นิพนธ์ต้นฉบับ

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

นเรศ ซ่วนยุก[1] หิรัญ กังแฮ[2] เรวัตร คงประดิษฐ์[3] และ กิจการ ศุภมาตย์[4]

Abstract

Suanyuk, N.[1], Kanghear, H.[2], Khongpradit, R.[3] and Supamattaya, K.[2]
***Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*)**
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 307-319

***Streptococcus agalactiae* was isolated from cultured tilapia in Surat Thani province. Isolates were Gram-positive cocci, catalase negative, alpha-haemolytic and serogroup B. Streptococcal-infected fish showed various swimming abnormalities such as swimming on their side, erratic surface or bottom swimming including serpentine movement, exophthalmia and opacity. Internally, splenomegaly, ascites as well as pale liver discoloration were observed. Fish experimentally infected by peritoneal injection using 10^1 -10^8 CFU/fish showed 20-90% mortality within 10 days and the LD_{50} was $3.60x10^1$ - $1.72x10^7$ CFU. Haematocrit, haemoglobin, plasma protein and blood cell values of infected and moribund fish were significantly decreased. Histopathological findings included the occurrence of inflammation, cells necrosis, infiltration of lymphocytes and the formation of granulomas in the infected organs.**

Key words : *Streptococcus agalactiae*, tilapia, blood parameters, histopathology

[1]Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, [2]Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand, [3]Songkhla Province Aquatic Animal Inspection and Quarantine, Department of Fisheries, Khlong Hoi Khong, Songkhla 90115 Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร ปร.ด. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร [2]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาวาริชศาสตร์ [4]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 [3]วท.ม. (วาริชศาสตร์) นักวิชาการประมง ด่านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดสงขลา กรมประมง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา 90115

Corresponding e-mail: kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 2 กันยายน 2547 รับลงพิมพ์ 22 พฤศจิกายน 2547

บทคัดย่อ

นเรศ ซ่วนยุก หิรัญ กังแฮ เรวัตร คงประดิษฐ์ และ กิจการ ศุภมาตย์

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 307-319

แบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* แยกจากปลานิลป่วยที่เลี้ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบแอลฟ่า และมีคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาเป็น group B อาการของโรคพบว่าปลาจะเสียการทรงตัวและว่ายน้ำแบบควงสว่าน ตาขุ่นและโปน ม้ามโต มีของเหลวในช่องท้องและตับซีด การทดลองในปลานิลแดงแปลงเพศโดยการฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรียเข้าช่องท้องปริมาณ 10^1 - 10^8 CFU/ตัว ทำให้ปลาตาย 20-90% ภายใน 10 วัน มีค่า LD_{50} เท่ากับ $3.60x10^1$ - $1.72x10^7$ CFU องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน พลาสมาโปรตีน และปริมาณเม็ดเลือดของปลาใกล้ตาย เนื่องจากได้รับเชื้อมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบการอักเสบ การตายของเซลล์ มีการแทรกตัวของลิมโฟซัยต์จำนวนมาก และเกิดกรานูโลมาในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่ติดเชื้อ

การเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นปัญหาสำคัญต่อเกษตรกรเป็นอย่างมาก ปัจจุบันพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 60-70 ชนิดที่สามารถก่อโรคในสัตว์น้ำได้ (Plumb, 1999) สเตรฟโตคอคโคซีสคืออีกโรคหนึ่งที่เป็นอุปสรรคสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเนื่องจากทำให้ปลาตายได้มากกว่า 75% เมื่อเลี้ยงในระบบปิด (Perera *et al*., 1994) การเกิดโรคชนิดนี้ในสัตว์น้ำเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในสหรัฐอเมริกายุโรป ออสเตรเลียและญี่ปุ่น แต่ยังไม่มีข้อมูลชัดเจนมากนักในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Komar *et al*., 2003) การแพร่ระบาดของโรคชนิดนี้พบได้ในปลาหลายชนิด เช่น ปลานิล (*O. niloticus*) (Shoemaker *et al*., 2000) ปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) (Al-Harbi, 1994; Perera *et al*., 1994) ปลาเทอบอท (*Scophthalmus maximus* L.) (Doménech *et al*., 1996) ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (Bromage *et al*., 1999) ปลาซีกเดียว (*Paralichthys olivaceus*) (Nguyen *et al*., 2001; Nguyen *et al*., 2002) ปลาซีบรีม (*Sparus auratus* L.) และปลากระบอก (*Liza klunzingeri* Day) (Evans *et al*., 2002) โดยทั่วไปแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคนี้สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์น้ำ อาการของโรคในปลามีความผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของปลา แต่อาการที่พบโดยทั่วไป เช่น เสียการทรงตัว ลำตัวสีคล้ำ ตาขุ่นและโปนข้างเดียวหรือทั้งสองข้าง ตกเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือก และโคนครีบ รวมทั้งเป็นแผลบริเวณลำตัว (Inglis *et al*., 1993)

โรคสเตรฟโตคอคโคซีส เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่มีเอนไซม์คาตาเลส สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ทั้งแบบแอลฟ่า เบต้า หรือแกมม่า วิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยทั่วไปจะใช้การทดสอบคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาของแอนติเจน (Lancefield group antigen) ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Lancefield, 1933) รวมทั้งการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เช่น S. *pyogenes* สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดได้ทั้งแบบแอลฟ่า เบต้า หรือแกมม่า และมีคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาของแอนติเจนที่ผนังเซลล์เป็น group A (Sneath *et al*., 1986) ในขณะที่ S. *iniae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรครุนแรงในสัตว์น้ำ (Hawke, 2000) สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดได้แบบแอลฟ่าหรือเบต้าและไม่มีคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ตั้งแต่ group A ถึง V (Sneath *et al*., 1986)

การจำแนกชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาพบว่าแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ที่มีแอนติเจนที่ผนังเซลล์เป็น group B มีเพียงชนิดเดียวคือ *S. agalactiae* (Evans *et al*., 2002) มีรายงานว่าแบคทีเรียสเตรฟโตคอคคัส group B สามารถก่อโรคในปลาบุลมินเนา (Bull-

minnows: *Fundulus grandis* Baird & Girard) ที่เลี้ยงในประเทศสหรัฐอเมริกา (Rasheed and Plumb,1984; Rasheed *et al*.,1985) ปลาบลูฟิช (Bluefish: *Pomatomus saltatrix*) ปลาสไตรป แบส (Striped bass: *Morone saxatilis* Walbaum) และปลาเทร้าท์ทะเล (Sea trout: *Cynoscion regalis*) ในอ่าวชีสพีค (Baya *et al*., 1990) รวมทั้งปลาซีบรีม (*Sparus auratus* L.) และปลากระบอก (*Liza klunzingeri* Day) ในประเทศคูเวต (Evans *et al*., 2002)

ผู้วิจัยได้พบปลานิลที่เลี้ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีอาการป่วยคล้ายกับอาการของโรคสเตรฟโตคอคโคซีส จึงทำการหาสาเหตุของโรคโดยการแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยและศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวเคมีและซีรั่มวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ รวมทั้งลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ และองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศที่ติดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเป็นข้อมูลเกี่ยวกับการก่อโรคดังกล่าวในปลานิล

อุปกรณ์และวิธีการ

ก. สัตว์ทดลอง

ปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 89.54±18.12 กรัม ที่ปลอดเชื้อแบคทีเรีย นำมาเลี้ยงก่อนการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ที่โรงเพาะฟักของศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา ในช่วงของการเลี้ยงให้อาหารเม็ดลอยน้ำวันละ 2 มื้อ

ข. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลานิลป่วย

นำปลานิลป่วยที่เลี้ยงในกระชังและบ่อดินในจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 17 ตัว มาบันทึกลักษณะอาการภายนอกและทำการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากตับ ไต ตาและสมอง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA: Merck, Darmstadt, Germany) และบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC นาน 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร จึงทดสอบเบื้องต้นโดยสุ่มเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ มาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและทดสอบเอนไซม์คาตาเลส จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม และไม่มีเอนไซม์คาตาเลสที่ได้จำนวนทั้งหมด 50 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB: Merck, Darmstadt, Germany) ผสมกลีเซอรอล 15% ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำไปใช้งานต่อไป

ค. วิธีการ

1. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวเคมีและซีรั่มวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

สุ่มเลือกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 13 ไอโซเลต มาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวเคมีและซีรั่มวิทยา โดยการย้อมแกรม ทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar (Merck, Darmstadt, Germany) ที่ผสมเม็ดเลือดแดงแกะ 5% การเจริญใน Bile-esculin media (Chuard and Reller, 1998) การทนต่อสภาวะความเป็นด่าง (pH 9.6) การเจริญเติบโตในความเค็ม 6.5 8 และ 10% และการทนต่ออุณหภูมิ 4 10 35 40 และ 45°C นาน 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Al-Harbi, 1994) การสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส มอลโตสและซูโครสและการใช้ชุดทดสอบ API20STREP (BioMerieux®, Marcy I'Etoile, France) ซึ่งทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการไฮโดรไลซีส ฮิบปูเรต เอสคูลิน อาร์จินีน แป้งและไกลโคเจน การดึงหมู่คาร์บอกซี่ของไพโรลิโดนิลเอริลอะมิเดส แอลฟ่า-กาแลคโตซิเดส เบต้า-กลูคิวโรนิเดส เบต้า-กาแลคโตซิเดส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และลิวซีน อะมิโนเปบติเดส รวมทั้งการสร้างกรดจากน้ำตาลไรโบส อะราบิโนส แมนนิทอล ซอร์บิทอล แลคโตส ทรีฮาโลส อินูลิน และราฟฟิโนส และทดสอบคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาโดยใช้ชุดทดสอบ Slidex Strepto-kit latex B kit (BioMerieux®, Marcy I' Etoile, France) และใช้ Bergey's manual of systematic bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974; Sneath *et al*.,1986) โปรแกรม APILAB PLUS (BioMerieux®, Marcy I' Etoile, France) และเอกสารอ้างอิง (Evans *et al*., 2002) ที่รายงานคุณสมบัติดังกล่าวช่วยในการจำแนกชนิดของ

แบคทีเรีย

2. การทดสอบความไวของเชื้อ *S. agalactiae* ต่อยาปฏิชีวนะ

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion method (MacFaddin, 1980) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย S. *agalactiae* ที่สุ่มไว้จำนวน 13 ไอโซเลต และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน S. *agalactiae* DMST17129 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อและเกลี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA: Merck, Darmstadt, Germany) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อแล้วใช้ปากคีบปลอดเชื้อวางแผ่นยามาตรฐาน (Oxoid Ltd., England) ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ เพนนิซิลิน จี (30 ไมโครกรัม/แผ่น) นาลิดิซิค แอซิด (30 ไมโครกรัม/แผ่น) ซัลฟาเมธท๊อกซาโซล/ไตรเมธโธพริม (25 ไมโครกรัม/แผ่น) อิริโทรมัยซิน (15 ไมโครกรัม/แผ่น) ออกโซลินิค แอซิด (2 ไมโครกรัม/แผ่น) แอมพิซิลิน (10 ไมโครกรัม/แผ่น) และออกซีเตตร้าซัยคลิน (30 ไมโครกรัม/แผ่น) ลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC นาน 24 ชั่วโมง จึงวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นและแปลผลโดยเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐานในการแปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะ

3. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae*

ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae* โดยหาปริมาณของเชื้อที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) โดยนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 4 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^2-10^9 CFU/มล. แล้วนำไปฉีดเข้าช่องท้องปลานิลแดงแปลงเพศตัวละ 0.1 มล. จำนวน 10 ตัว/ความเข้มข้น/ตู้ ใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85% แทนเชื้อแบคทีเรียในชุดควบคุม และนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยวิธี drop plating techniques (ดัดแปลงจาก Straka and Stokes, 1957) ในระหว่างการทดลองอุณหภูมิของน้ำเท่ากับ 26ºC บันทึกอัตราการตายและยืนยันการตายโดยการเพาะเชื้อจากตับ ไต และสมองของปลาที่ตาย และคำนวณค่า LD_{50} โดยใช้โปรแกรม probit analysis (โชคชัย, 2531)

4. การศึกษาองค์ประกอบเลือดปลานิลแดงแปลงเพศที่ติดเชื้อ *S. agalactiae*

นำปลาใกล้ตายจำนวน 51 ตัว จากการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae* มาเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดบริเวณโคนหาง (caudal vein) โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล และเข็มฉีดยาขนาด 25G x 1 นิ้ว (NIPRO (THAILAND) CORP. LTD.) ที่เคลือบด้วย 1% EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัว (anticoagulant) ของเลือด นำตัวอย่างเลือดที่เจาะได้มาหาค่าองค์ประกอบของเลือด ได้แก่ ฮีมาโตคริต (Blaxhall and Daisley, 1973) ปริมาณฮีโมโกลบินรวมโดยวิธี Cyanmet-haemoglobin (Larsen and Snieszko, 1961) โปรตีนในพลาสมาโดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) (กิจการ และคณะ, 2543) และปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (กิจการ, 2538)

5. พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae*

ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน (Humason, 1979) และนำตัวอย่างปลานิลที่แสดงอาการของโรคชัดเจนทั้งที่เลี้ยงในธรรมชาติ จำนวน 8 ตัว และจากการทดลอง จำนวน 8 ตัว มาตัดเหงือก ตับ ไต ม้าม และสมอง ดองในฟอร์มาลิน 10% เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงนำอวัยวะทั้งหมดมาผ่านขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่อง Automatic Tissue Processor (Autotechnicon MonoMOD. 2A) โดยผ่านระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ จาก 50 ถึง 100% เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ แล้วผ่านลงในไอโซโพรพิลและไซลีน และฝังในพาราพลาส แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (Jung AG Heidelberg) หนา 3-5 ไมครอน ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (H&E) (Bancroft, 1967) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสง

ผลการทดลอง

1. อาการของโรค

1.1 การติดเชื้อในธรรมชาติ (Natural infection)

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้จากสมอง ตา ตับ และไตของปลานิลป่วยที่เลี้ยงในกระชังและบ่อดิน พบว่าปลาปลานิลแดงมีสีซีดบริเวณลำตัว (Figure 1) ท้องบวมและมีเลือดออกที่รูทวาร (Figure 2) เสียการทรงตัว ว่ายน้ำขึ้นลงหรือไปทางด้านข้างและควงสว่าน นอกจากนี้ยังพบอาการตาขุ่นและโปนข้างเดียวหรือสองข้าง อาการภายในของปลาติดเชื้อมีเลือดออก (haemorrhage) และมีของเหลวในช่องท้อง ม้ามโต และมีสีเข้ม ส่วนตับมีสีซีด

1.2 การติดเชื้อในห้องทดลอง (Experimental infection)

การทดลองติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จำนวน 4 ไอโซเลตในปลานิลแดงแปลงเพศโดยการฉีดเข้าช่องท้องปริมาณ 10^1-10^8 CFU/ตัว ทำให้ปลาตาย 20-90% ภายใน 10 วัน โดยปลาที่ติดเชื้อส่วนใหญ่แสดงอาการของโรคภายใน 7 วันหลังการฉีดเชื้อ อีกทั้งมีปลาบางตัวที่ตายโดยไม่แสดงอาการภายนอกให้เห็น ปลานิลแดงแปลงเพศที่ติดเชื้อ มีอาการภายนอกคือ ลำตัวสีซีดและท้องบวม ตาโปนและขุ่นหนึ่งข้างหรือสองข้าง (Figure 3) ปลาป่วยมีอาการเซื่องซึม ลอยหัวอยู่บริเวณผิวน้ำ เสียการทรงตัว ว่ายน้ำแบบควงสว่านและตายในที่สุด ส่วนอวัยวะภายในของปลาที่ติดเชื้อมีม้ามโต ตกเลือดและมีของเหลวในช่องท้อง รวมทั้งตับมีสีซีด

การฉีดเชื้อและแยกเชื้อจากปลาตายและทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี พบว่าเชื้อที่แยกได้เป็นแบคทีเรียชนิดเดิมที่ฉีดเข้าไป และค่า LD_{50} ที่ 10 วัน ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต เท่ากับ 3.60×10^1, 3.78×10^5, 6.34×10^5 และ 1.72×10^7 CFU

2. คุณสมบัติทางกายภาพ ชีวเคมีและซีรั่มวิทยาของเชื้อแบคทีเรียและความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ และการใช้ชุดทดสอบ API20STREP และ Slidex Strepto-kit latex B kit (Table 1) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลป่วยเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม เรียงตัวเป็นคู่หรือสายโซ่สั้นๆ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลสและเอนไซม์ออกซิเดส เจริญได้ในอาหาร Blood Agar ที่ผสมเม็ดเลือดแดงแกะ 5% และย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบแอลฟ่า เจริญได้ใน 0.1% Methylene blue milk และทนต่อความเค็ม 6.5-8% ความเป็นกรด-ด่าง 9.6 และอุณหภูมิ 4-40°C ผลการใช้ชุดทดสอบ API20STREP และใช้โปรแกรมวิเคราะห์พบว่ามีโครงสร้างเป็นหมายเลข 3 6 6 3 0 1 0 ตรงกับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* (APILAB PLUS, Bio Merieux®, Marcy I' Etoile, France) และการทดสอบคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาโดยใช้ชุดทดสอบ Slidex Strepto-kit latex B kit พบว่ามี Lancefield antigen group เป็น group B

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ

Table 1. Phenotypic and biochemical characteristics of *S. agalactiae* isolated from infected fish.

Test	Present isolates Tilapia (n=13)	Evans *et al.* (2002) Mullet (n=27)	Evans *et al.* (2002) Sea bream (n=2)	Sneath *et al.* (1986) Bergey's manual
Gram staining reaction	+	+	+	+
Cell morphology	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Catalase production	-	-	-	-
Oxidase production	-	-	-	nr
VP test	+	+	+	+
Haemolysis	α	α	α	d
Growth on:				
BHIA	+	nr	nr	nr

Table 1. (Continued)

Test	Present isolates Tilapia (n=13)	Evans *et al.* (2002) Mullet (n=27)	Evans *et al.* (2002) Sea bream (n=2)	Sneath *et al.* (1986) Bergey's manual
Trypticase Soy Agar	+	+	+	nr
Blood Agar (5%SRBC)	+	+	+	+
0.1% methylene blue milk	+	nr	nr	nr
Bile-esculin media	+	-	-	d
Black pigment in bile esculin media	-	nr	nr	nr
Growth in:				
6.5% NaCl	+	nr	nr	d
8% NaCl	+	nr	nr	nr
10% NaCl	+(23.08)	nr	nr	nr
Tolerance of :				
pH 9.6	+	nr	nr	-
Temp 4ºC	+	nr	nr	nr
Temp 10ºC	+	-	-	d
Temp 35ºC	+	nr	nr	nr
Temp 40ºC	+	nr	nr	nr
Temp 45ºC	-	nr	nr	-
Hydrolysis of :				
Hippurate	+(38.46)	+(19)	+	+
Esculin	-	nr	nr	-
Arginine	+	+	+	+
AMD	-	-	-	nr
Glycogen	-	-	-	nr
Decarboxylation of:				
Pyrrolidonylarylamidase	-	-	-	-
α-Galactosidase	+	+(7)	+	d
β-Glucoronidase	+	+	+	d
β-Galactosidase	-	-	-	nr
Alkaline phosphatase	+	+(11)	+	+
Leucine aminopeptidase	+	+	+	nr
Acid production from :				
D-Ribose	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-
D-Lactose	-	-	-	d
D-Trehalose	+	+	+	+
Inulin	-	nr	nr	-
D-Raffinose	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+
Sucrose	+(7.69)	+	+	+
Glucose	+(7.69)	nr	nr	+

Identification: +, positive; -, negative; n, reflects number of isolates; nr, not reported; d, 11-89% of strain positive; ( ), denotes percent of isolates that gave the opposite result.

Figure 1. Gross view of a *S. agalactiae* infected cultured tilapia showing body discoloration.

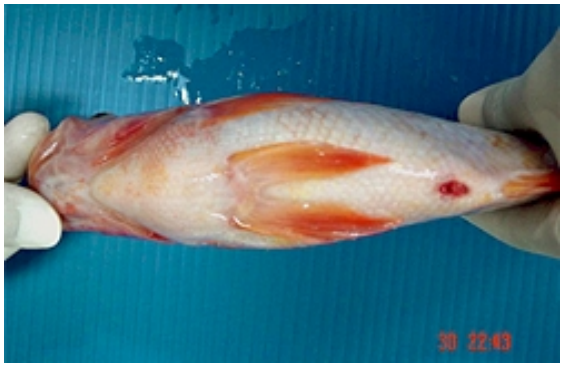

Figure 2. Gross view of a *S. agalactiae* infected cultured tilapia showing abdominal swelling and haemorrhage of the anal vent.

Figure 3. Gross view of sex reversed red tilapia infected with *S. agalactiae* by experimental infection showing pale body and eye opacity.

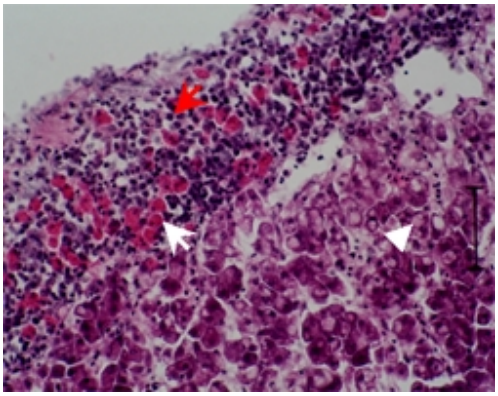

Figure 4. Liver tissue of tilapia infected with *S. agalactiae*, showing dilation of hepatic sinusoids and eosinophilic granular cells (White arrow) and lymphocytes (red arrow) infiltration to epithelium sheath of liver. Hepatocytes showed highly vacuolization and focal necrosis (arrow head) (H&E, Bar = 50 μm).

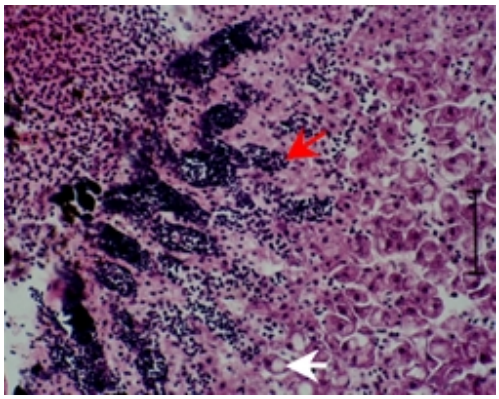

Figure 5. Liver tissue of of tilapia infected with *S. agalactiae*, showing hepatocytes vaculolization (white arrow) and lymphocytes infiltration (red arrow) (H&E, Bar = 50 µm).

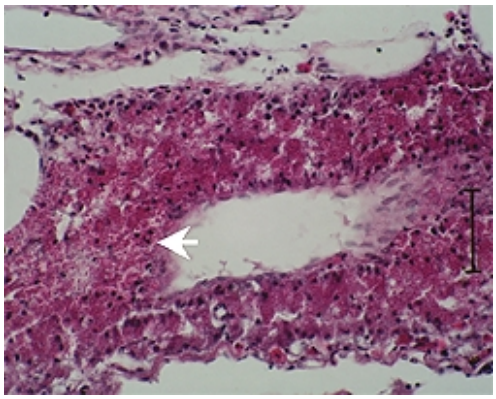

Figure 6. Pancreas of tilapia infected with *S. agalactiae*, showing degenerated acinar cells (arrow) and lost of zymogen granule (H&E, Bar = 50 µm).

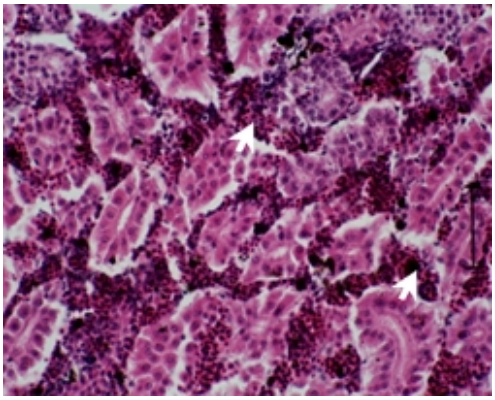

Figure 7. Kidney tissue of tilapia infected with *S. agalactiae*, showing haemorrhage in hemopoietic tissue and infiltrated by lymphocytes (arrow) (H&E, Bar = 50 µm).

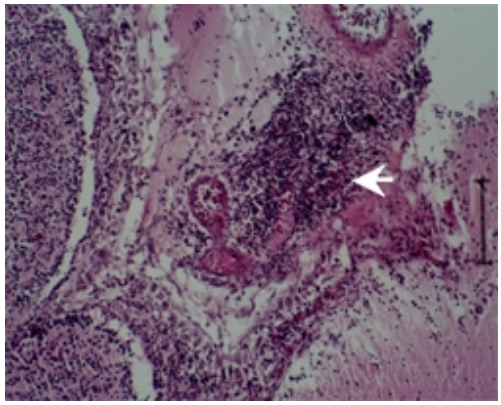

Figure 8. Brain tissue of tilapia infected with *S. agalactiae*, showing the granuloma in third ventricle and infiltrated by lymphocytes (arrow) (H&E, Bar = 50 µm).

7 ชนิด พบว่าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด คือ เพนนิซิลิน จี อิริโทรมัยซิน แอมพิซิลิน และออกซีเตตร้าซัยคลิน และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ ซัลฟาเมธท๊อกซาโซล/ไตรเมธโธพริม นาลิดิซิค แอซิด และออกโซลินิค แอซิด (Table 2) และสอดคล้องกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *S. agalactiae* DMST17129 ยกเว้นยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินที่ให้ผลแตกต่างกัน

3. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* เกิดขึ้นในอวัยวะภายในหลายแห่ง เช่น ตับ ไต สมอง โดยลักษณะทางพยาธิสภาพเหมือนกันทั้งปลาที่เลี้ยงในธรรมชาติและปลาที่ติดเชื้อในห้องทดลอง ซึ่งรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงมีดังนี้

3.1 ตับ การติดเชื้อ *S.agalactiae* ทำให้โครงสร้าง

Table 2. Susceptibility of *S. agalactiae* to antimicrobial agent.

Antibiotics	Result (n=13)
Ampicillin (10)[1]	S(3)[2]
Erythromycin (15)	S(2)
Nalidixic acid (30)	R
Oxolinic acid (2)	R
Oxytetracycline (30)	S(1)
Penicillin G (10)	S(1)
Sulphamethoxazol/Trimethoprim (25)	R

R, resistant; S, sensitive; n, reflects number of isolates;
( )[1],Disc content (mg/disc);
( )[2], denotes number of isolates that gave the intermediate result.

ของเนื้อตับเปลี่ยนไป มีช่องว่างในเซลล์มากขึ้น มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยต์และเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิล (eosinophilic granular cells) จำนวนมากเข้าสู่เนื้อเยื่อตับและเยื่อหุ้มตับ นอกจากนี้ยังพบเซลล์ตับบางส่วนมีการหดตัว (atrophy) รวมทั้งเกิดการตายและสลายตัว (Figure 4-5)

3.2 ตับอ่อน พบการเสื่อมสภาพและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ตับอ่อน (pancreatic acinar) และเกิดการสลายตัวทำให้ไซโมเจนกรานูลจำนวนมากแตกตัวออกจากเซลล์ portal vein ในส่วนนี้จะขยายขนาดใหญ่ขึ้น (Figure 6)

3.3 ไต พบการอักเสบและตกเลือดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* บริเวณไตตอนหลังและมีเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยต์แทรกตัวเข้ามาเป็นจำนวนมาก (Figure 7)

3.4 สมอง พบการอักเสบอย่างรุนแรงจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* เกิดกรานูโลมาบริเวณที่มีการติดเชื้อในสมองส่วนหน้า โดยตรวจพบกรานูโลมาในส่วนของ third ventricle เยื่อหุ้มสมองมีการอักเสบอย่างรุนแรงโดยมีเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยต์แทรกตัวเข้าสู่ชั้นของ neurocranium จำนวนมาก (Figure 8)

4. องค์ประกอบเลือด

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศใกล้ตายจากการติดเชื้อเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลาที่ติดเชื้อจะมีค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน พลาสมาโปรตีน ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าปลาในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และปลาที่ได้รับเชื้อในปริมาณมาก (10^6 - 10^8 CFU/fish) จะมีค่าองค์ประกอบเลือดต่ำกว่าปลาที่ได้รับเชื้อความเข้มข้นต่ำ (10^2 - 10^4 CFU/fish) (Table 3) โดยค่าฮีมาโตคริตในชุดควบคุมมีค่า 21.91±4.02% และลดลงเหลือเพียง 15.75±4.16 และ 11.69±4.29% เมื่อปลาได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 - 10^4 และ 10^6 - 10^8 CFU/fish ตามลำดับ ส่วนค่าฮีโมโกลบินลดลงจาก 5.80±1.40 เป็น 4.81±1.64 และ 3.58±1.29 ก/เดซิลิตร พลาสมาโปรตีนลดลงจาก 31.30±4.73 เป็น 19.71±7.91 และ 15.78±4.36 มก/มล ปริมาณเม็ดเลือดแดงลดลงจาก 17.80±2.70 เป็น 11.11±3.17 และ 8.10±3.37 (x10^5 เซลล์/ลบ มม) และเม็ดเลือดขาวลดลงจาก 7.18±2.00 เป็น 1.86±1.18 และ 1.52±0.86 (x10^4 เซลล์/ลบ มม) เมื่อปลาได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 - 10^4 และ 10^6 - 10^8 CFU/fish ตามลำดับ (Table 3)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลป่วยโดยการเปรียบเทียบกับผลที่เคยรายงานไว้โดย Evans และคณะ (2002) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบมีคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่พบในปลาซีบรีม (*Sparus auratus* L.) และ

Table 3. Blood parameters of healthy and infected fish.

Condition of fish	Haematocrit (%)	Haemoglobin (g/dl)	Red blood cell ($x10^5$ cell/mm^3)	White blood cell ($x10^4$ cell/mm^3)	Plasma protein (mg/ml)
Control (n=20)	21.91±4.02c (15.35-33.53)	5.80±1.40c (3.90-10.36)	17.80±2.70c (13.20-23.80)	7.18±2.00b (3.70-11.57)	31.30±4.73c (23.78-42.28)
Infected with *S. agalactiae* (10^2 - 10^4 CFU/fish) (n=33)	15.75±4.16^b (7.5-22.52)	4.81±1.64^b (2.04-9.44)	11.11±3.17^b (3.52-16.48)	1.86±1.18^a (0.36-5.21)	19.71±7.91^b (5.78-34.19)
Infected with *S. agalactiae* (10^6 - 10^8 CFU/fish) (n=18)	11.69±4.29^a (4.71-17.70)	3.58±1.29^a (1.40-5.82)	8.10±3.37^a (2.20-14.12)	1.52±0.86^a (0.58-3.30)	15.78±4.36^a (7.03-22.61)

Means within columns not sharing the same superscript are significantly different ($p<0.05$).
n; number of samples, figures in parenthesis are the range.

ปลากระบอก (*Liza klunzingeri* Day) ในประเทศคูเวต ถึงแม้การไฮโดรไลซ์ฮิบปูเรตซึ่งสามารถจำแนกระหว่างแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. กับ *Enterococcus* sp. จะมีความผันแปรแต่ Vandamme และคณะ (1997) พบว่าการไฮโดรไลซ์ฮิบปูเรตโดยแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. group B โดยใช้ชุดทดสอบ API จะให้ผลแตกต่างกันได้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และการทดลองของ Evans และคณะ (2002) ยังพบว่า 19% ของเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลากระบอกก็ให้ผลการไฮโดรไลซ์เป็นลบเช่นกัน นอกจากนี้ การทนต่ออุณหภูมิ 10°C และทนต่อ bile esculin ของเชื้อที่พบในครั้งนี้ให้ผลต่างกับ Evans และคณะ (2002) เช่นกัน อย่างไรก็ตาม Sneath และคณะ (1986) ชี้แจงว่าการเจริญที่อุณหภูมิ 10°C และทนต่อ bile esculin ของแบคทีเรีย S. *agalactiae* จะมีความผันแปรได้ ส่วนการไม่เปลี่ยนเป็นสีดำของ bile esculin media สอดคล้องกับรายงานของ Chuard และ Reller (1998) ที่ว่า bile esculin media เป็นอาหารที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย Enterococci และ Streptococci group D ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์เอสคูลินได้กับแบคทีเรีย Streptococci กลุ่มอื่นที่ไม่เจริญหรือเจริญได้น้อยและไม่สามารถไฮโดรไลซ์เอสคูลินเป็นเอสคูเลตินทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิดสีดำ

มีบทความหลายฉบับรายงานว่า เชื้อแบคทีเรียสเตรฟโตคอคคัส group B มีความไวต่อยาแอมพิซิลิน คลอแรมเฟ็นนิคัล ออกซีเตตร้าซัยคลิน เพนนิซิลิน อิริโทรมัยซิน โนโวไบโอซิน และไนโตรฟูแรนโทอิน (Robinson and Meyer, 1966; Baya *et al*., 1990; Evans *et al*., 2002) และดื้อต่อยาซัลฟาเมธท๊อกซาโซล/ไตรเมธโธพริม ออกโซลินิค แอซิดและนาลิดิซิค แอซิด (Baya *et al*., 1990; Duremdez *et al*., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด (เพนนิซิลิน จี อิริโทรมัยซิน แอมพิซิลิน และออกซีเตตร้าซัยคลิน) และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ ซัลฟาเมธท๊อกซาโซล/ไตรเมธโธพริม นาลิดิซิค แอซิด และออกโซลินิค แอซิด อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า เชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลมีความไวต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน แตกต่างกับสายพันธุ์มาตรฐาน ทั้งนี้อาจเนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเลือดคนป่วย ซึ่ง Fernandez และคณะ (1998) รายงานว่าแบคทีเรียสเตรฟโตคอคคัส group B ที่แยกได้จากคนป่วย จะดื้อต่อยาเตตร้าซัยคลินซึ่งเป็นยาในกลุ่มเดียวกันกับออกซีเตตร้าซัยคลิน อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาผลการทดลองจะพบว่ามียาปฏิชีวนะหลายชนิดที่สามารถใช้ในการรักษาโรคนี้ได้ แต่ผู้ใช้ยาควรเลือกใช้เฉพาะยาที่อนุญาตให้ใช้ผสมในอาหารสัตว์และใช้รักษาโรคในสัตว์ที่นำมาใช้เพื่อการบริโภค และต้องมีการจดทะเบียนอย่างถูกต้องกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เช่น ออกซีเตตร้าซัยคลิน เป็นต้น

อาการของโรคที่ปรากฏให้เห็นทั้งในปลานิลที่เลี้ยงในธรรมชาติและปลานิลแดงแปลงเพศที่ติดเชื้อในห้องทดลอง พบว่าปลาป่วยมีอาการภายนอกคือ เซื่องซึม ตาโปนและขุ่น หนึ่งหรือสองข้าง ลอยหัวอยู่บริเวณผิวน้ำ เสียการทรงตัว ว่ายน้ำแบบควงสว่าน และตายในที่สุด

ส่วนอวัยวะภายในของปลาที่ติดเชื้อมีอาการม้ามโต เลือดออกและมีของเหลวในช่องท้อง รวมทั้งตับมีสีซีด การติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในห้องทดลองพบว่าปลาที่ติดเชื้อส่วนใหญ่แสดงอาการและตายภายใน 7 วันหลังการฉีดเชื้อ อีกทั้งมีปลาบางตัวที่ตายโดยไม่แสดงอาการภายนอกให้เห็น สอดคล้องกับรายงานของ Rasheed และคณะ (1985) ที่พบว่าแบคทีเรียสเตรฟโตคอคคัส group B ทำให้ปลาบุลมินเนา (*Fundulus grandis* Baird & Girard) มีอาการซึม ลอยอยู่บริเวณผิวน้ำและว่ายน้ำแบบควงสว่าน เลือดออกบริเวณตาและตาโปน ข้างเดียวหรือสองข้าง อีกทั้งยังพบว่าปลาบางตัวตายโดยไม่แสดงอาการภายนอกเช่นกัน เช่นเดียวกับ Evans และคณะ (2002) ที่พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทำให้ปลากระบอกมีพฤติกรรมผิดปกติ เช่น ว่ายน้ำแบบควงสว่าน ตาขุ่น โปน และมีเลือดออกและเมื่อนำเชื้อที่แยกจากสมองปลากระบอก และปลาซีบรีมฉีดให้กับปลานิลจะทำให้ปลาตายภายในเวลา 7 วัน

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่าค่า LD_{50} ที่ 10 วัน ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต อยู่ในช่วง 10^1 - 10^7 CFU โดยไอโซเลตที่มีความรุนแรงสูงมีค่า LD_{50} เท่ากับ 36 CFU สอดคล้องกับการทดลองของ Rasheed และ Plumb (1984) ที่รายงานค่า LD_{50} ที่ 7 วัน ในปลากัลฟ์ คิลลิฟิช (Gulf killifish: *Fundulus grandis* Baird and Girard) ที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. group B เท่ากับ 75 CFU รวมทั้ง Evans และคณะ (2002) ที่รายงานการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลพบว่ามีค่า LD_{50} ที่ 7 วัน เท่ากับ $1.9x10^{3.3}$ CFU อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่าความรุนแรงของเชื้อแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากพื้นที่และช่วงเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเชื้อ รวมทั้งอวัยวะที่แยกเชื้อได้มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลให้ได้เชื้อที่ได้มีความรุนแรงแตกต่างกัน

การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของปลานิลติดเชื้อ *S. agalactiae* พบการติดเชื้อในตับ ตับอ่อน ไตและสมอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรฟโตคอคคัสโดยทั่วไปที่พบว่าแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายอวัยวะต่างๆ และทำให้เกิดโรคได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง (Miyazaki *et al*., 1984; Rasheed and Plumb, 1984; Chang and Plumb, 1996; Perera *et al*., 1998; Eldar *et al*., 1999) จากการทดลองพบอาการตับซีดในปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับพบการตายและเกิดช่องว่างในเซลล์ตับ สอดคล้องกับการทดลองของ Rasheed และคณะ (1985) ที่พบอาการเดียวกันนี้ในปลาบุลมินเนาที่ติดเชื้อสเตรฟโตคอคคัส group B อย่างไรก็ตาม การทดลองในครั้งนี้พบการหดตัวของเซลล์ตับซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ค่อยพบในปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้สาเหตุของการหดตัวอาจเกิดจากการอดอาหารของปลาเนื่องจากพบว่าปลาที่ติดเชื้อจะไม่ค่อยกินอาหาร ส่วนการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองและการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวเข้าสู่สมองยังคล้ายกับรายงานของ Chang และ Plumb (1996) ที่พบการอักเสบและการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวเข้าสู่เยื่อหุ้มสมองในปลานิลและปลากดอเมริกันที่ติดเชื้อสเตรฟโตคอคคัสเช่นเดียวกัน

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดของปลาที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย พบว่าองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศใกล้ตายจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* อย่างรุนแรงจะต่ำกว่าชุดควบคุมมาก โดยค่าฮีมาโตคริต พลาสมาโปรตีนและปริมาณเม็ดเลือดของปลาที่ติดเชื้อจะลดลงมากกว่าชุดควบคุมประมาณ 50% ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับการทดลองของ Foda (1973) ที่รายงานถึงการลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินของปลาแอตแลนติก แซลมอล (*Salmo salar*) ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas salmonicida* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคฟูรันคูโลซีส (furunculosis) โดย Foda (1973) ให้เหตุผลว่าการลดลงของค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินเกิดขึ้น เนื่องจากการมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ ทั้งภายในและภายนอก หรือสาเหตุอื่น เช่น การที่เซลล์เม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยการย่อยสลายเม็ดเลือด ซึ่งสังเกตได้จากสีของพลาสมา การทดลองครั้งนี้พบว่าหลังการหมุนเหวี่ยงเพื่อเตรียมพลาสมาจะมีบางตัวอย่างเป็นสีชมพูหรือแดง ชี้ให้เห็นว่าเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย ซึ่งอาจจะสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถของเชื้อ *S. agalactiae* ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแกะในอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดได้เป็นแบบแอลฟ่า ชี้ให้เห็นว่าการลดลง

ของค่าองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เกิดจากการที่เม็ดเลือดถูกทำลายและการมีเลือดออกในอวัยวะภายใน

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย *S. agalactiae* มีบทบาทสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยสำคัญที่สร้างความรุนแรงให้แก่แบคทีเรียชนิดนี้ และการใช้วัคซีนในการป้องกันการเกิดโรคจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นที่ควรศึกษาเพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดยทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกรุ่นที่ 4 แก่นายนเรศ ซ่วนยุก คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณไกรสร ดุเหว่า คุณสมาภรณ์ จอมสวัสดิ์ และคุณอภิญญา ส่งประดิษฐ์ ที่ให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างปลานิลติดเชื้อในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์. 2538. คู่มือปฏิบัติการโรคและพยาธิปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และนรินทร์ สงสีจันทร์. 2543. การศึกษาค่าปกติของระบบภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ ฉบับ วทท. 22(ฉบับพิเศษ): 597-603.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. 2531. การใช้ไมโครคอมพิวเตอร์ประมาณค่าความเป็นพิษของสารเคมีที่มีต่อสัตว์น้ำ. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 3(1): 25-38.

Al-Harbi, A.H. 1994. First isolation of Streptococcus sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. Aquacult. 128: 195-201.

Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. London: Butterworths.

Baya, A.M., Lupiani, B., Hetrick, F.M., Roberson, B.S., Lukacovic, R., May, E. and Poukish, C. 1990. Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. J. Fish Dis. 13: 251-253.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5: 771-781.

Bromage, E.S., Thomas, A. and Owens, L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer.* Dis Aquat. Org. 36: 177-181.

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition. Baltimore, U.S.A.: The Williams and Wilkins company.

Chang, P.H. and Plumb, J.A. 1996. Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J. Fish Dis. 19: 235-241.

Chuard, C. and Reller, L.B. 1998. Bile-esculin test for presumptive identification of Enterococci and Streptococci: Effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. J. Clin. Microbiol. 36: 1135-1136.

Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J.F., Pascual, C., Garcia, J.A., Cutuli, M.T., Moreno, M.A., Collins, M.D. and Dominguez, L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J. Fish Dis. 19: 33-38.

Duremdez, R., Al-Marzouk, A., Qasem, J. A., Al-harbi, A. and Gharabally, H. 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. J. Fish Dis. 27: 307-310.

Eldar, A., Perl, S., Frelier, P.F. and Bercovier, H. 1999. Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. Dis. Aquat. Org. 36: 121-127.

Evans, J.J., Klesius, P.H., Gilbert, P.M., Shoemaker, C.A., Al Sarawi, M.A., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A. 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. J. Fish Dis. 25: 505-513.

Fernancez, M., Hickman, M.E. and Baker, C.J. 1998. Antimicrobial susceptibilities of group B

Streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1517-1519.

Foda, A. 1973. Changes in hematocrit and hemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a result of furunculosis disease. J. Fish Res. Board Can. 30: 467-468.

Hawke, J.P. 2000. Bacterial disease agents. **In** encyclopedia of aquaculture (ed. R. R., Stickney). pp. 69-97. New York, U.S.A.: John Wiley & Sons.

Humason, G.L. 1979. Animal tissue techniques. San Francisco: W. H. Freeman and Company,

Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. 1993. Bacterial Disease of Fish. New York, U.S.A.: Academic Press.

Komar, C., Tan, Z., Bolland, A. and Grisez, L. 2003. The prevalence of Streptococcus iniae infection in cultured fish of South East Asia. Program and abstract book, Proceeding on "Quality: The Focus of Asian Aquaculture" September 22-25, 2003. Ambassador Bangkok Hotel, Bangkok, Thailand. p 121.

Lancefield, R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med. 59: 571-591.

Larsen, H.M. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of the microhaematocrit technique with trout blood. Trans. Am. Fish. Soc. 90: 139-142.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Miyazaki, T., Kubota, S.S., Kaige, N. and Miyashita, T. 1984. A histopathological study of Streptococcal disease in tilapia. Fish Pathol. 19: 167-172.

Nguyen, H.T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K. 2001. Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Pathol. 36(1): 40-41.

Nguyen, H.T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K. 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. Aquacult. 205: 7-17.

Perera, R.P., Johnson, S.K., Collins, M.D. and Lewis, D.H. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* Hybrids. J. Aquat. Anim. Health. 6: 335-340.

Perera, R.P., Fiske, R.A. and Johnson, S.K. 1998. Histopathology of hybrid tilapias infected with a biotype of *Streptococcus iniae*. J. Aquat. Anim. Health. 10: 294-299.

Plumb, J.A. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames, Iowa, U.S.A. Iowa State University press.

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

Rasheed, V., Limsuwan, C. and Plumb, J. 1985. Histopathology of bullminnows, *Fundulus grandis* Baird & Girard, infected with a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. J. Fish Dis. 8: 65-74.

Robinson, J.A. and Meyer, F.P. 1966. Streptococcal fish pathogen. J. Bacteriol. 92: 512.

Shoemaker, C.A., Evans, J.J. and Klesius, P.H. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquacult. 188: 229-235.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2. Baltimore: Williams & Wilkins.

Straka, R.P. and Stokes, J.L. 1957. Rapid destruction of bacteria in commonly used diluent and its elimination. Appl. Microbiol. 5: 21.

Vandamme, P., Devriese, L.A., Pot, B., Kersters, K. and Melin, P. 1997. *Streptococcus difficile* is a non-hemolytic group B, type Ib Streptococcus. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 81-85.