survival fish	% Infection
Bacteriology	0/10	0	0/10	0
PCR	0/10	0	10/10	100

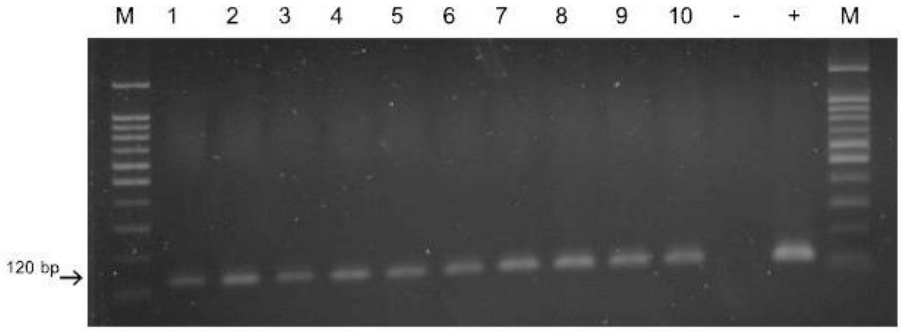

Figure 3 PCR product of *S. agalactiae* detection in Nile tilapia tissue by gills inoculation (M: 100 bp marker, Lane 1-10: organs of survival fish, - : negative control, + : positive control), The results of positively *S. agalactiae* yielded a single 120-bp product (Lane 1-10)

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้ง 2 การทดลอง พบว่าอุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 28±1 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ 4.61±0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ย 7.80±0.2 แอมโมเนียเฉลี่ย 0.020±0.01 มิลลิกรัม/ลิตร และไนไตรท์เฉลี่ย 0.020±0.01 มิลลิกรัม/ลิตร

วิจารณ์ผล

การศึกษานี้พบว่าการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูกสามารถทำให้เกิดการตายและการติดเชื้อได้ โดยปกติตามธรรมชาติในการเคลื่อนที่ของปลาจะส่งผลให้น้ำผ่านเข้าทางจมูกเป็นไปได้ว่าเชื้อแพร่เข้าสู่อวัยวะรับกลิ่น olfactory organ ที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาทสมอง และเชื้อมีคุณสมบัติสามารถเพิ่มจำนวนและกระจายสู่กระแสเลือด (septicemia) ได้ ซึ่งมีรายงานในวิธีการให้ทางจมูกในปลากะพง พบอัตราการตายถึง 98.3% ของการติดเชื้อ *S. iniae* และสามารถพบเชื้อที่ olfactory lobe ได้ที่ 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ (Evans *et al*., 2000, 2001) จึงมีแนวโน้มว่าการติดเชื้อ *S. agalactiae* สามารถแพร่จาก olfactory organ ไปยังสมองได้ นอกจากนี้ผลการติดเชื้อของวิธีการให้ทางจมูก ยังมีปลารอดชีวิตที่ไม่พบการติดเชื้อ อาจเกิดจากการที่เชื้อถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของปลา ซึ่งการตอบสนองต่อการติดเชื้อเกิดขึ้นจากขบวนการอักเสบที่มีเม็ดเลือดขาวเข้าทำลายและป้องกันการแทรกผ่านของเชื้อ รวมไปถึงปริมาณของเชื้อที่ปลาได้รับในแต่ละตัวอาจไม่เท่ากัน จึงส่งผลให้มีอัตราการตายและการติดเชื้อน้อย ส่วนผลการศึกษาโดยวิธีการให้เชื้อทางเหงือกไม่พบอัตราการตาย อาจเนื่องมาจากจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่ปลาและความเข้มข้นที่ใช้ไม่สามารถทำให้ปลาตายได้ แต่สามารถพบการติดเชื้อจากปลารอดชีวิต โดยจากการให้เชื้อเข้าทางเหงือกเชื้อสามารถแพร่เข้าซี่เหงือกที่มีเส้นเลือดฝอยได้โดยตรง เนื่องจากเหงือกของปลามีเยื่อบุชั้นในที่มีพื้นที่ผิวมาก ซึ่งเชื้อสามารถเข้าผ่านช่องว่างขนาดเล็กระหว่างเซลล์เยื่อบุเหงือกและสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายทั่วร่างกาย โดยมีรายงานพบอัตราการตายถึง 33% ของการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล และ 13-100% ของการติดเชื้อ *S. iniae* ในปลากะพง (McNulty *et al*.,2003; Mian *et al*., 2009)

มีรายงานการศึกษาโดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือกของการติดเชื้อ *S. iniae* ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ในปลากะพง สามารถทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 98.3% (Evans *et al*., 2000) และ 13% (McNulty *et al*., 2003) จากรายงานดังกล่าวจะให้เห็นว่าความเข้มข้นที่เท่ากันของเชื้อและปลาชนิดเดียวกัน อาจมีแนวโน้มหรือเป็นไปได้ว่าวิธีการให้ทางจมูกสามารถทำให้เชื้อเข้าก่อโรคและสามารถพบอัตราการตายได้มากกว่าวิธีการให้ทางเหงือก นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ตาย 50% โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องของการศึกษาครั้งนี้ คือ ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ซึ่งต่างจากรายงานการศึกษา LD_{50} ของเชื้อ *S. agalactiae* อื่นๆ ที่ได้ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml โดยการฉีดเข้าช่องท้องในปลานิลแดง (Abuseliana *et al*., 2011) และความเข้มข้นที่ 10^2 CFU/ml โดยการฉีดเข้าช่องท้องในปลาม้าลาย (Patterson *et al*., 2012) จะเห็นได้ว่าค่า LD_{50} มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ รวมไปถึงชนิดของปลาด้วย

โดยทั่วไปการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลามักแสดงอาการและรอยโรคคือ ว่ายน้ำผิดปกติ สูญเสียการทรงตัว ลำตัวสีเข้ม ตาขุ่น-โปน ม้ามโต มีของเหลวในช่องท้องและตับซีด (Abuseliana *et al*., 2011; Li *et al*., 2014) แต่ในการศึกษานี้พบอาการและรอยโรคเพียง ลำตัวมีสีเข้ม ลอยตัวผิวน้ำ และ/หรือม้ามโต อาจเนื่องมาจากความเข้มข้น ปริมาตร ความจำเพาะของเชื้อ ชนิดของปลา สิ่งแวดล้อม ช่องทางการเข้าก่อโรค และเป็นไปได้ว่าในการศึกษาครั้งนี้ที่พบอัตราการตายเพียง 10% อาจเนื่องมาจากความรุนแรงของเชื้อต่อสายพันธุ์ปลา ซึ่งแหล่งที่มาของเชื้อแยกได้จากปลานิลแดง สอดคล้องกับรายงานของ Evans และคณะ (2000) รายงานว่าความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้จากปลากะพงอาจจะส่งผลให้มีอัตราการตายในปลากะพงสูงกว่าในปลานิล

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าจมูกและเหงือกสามารถเป็นช่องทางการเข้าของเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลได้ นอกจากนี้อาจจะทำการศึกษาความแตกต่างของปัจจัยอื่นๆเพิ่มเติม เช่น ความเข้มข้น ปริมาตรของเชื้อ ความหนาแน่น อุณหภูมิของน้ำ ช่องทางการติดเชื้อเลียนแบบธรรมชาติอื่นๆ หรือศึกษาทางพยาธิกำเนิดเพื่อเข้าใจถึงกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *S. agalactiae* โดยช่องทางการติดเชื้อดังกล่าวในปลานิลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนทุนในครั้งนี้ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสัตว์น้ำและห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Abuseliana, A. F., Daud, H. H. M., Aziz, S. A., Bejo, S. K., and Alsaid, M. 2011. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). Journal of Animal and Veterinary Advances, 10(7), 914-919.

Austin, B., and Austin, D. 2007. Characteristics of the diseases. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 15-46.

Delamare Deboutteville, J., Bowater, R., Condon, K., Reynolds, A., Fisk, A., Aviles, F., and Barnes, A. 2015. Infection and pathology in Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus*,(Bloch), caused by exposure to *Streptococcus agalactiae* via different routes. Journal of Fish Diseases, 38(12), 1021-1035.

Evans, J. J., Shoemaker, C. A., and Klesius, P. H. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. Aquaculture, 189(3-4), 197-210.

Evans, J. J., Shoemaker, C. A., and Klesius, P. H. 2001. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *Morone saxatilis*) following nare inoculation. Aquaculture, 194(3-4), 233-243.

Evans, J., Klesius, P., Gilbert, P., Shoemaker, C., Al Sarawi, M., Landsberg, J., and Al Zenki, S. 2002. Characterization of β°-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. Journal of Fish Diseases, 25(9), 505-513.

Evans, J., Klesius, P., and Shoemaker, C. 2006. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. Aquaculture Health International, 7, 10-14.

Inglis, V., Roberts, R. J., and Bromage, N. R. 1993. Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 312p.

Kasornchan, J., Boonyaratpalin, S., and Supamataya, K. 1986. *Streptococcus* sp. the pathogenic bacteria of sand goby, *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker). Songklanakarin J Sci Technol, 8, 329-332. [in Thai]

Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I., and Rodkhum, C. 2014. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 26(4), 488-495.

Li, Y., Liu, L., Huang, P., Fang, W., Luo, Z., Peng, H., and Li, A. 2014. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. Journal of Fish Diseases, 37(8), 757-763.

Maisak, H., Patamalai, B., Amonsin, A., and Wongtavatchai, J. 2008. Streptococcosis in Thai cultured tilapia *Oreochromis nilotica*. Proceedings of the 7th Chulalongkorn University Veterinary Science Annual Conference. Bangkok, Thailand. 85-86.

McNulty, S. T., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., and Evans, J. J. 2003. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. Aquaculture, 220(1-4), 165-173.

Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedmann, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S., and Kashi, Y. 2002. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. Journal of Dairy Science, 85(7), 1717-1723.

Mian, G., Godoy, D., Leal, C., Yuhara, T., Costa, G., and Figueiredo, H. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Veterinary microbiology, 136(1-2), 180-183.

Miles, A. A., Misra, S., and Irwin, J. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. Journal of Hygiene, 38(6), 732-749.

Patterson, H., Saralahti, A., Parikka, M., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., and Rämet, M. 2012. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. Developmental & Comparative Immunology, 38(3), 447-455.

Plumb, J. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press. Ames, USA. 328p.

Soto, E., Zayas, M., Tobar, J., Illanes, O., Yount, S., Francis, S., and Dennis, M. 2016. Laboratory-controlled challenges of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: comparisons between immersion, oral, intracoelomic and intramuscular routes of infection. Journal of comparative pathology, 155(4), 339-345.

Suanyuk, N., Sukkasame, N., Tanmark, N., Yoshida, T., Itami, T., Thune, R. L., and Supamattaya, K. 2010. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. Songklanakarin Journal of Science & Technology, 32(4).