ลักษณะของการเกิดโรคและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยง

นางสาวหทัยรัตน์ ไม้สัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STREPTOCOCCOSIS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES FROM FARMED TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICA*)

Miss Hathairat Maisak

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health

Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลักษณะของการเกิดโรคและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยง
โดย	นางสาวหทัยรัตน์ ไม้สัก
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.เบญจมาศ ปัทมาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.เบญจมาศ ปัทมาลัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หทัยรัตน์ ไม้สัก : ลักษณะของการเกิดโรคและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยง (STREPTOCOCCOSIS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES FROM FARMED TILAPIA *OREOCHROMIS NILOTICA*) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.สพ.ญ.ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย และ ผศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์, 82 หน้า.

ปลานิล (*Oreochromis nilotica*) จัดเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สามารถเลี้ยงได้ทุกสภาพภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ผลผลิตปลานิลเป็นที่นิยมบริโภคภายในประเทศและมีมูลค่าการส่งออกสูงสุดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจืดของประเทศไทย การพัฒนาระบบการเลี้ยงปลานิลเพื่อเพิ่มผลผลิตและเลี้ยงหนาแน่นทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหรือการระบาดของโรค เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเป็นสาเหตุโรครุนแรงในปลานิลและมีรายงานการสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย การศึกษานี้เป็นการศึกษาลักษณะของการเกิดโรคและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยง ปลานิลป่วยหรือตายจากอาการสันนิษฐานว่าเกิดการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสจำนวน 60 รายงานการเกิดโรคจาก 9 จังหวัด นำมาศึกษาลักษณะของการเกิดโรคโดยการชันสูตรซาก แยกเชื้อสเตรปโตคอคคัสเพื่อทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ amoxicillin, oxytetracycline, sulfadiazine/trimethoprim และ sulfadimethoxine/ormetoprim จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API และยืนยันชนิดของเชื้อทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR การศึกษารอยโรคของปลานิลป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิสพบลักษณะผิดปกติ ได้แก่ จุดเลือดออกที่อวัยวะภายใน ของเหลวสีน้ำเลือดในช่องท้อง ตับ ไต และม้ามมีขนาดใหญ่ ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเป็นจุดสีขาวและพบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบโคโลนี เชื้อติดสีแกรมบวก เซลล์กลมเรียงต่อกันเป็นสายไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส การทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดย agar dilution technique แสดงความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิด การจำแนกเชื้อสเตรปโตคอคคัสด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API จำนวน 60 รายงานการเกิดโรค พบเป็น *Streptococcus agalactiae* 47 ราย (81.67%) *S. dys.ssp.equisimilis* 4 ราย (6.67%) *S. porcinus* 8 ราย (13.33%) และ *S. constellatus* 1 ราย (1.67%) ผลการยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer จาก sequence ใน 16sRNA gene สำหรับตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสจำนวน 3 คู่ คือ primer C1, 5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA A-3' และ C2, 5'-TAC AAC GCA GGT CCA TCT-3'; primer F1, 5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3' และ IMOD, 5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3'; primer Sin-1, 5'-CTA GAG TAC ACA TGT ACT AAG-3' และ Sin-2, 5'-GGA TTT TCC ACT CCC ATT AC-3' การตรวจระบุชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสโดยวิธีทางชีวโมเลกุลแสดงผลต่างจากการจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี คือการตรวจระบุเชื้อโดยวิธี PCR พบ *S. agalactiae* 53 ราย (83.33%) และ *S. iniae* 7 ราย (11.64%)

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข
สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4875574131 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD: STREPTOCOCCOSIS / ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY / TILAPIA

HATHAIRAT MAISAK : STREPTOCOCCOSIS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES FROM FARMED TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICA*).

THESIS ADVISOR : ASST.PROF.BENJAMAS PATAMALAI, D.V.M., Ph.D

THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF.JANENUJ WONGTAVATCHAI, D.V.M., MS., Ph.D AND ASST.PROF.ALONGKORN AMONSIN, D.V.M., Ph.D 82 PP.

Tilapia *(Oreochromis niloticus)* is being increasingly cultured for food fish in many countries. Amongs diseases in intensive tilapia farming, Streptococcosis causes the most reduction in stocking of tilapia and has economic consequences on fisheries in many areas of the world. With the intensive growth of tilapia culture, Streptococcal infections are becoming a major threat to the tilapia industry worldwide. The present study aims to identify Streptococcal bacteria in Thai cultured tilapia and their susceptibility to different antimicrobials; amoxicillin, oxytetracycline, sulfadiazine/trimethoprim and sulfadimethoxine/ormetoprim. Diseased fishes obtained from 9 provinces, 60 clinical cases were used for the study. Streptococcus bacteria was isolated from the kidney of diseased fish and biochemically identified using the API system. Bacterial isolates those represented morphology and biochemical profiles of *Streptococcus spp.* were further confirmed by the polymerase chain reaction (PCR). The diseased fish was found to have gross lesions as generally described in fish Streptococcosis; including generalized hemorrhage of the visceral organs, serosanguneous peritonitis and congestion of the liver, kidney and spleen. Bacteriological procedures on the sample obtained from nephritic tissue showed dull-white pin point colonies with hemolysis and catalase negative. Microscopic morphology of bacterial isolates revealed gram positive, long chain cocci. Antimicrobial susceptibility test showed that most of isolates were susceptible to all 4 compounds tested. Biochemical analysis with the API system indicated that isolates were *Streptococcus agalactiae* 47 cases (81.67%) *S. dys.ssp.equisimilis* 4 cases (6.67%) *S. porcinus* 8 cases (13.33%) and *S. constellatus* 1 cases (1.67%). PCR identification was performed by using primers templated from specific sequences of 16sRNA gene ; C1 (5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA A-3'), C2 (5'-TAC AAC GCA GGT CCA TCT-3'); F1 (5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3'), IMOD (5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3'); and Sin-1 (5'-CTA GAG TAC ACA TGT ACT AAG-3'), Sin-2 (5'-GGA TTT TCC ACT CCC ATT AC-3'). The PCR technique demonstrated different results from biochemical identification, PCR products suggesting the 16sRNA amplification of *S. agalactiae* were 53 out of 60 cases (83.33%) and other cases were *S. iniae* (7 cases, 11.64%).

Department Veterinary Public Health Student's signature Hathairat Maisak

Field of study Veterinary Public Health Advisor's signature Benjamas Patamalai

Academic year 2006 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิตเรื่อง ลักษณะของการเกิดโรคและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยง สำเร็จลงได้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น แก้ไข และตรวจทานวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขทุกท่านสำหรับคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ทั้งด้านการทดลอง การเขียน และการนำเสนอวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนวิจัย ครั้งที่ 2 ประจำปีงบประมาณ 2549

ขอขอบคุณ สพ.ญ. ญาณิน ลิมปานนท์ และ สพ.ญ.นุชนารถ ทิพย์มงคลศิปส์ สำหรับคำแนะในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียและขั้นตอนการทำ MIC

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัวของผู้เขียนซึ่งมีส่วนทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1-4
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	4
ขอบเขตการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5-20
ตลาดปลานิลของประเทศไทย	5
ปัญหาด้านคุณภาพปลานิลของประเทศไทย	6
การควบคุมมาตรฐานปลานิลส่งออก	6
โรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลา	12
เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสก่อโรคทั้งในปลาและคน	16
การตรวจวินิจฉัยยืนยันการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลา	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	21-33
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	21
วิธีดำเนินการวิจัย	23
การทดลองส่วนที่ 1 ศึกษาลักษณะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลที่เพาะเลี้ยง ศึกษารอยโรคและวิการของปลานิลป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส	23
ศึกษาชนิดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง	
1. ตรวจวินิจฉัยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเบื้องต้น	24
2. จำแนกชนิดเชื้อจากคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API	25
3. การตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุล	27
3.1 การสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส	27
3.2 การเลือก primer ที่มีความจำเพาะ	30
3.3 การศึกษาขั้นตอนการทำ PCR amplification	30
4. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส	31
การทดลองส่วนที่ 2 ศึกษาความไวรับของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสต่อยาต้านจุลชีพ	32

บทที่ หน้า

บทที่ 4 ผลการศึกษา 34-47

การทดลองส่วนที่ 1 ศึกษาลักษณะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลที่เพาะเลี้ยง

1. รอยโรคและวิการของปลานิลป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส..... 34

2. ชนิดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

2.1 การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น..... 36

2.2 ชนิดเชื้อจากคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API..... 38

3. การตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุล..... 39

4. จำแนกชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัสทั้งหมดจัดกลุ่มตามชนิดของเชื้อและแหล่งระบาด..... 42

การทดลองส่วนที่ 2 ศึกษาความไวรับของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสต่อยาต้านจุลชีพ.... 43

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ 48

รายการอ้างอิง..... 52

ภาคผนวก..... 56

ภาคผนวกที่ 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวกที่ 2 : ขั้นตอนการย้อมสีแกรมและการทดสอบเอนไซม์คะตาเลส

ภาคผนวกที่ 3 : API Identification

ภาคผนวกที่ 4 : การเตรียมยาต้านจุลชีพทดสอบ

ภาคผนวกที่ 5 : คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิล

ภาคผนวกที่ 6 : Minimum Inhibitory Concentration (MIC)ของเชื้อสเตรปโตคอคคัส

ภาคผนวกที่ 7 : ประวัติของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิล

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 82

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
ตารางที่ 1	รายงานระบาดวิทยาการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* จากปลาสู่คน.....	17
ตารางที่ 2	การจำแนกชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี.....	19
ตารางที่ 3	Identification table (API STREP20, BioMeieux) %positive reaction……	26
ตารางที่ 4	Sequence ของ primer สำหรับตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส.....	30
ตารางที่ 5	ความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่ยั้บยั้งการเจริญของ *S. pneumonia*…….	33
ตารางที่ 6	เปอร์เซ็นต์ที่พบอาการผิดปกติของปลานิลที่ป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส.....	34
ตารางที่ 7	คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆ	38
ตารางที่ 8	เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆ ที่แยกได้จากปลาป่วยเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ API STREP20 กับการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR…….....	40
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างผลการตรวจวินิจฉัยระหว่างวิธี API STREP20 กับ PCR.....	42
ตารางที่ 10	Minimum Inhibitory Concentration 50% และ 90% (MIC_{50} และ MIC_{90}) ของยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด.....	44
ตารางที่ 11	คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus iniae* ที่ยืนยันด้วยวิธี PCR……..	49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
รูปที่ 1	กฎระเบียบและมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบรับรองสินค้ากลุ่มสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์	7
รูปที่ 2	ตำแหน่งอวัยวะภายในสำหรับเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส	24
รูปที่ 3-4	ลักษณะรอยโรคภายนอกของโรคสเตรปโตคอคโคซิส	35
รูปที่ 5-8	ลักษณะรอยโรคภายในของโรคสเตรปโตคอคโคซิส	35
รูปที่ 9	ลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส	37
รูปที่ 10	ลักษณะเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเมื่อย้อมสีแกรม	37
รูปที่ 11	การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase	37
รูปที่ 12	การจำแนกชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัสจากคุณสมบัติชีวเคมีด้วย API STREP20	37
รูปที่ 13	DNA band ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส	39
รูปที่ 14	กราฟแสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration ของยา Amoxicillin และ Oxytetracycline	45
รูปที่ 15	กราฟแสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration ของยา Sulfadiazine/Trimethoprim	46
รูปที่ 16	กราฟแสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration ของยา Sulfadimethoxine/Ormetoprim	47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลานิล *Oreochromis nilotica* เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งอยู่ในตระกูล Cichlidae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยีกา (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2547) ปลานิลเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงทั่วไปทั้งในภาคพื้นเอเชียและประเทศสหรัฐอเมริกาเนื่องจากเจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่ายเหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อได้เป็นอย่างดี และเนื้อปลานิลเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544) ผลผลิตปลานิลทั่วโลกมีมากเป็นอันดับ 9 ของผลผลิตสัตว์น้ำทั่วโลกที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง และมีมากกว่าปลาแซลมอน กุ้งทะเล และหอยแมลงภู่ ผลผลิตปลานิลทั่วโลกในปี 1990 มีปริมาณเพียง 830,000 ตัน ในปีต่อ ๆ มาความต้องการเพิ่มสูงขึ้นโดยปริมาณการผลิตปลานิลทั่วโลกในปี 2005 ประมาณ 2.2 ล้านตัน ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง โดยทวีปเอเชียประเทศจีนมีผลผลิตปลานิลสูงสุด รองลงมาได้แก่ อินโดนีเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน (World aquaculture, 2005) สำหรับประเทศไทย ปลานิลจัดว่าเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจโดยสามารถเลี้ยงได้ทุกสภาพในภูมิภาคต่างๆ ของไทย และเป็นปลาที่ประชาชนนิยมเลี้ยงกันมาก ทั้งในรูปแบบอุตสาหกรรมการค้าและการเลี้ยงเพื่อบริโภคในครัวเรือน (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544) เมื่อพิจารณาศักยภาพการผลิตสัตว์น้ำจืดของประเทศไทยในปัจจุบัน ได้แก่ ปลาดุก ปลาช่อน ปลานิล และกุ้งก้ามกราม จำนวนการผลิตโดยรวมประมาณ 250,000 ตันต่อปี โดยเฉพาะปลานิลสามารถผลิตได้ปริมาณ 100,000 ตันต่อปี พบว่าปริมาณการผลิตเพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศและสามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดผู้บริโภคและตลาดส่งออก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป (กรมสินค้าส่งออก, 2548) โดยประเทศไทยจัดอยู่ในลำดับ 5 หรือ 6 ของโลกในการผลิตปลานิลสูงสุด (World aquaculture, 2005) มูลค่าการส่งออกปลานิลปัจจุบันประมาณ 600 ล้านบาท ซึ่งจัดว่าเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าสูงสุดของสัตว์น้ำจืด ผลิตภัณฑ์ปลานิลส่งออก ได้แก่ ปลานิลสดแช่เย็น ปลานิลสดแช่แข็ง เนื้อปลานิลแล่แช่เย็น เนื้อปลานิลแล่แช่แข็ง ปลานิลอบแห้งและผลิตภัณฑ์อื่นๆ (กรมสินค้าส่งออก, 2548) จากการพัฒนาระบบการเลี้ยงให้เป็นระบบอุตสาหกรรมในปัจจุบันเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดผู้บริโภคและตลาดส่งออก ผู้เลี้ยงส่วนใหญ่จึงเร่งเพิ่มกำลังการผลิตโดยการปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นมากขึ้น รวมทั้งขาดการจัดการและระบบการป้องกันโรคเข้าฟาร์ม (Biosecurity system) ไม่เป็นมาตรฐานของอุตสาหกรรมการผลิตปลาเป็นผลให้สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงมีสภาวะไม่เหมาะสม นำไปสู่ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและการระบาดของโรคที่รุนแรงภายในฟาร์ม เป็นต้นเหตุสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิต (Americulture, 1999; Evans et al., 2000) และโรคระบาดที่เกิดขึ้นในปลานิลอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพผู้บริโภคจากการได้รับเชื้อผ่านทางปลา (OIE[b], 2005)

โรคติดเชื้อที่พบได้ในปลานิลที่เพาะเลี้ยง เช่น โรคจากปรสิต โรคติดเชื้อแบคทีเรีย และโรคติดเชื้อริคเกตเซีย เป็นต้น แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครุนแรงในปลานิลและเป็นต้นเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลทั่วโลก (Evans et al., 2000) จากการศึกษาของ Evan et al. (2002) โดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* 3 isolates ที่เคยมีการระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลา (the Kuwait isolate, KF1; USDA mullet, No. 11 brain isolate; USDA seabream, No. 37 brain isolate) เข้าทางช่องท้องพบว่าปลานิลที่ได้รับเชื้อจาก USDA mullet และ USDA seabream แสดงอาการของโรคภายใน 24 ชั่วโมง และมีอัตราการตายสูงถึง 100 และ 90% ภายใน 7 วันหลังได้รับเชื้อ

โรค Streptococcosis มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมบวกสเตรปโตคอคคัสที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (beta-hemolysis) และไม่สมบูรณ์ (alpha-hemolysis) ซึ่งโรคนี้ก่อให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดปลา สามารถเกิดการระบาดในบริเวณที่เคยมีและไม่มีโรคได้บ่อยครั้งฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลมักเกิดโรคระบาดจากเชื้อ *Streptococcus iniae* และ *Streptococcus agalactiae* (Yanong and Floyed, 2005)

ผลกระทบของการเกิดโรค Streptococcosis ทำให้เกิดอัตราการตายของปลาที่เพาะเลี้ยงสูงมากกว่า 50% ในช่วงเวลา 3-7 วันหลังจากติดเชื้อ ถ้ามีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงอาจพบอัตราการตายที่สูงถึง 80-100% (Yanong and Floyed, 2005) พบการสูญเสียปลาขนาดส่งขายปริมาณ 4,000 ตัวต่อวัน (Americulture, 1999) การเกิดโรคส่วนใหญ่เป็นแบบเรื้อรัง ปลามีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากการกินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหารทำให้ระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้นเป็น 10-12 เดือน จากปกติขุนนาน 7-8 เดือน และผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน สภาพซากไม่สมบูรณ์มีตำหนิ ไม่มีความสด เก็บได้ไม่นาน ปลาที่เป็นโรคเรื้อรังจะอ่อนแอและตายระหว่างการขนส่ง นอกจากนี้ปริมาณเชื้อที่ตกค้างอยู่ในเนื้อปลามีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อปลา เป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก (Americulture, 1999) เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการสูญเสียประมาณ 7,500 ล้านบาท จากการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิล (Evans et al., 2000)

เนื่องจากโรค Streptococcosis เกิดขึ้นได้ในปลานิลทุกวัย ตั้งแต่ระยะพ่อแม่พันธุ์ปลา ไข่ปลา ลูกปลา จนเป็นปลาส่งขาย (เจนนุช และคณะ, 2549) ดังนั้นเมื่อพบการระบาดของโรค Streptococcosis จึงจำเป็นต้องใช้ยาต้านจุลชีพสำหรับการรักษา ควบคุมและป้องกันโรคในทุกระยะของการเลี้ยง ซึ่งส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น และยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์น้ำส่วนใหญ่มักผสมในอาหารซึ่งกระจายตัวได้ดีในน้ำและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยผ่านทางน้ำทิ้งจากฟาร์มทำให้แบคทีเรียปกติในสิ่งแวดล้อม (normal flora) และปลาในธรรมชาติเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ และพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อปลาซึ่งมีผลกระทบต่อสุขภาพของคน เช่น การใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อในคนทำได้ยากขึ้น (Angulo, 1999; WHO Technical Report Series, 1999) จากปัญหาการใช้ยาต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาและยาสัตว์ตกค้างที่พบในปัจจุบันแสดงถึงการขาดข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างถูกต้องสำหรับป้องกันและรักษาโรค Streptococcosis

ในปลานิลจึงควรมีการศึกษาชนิดของยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพและข้อบ่งชี้ในการป้องกันหรือรักษาโรค Streptococcosis นอกจากนี้ควรใช้วิธีการอื่นๆ ในการควบคุมและป้องกันโรคร่วมกัน ได้แก่ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อการเกิดโรค (host susceptibility) การตรวจตัวอย่างปลาและคุณภาพน้ำอย่างสม่ำเสมอ การใช้ยาฆ่าเชื้อ การใช้วัคซีนป้องกันโรค Streptococcosis เป็นต้น

ผลกระทบต่อสุขภาพผู้บริโภค : *Streptococcus iniae* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรวมทั้งคน มีรายงานว่าการติดเชื้อในคนโดยผ่านทางปลาเกิดจากการติดเชื้อทางบาดแผลในขณะจับปลาหรือเตรียมปลาสดในการทำอาหารและเกิดอาการป่วยในระยะเวลาต่อมา คนที่เป็นโรคส่วนใหญ่เป็นคนจับปลาหรือเตรียมปลาก่อนทำอาหาร อาการที่พบหลังจากติดเชื้อ คือ การอักเสบบริเวณที่ได้รับการสัมผัสกับเชื้อ เช่น มือโดยเป็นการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณส่วนใต้หนัง (cellulitis) และมีอาการไข้ในระยะเวลาต่อมา (Weinstein et al., 1997)

จากการศึกษาสถานภาพของการเกิดโรค Streptococcosis ในประเทศไทยพบว่า การระบาดของโรคมักเกิดขึ้นในทุกภูมิภาคของประเทศที่มีการเพาะเลี้ยงปลานิลอย่างหนาแน่น โดยสาเหตุของโรคส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (เจนนุช และคณะ, 2549) โรค Streptococcosis ในปลานิลเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการผลิตและการส่งออกปลานิลของประเทศไทยซึ่งอาจจะมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ หากไม่ได้รับการควบคุมและป้องกันอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาลักษณะของการเกิดโรคและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยงมีความจำเป็นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาการจัดการและควบคุมโรค Streptococcosis ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยงของประเทศไทย
2. ศึกษาชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง
3. ศึกษาความไวรับต่อยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมต่อการรักษาโรครวมทั้งการใช้ยาที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคปลานิล

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้แบ่งเป็น **การวิจัยโดยการสังเกต** (Observational Research) ได้แก่ การศึกษาลักษณะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง และ**การวิจัยโดยการทดลอง** (Experimental Research) ประกอบด้วยการทดลอง 3 ส่วน คือ การทดลองส่วนที่ 1 ศึกษาชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุด้วยการศึกษาลักษณะทางกายภาพและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี การทดลองส่วนที่ 2 เป็นการทดลองการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล การทดลองส่วนที่ 3 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดในห้องปฏิบัติการ (in vitro) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสและเปรียบเทียบชนิดและปริมาณยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงชนิดและสเตรนของการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยงในแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย
2. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางมาตรการ หรือการจัดการเพื่อลดความเสี่ยงของการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในคนโดยผ่านทางปลา และการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในฟาร์มปลานิลของประเทศไทยเพื่อเป็นแนวทางช่วยลดความสูญเสียในปลานิลที่เพาะเลี้ยง
3. พัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลให้มีศักยภาพในการแข่งขันเพื่อการส่งออก คุณภาพเนื้อปลานิลที่ผลิตโดยประเทศไทยได้มาตรฐาน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
(Literature review)

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่เลี้ยงได้ทุกสภาพในภูมิภาคต่างๆ ของไทยและแพร่หลายกันทั่วโลกทั้งทวีปเอเชีย อัฟริกาและอเมริกาโดยเฉพาะในเขตประเทศร้อนชื้น เนื่องจากเป็นปลาที่เติบโตเร็วและนิยมบริโภค (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544)

ตลาดปลานิลของประเทศไทย

ตลาดภายในประเทศ

ปัจจุบันผู้บริโภคภายในประเทศเริ่มสนใจบริโภคปลานิลมากขึ้นทำให้การจำหน่ายมีแนวโน้มที่สูงขึ้นและผลผลิตปลานิลส่วนใหญ่ที่บริโภคภายในประเทศอยู่ในรูปปลานิลสดประมาณ 89% ส่วนแปรรูปอื่นๆ เช่น ตากแห้งทำเค็ม ประมาณ 7-8% ส่วนปลานิลและเนื้อปลานิลแช่แข็งมีการจำหน่ายในประเทศเป็นบางส่วน (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544)

ตลาดต่างประเทศ

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 ความต้องการบริโภคปลานิลในหลายๆ ประเทศมีมากขึ้น ทำให้ประเทศไทยเริ่มพัฒนาการเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตปลานิลในรูปแบบอุตสาหกรรมที่เป็นมาตรฐานและสามารถส่งปลานิลออกไปขายยังประเทศต่างๆ ได้ (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544) ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีบทบาทและศักยภาพในการค้าสินค้าประมงติด 10 อันดับแรกของโลก และปลานิลจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย ปริมาณการผลิตปลานิลในปี พ.ศ. 2547 เท่ากับ 100,000 ตัน (มารุต, 2547; World aquaculture, 2005) สำหรับบริโภคภายในและส่วนหนึ่งส่งออกนอกประเทศเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ปลานิลสดแช่เย็น ปลานิลสดแช่แข็ง เนื้อปลานิลสดแช่เย็น ปลานิลอบแห้ง และผลิตภัณฑ์แปรรูปอื่นๆ เช่น เนื้อปลาชุปแป้งทอด เนื้อปลารมควัน ซาชิมิ (sashimi) หนังปลานิลอบแห้ง เป็นต้น โดยมีการนำหัวและเครื่องในต่างๆ ออกก่อนบรรจุสินค้า (กรมสินค้าส่งออก, 2548; World aquaculture, 2005) ขนาดปลานิลที่นำมาแล่เนื้อต้องมีน้ำหนักตัว 400 กรัมต่อตัวขึ้นไป เพื่อให้ได้เนื้อปลาขนาด 40-60 กรัม และ 60-80 กรัมต่อชิ้น เป็นลักษณะตามต้องการของตลาดต่างประเทศ (มกอช., 2547) ผลิตภัณฑ์ปลานิลส่งออกที่ต้องการมากสำหรับตลาดต่างประเทศ คือ ปลานิลและเนื้อปลานิลสดแช่แข็งแบบเป็นตัวๆ หรือชิ้นเดียว (Individually Quick Frozen; IQF) (กรมสินค้าส่งออก, 2548; World aquaculture, 2005) ตลาดต่างประเทศที่ต้องการปลานิลแบบแช่แข็ง ได้แก่ ฝรั่งเศส (28.92%) ซาอุดิอาระเบีย (34.53%) ยุโรปส่วนตะวันตก (7.04%) อาหรับ (8.48%) คูเวต (6.13%) โปรตุเกส (4.42%) อิตาลี (1.75%) เบลเยี่ยม (1.70%) เนเธอร์แลนด์ (1.41%) และยูเครน (1.71%) ส่วนตลาดต่างประเทศที่ต้องการเนื้อปลานิลสดแช่แข็ง ได้แก่ เบลเยี่ยม (32.26%) เนเธอร์แลนด์ (9.35%) ยุโรปส่วนตะวันตก (8.61%) อเมริกา (9.91%) ซาอุดิอาระเบีย (27.80%) อาหรับ (12.06%) ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ อิตาลี และสิงคโปร์ ปริมาณความต้องปลานิลส่งออกตลาดต่างประเทศเพิ่มขึ้นในแต่ละปี (กรมสินค้าส่งออก, 2548)

ปัญหาด้านคุณภาพปลานิลของประเทศไทย

ปัญหาสำคัญในการกำหนดมาตรฐานและราคาขายปลานิลในประเทศและการส่งออก ได้แก่

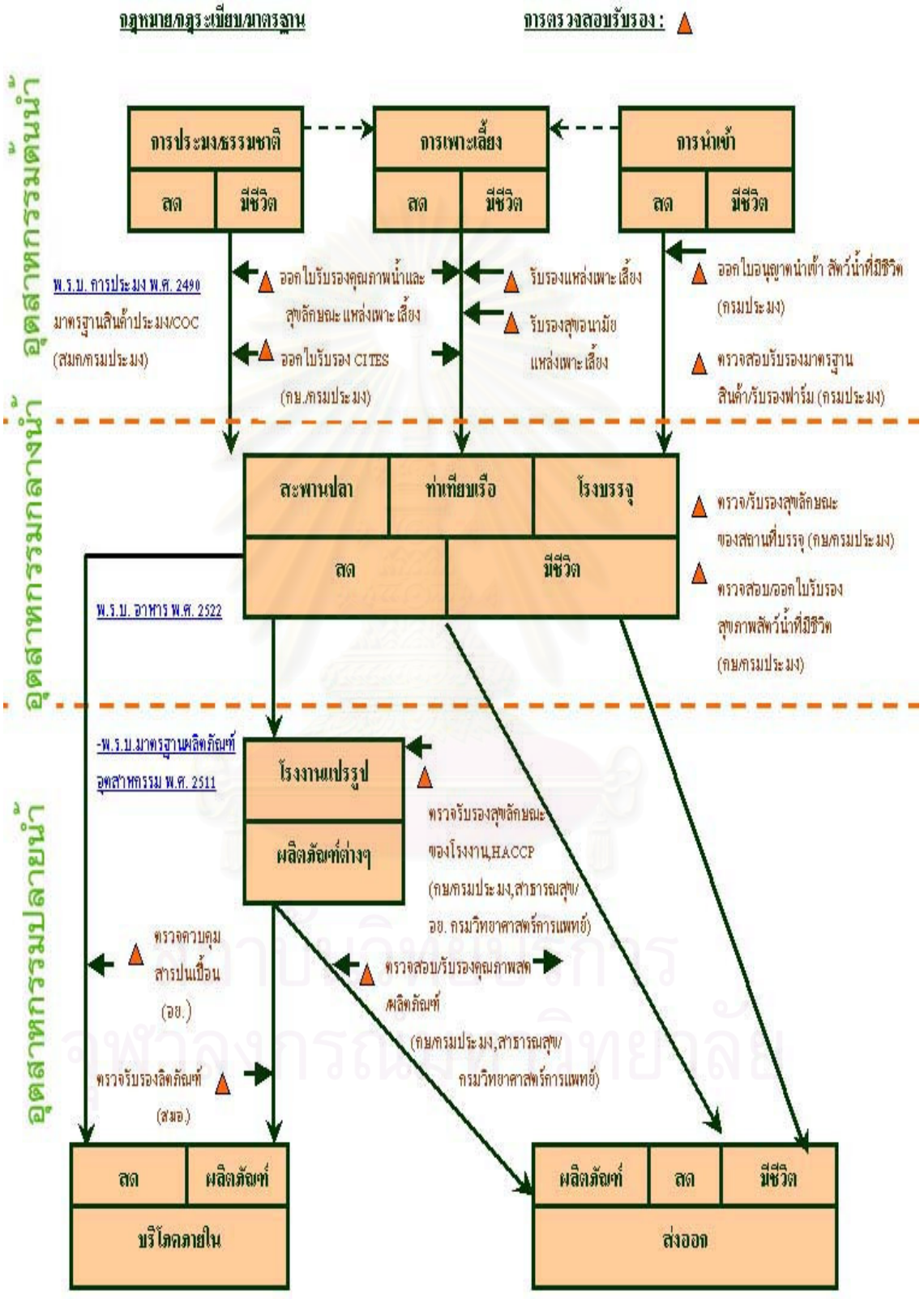
1. ขนาดพันธุ์ปลา ความหลากหลายของสายพันธุ์ในการเลี้ยง ทำให้ได้ขนาดและน้ำหนักปลานิลไม่สม่ำเสมอ
2. กลิ่นโคลนของเนื้อปลา เป็นปัญหามากต่อการส่งออกและส่วนใหญ่เกิดจากการเลี้ยงในบ่อดิน (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544; มกอช., 2547) สาเหตุเกิดจากการให้อาหารปริมาณมากเกินไป ทำให้จุลินทรีย์และสาหร่ายสีน้ำแกมเขียวบางชนิดเพิ่มจำนวนและผลิตสารจีออสมิน (Geosmin) ออกมา ปลาสามารถดูดซับสารชนิดนี้โดยตรงทางเหงือกหรือกินสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิดและไปสะสมตามเนื้อเยื่อไขมันปลา การกำจัดกลิ่นโคลนของเนื้อปลาทำได้โดยเลี้ยงในน้ำสะอาดและงดให้อาหารเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิน้ำมากกว่า 24 องศาเซลเซียส (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544)
3. การเกิดโรคระบาด

ปัจจุบันการเร่งกำลังการผลิตโดยการเลี้ยงหนาแน่นเพื่อตอบสนองต่อความต้องการปริมาณปลานิลที่สูงขึ้น ถ้าฟาร์มขาดการจัดการที่ดีและระบบการป้องกันโรคเข้าฟาร์ม (Biosecurity system) ไม่เป็นไปตามมาตรฐานของอุตสาหกรรมการผลิตปลาเป็นผลให้เกิดโรคระบาดในฟาร์มได้ง่ายถ้ามีเชื้อที่ก่อโรคปนเปื้อนอยู่ในบ่อเลี้ยง (Americulture, 1999) ความหนาแน่นสำหรับการเลี้ยงปลานิลมีอัตราการปล่อยปลาประมาณ 5,000-8,000 ตัวต่อไร่ (2-3 ตัวต่อลิตร) สำหรับปลาขนาด 3-5 เซนติเมตร (2-4 กรัม) (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544) จากการศึกษาของ Shoemaker et al. (2000) โดยแช่ปลานิลในน้ำที่มีเชื้อ *Streptococcus iniae* เป็นเวลา 20 นาที ตามความหนาแน่นในแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ความหนาแน่น 25 ตัว/ลิตร (5.6 กรัม/ลิตร) ความหนาแน่น 50 ตัว/ลิตร (11.2 ตัว/ลิตร) และความหนาแน่น 100 ตัว/ลิตร (22.4 กรัม/ลิตร) เลี้ยงเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าการเลี้ยงปลานิลตั้งแต่ 50 ตัว/ลิตร (11.2 ตัว/ลิตร) พบอัตราการตายสูง ในกรณีที่มีการเลี้ยงแบบระบบปิดจะพบอัตราการตายสูงมากกว่า 70% ผลจากปัญหาการเกิดโรคระบาดในอุตสาหกรรมการผลิตปลานิล ประเทศผู้นำเข้าอาจเข้มงวดด้านคุณภาพของปลานิลโดยกำหนดเกณฑ์มาตรฐานในอนาคต

การควบคุมมาตรฐานปลานิลส่งออก

ปลานิลเป็นสินค้าประมงที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและมีศักยภาพในการส่งออก เพื่อให้ปลานิลของประเทศไทยเป็นที่ยอมรับในระดับชาติและสากล สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงจัดทำมาตรฐานปลานิลขึ้น โดยให้ความสำคัญในเรื่องความปลอดภัยของอาหารที่ปลอดจากสารพิษและเชื้อโรคที่ส่งผลต่อสุขภาพผู้บริโภค และสอดคล้องกับมาตรฐานสากล (มกอช., 2547) คณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO (Codex) มีหน้าที่กำหนดมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ โดยอาหารประเภทเนื้อสัตว์ต่างๆ ต้องผ่านการตรวจสอบและประเมินความเสี่ยงอันตรายที่มาจากอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ได้แก่ อันตรายทางชีวภาพ เคมี และกายภาพ หรือเป็นเหตุให้เกิดโรคระบาดสัตว์กลุ่มเดียวกัน (WHO Technical Report Series, 1999) การตรวจสอบและประเมินความเสี่ยงควรเริ่มตั้งแต่การตรวจวัดที่ระดับฟาร์ม จนถึงการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มาสู่ผู้บริโภค (มกอช., 2547; OIE[a], 2005) ดังรูปที่ 1 สำหรับการควบคุมมาตรฐานการผลิตปลานิลต้องประกอบด้วย มาตรฐานความปลอดภัยด้านอาหารตามที่กำหนดไว้ในโครงการมาตรฐานอาหารของ FAO/WHO (Codex) ออกข้อกำหนด Standard for fish and Fishery Product (FAO/WHO, 2004) และองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health หรือ Office International des Epizooties, OIE) กำหนด Aquatic Animal Health Code (OIE[a], 2005)

รูปที่ 1 กฎระเบียบและมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบรับรองสินค้ากลุ่มสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์



ที่มา : มกอช., 2549

การส่งออกปลานิลของประเทศไทยจะมีหน่วยงานของ มกอช. ซึ่งเป็นหน่วยงานกลางขององค์กรระหว่างประเทศกำกับดูแลเพื่อสร้างความมั่นใจว่าประเทศไทยปฏิบัติตามสิทธิและหน้าที่ตามข้อตกลงระหว่างประเทศและองค์กรที่เกี่ยวกับการพัฒนามาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารหรือที่เกี่ยวข้องกับการค้าโดย มกอช. ได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานปลานิลในปี 2547 พิจารณาจากคุณภาพ ขนาด การบรรจุผลิตผล สารตกค้าง (residue) และการปนเปื้อน (contaminate) ของผลิตภัณฑ์ (มกอช., 2547)

ข้อกำหนดเรื่องคุณภาพ

โดยคุณภาพขั้นต่ำที่ยอมรับได้คือ เป็นปลานิลสดทั้งตัวมีส่วนหัว ลำตัว หาง ครีบ และส่วนอื่นๆ ครบถ้วน ไม่มีตำหนิที่เห็นได้ชัด เช่น ความพิการ เป็นแผลบนลำตัวหรือท้องแตก และไม่เน่าเสีย สะอาดปลอดจากพยาธิเมื่อตรวจสอบด้วยสายตาและไม่เป็นโรค ไม่มีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นโคลน ไม่มีสิ่งแปลกปลอมซึ่งไม่ใช่ส่วนของปลานิล เช่น เศษหิน กรวด ทราย โคลน เพื่อตรวจสอบความบกพร่องจากการปฏิบัติไม่ถูกสุขลักษณะ (มกอช., 2547; อุษา, 2548)

ข้อกำหนดเรื่องขนาด ขนาดปลานิลจะพิจารณาจากน้ำหนักตัวดังนี้ (มกอช., 2547)

ขนาด	น้ำหนัก (กรัม/ตัว)
1	>1,000
2	>700 - 1,000
3	>500 - 700
4	>300 - 500
5	$\leq$300

ข้อกำหนดเรื่องการบรรจุผลิตผล

ปลานิลที่บรรจุในภาชนะเดียวกันต้องเป็นผลผลิตจากแหล่งน้ำธรรมชาติหรือบ่อหรือกระชังจากแหล่งเดียวกันโดยมีฉลากหรือหนังสือกำกับพันธุ์สัตว์น้ำ การบรรจุต้องบรรจุปลานิลในภาชนะบรรจุที่สามารถเก็บรักษาปลานิลได้เป็นอย่างดีโดยภาชนะที่บรรจุต้องทำจากวัสดุไม่ดูดซับน้ำ สะอาดและถูกสุขลักษณะปราศจากกลิ่นและวัตถุแปลกปลอมมีคุณสมบัติทนทานต่อการปฏิบัติการขนส่งและรักษาคุณภาพปลาและปลอดภัยสำหรับการบรรจุมีปริมาณบรรจุที่เหมาะสม ปลาไม่ช้ำเสียหายในระหว่างการขนส่ง ในกรณีที่ใช้น้ำแข็งให้ความเย็น น้ำแข็งที่ใช้ต้องสะอาดและอุณหภูมิในการเก็บรักษาไม่ควรเกิน 0ºC (มกอช., 2547; FAO/WHO, 2001)

ข้อกำหนดเรื่องสารตกค้าง (residue)

แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ สารปนเปื้อน ได้แก่ สารโลหะหนัก ยาฆ่าแมลง เป็นต้น และยาสัตว์ตกค้างโดยปริมาณที่ตกค้างเป็นไปตามข้อกำหนดในกฎหมายที่เกี่ยวข้องและกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติเรื่องสารปนเปื้อนและยาสัตว์ตกค้าง (มกอช., 2547)

สารปนเปื้อน

สารปนเปื้อน หมายความว่า สารที่ปนเปื้อนกับอาหารซึ่งเกิดจากกระบวนการผลิต กรรมวิธีการผลิตโรงงาน หรือสถานที่ผลิต การดูแลรักษา การบรรจุ การขนส่งหรือการเก็บรักษา หรือเกิดเนื่องจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2529)

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 กำหนดค่ามาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน

สารปนเปื้อน	**ค่ามาตรฐาน** (mg/kg)
1. โลหะหนัก	
- ดีบุก	250
- สังกะสี	100
- ทองแดง	1
- ตะกั่ว	1
- สารหนู	2
- สารปรอท	
- อาหารทะเล	0.5
- อาหารอื่นๆ	0.02
2. อะฟลาท็อกซิน	0.02
3. สารอื่นๆ	

ยาสัตว์ตกค้าง (veterinary drug residues)

ยาสัตว์ตกค้าง หมายความถึง สารประกอบตั้งต้น สารที่เกิดจากกระบวนการสร้างและสลาย (metabolite) สารเจือปนที่เกี่ยวข้องตกค้างในอวัยวะหรือผลผลิตของสัตว์ที่บริโภคได้ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2544)

ในการผลิตสัตว์น้ำเพื่อการค้าส่วนใหญ่เมื่อเกิดปัญหาโรคระบาดขึ้นผู้เลี้ยงนิยมใช้ยาต้านจุลชีพรักษาและควบคุมโรคซึ่งเกิดปัญหาต่างๆ ตามมาคือ แบคทีเรียเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพจากการเลือกใช้ยารักษาและควบคุมโรคในปริมาณและชนิดไม่ถูกต้อง การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์น้ำส่วนใหญ่มักผสมในอาหารซึ่งละลายได้ดีในน้ำ และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยผ่านทางน้ำทิ้งจากฟาร์มทำให้แบคทีเรียปกติในสิ่งแวดล้อม (normal flora) และปลาในธรรมชาติเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยแบคทีเรียที่เกิดการดื้อยาสามารถส่งผ่านลักษณะที่จำเพาะ (determinant) เกี่ยวกับการดื้อยาไปสู่แบคทีเรียตัวอื่นๆ เช่น แบคทีเรียที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus, Escherichia coli* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ก่อโรคในปลา โดยส่งผ่านทางพันธุกรรมทางส่วน R-plasmid และเพิ่มจำนวนต่อไปในแหล่งน้ำ จากรายงานพบแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพในหอย ปลาและพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อปลาหลังจากมีการใช้ oxytetracycline และ oxolinic acid ซึ่งมีผลกระทบต่อสุขภาพคนเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปนเปื้อนมาสู่เนื้อปลาและผลิตภัณฑ์ของปลา เช่น การใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อในคนทำได้ยากขึ้น (Angulo, 1999; WHO Technical Report Series, 1999)

ยาต้านจุลชีพที่ประเทศทางยุโรปและอเมริกาตอนเหนืออนุญาตให้ใช้ในปลาสำหรับเป็นอาหาร ได้แก่ oxytetracycline, oxolinic acid, amoxicillin และ co-trimazine (trimethoprim+sulfadiazine) ส่วนประเทศนอรเวย์จะอนุญาตให้ใช้ได้มากชนิด ได้แก่ benzylpenicillin, dihydrostreptomycin, florfenicol, flumequine, oxolinic acid, oxytetracycline และ co-trimazine และมีการกำหนดหลักปฏิบัติที่ดีในการใช้ยาสัตว์ (Good Practice in The Use of Veterinary drugs) เพื่อความปลอดภัยจากการใช้ยาสัตว์ซึ่งอาจก่อให้เกิดสารตกค้าง โดยมีช่วงระยะหยุดยาที่เหมาะสม พร้อมทั้งวิเคราะห์ตรวจหาสารตกค้างที่เหมาะสม (WHO Technical Report Series, 1999)

ข้อกำหนดเรื่องสุขลักษณะ

การเลี้ยง การจับปลา การดูแลรักษาปลานิลหลังจับและการขนส่งปลานิลต้องปฏิบัติอย่างถูกสุขลักษณะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและป้องกันการเสื่อมคุณภาพ โดยมีการกำหนดจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ดังนี้

1. จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดต้องไม่เกิน $1x10^7$ โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของเนื้อปลาและจะมีจำนวนจุลินทรีย์เกิน $5x10^5$ โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของเนื้อปลาได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง

2. ต้องไม่พบซาลโมเนลลา (*Salmonella spp.*) ในตัวอย่างเนื้อปลา 25 กรัม

3. เอสเคอริเคีย โคไล (*Escherichia coli*) กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต้องไม่เกิน 500 ต่อตัวอย่าง 1 กรัมของเนื้อปลาและจะมีค่า MPN เกิน 11 ต่อตัวอย่าง 1 กรัมของเนื้อปลาได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง (มกอช., 2547)

ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่พบในสัตว์น้ำ เช่น *Aeromonas hydrophilla, Plesiomonas shigelloides, Streptococcus iniae* สามารถก่อให้เกิดอันตรายจากอาหารต่อผู้บริโภค (Foodborne disease) แต่อุบัติการณ์พบต่ำเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae เช่น *Salmonella spp.* และ *Escherichia coli* (WHO Technical Report Series, 1999)

ข้อกำหนดเรื่องสุขอนามัยสัตว์

การผลิตสินค้าที่มาจากสัตว์ซึ่งในที่นี้คือ ปลานิลและผลิตภัณฑ์จากปลานิล นอกจากจะตรวจสอบในเรื่องของความปลอดภัยด้านอาหารประเภทเนื้อสัตว์ (Animal Production Food Safety) แล้วยังต้องให้ความสำคัญในเรื่องของสุขภาพสัตว์ร่วมด้วย โดยตามประกาศขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) ได้มีการกำหนดการดูแลสุขภาพเกี่ยวกับสัตว์น้ำที่นำมาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งออกใน Aquatic Animal Health Code ปี 2005 ซึ่งเน้นด้านความปลอดภัยเกี่ยวกับโรคระบาดที่มาจากสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำในการค้าระหว่างประเทศ โดยให้ความสำคัญของโรคระบาดที่ผ่านมาทางสินค้านำเข้าเพื่อป้องกันการเกิดโรคระบาดในสัตว์และคนของประเทศนำเข้าสินค้า ในขณะเดียวกันเป็นการหลีกเหลี่ยงการกีดกันทางการค้าหรือภาษี ดังนั้นประเทศผู้ส่งออกควรมีใบรับรองสุขภาพสัตว์น้ำเป็นข้อมูลลายลักษณ์อักษรเพื่อสร้างความมั่นใจให้กับประเทศที่นำเข้าสินค้าถึงความปลอดภัยและเป็นการบอกถึงคุณภาพผลิตภัณฑ์ของประเทศส่งออก (OIE[a], 2005) ในสหรัฐอเมริกามี Animal Disease Diagnostic Laboratory เพื่อตรวจสุขภาพปลานิลและเฝ้าระวังการเกิดโรคระบาดที่มีผลกระทบต่อการผลิตปลาคือ Streptococcus, Trichodina, Columnaris และ Aeromonas โดยมีการเก็บตัวอย่างทุก 6 เดือน จำนวน 60 ตัวอย่างต่อการตรวจ 1 ครั้ง (Americulture, 1999) ประเทศออสเตรเลียมีการตรวจและประเมินความเสี่ยงของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในปลาที่นำเข้าชนิดต่างๆ โดยต้องไม่พบเชื้อในปลา (The Australian

Ministry of Agriculture and Forestry, 1999) เป็นต้น องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) ให้คำนิยามเกี่ยวกับโรคในสัตว์ว่า เมื่อเกิดการระบาดของโรคขึ้นโรคนั้นจะเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียผลผลิตโดยเกิดอัตราการป่วยและตายสูงในเขตที่มีการระบาดหรือมีผลกระทบต่อการสูญเสียมูลค่าในการควบคุมและป้องกันโรค เมื่อเกิดการระบาดขึ้นหรือมีผลต่อทางสาธารณสุข เช่น สามารถก่อโรคในคนโดยตรงหลังจากสัมผัสเชื้อจากสัตว์น้ำหรือผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่มีเชื้อนั้นแฝงอยู่ในร่างกายสัตว์ อย่างเช่นเชื้อ *Streptococcus iniae* สามารถก่อโรคในปลาและติดเชื้อมาสู่คนผ่านทางปลา เป็นต้น (OIE[a], 2005)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococcosis) ในปลา

โรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลามีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสเตรปโตคอคคัส ซึ่งโรคนี้ก่อให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดปลา สามารถเกิดการระบาดในบริเวณที่เคยมีและไม่มีโรคได้ บ่อยครั้งที่พบโรคนี้ระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาโดยเชื้อ *Streptococcus iniae* และ *Streptococcus agalactiae* (Yanong and Floyed, 2005)

คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมและต่อกันเป็นสายยาว (cocci chain) (Songer and Post, 2005; Talaro and Talaro, 1996) จัดอยู่ใน Family Streptococcaceae และ genus Streptococcus เป็นกลุ่มที่ก่อโรคในคนและสัตว์ บางชนิดได้มีการพิสูจน์พบว่าเป็นเชื้อที่ก่อโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (Zoonosis) (OIE[b], 2005) คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ได้แก่ ไม่สามารถสร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile) เป็นแบคทีเรียที่อยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถย่อยน้ำตาลได้หลายชนิดและผลิตกรดแลคติก ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) แต่เชื้อมีเอนไซม์เพอรอคซิเดส (peroxidase) สำหรับยับยั้งการทำงานของไฮโดรเจนเปอรอคไซด์ (hydrogen peroxide) ทำให้กลุ่มเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสสามารถอยู่ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ต้องอาศัยโฮสต์ (parasitic form) ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้อจึงเจริญเติบโตได้ยากในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสต้องได้รับอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์จึงอยู่รอดและเพิ่มจำนวนเชื้อนอกโฮสต์ได้ (Songer and Post, 2005; Talaro and Talaro, 1996) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะต่อการเพาะเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya agar (TSA) ผสมเลือด 5-10% เรียกว่า blood agar สามารถเพาะในสภาพที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจนเป็นระยะเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง และส่วนใหญ่พบลักษณะการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) บน blood agar (Edward, 2000) เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสไม่ทนต่อความแห้ง ความร้อน และยาฆ่าเชื้อ เช่น 1% sodium hypochlorite, 70% ethanol, formaldehyde, glutaraldehyde และไอโอดีน (OIE[b], 2005; Talaro and Talaro, 1996)

ปัจจัยในการก่อความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

ความสำคัญของการก่อโรคในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคคัส คือ พื้นผิวที่เป็นแอนติเจนของเชื้อ (surface antigen) การสร้างสารพิษและการผลิตเอนไซม์ โดยปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของส่วนพื้นผิวที่เป็นแอนติเจนของเชื้อ ได้แก่ ส่วนแคปซูลช่วยในการเกาะพื้นผิวเซลล์โฮสต์ จากการศึกษาโดยการเพาะเชื้อพบว่าแคปซูลถูกสร้างในช่วงที่เชื้อเจริญเติบโต (rapid growth phase) เท่านั้น แต่เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสบางกลุ่มพบว่าส่วนของแคปซูลไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อการก่อความรุนแรง ส่วน c-carbohydrate ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบเป็น polysaccharide หรือ techoic acid ซึ่งพบอยู่บนผิวของผนังเซลล์ ส่วนนี้สามารถใช้จัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ในวิธี Lancefield ได้ c-carbohydrate ช่วยปกป้องเชื้อจากไลโซไซม์ที่ปล่อยมาจากโฮสต์ทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและกระจายภายในร่างกายโฮสต์ Lipotechoic acid พบเฉพาะในเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ช่วยในการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell) ของบริเวณผิวหนังและคอหอย M protein เป็นโมเลกุลที่จำเพาะต่อการก่อความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส แบ่งเป็น 80 subtype M protein เป็นส่วนประกอบหลักของ fimbraie สามารถต้านการเกิด phagocytosis และปรับการยึดเกาะต่อโฮสต์ (Stokes and Ridgway, 1980)

สารพิษหลักของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคคัส ได้แก่ ฮีโมลไลซินหรือเรียกว่าสเตปโตไลซิน (Streptolysin) แบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ Streptolysin O และ Streptolysin S สารพิษทั้ง 2 ชนิดทำให้เกิดการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงสมบูรณ์บน blood agar โดย Streptolysin S ทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนพื้นผิว blood agar (surface hemolysis) ส่วน Streptolysin O ทำให้เกิดที่ส่วนลึกของ blood agar (deep hemolysis) ซึ่งเป็นสภาวะไม่มีออกซิเจน สารพิษชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อหลายๆ ชนิดอย่างรวดเร็วรวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) ตับและหัวใจ Erythrogenic toxin หรือ pyogenic toxin พบเฉพาะในเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ตอบสนองให้เกิดผื่นบนผิวหนังและมีไข้ (Stokes and Ridgway, 1980)

เอนไซม์หลักของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคคัสหลายตัวสามารถย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น Streptokinase คล้าย Staphylokinase ย่อยก้อนไฟบริน ทำให้เชื้อสามารถแทรกผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย Hyaluronidaes ทำลายการเชื่อมกันของเนื้อเยื่อ connective และเชื้อแพร่ผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ง่าย เป็นต้น (Stokes and Ridgway, 1980) ดังนั้นเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นโน้มนำให้เกิดการแพร่ผ่านของเชื้อสู่เนื้อเยื่อบริเวณอื่นๆ ได้ง่าย เช่น การติดเชื้อทางผิวหนังหรือ mucous membrane เชื้อสามารถผ่านทางแผลขนาดเล็กหรือแผลฉีกขาดและแพร่เข้าทาง subcutaneous และ dermis tissue โดยปกติการติดเชื้อทั่วไปจะมีการส่งสัญญาณให้เกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยเรียกเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น macrophage และ polymorphonuclear leukocyte มาทำลายเชื้อจึงพบการอักเสบในบริเวณที่เกิดแผลและจำกัดพื้นที่อยู่บริเวณ dermis นอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันที่มีทั้งส่วนที่เป็นเซลล์และสารเคมี (แอนติบอดี้) ช่วยป้องกันการแทรกผ่านของเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดและอวัยวะภายในร่างกาย (McKane and Kendel, 1996; Stokes and Ridgway, 1980) แต่จากคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสสามารถหลบเหลี่ยงการถูกทำลายจากเซลล์เก็บกินและภูมิคุ้มกันในร่างกายทำให้เชื้อสามารถแทรกผ่านทางน้ำเหลืองและเลือดเกิดภาวะ septicemia (Stokes and Ridgway, 1980)

แหล่งที่พบและการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส พบได้ในสิ่งมีชีวิต เช่น คน สัตว์และพืช พบในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำและโคลนก้นบ่อเลี้ยง ปลาที่ติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการหรือรอยโรค (carrier fish) และการปนเปื้อนเชื้อในอาหารเลี้ยงปลาส่งผลกระทบต่อการเกิดโรคระบาดในฟาร์มขึ้น (Evans et al., 2000; Wildgoose, 2001; Yanong and Floyed, 2005) การแพร่กระจายเชื้อเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจากการเลี้ยงปลาในแหล่งน้ำเดียวกันโดยการกินปลาป่วยหรือปลาที่ติดเชื้อเป็นอาหาร นอกจากนี้ยังติดเชื้อได้ทางบาดแผลบริเวณผิวหนังและการได้รับเชื้อโดยการฉีดเข้าทางร่างกายในสภาพการทดลอง (Evans et al., 2000; Yanong and Floyed, 2005) ส่วนสินค้าประเภทปลาส่งขาย เช่น ปลาสดหรือปลาแช่แข็งอาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อสู่บริเวณอื่นๆ ในการเพาะเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ ที่ไม่เคยพบการระบาดของโรคโดยผ่านในรูปของเสีย เช่น การถอดเกล็ด หนังปลา วัสดุบรรจุและน้ำเสียจากการล้างโดยไม่ได้ผ่านความร้อนหรือการฆ่าเชื้อ เป็นต้น ทำให้เชื้อสามารถปนเปื้อนอยู่ในดินและแหล่งน้ำธรรมชาติ (The Australian Ministry of Agriculture and Forestry, 1999)

แหล่งที่เคยพบการแพร่ระบาด ได้แก่ อเมริกาตอนใต้ อัฟริกาตอนใต้ ญี่ปุ่น อิสราเอล และ อิตาลี (Edward, 2000) ส่วนการศึกษาสถานภาพของโรค Streptococcosis ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลของประเทศไทย (เจนนุช และคณะ, 2549) พบว่า การระบาดของโรคเกิดขึ้นในทุกภูมิภาคของประเทศไทยที่มีการเพาะเลี้ยงปลานิลแบบหนาแน่นเป็นระบบอุตสาหกรรม สาเหตุส่วนใหญ่ของการเกิดโรคมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* โดยแยกเชื้อจากปลาป่วยทุกวัยและสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งปลานิลดำและปลานิลแดง เมื่อพิจารณาเชื้อ *Streptococcus*

agalactiae พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสกลุ่ม B ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบทั่วไป (normal flora) ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ในส่วนช่องคลอด คอหอยและลำไส้ใหญ่ (Songer and Post, 2005; Talaro and Talaro, 1996) และมีรายงานพบเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ เช่น โรคเต้านมอักเสบในสัตว์กีบคู่ folliculitis ในช้าง การติดเชื้อปากมดลูกและผิวหนังในสุนัข (Songer and Post, 2005) โรค Streptococcosis ในปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม (Yanong and Floyed, 2005) ส่วนในคนเกิดการติดเชื้อในตัวอ่อน การติดเชื้อส่วนผิวหนังที่มีแผล และบางรายอาจพบการอักเสบเนื้อเยื่อหัวใจ (endocarditis) เป็นต้น (Songer and Post, 2005; Talaro and Talaro, 1996)

ปัจจัยโน้มนำในการก่อโรค

การเกิดโรค Streptococcosis มักเป็นผลเนื่องมาจากปลาเกิดความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม หรือการเปลี่ยนแปลงการจัดการอย่างกระทันหัน ความหนาแน่นในการเลี้ยงสูง การจับปลา และคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำต่ำ แอมโมเนียหรือไนไตร์ตสูง เป็นต้น การเกิดความเครียดทำให้ภูมิคุ้มกันโรคของปลาลดลงเนื่องจากผลของความเครียดกระตุ้นต่อมใต้สมอง (hypothalamic-pituitary-interrenal axis) ให้ระดับปริมาณคอทิซอล (cortisol) ในเลือดสูงขึ้นและมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต ระบบสืบพันธุ์ และเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อมากขึ้น (Yanong and Floyed, 2005; Wildgoose, 2001) สำหรับประเทศไทยที่มีอุณหภูมิของน้ำในช่วงฤดูร้อนสูงถึง 30 ^{O}C ทำให้ปลาในบ่อเกิดความเครียด โดยเฉพาะลูกปลามีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่าปลารุ่นหรือปลาขุน นอกจากนี้อุณหภูมิน้ำประมาณ 30 ^{O}C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะต่อการคงอยู่และเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมนอกตัวปลา (Yanong and Floyed, 2005)

ชนิดของปลาที่ไวต่อการเกิดโรค Streptococcosis

เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม ปลาที่ไวต่อการเกิดโรค Streptococcosis ได้แก่ salmon, mullet, golden shiner, pinfish, eel, sea trout, tilapia, sturgeon, striped bass, Attantic croaker, gulf menhaden, yellowtail, catfish, hardhead sea catfish, stingray และ Japanese flounder เป็นต้น (Edward, 2000; Yanong and Floyed, 2005) ส่วนใหญ่พบอุบัติการณ์ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสก่อโรคในปลานิลเพาะเลี้ยงสูงกว่าปลาชนิดอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยง โดยการศึกษาของ Chang and Plumb (1996) เปรียบเทียบความไวต่อการเกิดโรค Streptococcosis ในปลาเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ ปลานิล และ channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ทดลองโดยการแช่ปลาในน้ำปริมาตร 40 ลิตร อุณหภูมิ 25 ^{O}C ที่มีเชื้อ *Streptococcus spp.* 3 isolates จากปลาที่ป่วยเป็นโรค Streptococcosis ในประเทศอเมริกา (Lake, DL805 และ MS91452) ปริมาณ 2.4 X 10^{7} CFU (Colony Forming Unit) ในลูกปลา น้ำหนัก 20 กรัม เป็นเวลา 10 นาที พบว่าปลานิลแสดงอาการและรอยโรคในระดับที่รุนแรงกว่า channel catfish หลังจากรับเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และจากการศึกษาของ Evan et al. (2002) ทดลองโดยการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* 3 isolates ที่เคยมีการระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลา (the Kuwait isolate, KF1; USDA mullet, No. 11 brain isolate; USDA seabream, No. 37 brain isolate) เข้าทางช่องท้องปริมาณ 1 X 10^{7} CFU ต่อน้ำหนักปลา 40 กรัม พบว่าปลานิลที่ได้รับเชื้อจาก USDA mullet และ USDA seabream แสดงอาการของโรคภายใน 24 ชั่วโมง และมีอัตราการตายสูงถึง 100 และ 90% ภายใน 7 วันหลังได้รับเชื้อ

อาการและรอยโรค

อาการและรอยโรคภายนอกเด่นชัดในปลาเต็มวัย ได้แก่ ลักษณะการว่ายน้ำผิดปกติ (spiraling หรือ spinning) อ่อนแรง (lethargy) กินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหาร (anorexia) สีตามลำตัวเข้ม (melanosis) สูญเสียการทรงตัว (imbalance movement) ตาโปนอาจพบหนึ่งหรือสองข้าง (exophthalmos; pop-eye) กระจกตาขุ่นมัว (corneal opacity) แผลหลุมตามตัว (ulceration) และจุดเลือดออกทั่วร่างกายโดยเฉพาะบริเวณรอบๆ ตา เหงือก ครีบและกระพุ้งแก้ม (operculum) (Edward, 2000; Yanong and Floyed, 2005)

รอยโรคภายในร่างกาย ได้แก่ ม้ามมีขนาดใหญ่และบวม จุดเลือดออกที่อวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ตับ ตา ม้ามและเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย (diffuse visceral hemorrhage) สมองและเยื้อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) บริเวณช่องท้องและผนังลำไส้พบของเหลวสีน้ำเลือด (serosanguinous) ปลาที่มีอาการแบบเฉียบพลันอาจตายทันทีโดยไม่แสดงอาการหรือรอยโรคที่ชัดเจน (Edward, 2000; Yanong and Floyed, 2005)

ผลกระทบของการเกิดโรค Streptococcosis

โรค Streptococcosis ทำให้เกิดอัตราการตายในปลาที่เพาะเลี้ยงสูงมากกว่า 50% ช่วงเวลา 3-7 วัน หลังจากติดเชื้อ ถ้ามีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงอาจพบอัตราการตายที่สูงประมาณ 80-100% (Yanong and Floyed, 2005) พบการสูญเสียปลาขนาดส่งขายปริมาณ 4,000 ตัวต่อวัน (Americulture, 1999) แต่การเกิดโรคส่วนใหญ่มักพบแบบเรื้อรัง ปลามีอัตราการเจริญเติบโตลดลงจากการกินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหารทำให้ระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้นเป็น 10-12 เดือน จากปกติขุนเลี้ยงเป็นเวลา 7-8 เดือน และผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน สภาพซากไม่สมบูรณ์มีตำหนิ ไม่มีความสด เก็บได้ไม่นาน ปลาที่เป็นโรคเรื้อรังจะอ่อนแอและมักตายระหว่างการขนส่งและปริมาณเชื้อที่ตกค้างอยู่ในเนื้อปลามีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อปลา เป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก (Americulture, 1999) เช่น จากรายงานมูลค่าการสูญเสียของประเทศอเมริกาประมาณ 7,500 ล้านบาท จากปัญหาของโรค Streptococcosis (Evans et al., 2000)

การควบคุมและป้องกัน

เมื่อเกิดการระบาดของโรค Streptococcosis ภายในฟาร์ม การรักษาปลาป่วยด้วยการให้ยาต้านจุลชีพเป็นวิธีที่อาจช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ แต่การใช้ยาต้านจุลชีพจำเป็นต้องมีการทดสอบความไวของเชื้อต่อชนิดยาต้านจุลชีพก่อนนำมาใช้เนื่องจากเชื้ออาจเกิดการดื้อยาทำให้ไม่ได้ผลการรักษาและทำให้ยาตกค้างในเนื้อปลา ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรค (OIE[b], 2005; WHO Technical Report Series, 1999)

การป้องกันโรคควรเน้นในเรื่องการจัดการร่วมกับการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงปลาให้เหมาะสม (Wildgoose, 2001) ได้แก่ การเลี้ยงในปริมาณความหนาแน่นที่เหมาะสมและฆ่าเชื้อลูกปลาก่อนนำมาเลี้ยงสามารถลดปัญหาการติดเชื้อในปลา การจัดการอื่นๆ เช่น การพักบ่อและเตรียมบ่อด้วยการใส่ยาฆ่าเชื้อและตากบ่อก่อนเลี้ยงปลานิลชุดต่อไป การจัดการสุขศาสตร์การเลี้ยงและมีระบบการป้องกันโรคเข้าฟาร์ม เช่น การจัดการคุณภาพน้ำ ทำความสะอาดสิ่งแวดล้อมรอบๆ บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงปลา ตรวจวินิจฉัยปลาที่นำเข้ามาใหม่ก่อนลงเลี้ยงรวมในบ่อ เมื่อพบปลาที่เริ่มแสดงอาการป่วยหรือสงสัยว่าเกิดโรค Streptococcosis ควรทำการแยกออกจากกลุ่มที่เลี้ยงและอุปกรณ์ที่เลี้ยงควรแยกการใช้หรืออาจจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้ เช่น เบนซาลโคเนียมคลอไรด์ (benzalkonium chloride) (Americulture, 1999; Yanong and Floyed, 2005) นอกจากนี้การพิจารณาการ

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อโรค Streptococcosis และการใช้วัคซีนร่วมกับการจัดการอาจเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดปัญหาจากการใช้ยาต้านจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wildgoose, 2001)

วัคซีนป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิล

เริ่มมีการพัฒนาการผลิตวัคซีนในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิลเนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่าลูกปลานิลที่ไม่ได้ทำวัคซีนมีมูลค่าการสูญเสียต่อการผลิตสูงกว่าลูกปลาที่ผ่านการทำวัคซีน นอกจากนี้ โรค Streptococcosis ยังมีผลกระทบต่อปลาเพาะเลี้ยงขนาดสำหรับส่งขายโดยพบอัตราการตายสูงประมาณ 4,000 ตัวต่อวันในการระบาดของโรคอย่างรุนแรงจากการไม่ทำวัคซีนตั้งแต่เริ่มแรก (Americulture, 1999) ดังนั้นการทำวัคซีนช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรค Streptococcosis และช่วยลดการแสดงอาการ ลักษณะร่างกายที่ผิดปกติจากการติดเชื้อและอัตราการตาย เป็นต้น แต่ผลของการใช้วัคซีนยังมีข้อบ่งชี้ในเรื่องของการป้องกันโรคจากสเตรนที่แตกต่างกันในแต่ละท้องที่หรือประเทศที่มีการระบาด ขนาดลูกปลาที่เริ่มให้วัคซีน และวิธีการให้วัคซีน เป็นต้น (Evans et al., 2004; Klesius et al., 2000)

ชนิดของวัคซีนที่ใช้ในการควบคุมโรค Streptococcosis ปลานิลมักเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อ *Streptococcus iniae* เช่น formalin-killed *Streptococcus iniae* vaccine, Modified-killed *Streptococcus iniae* ประกอบด้วยเซลล์แบคทีเรียและ extracellular product (Evans et al., 2004) ส่วนวัคซีนควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เช่น Formalin-killed whole cells ของ *S. agalactiae* และมี extracellular product (ECP) ผสมรวมในวัคซีน (Evans et al., 2004; Pasnik et al., 2005) ไม่นิยมพัฒนา modified live vaccine ของเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. iniae* เพราะอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพคน (Evans et al., 2004)

เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสก่อโรคทั้งในปลาและคน

องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Official international des epizooties, OIE) ระบุว่าเชื้อ *Streptococcus iniae* สามารถก่อโรคในปลาและติดเชื้อมาสู่คนโดยผ่านทางปลา (zoonosis) (OIE[b], 2005) ซึ่งมีรายงานการเกิดโรคดังตารางที่ 1 การติดเชื้อในคนโดยผ่านทางปลาจากรายงานของ Weinstein et al. (1997) เกิดจากการติดเชื้อทางบาดแผลในขณะเตรียมปลาสดในการทำอาหารและเกิดอาการป่วยในระยะเวลาต่อมา คนที่เป็นโรคส่วนใหญ่เป็นคนจับปลาหรือเตรียมปลาก่อนทำอาหาร อาการที่พบหลังจากติดเชื้อ คือ การอักเสบของผิวหนังบริเวณที่ได้รับการสัมผัสกับเชื้อ เช่น มือพบการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณส่วนใต้หนัง (cellulitis) และมีอาการไข้ในระยะเวลาต่อมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 รายงานระบาดวิทยาการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* จากปลาสู่คน

ปี	รายงานการระบาด	เอกสารอ้างอิง
1976	*Streptococcus iniae* ถูกรายงานครั้งแรกเป็นสาเหตุให้เกิด subcutaneous abscesses ในปลาโลมาน้ำจืดในเขต San Francisco และ New York	Weinstein et al., 1997
1980-1989	*Streptococcus iniae* เป็นสาเหตุให้เกิดเยื่อหุ้มและสมองอักเสบ (acute meningoencephalitis) และพบอัตราการป่วย และตายสูงมากกว่า 50% ในการเพาะเลี้ยงปลา ได้แก่ rainbow trout, tilapia, yellow tail และ salmon พบการระบาดในประเทศ อิสราเอล, ไต้หวัน และอเมริกา การเกิดลักษณะของเยื่อหุ้มและสมองอักเสบ (Meningoencephalitis) สามารถเกิดได้จากการติดเชื้อ *Streptococcus iniae, Streptococcus agalactiae* และ *Lactococcus garvieae*	Weinstein et al., 1997; GOH et al., 1998
1991	รายงานการเกิดโรคครั้งแรกในคน ใน Texas	GOH et al., 1998
1993	แยกเชื้อจากปลาที่แสดงอาการเยื่อหุ้มและสมองอักเสบในเขต Texas และ Virginia	Weinstein et al., 1997
1994	รายงานการเกิดโรคครั้งที่ 2 ในคน ที่ Ottawa ในประเทศแคนาดา และพบการระบาดของโรคในปลานิล	GOH et al., 1998
1995-1996	พบผู้ป่วยชาวเอเชีย 4 รายใน Toronto มีการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* โดยพบ 3 รายมีอาการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณส่วนใต้หนัง (cellulites) และคนที่ 4 มีอาการติดเชื้อที่ระบบอื่น ๆ ได้แก่ endocarditis, meningitis และ arthritis สาเหตุเกิดจากการจับปลานิลเพื่อเตรียมอาหาร	Weinstein et al., 1997; GOH et al., 1998
1998	CDC lab (centers for disease control and prevention Streptococcus Reference lab) ได้แยกเชื้อ 2 strain จากผู้ป่วยใน Vancouver และ British Columbia ได้ข้อสรุปชัดเจนว่า *Streptococcus iniae* ก่อโรครุนแรงในปลาและติดต่อมาสู่คนได้	GOH et al., 1998
2001-2004	ศึกษาแยกเชื้อ *Streptococcus iniae* จาก 7 ตัวอย่างทั้งในปลาและคน ใน California และ Pensylvania จาก CDC lab	Facklam et al., 2005

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจวินิจฉัยยืนยันการเกิดโรค Streptococcosis ในปลา

ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ตัวอย่างที่นำมาตรวจควรเก็บปลาที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคมาเปรียบเทียบผลตรวจ กรณีตัวอย่างเป็นปลาที่ยังมีชีวิตจะเก็บตัวอย่างจากรอยโรค เช่น บริเวณที่เกิดหนองหรือเจาะเลือด ส่วนตัวอย่างที่ตายถ้าปลามีขนาดเล็กมากอาจเก็บตัวอย่างทั้งตัวแต่ถ้าปลามีขนาดใหญ่จะพิจารณาเก็บอวัยวะเป้าหมาย คือ ไตและสมอง (Americulture, 1999; Yanong and Floyed, 2005) การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส พิจารณาจากคุณสมบัติของเชื้อ ได้แก่

1. การตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวเคมี (Biochemical test) ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส บน blood agar เพาะในสภาวะที่มีออกซิเจนมีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-1 มิลลิเมตร พื้นผิวเรียบ โค้งมน มีลักษณะคล้ายเมือกเหนียวๆ สีขาว (dull white) และกึ่งโปร่งแสงหรือทึบแสง อาจพบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงหรือไม่พบรอบๆ โคโลนีของเชื้อ ส่วนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่เพาะในสภาวะไม่มีออกซิเจนแต่มีส่วนผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 10% พบว่าเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสทุกชนิดโตได้ดีโดยโคโลนีมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อยและเห็นการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงชัดเจนมากกว่าที่เพาะในสภาวะมีออกซิเจน (Edward, 2000; Stokes and Ridgway, 1980; Talaro and Talaro, 1996) คุณสมบัติการแตกตัวเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเป็นผลเนื่องมาจากการผลิตสารพิษฮีโมไลซิน (hemolysin) หรือเรียกว่า Streptolysin O สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงสมบูรณ์ (beta-hemolysis Streptococcus) สังเกตได้ชัดเมื่อเพาะลง blood agar ในสภาวะไม่มีออกซิเจนเพราะ hemolysin ทำงานไม่ดีเมื่อมีออกซิเจนโดย hemolysin รวมกับ second hemolysin (Streptolysin S) และเกิดภาวะ beta-hemolysis กลุ่มที่ทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ (alpha-hemolysis Streptococcus) ไม่ได้เป็นผลจากสารพิษ hemolysin แต่เกิดจากการเปลี่ยนสีของฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (non-hemolysis Streptococcus) (McKane and Kendel, 1996; Talaro and Talaro, 1996) การทดสอบคุณสมบัติการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงสมบูรณ์พิจารณาจากการเพาะเชื้อใน blood agar (Talaro and Talaro, 1996) และการทดสอบ hemolysin ด้วยวิธี soluble hemolysin test โดยนำเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่เพาะใน blood agar เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีซีรั่ม 15-20% และเลือดแกะ 5% และทำกลุ่มควบคุมโดยใส่น้ำเกลือแทนเชื้อเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าเป็น Beta-hemolysis Streptococcus พบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Stokes and Ridgway, 1980) แยกแกรมบวกหรือลบแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสติดสีแกรมบวก รูปร่างของเซลล์มีลักษณะรีหรือกลมขนาดเล็กและการจัดเรียงของเซลล์ต่อกันเป็นสายยาวเหมือนสร้อยลูกปัด (Stokes and Ridgway, 1980)

ลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical test) เริ่มจากทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อแบคทีเรียสแตปฟิโลคอคคัส (Staphylococcus) และเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (Streptococcus) โดยเชื้อสแตปฟิโลคอคคัสและไมโครคอคคัส (Micrococcus) สามารถผลิตเอนไซม์ catalase แต่เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสไม่มี โดยนำเชื้อทดสอบกับ 3% hydrogen peroxide ถ้าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ catalase จะพบฟองแก๊ซเกิดขึ้น (Stokes and Ridgway, 1980) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ มีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสซึ่งปัจจุบันมีชุดทดสอบและสามารถระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสโดยใช้หลักการทดสอบทางชีวเคมี เช่น API STREP20 เป็นต้น ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี

Characteristics	*S. agalactiae*[1]	*S. dys. ssp.equisimilis*[2]	*S. iniae*[3]	*S. porcinus*[4]
Growth in air	+	+	+	+
Growth in air plus 5% CO_2	+	+	+	+
Growth anaerobically	+	+	+	+
Growth at:				
10 °C	d	-	+	ND
45 °C	-	-	-	-
pH 9.6	d	-	-	ND
Growth with:				
6.5% NaCl	d	-	-	d
40% bile	d	-	-	d
0.25% optocin	+	+	+	+
Alpha-hemolysis	-	-	+	-
Beta-hemolysis	d	+	+	(+)
Hydrolysis of:				
Arginine	+	-	V	+
Hippurate	+	-	-	-
Esculin	-	-	+	(+)
Acid from:				
Starch	ND	ND	+	ND
Glycogen	ND	-	+	ND
Inulin	-	-	-	-
Lactose	d	-	-	d
Mannitol	-	-	+	+
Raffinose	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+
Salicin	d	ND	+	+
Sorbital	-	-	-	+
Trehalose	+	+	+	+
L-arabinose	ND	-	-	ND
Production of:				
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Alpha-Galactosidase	-	-	-	-
Beta-Glucuronidase	d	+	+	+
Beta-Galactosidase	-	-	-	-
Pyrrolidonearylamidase	-	-	+	-
Leucine arylamidase	ND	+	+	ND
Voges-Proskauer test	+	-	-	+
Lancefield serological group	B	C	Uncertain	E,P,U or V

[1] ; Buller, 2004 [2] ; Nomoto และคณะ 2004 [3] ; Colorni และคณะ 2002 [4] ; John และคณะ 1994

+ ; 90% หรือมากกว่าที่ให้ผลบวก, (+) ; 80-89% ที่ให้ผลบวก, d ; 21-79% ที่ให้ผลบวก,

- ; 11-20% ที่ให้ผลบวก (-) ; 90% หรือมากกว่าที่ให้ผลลบ, ND ; not determined V ; variation

2. การตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา (Immunological test)

การทดสอบทางซีรั่มวิทยาเป็นการตรวจแอนติเจนที่จำเพาะต่อโครงสร้างบนผิวของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสกลุ่มต่างๆ ในปี 1930-1939 มีการพัฒนาวิธีการจัดกลุ่มและชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส โดย Rebecca Landcefield พิจารณาความจำเพาะของแอนติเจนที่เป็น c-carbohydrate ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของเชื้อ แอนติเจนนี้มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในแต่ละกลุ่มทำให้มีความหลากหลายต่อการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะในโฮสต์ วิธีนี้สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ได้ 14 กลุ่มเรียงตามตัวอักษรภาษาอังกฤษ A ถึง H และ K ถึง V (Songer and Post, 2005; Stokes and Ridgway, 1980; Talaro and Talaro, 1996) จากรายงานเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่ก่อโรคในสัตว์มักพบอยู่ในกลุ่ม A, B, C, D, E, G, L และ V ตามวิธี Lancefield's precipitin test แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสบางชนิดที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มตามวิธี Lancefield's precipitin test พบว่าก่อโรคในสัตว์เช่นกัน (Songer and Post, 2005) นอกจากนี้อาจพิจารณาจากความจำเพาะของแอนติเจนที่เป็น M protein ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของเชื้อสามารถใช้จำแนก strain ภายในกลุ่มเชื้อ (McKane and Kendel, 1996)

การทดสอบทางซีรั่มวิทยายังมีวิธี ELISA และ immunofluorescent โดยใช้หลักการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้และผลของการเกิดปฏิกิริยาออกมาในลักษณะของการเกิดสี (Quinn et al., 2003) เช่น วิธี monoclonal antibody indirect fluorescent antibody technique (IFAT) เป็นวิธีที่ตรวจระบุเชื้อที่เป็นสาเหตุได้อย่างรวดเร็วในปลานิลที่ติดเชื้อหรือเป็นพาหะของการติดเชื้อ *Streptococci iniae* ในสหรัฐอเมริกา เป็นต้น แต่การตรวจหาสาเหตุที่จำเพาะของโรคอย่างรวดเร็วจะต้องมีการสำรวจชนิดและสเตรนของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่จำเพาะในแต่ละแหล่งที่มีการระบาดของโรคก่อน (Evans et al., 2004)

3. การตรวจวินิจฉัยระดับชีวโมเลกุล (Molecular technique)

โดยปกติสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งเชื้อที่ก่อโรคต่าง ๆ ทั้งในคนและสัตว์จะมีรหัสทางพันธุกรรมที่เรียกว่า DNA เป็นส่วนประกอบ สามารถใช้ประโยชน์ในการระบุชนิดเชื้อได้อย่างรวดเร็วและจำเพาะ ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลเป็นวิธีหนึ่งที่มีความจำเพาะสูงสำหรับตรวจหาชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่ก่อโรคระบาดในปลานิลอย่างจำเพาะโดยพิจารณาการเรียงลำดับเบส (sequence) ใน 16sRNA gene ซึ่งเป็น gene ที่พบทั่วไปในแบคทีเรียเพื่อใช้ในการออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสแต่ละชนิดแล้วนำมาทำ PCR assay (Salar, 2005; Zlotkin et al., 1998) หรือการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี DNA fingerprinting ด้วยการใช้ restriction enzyme ตัดใน sequence ของเชื้ออย่างจำเพาะร่วมกับการใช้ probe สามารถตรวจหาชนิดและสเตรนของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส นอกจากนี้วิธีการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลสามารถประยุกต์ใช้ในการสำรวจทางระบาดวิทยา

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- ชุด Analytical Profile Identification (API) 20 STREP สำหรับการพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biomeieux, France)
- McFarland standard : 0.5, 4 McFarland
- Sharking incubator (BIOSAN, Medical-Biological Research & Technologies, Latvia)
- Mulitpoint inoculator
- ตะเกียงแอลกอฮอร์

2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ

- Volumetric flask ขนาด 10, 20 มิลลิลิตร
- Beaker ขนาด 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร
- Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- PCR tube with domed cap ขนาด 200 ไมโครลิตร
- Micropipette พร้อม tips ขนาด 200, 1,000 ไมโครลิตร
- อุปกรณ์เพาะเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ glass/plastic plate, wire loop, wire needle

3. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- incubator (SANYO ELECTRIC, Japan)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, Germany)
- เครื่อง Centrifuge (IEC, USA)
- Vortex mixer Geinie 2 (Scientific Industries, USA)
- PCR thermalcycler (PCRsprint-Hybaid, Ashford, UK)
- Electrophoresis (Bio-Red, USA)
- UV transilluminator (Vilber Lourmat, Germany)

4. สารเคมี

- Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxoid, England)
- Mueller Hinton Agar (Oxoid, England)
- Meat extract (Oxoid, England)
- Yeast extract (Oxoid, England)
- Agar (Oxoid, England)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Fetal bovine serum (GIBCO®, USA)
- Sodiumchloride (NaCl) (Carlo erba, Spain)
- Sheep blood (ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ)
- ชุดสีย้อมแกรม ประกอบด้วย Crystal-violet, Lugol solution (Gram's iodine), Decolorizer (Ethyl alcohol 70%) และ Safranin solution
- Hydrogenperoxide (H_2O_2) 3%
- Hydrochloric acid 36.5-38.0% (Carlo erba, Spain)
- Sodium hydroxide 50% w/w (Merck, Germany)
- สารมาตรฐาน amoxicillin, oxytetracycline, trimethoprim/sulfadiazine (SIGMA, USA) และ ormetoprim/sulfadimethoxine (PHRAMAG, Norway)
- สารเคมีสำหรับ PCR amplification ได้แก่
    - Tag polymerase, dNTP, 10X PCR buffer (with 20 mM $MgCl_2$) (iNtRON Biotechnology, USA)
    - primer (Sigma-Genosys, Singapore)
    - Ultra Pure™ Distilled water DNAse, RNAse (GIBCO®, USA)
- DNA ladder และ loading dye (SibEnzyme, Russia)
- Agarose gel (Molecular Biology Grade) (Research organics, USA)
- Ethidium bromide 10 mg/ml (Sigma Algrich Inc., USA)
- ชุดสกัด DNA จากโครโมโซม (NucleoSpin®, MACHEREY-NAGEL, Germany)
- Phenol (BDHLaboratory Supplies Poole, England)
- Chloroform (LAB-SCAN ASIA, Thailand)
- Isoamyl alcohol (Merck, Germany)
- Absolute ethanol (Merck, Germany)
- Ultra Pure Tris (Tris buffer) (National diagnostics, USA)
- 0.5 M EDTA, pH 8.0 (GIBCO®, USA)
- Lysozyme 1 g (Bio Basic Inc., Canada)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (AMRESCO®, USA)
- Proteinase K 100 mg (Roche, USA)
- Ammonium acetate (Analytical Univar Reagent, Australia)
- 10X TBE buffer (Bio Basic Inc., Canada)

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ **ส่วนที่ 1** ศึกษาลักษณะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง โดยการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคภายในฟาร์ม สังเกตอาการ รอยโรคภายนอกและภายใน และความรุนแรงของโรค **ส่วนที่ 2** รวบรวมเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยในแหล่งระบาดต่างๆ ของประเทศไทยและเก็บรักษาเชื้อเพื่อนำไปศึกษาความไวรับของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Susceptibility Test)

การทดลองส่วนที่ 1 ศึกษาลักษณะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง

ศึกษารอยโรคและวิการของปลานิลป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส

1. เก็บตัวอย่างปลานิลป่วยหรือตายที่สงสัยว่าเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสจาก 12 ฟาร์ม 9 จังหวัดในเขตภาคตะวันออก กลางตะวันตกและภาคกลาง รวมทั้งหมด 60 cases ตั้งแต่ปี 2546 ถึง 2549
2. ทำการชันสูตรซากจากลักษณะภายนอก และรอยโรคของอวัยวะภายใน

ศึกษาชนิดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยงในฟาร์ม
สรุปขั้นตอนการตรวจเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในตัวอย่างสัตว์น้ำ

Bacterial Culture

เพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากอวัยวะเป้าหมาย เช่น ไต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสม

⇩ incubate ที่ 33 ^{O}C 24 ชม.

Gram's stain

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่ามีลักษณะเป็นเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสย้อมสีแกรม

⇩ ส่องกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

Catalase testing

นำเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (หลังจากย้อมสีแกรม) ทดสอบคุณสมบัติเชื้อในการสร้างเอนไซม์ Catalase

⇩ ตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

API STREP20

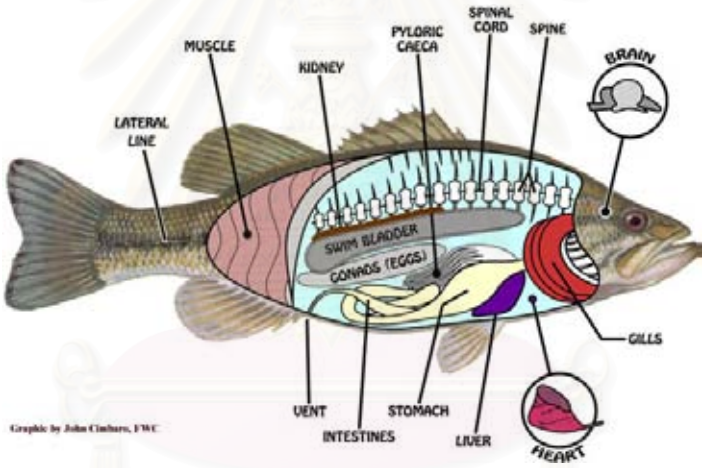
⇩ ยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

PCR

1. **ตรวจวินิจฉัยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเบื้องต้น**

1. แยกเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสสามารถเก็บจากอวัยวะเป้าหมายที่เชื้อเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน จากรายงานการศึกษาของ Evan et al. (2002) อวัยวะเป้าหมายที่เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน ได้แก่ สมอง เลือด ตา ตับ ไต ม้าม และลำไส้ เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีเลือดไหลเวียนผ่านในกรณีที่มีการติดเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เลือกอวัยวะส่วนไตในการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซิสเนื่องจากเป็นตำแหน่งเก็บตัวอย่างเชื้อได้ง่าย ไม่ต้องเลือกใช้อุปกรณ์จำเพาะในการเก็บตัวอย่างและลดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ที่อาจมีผลต่อการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุของโรค

<u>ตัวอย่างปลาขนาดใหญ่</u> : ใช้แอลกอฮอล์ 70% เช็ดบริเวณท้อง หลังจากนั้นใช้กรรไกรสะอาดเปิดช่องท้อง นำ wire loop เผาไฟแล้วรอให้เย็น เขี่ยไต (kidney) แสดงตำแหน่งดังรูป 2 มาขีด (streak) ลง Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid, England) ผสมเลือดแกะ 5% บ่มที่อุณหภูมิ 33^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ตำแหน่งอวัยวะภายในสำหรับการเก็บตัวอย่างเชื้อสเตรปโตคอคคัส (ที่มารูป : Cimboro, 2005)

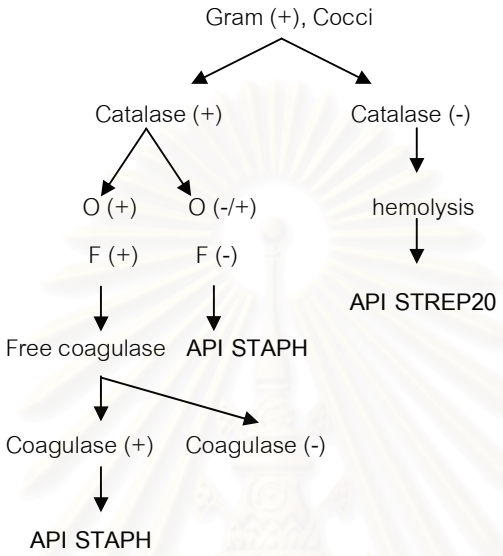
<u>ตัวอย่างขนาดเล็ก (ไม่สามารถเขี่ยเชื้อจากไต)</u> : หากตัวอย่างยังไม่ตายนำไปแช่แข็งประมาณ 10-15 นาที เพื่อทำให้สลบหรือตายแบบไม่ทรมาน พ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทั้งตัว และล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำอีกที ใช้กรรไกรและ forceps ที่ผ่านการแช่แอลกอฮอล์ 70% ตัดส่วนหัว และครีบหางใส่ลงในอุปกรณ์สำหรับบดตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (hand monogenizer) ใส่น้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (normal saline sterile, 0.9%NaCl) 1 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด ใช้ wire loop เผาไฟแล้วรอให้เย็นแล้วแตะ (swab) เชื้อมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสม (blood agar) บ่มที่อุณหภูมิ 33^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. พิจารณาลักษณะ และการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสด้วยการย้อมสีแกรม และทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase รายละเอียดขั้นตอนการทดสอบแสดงในภาคผนวกที่ 2

2. **จำแนกชนิดเชื้อจากคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API** (BioMeieux, France)

การเลือกใช้ชุดทดสอบ API สำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการจำแนกชนิดเชื้อ ต้องพิจารณาจากผลการย้อมสีแกรม รูปร่างเซลล์ของเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ ดังนี้

แบคทีเรียแกรมบวก



หมายเหตุ : O, Oxidation; F,Fermentation

เมื่อผ่านการตรวจวินิจฉัยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเบื้องต้น ต่อมาจำแนกชนิดเชื้อจากคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยเลือกใช้ API STREP20 (BioMeieux, France) แสดงดังตารางที่ 3 ซึ่งตรวจคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ acetoin production, hippurate, β-glucosidase, pyrrolidonyl arylaminidase, α-galactosidase, β-glucuronidase, β-galactosidase, alkaline phosphatase, leucine arylamidase, arginine dihydrolase, ribose, L-arabinose, manitol, sorbital, lactose, trehalose, inulin, raffinose, starch และ glycogen รายละเอียดขั้นตอนการทดสอบแสดงในภาคผนวกที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 Identification table (API STREP20, BioMeieux) % positive reactions after 4/24 hrs. at 35-37^{0}C*

API STREP20	*S. dys.ssp. equisimilis*	*S. agalactiae*	*S. porcinus*	*S. constellatus*
VP	0	100	100	100
HIP	1	99	5	1
ESC	25	1	99	27
PYRA	1	1	1	0
AGAL	1	4	19	0
BGUR	99	79	99	0
BGAL	1	1	1	5
PAL	99	96	97	99
LAP	100	99	97	100
ADH	97	99	100	100
RIB	97	98	98	0
ARA	1	0	0	0
MAV	1	1	88	0
SOR	1	1	88	0
LAC	45	50	83	10
TRE	99	87	99	72

* API Company, BioMeieux, France. API STREP20 Instruction manual

VP: acetoin production (Voges Proskauer)
HIP: hydrolysis (hippuric acid)
ESC: β-glucosidase hydrolysis (esculin)
PYRA: pyrolidonyl arylamidase
αGAL: α-galactosidase
βGUR: β-giucuronidase
βGAL: β-galactosidase
PAL: alkaline phosphatase
LAP: leucine aminopeptidase
ADH: arginine dihydrolase
RIB: acidification (ribose)
ARA: acidification (arabinose)
MAN: acidification (mannitol)
SOR: acidification (sorbitol)
LAC: acidification (lactose)
TRE: acidification (trehalose)
INU: acidification (inulin)
RAF: acidification (raffinose)
AMN: acidification (amidon)
GLYG: acidification (glycogen)
βHEM: β-hemolysis

3. การตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุล

นำเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยหรือตายจำนวน 60 cases ยืนยันชนิดเชื้อทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ วิธีการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส การเลือก primer จำเพาะต่อ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆ และขั้นตอนการทำ PCR amplification เป็นต้น

3.1 การสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

สกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสสำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR มีขั้นตอนดังนี้

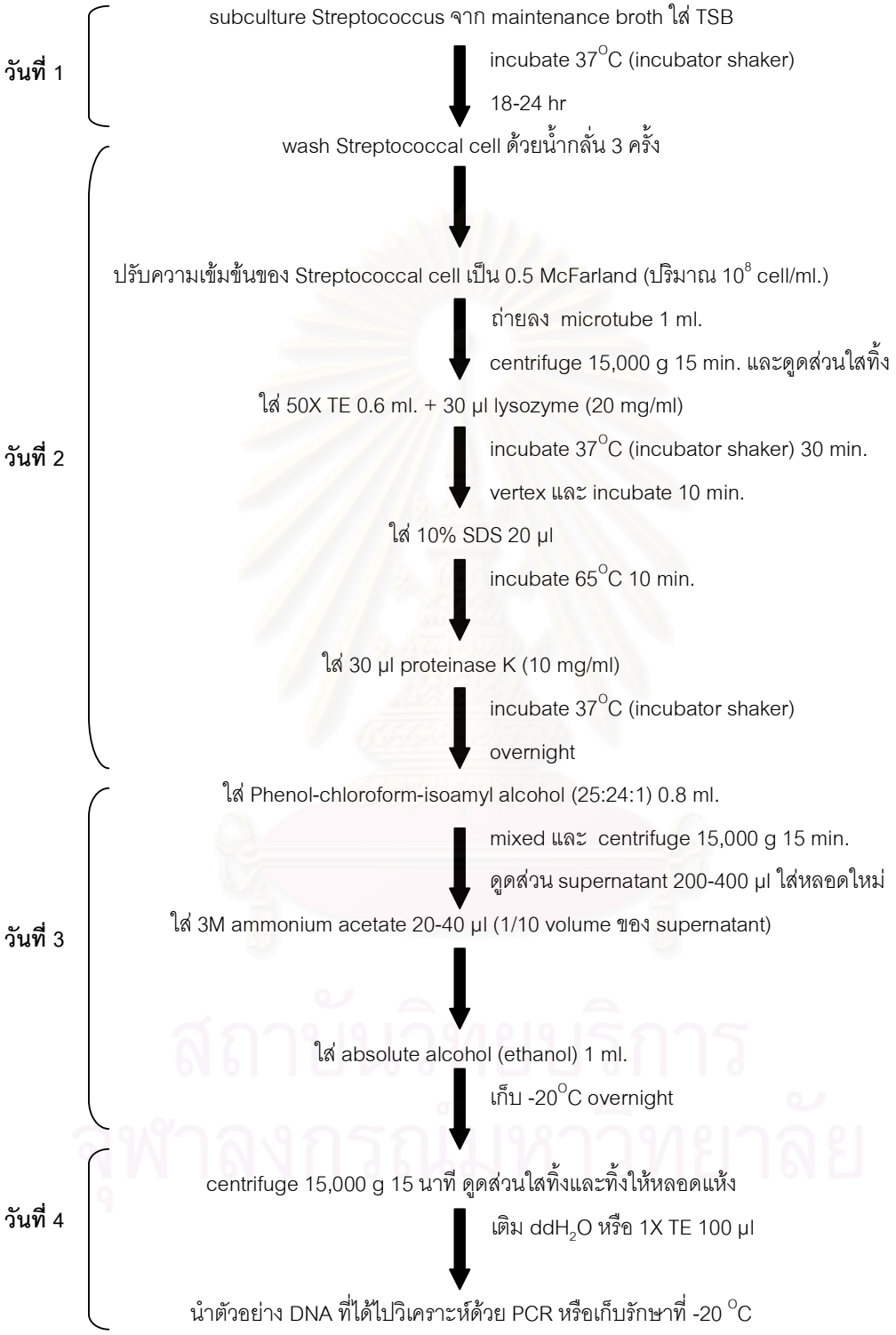
1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยหรือตายจำนวน 60 cases เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ได้แก่ เชื้อ *Streptococcus iniae* ATCC 29178 *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 และเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654 เพาะเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Both (TSB) (Oxoid, England) บ่มใน incubator shaker (BIOSAN, Latvia) ที่อุณหภูมิ 37^{O}C 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียละลายในน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อและปรับความเข้มข้นเชื้อเทียบเท่า 0.5 McFarland standard (10^{8} cells/ml) และใส่สารละลายเชื้อ 0.5 McFarland standard ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใน microtube

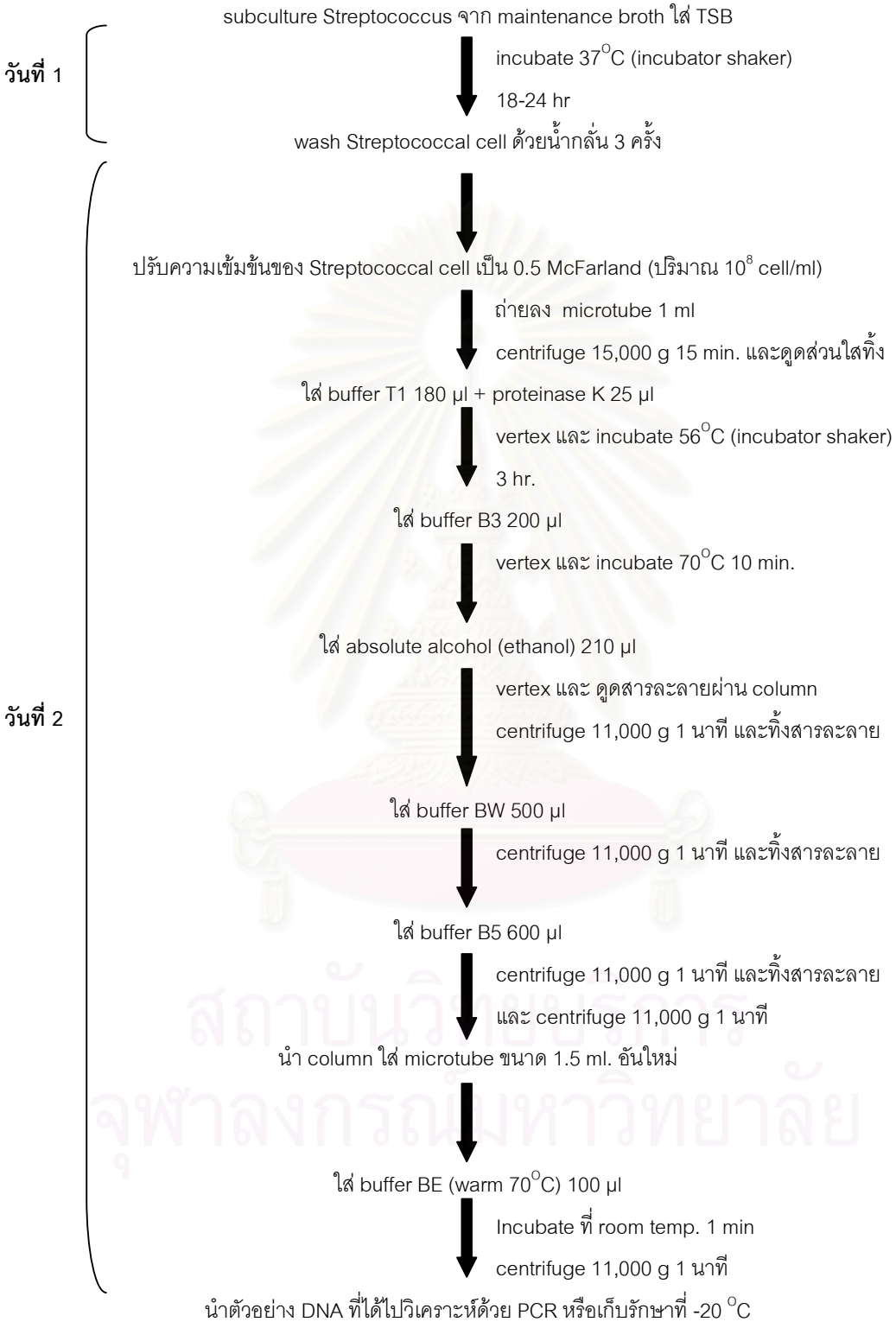
2. สกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสด้วยวิธี phenol-chloroform extraction (modified from Wolf, 2006) และ DNA-binding spin column (NucleoSpin®, Germany) แสดงในขั้นตอนรายละเอียดวิธีการสกัด (หน้า 28-29)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform extraction



ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง DNA ด้วย DNA-binding spin column (NucleoSpin®, Germany)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การเลือก primer ที่มีความจำเพาะต่อ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

เลือก primer ที่มีความจำเพาะต่อ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสพิจารณา sequence ใน 16sRNA gene เนื่องจากเป็น gene ที่มีการเปลี่ยนแปลงในแบคทีเรียแต่ละชนิดน้อย สำหรับ sequence ของ primer (Sigma-Genosys, Singapore) ใช้ใน PCR แสดงตารางที่ 4

ตารางที่ 4 sequence ของ primer สำหรับตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

primer		sequence	เอกสารอ้างอิง
Streptococcus	C1	5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA A-3'	Meiri-Bendex
	C2	5'-TAC AAC GCA GGT CCA TCT-3'	et al., 2002
Streptococcus agalactiae	F1	5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3'	Martinez et al.,
	IMOD	5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3'	2001
Streptococcus iniae	Sin-1	5'-CTA GAG TAC ACA TGT ACT AAG-3'	Zlotkin et al.,
	Sin-2	5'-GGA TTT TCC ACT CCC ATT AC-3'	1998

3.3 การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification

ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนผสมในการทำ PCR ขั้นตอน PCR amplification และ Gel electrophoresis

ส่วนผสมในการทำ PCR

ประกอบด้วย 10X PCR buffer (1 mM $MgCl_2$), dNTP 2.5 mM, Tag polymerase 2.5 U (iNtRON Biotechnology, USA), Forword primer 10 μM, Reverse primer 10 μM, DNA 50-100 ng/μl (Meiri-Bendex et al., 2002) และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรโดยรวมเท่ากับ 20 μl (iNtRON Biotechnology, USA)

ขั้นตอน PCR amplification

นำส่วนผสมที่เตรียมเข้าเครื่อง PCR Thermalcycler (PCRsprint-Hybaid, UK) ขั้นตอน PCR amplification เริ่มต้นด้วย preheating 94 ^{O}C เวลา 2 นาที และผ่าน 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน denaturation 94 ^{O}C เวลา 20 วินาที ขั้นตอน annealing 56 ^{O}C เวลา 10 วินาที และ ขั้นตอน extension 72 ^{O}C เวลา 30 วินาที จำนวน 30 รอบ โดยรอบสุดท้ายในขั้นตอน extension 72 ^{O}C ใช้เวลา 2 นาที

ขั้นตอน Gel electrophoresis

นำ PCR product และ 1-kbp DNA ladder (SibEnzyme, Russia) ผ่าน 2%agarose gel (Research organics, USA) ในเครื่อง Electrophoresis (Bio-Rad, USA) ที่ 100 volt เป็นเวลา 40 นาที และย้อมติดสีด้วย 0.5 μg/ml Ethidium bromide (Sigma Algrich Inc., USA) 30 นาที

อ่านผล DNA band ของ PCR product ใน 2%agarose gel ด้วยเครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, Germany) และถ่ายภาพภายใต้แสง UV นำมาตรวจวิเคราะห์ DNA จากตัวอย่างศึกษาเปรียบเทียบกับ positive control

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสถ่ายลงใน maintenance broth ที่มีส่วนผสมของ 20% glycerol และ 10% fetal bovine serum เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C เป็นระยะเวลา 6 เดือน และอุณหภูมิ -70 ^{O}C เป็นระยะเวลามากกว่า 1 ปี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองส่วนที่ 2 ศึกษาความไวรับของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Susceptibility Test)

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ได้แก่ oxytetracycline, amoxicillin และ co-trimazine (trimethoprim+sulfadiazine) (WHO Technical Report Series, 1999) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสด้วยวิธี antimicrobial agar dilution susceptibility tests เพื่อหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ตามวิธีของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002 ก่อนหน้านี้เรียกว่า NCCLS)

1. ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการศึกษา
    1.1 ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ได้แก่ oxytetracycline, amoxicillin, sulfadiazine/ trimethoprim และ sulfadimethoxine/ormetoprim
    1.2 บริษัทผู้ผลิตยา Lot number ตัวทำละลายของยาและความเข้มข้นแสดงในภาคผนวกที่ 4
    1.3 ละลายตัวยาด้วยตัวทำละลายตามที่ระบุไว้ใน CLSI (2002); amoxicillin, sulfadiazine, sulfadimethoxine 0.1 N NaOH; oxytetracycline 0.1 N HCl; trimethoprim, ormetoprim absolute ethanol โดยเติมตัวทำละลายทีละน้อยให้ยาละลายจนหมด เติมน้ำกลั่นเพื่อเจือจางจนได้ปริมาตรที่ต้องการ ยกเว้นยา trimethoprim และ ormetoprim ที่ใช้ตัวทำละลายเท่านั้น ไม่ต้องเติมน้ำกลั่น เก็บรักษา stock solution ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 2 เดือน

2. เตรียมตัวอย่างยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ ภาคผนวกที่ 4
    2.1 เจือจางยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อครั้งละ 2 เท่า (two-fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพประมาณ 6-10 ความเข้มข้น
    2.2 ผสมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10 โดยผสมยาแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 2 มิลลิลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton (Oxoid, England) 18 มิลลิลิตร และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา
    3.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่แยกได้จากปลานิลป่วย 50 isolates และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 3 ชนิด สำหรับควบคุมคุณภาพการทดลอง ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802
    3.2 เพาะเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่แยกได้จากปลานิลป่วย 50 isolates และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 3 ชนิด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxoid, England) บ่มอุณหภูมิ 33 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
    3.3 ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้ได้ความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) และทำการเจือจางอีก 10 เท่า ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร

4. ทดสอบหาความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

   4.1 ดูดส่วนผสมเชื้อ (inoculum) จากขั้นตอน 3.3 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในชุด multipoint inoculator

   4.2 นำ multipoint inoculator จุ่มในเชื้อที่เตรียมไว้ แตะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton ที่ผสมยาต้านจุลชีพปริมาณต่างๆ จะได้เชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^4 เซลล์/spot บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำ negative control (อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton ที่ไม่ผสมยาต้านจุลชีพ) ควบคู่ไปพร้อมกับกลุ่มทดลอง

   4.3 ทิ้งไว้จนจุดที่ถ่ายเชื้อแห้ง (แต่ไม่เกิน 30 นาที) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง อ่านผลแต่ละจุด isolate โดยดูความเข้มข้นของยาต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา

5 ทำการวิเคราะห์ผลและสรุปความไวรับของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ที่ทำการศึกษา ด้วยโปรแกรม WHONET 5 (WHO, 1999) และพิจารณาผลทดสอบเปรียบเทียบกับ MIC interpretive standard (CLSI, 2002) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่ยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus pneumoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทดสอบโดย Standard Agar Dilution Method (CLSI, 2002)

ยาต้านจุลชีพ	MIC Interpretive Standard (µg/ml)		
	Susceptible	Intermediate	Resistance
Amoxicillin	$\leq$ 0.5	1	$\geq$ 2
Tetracycline	$\leq$ 2	4	$\geq$ 8
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	$\leq$ 9.5/0.5	19/1-38/2	$\geq$ 76/4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การทดลองส่วนที่ 1 ศึกษาลักษณะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง

1. ศึกษารอยโรคและวิการของปลานิลป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส

ลักษณะอาการของปลานิลที่ป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส พบว่ามีลักษณะการว่ายน้ำผิดปกติ (spiraling หรือ spinning) ไม่มีแรง หรือ ไม่มีทิศทาง สีตามลำตัวเข้ม (melanosis) สูญเสียการทรงตัว (imbalance movement) ท้องขยายใหญ่ (abdominal distension) ตาโปนโดยอาจพบหนึ่งหรือสองข้าง (exophthalmos; pop-eye) กระจกตาขุ่นมัว (corneal opacity) หรืออาจมีเลือดออกภายในช่องตา มีจุดเลือดออกบริเวณโคนครีบ กระพุ้งแก้ม (operculum) ผิวหนัง และบริเวณรอบรูทวาร เป็นต้น ซึ่งเห็นได้ชัดในปลาขนาดใหญ่ (รูปที่ 3-4)

ลักษณะรอยโรคภายในของปลานิลที่ป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส พบว่ามีของเหลวในช่องท้องทำให้เห็นจากภายนอกว่ามีอาการท้องขยายใหญ่ ของเหลวที่พบอาจมีลักษณะใส หนืด หรือปนเลือด (serosanguinous) ตับขยายใหญ่ สีซีด ม้ามขยายใหญ่ มีสีดำเข้ม ผนังลำไส้ด้านนอกมีเลือดคั่ง ผนังลำไส้บาง จุดเลือดออกที่ตับ ตา ม้ามและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (diffuse visceral hemorrhage) บางตัวอาจพบอาการหรือรอยโรคไม่ชัดเจน (รูปที่ 5-8)

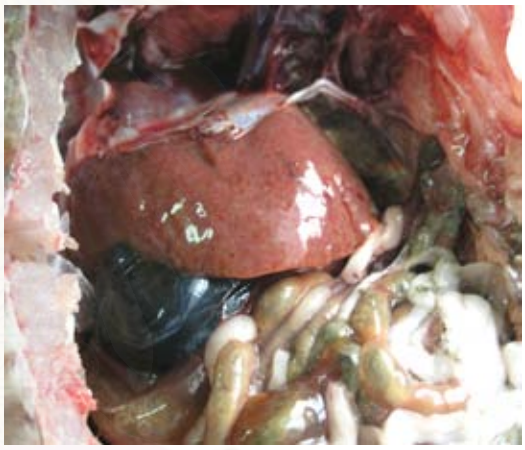
ตารางที่ 6 อาการผิดปกติของปลานิลที่ป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิสจากทั้งหมด 24 cases*

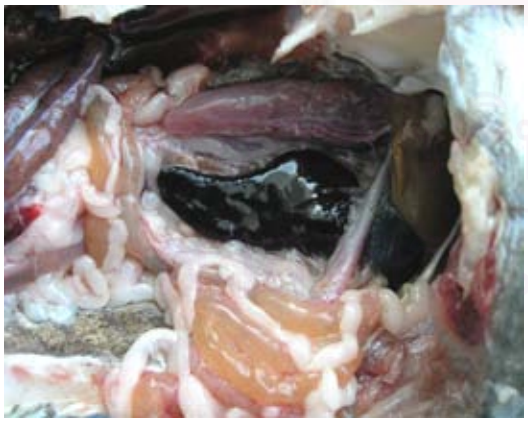
อาการและลักษณะความผิดปกติ	จำนวนพบ/ทั้งหมด	รอยโรค**	จำนวนพบ/ทั้งหมด
ว่ายน้ำผิดปกติ**	10/14	ของเหลวในช่องท้อง	4/10
สีตามลำตัวเข้ม	8/24	ตับขยายใหญ่	8/10
สูญเสียการทรงตัว**	5/14	ม้ามขยายใหญ่	8/10
ท้องขยายใหญ่	2/24	ผนังลำไส้บาง	8/10
ตาโปนโดยอาจพบหนึ่งหรือสองข้าง	2/24	จุดเลือดออกอวัยวะภายใน	10/10
กระจกตาขุ่นมัว	18/24		
จุดเลือดออก	24/24		

หมายเหตุ :

* ปลานิลที่ป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิสจำนวน 24 ตัวอย่าง อยู่ในสภาพมีชีวิตจำนวน 14 cases และตายจำนวน 10 cases (ลูกปลาจำนวน 14 cases และปลาขนาดใหญ่ 10 cases)

** ว่ายน้ำผิดปกติและสูญเสียการทรงตัวพิจารณาจากจำนวนปลามีชีวิต; รอยโรคพิจารณาจากปลาขนาดใหญ่





3	4
5	6
7	8

รูปที่ 3-4 รอยโรคภายนอก และ**รูปที่** 5-8 รอยโรคภายในของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล

รูปที่ 3 **และ** 4 จุดเลือดออกทั่วไปตามลำตัว เยื่อบุผิวบริเวณปาก ตา กระพุ้งแก้ม และบริเวณครีบ ท้องขยายใหญ่ เยื่อบุตาขาวอักเสบแบบเฉียบพลัน กระจกตาขุ่นและอาจมีของเหลวในช่องระหว่างกระจกตาและเยื่อบุตาที่อักเสบ ทำให้ตามีลักษณะโปนออก

รูปที่ 5 เมื่อเปิดผ่าช่องท้องของปลาป่วยมักพบจุดเลือดออกกระจายทั่วไปตามผนังเยื่อบุช่องท้องซึ่งเป็นลักษณะวิการจากการติดเชื้อในกระแสเลือดและจากการผลิตสารพิษของเชื้อ นอกจากนี้มักพบของเหลวในช่องท้อง (ascites) มีลักษณะปนเลือด (serosanguinous) ทำให้เห็นจากภายนอกว่ามีอาการท้องบวม พบการอักเสบของอวัยวะภายใน พบจุดเลือดออกบริเวณผนังลำไส้ด้านนอกและอวัยวะภายในอื่นๆ เช่น ตับ ม้าม เยื่อบุช่องท้อง

รูปที่ 6 โรคสเตรปโตคอคโคซิสทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญ ภาพแสดงตับขยายใหญ่และพบจุดเลือดออก

รูปที่ 7 **และ** 8 ภาพแสดงลักษณะม้ามบวม ขนาดใหญ่กว่าปกติ และพบรังไข่มีจุดเลือดออกในแม่พันธุ์ปลา

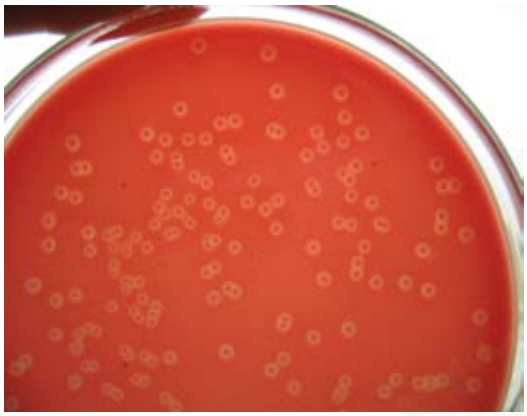
2. ศึกษาชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม

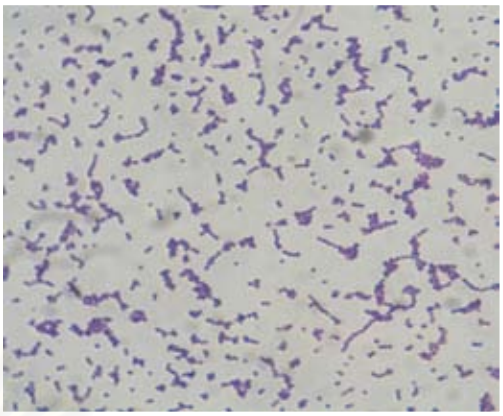
2.1 ตรวจวินิจฉัยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเบื้องต้น

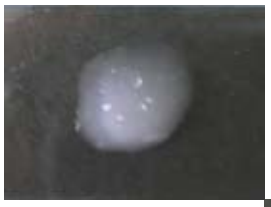
ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสมหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 33 ^{O}C เป็นเวลา 24ชั่วโมง เพาะในสภาวะที่มีออกซิเจนมีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร พื้นผิวเรียบ โค้งมน สีขาว (dull white) และทึบแสง อาจพบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) เห็นเป็นส่วนใสรอบโคโลนีหรือไม่พบรอบๆ โคโลนีของเชื้อ (ดังรูปที่ 9)

การพิจารณาลักษณะ และการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสด้วยการย้อมสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกติดสีม่วง รูปร่างกลมขนาด 1 ไมครอนและการจัดเรียงของเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว (cocci chain) เหมือนสร้อยลูกปัด (ดังรูปที่ 10)

ลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical test) ด้วยการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสแตปฟิโลคอคคัส (Staphylococcus) และเชื้อสเตรปโตคอคคัส (Streptococcus) โดยเชื้อสเตรปโตคอคคัสเมื่อทดสอบกับ 3% ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ไม่พบฟองแก๊ซเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสไม่มีการสร้างเอนไซม์ catalase แต่เชื้อสแตปฟิโลคอคคัสและเชื้อไมโครคอคคัส (Micrococcus) พบฟองแก๊ซแสดงว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ catalase (ดังรูปที่ 11)







negative catalase test

positive catalase test

9	10
11	12

รูปที่ 9-12 **ตรวจวินิจฉัยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส**

รูปที่ 9 ลักษณะของเชื้อสเตรปโตคอคคัสเมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนผสม (blood agar) โคโลนีของเชื้อมีลักษณะกลม นูน เป็นจุดสีขาว ขนาด 1 มิลลิเมตร รอบโคโลนีเป็นส่วนใส แสดงถึงการแตกของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจน

รูปที่ 10 การย้อมสีแกรม พบเชื้อสเตรปโตคอคคัส ติดสีแกรมบวก (สีน้ำเงิน) มีลักษณะรูปร่างของเซลล์กลมและเรียงตัวต่อกันของเซลล์เป็นสายโซ่

รูปที่ 11 **และ** 12 ลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical test) รูปที่ 11 เป็นการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสแตปฟิโลคอคคัสและเชื้อสเตรปโตคอคคัส โดยเชื้อสเตรปโตคอคคัสไม่มีการสร้างเอนไซม์ catalase จึงให้ผลลบ และรูปที่ 12 เป็นการจำแนกชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสจากคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API STREP20

2.2 จำแนกชนิดเชื้อจากคุณสมบัติทางชีวเคมี

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยจากฟาร์มต่างๆ ของประเทศไทย ทั้งหมด 60 cases ด้วย API STREP20 พบเป็น *Streptococcus agalactiae* จำนวน 47 cases *Streptococcus porcinus* จำนวน 8 cases *Streptococcus dys.ssp.equisimilis* จำนวน 4 cases และ *Streptococcus constellatus* จำนวน 1 cases สรุปผลคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆ ที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API STREP20 ดังตารางที่ 7 และรายละเอียดคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยจากฟาร์มต่างๆ ของประเทศไทยแสดงในภาคผนวกที่ 5

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆที่แยกได้จากปลาป่วยเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ API STREP20 (BioMeieux)

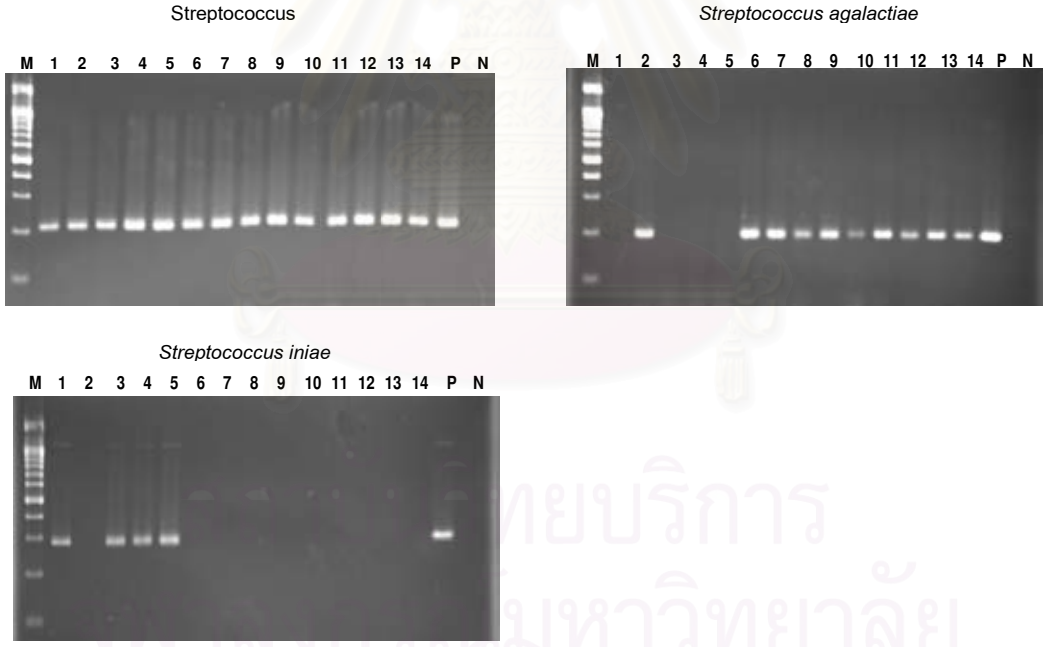
ชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส	คุณสมบัติทางชีวเคมี																				
	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	βHEM
S. agalactiae ATCC13813	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
S. iniae ATCC29178	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
S. dys.ssp.equisimilis[1]	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
S. dys.ssp.equisimilis[2]	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
S. agalactiae[1]	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. agalactiae[2]	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. agalactiae[3]	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
S. agalactiae[4]	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
S. agalactiae[5]	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. agalactiae[6]	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. agalactiae[7]	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. agalactiae[8]	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. agalactiae[9]	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. porcinus[1]	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. porcinus[2]	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S. porcinus[3]	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
S. constellatus	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

VP: acetoin production (Voges Proskauer), HIP: hydrolysis (hippuric acid), ESC: β-glucosidase hydrolysis (esculin), PYRA: pyrolidonyl arylamidase, αGAL: α-galactosidase, βGUR: β-giucuronidase, βGAL: β-galactosidase, PAL: alkaline phosphatase, RIB: acidification (ribose), ARA: acidification (arabinose), MAN: acidification (mannitol), SOR: acidification (sorbitol), LAC: acidification (lactose), TRE: acidification (trehalose), INU: acidification (inulin), RAF: acidification (raffinose), LAP: leucine aminopeptidase, AMN: acidification (amidon), ADH: arginine dihydrolase, GLYG: acidification (glycogen), βHEM: β-hemolysis

หมายเหตุ : *S. dys.ssp.equisimilis*[1], isolated number 1; *S. dys.ssp.equisimilis*[2], isolated number 50-52; *S. agalactiae*[1], isolated number 2-7, 12-17, 21, 22, 27-30, 35, 38-41, 47, 49; *S. agalactiae*[2], isolated number 18-20, 54-57; *S. agalactiae*[3], isolated number 24; *S. agalactiae*[4], isolated number 26; *S. agalactiae*[5], isolated number 31; *S. agalactiae*[6], isolated number 32-34; *S. agalactiae*[7], isolated number 45, 46; *S. agalactiae*[8], isolated number 58, 59; *S. agalactiae*[9], isolated number 42-44, 60-62; *S. porcinus*[1] , isolated number 9; *S. porcinus*[2], isolated number 8, 10, 11, 37; *S. porcinus*[3], isolated number 23; *S. constellatus*, isolated number 25

3. การตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสทางชีวโมเลกุล

จากการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุการป่วยหรือตายของปลานิลจำนวน 60 cases 12 ฟาร์มจากจังหวัดในเขตพื้นที่ภาคตะวันออก ตะวันตกและภาคกลางด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer 3 คู่ เป็น sequence ที่สร้างจาก 16sRNA gene ได้แก่ primer C1 : 5'-GCG TGC CTA ATA CAT GCA A-3' และ C2 : 5'-TAC AAC GCA GGT CCA TCT-3' ระบุเป็น genus Streptococcus ให้ PCR product ที่ความยาว 207 bp (Meiri-Bendek et al., 2002) เชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลให้ PCR product ที่ความยาว 207 bp ทั้ง 60 cases primer F1 : 5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3' และ IMOD : 5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3' ระบุเป็น species *Streptococcus agalactiae* ให้ PCR product ที่ความยาว 220 bp (Martinez et al., 2001) เชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลให้ PCR product ที่ความยาว 220 bp จำนวน 53 cases และ primer Sin-1 : 5'-CTA GAG TAC ACA TGT ACT AAG-3' และ Sin-2 : 5'-GGA TTT TCC ACT CCC ATT AC-3' ระบุเป็น species *Streptococcus iniae* ให้ PCR product ที่ความยาว 300 bp (Zlotkin et al., 1998) เชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลให้ PCR product ที่ความยาว 300 bp จำนวน 7 cases แสดงตัวอย่าง DNA band ดังรูปที่ 13 และเปรียบเทียบผลการตรวจจากคุณสมบัติทางชีวเคมีดังตารางที่ 8



รูปที่ 13 DNA band ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส cases ที่ 1-14 จำเพาะต่อ primer ที่ระบุเป็น genus Streptococcus, species ของ *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus iniae*

M, Molecular maker; 1-14, เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสแยกจากปลานิลป่วยหรือตาย; P, positive control (เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน); N, negative control (น้ำกลั่น)

หมายเหตุ : positive control ใช้เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ได้แก่ *Streptococcus agalactiae* ATCC13813 และ *Streptococcus iniae* ATCC29178

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆที่แยกได้จากปลาป่วยเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ API STREP20 (BioMeieux) กับการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR

จากตารางที่ 8 พบว่าการจำแนกชนิดเชื้อ Streptococcus บางตัวอย่างแสดงผล PCR และคุณสมบัติทางชีวเคมีแตกต่างกันสรุปดังตารางที่ 9 โดยการตรวจวินิจฉัยทาง PCR ส่วนใหญ่พบเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus iniae*

ID	Date	จังหวัด	วิธีการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส		
			API STREP20		PCR
			Identification	% Identification	
1	25/12/2546	มุกดาหาร	*S. dys.ssp.equisimilis*	99.8	*S. iniae*
2	6/2/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
3	6/2/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. iniae*
4	6/2/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. iniae*
5	6/2/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. iniae*
6	3/5/2547	ปราจีนบุรี	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
7	3/5/2547	ปราจีนบุรี	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
8	12/5/2547	นครปฐม	*S. porcinus*	90.0	*S. agalactiae*
9	12/5/2547	นครปฐม	*S. porcinus*	99.4	*S. agalactiae*
10	12/5/2547	นครปฐม	*S. porcinus*	90.0	*S. agalactiae*
11	12/5/2547	นครปฐม	*S. porcinus*	90.0	*S. agalactiae*
12	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
13	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
14	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
15	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
16	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
17	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
18	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	83.3	*S. agalactiae*
19	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	83.3	*S. agalactiae*
20	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	83.3	*S. agalactiae*
21	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
22	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
23	31/5/2547	สิงห์บุรี	*S. porcinus*	99.4	*S. agalactiae*
24	31/5/2547	สิงห์บุรี	*S. agalactiae*	99.1	*S. agalactiae*
25	31/5/2547	สิงห์บุรี	*S. constellatus*	99.9	*S. agalactiae*
26	31/5/2547	สิงห์บุรี	*S. agalactiae*	97.1	*S. agalactiae*
27	28/5/2547	ขอนแก่น	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
28	28/5/2547	ขอนแก่น	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
29	28/5/2547	ขอนแก่น	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
30	28/5/2547	ขอนแก่น	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
31	7/6/2547	No information	*S. agalactiae*	99.9	*S. agalactiae*

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆที่แยกได้จากปลาป่วยเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ API STREP20 (BioMeieux) กับการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR (ต่อ)

ID	Date	จังหวัด	วิธีการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส		
			API STREP20		PCR
			Identification	% Identification	
32	14/6/2547	กาญจนบุรี	*S. agalactiae*	97.8	*S. agalactiae*
33	14/6/2547	กาญจนบุรี	*S. agalactiae*	97.8	*S. agalactiae*
34	9/7/2547	กาญจนบุรี	*S. agalactiae*	97.8	*S. agalactiae*
35	07/7/48	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
36	07/7/48	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
37	07/10/48	นครปฐม	*S. porcinus*	90.0	*S. agalactiae*
38	07/10/48	นครปฐม	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
39	16/11/48	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
40	16/11/48	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
41	16/11/48	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
42	30/11/48	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	96.7	*S. agalactiae*
43	30/1/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	96.7	*S. agalactiae*
44	30/1/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	96.7	*S. agalactiae*
45	28/2/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	99.9	*S. agalactiae*
46	28/2/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	99.9	*S. agalactiae*
47	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
49	12-31/5/2547	มุกดาหาร	*S. agalactiae*	98.9	*S. agalactiae*
50	20/3/49	เพชรบุรี	*S. dys.ssp.equisimilis*	UA	*S. iniae*
51	20/3/49	หนองคาย	*S. dys.ssp.equisimilis*	UA	*S. iniae*
52	20/3/49	หนองคาย	*S. dys.ssp.equisimilis*	UA	*S. iniae*
54	29/3/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	83.3	*S. agalactiae*
55	29/3/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	83.3	*S. agalactiae*
56	29/3/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	83.3	*S. agalactiae*
57	29/3/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	83.3	*S. agalactiae*
58	26/4/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	95.9	*S. agalactiae*
59	26/4/49	เพชรบุรี	*S. agalactiae*	95.9	*S. agalactiae*
60	5/7/49	สมุทรปราการ	*S. agalactiae*	96.7	*S. agalactiae*
61	5/7/49	สมุทรปราการ	*S. agalactiae*	96.7	*S. agalactiae*
62	5/7/49	สมุทรปราการ	*S. agalactiae*	96.7	*S. agalactiae*

UA, unacceptable profile

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างผลวินิจฉัยชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัสระหว่างวิธี API STREP20 กับ PCR

ความสอดคล้องผลการตรวจระหว่าง API กับ PCR	จำนวน/ทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)
ผลการตรวจวินิจฉัยตรงกัน	47/60 (81.67)
ผลการตรวจวินิจฉัยต่างกัน	13/60 (18.33)
จาก *S. agalactiae* แปลผลเป็นชนิดอื่น	6/13
จาก *S. iniae** แปลผลเป็นชนิดอื่น	7/13

หมายเหตุ : *เชื้อ *S. iniae* ไม่มีฐานข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีในการตรวจวินิจฉัยของระบบ API

4. จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสทั้งหมดตามชนิดของเชื้อและแหล่งระบาด

จากผลการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยหรือตายจำนวน 60 cases 12 ฟาร์ม ด้วยวิธี PCR และพิจารณาข้อมูลประวัติตัวอย่างที่ได้รับจากฟาร์มปลานิลเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 8) พบว่าตัวอย่างเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลจำนวน 60 cases ในช่วงเดือนธันวาคม 2546 ถึงกรกฎาคม 2549 พบการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในเขตพื้นที่ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และภาคกลางของประเทศไทยโดยจังหวัดที่ตรวจพบ ได้แก่ นครปฐม ปราจีนบุรี สิงห์บุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี ขอนแก่น มุกดาหาร หนองคาย และสมุทรปราการ

ผลการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วยหรือตายด้วยวิธี PCR จำนวน 60 cases จำแนกเป็นเชื้อ *Streptococcus iniae* 7 cases (11.70%) และ *Streptococcus agalactiae* จำนวน 53 cases (88.3%) เมื่อพิจารณาข้อมูลประวัติตัวอย่างที่ได้รับจากฟาร์มปลานิลเพาะเลี้ยงทำให้ทราบว่าเชื้อ *Streptococcus iniae* จำนวน 6 cases พบที่ภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดมุกดาหารและหนองคาย และ 1 cases พบที่จังหวัดเพชรบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองส่วนที่ 2 ศึกษาความไวรับของเชื้อสเตรปโตคอคคัสต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Susceptibility Test)

การทดสอบหาความไวรับของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุการป่วยหรือตายของปลานิลจำนวน 50 isolates ต่อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ amoxicillin, oxytetracycline, sulfadiazine/trimethoprim และ sulfadimethoxine/ormetoprim ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่ประเทศทางยุโรปและอเมริกาตอนเหนืออนุญาตให้ใช้ในปลาสำหรับเป็นอาหารสำหรับผู้บริโภค (WHO Technical Report Series, 1999) พบว่าค่า MIC_{50} และ MIC_{90} (ค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ 50% และ 90% ของปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ) ของยา amoxicillin, sulfadiazine/trimethoprim และ sulfadimethoxine/ormetoprim มีค่าแตกต่างกันเพียง 2 เท่า โดยผลการทดสอบความไวรับต่อของยา amoxicillin มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 0.062 และ 0.125 μg/ml ยา sulfadiazine/trimethoprim และ sulfadimethoxine/ormetoprim มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 2.375/0.125 และ 4.75/0.25 μg/ml ส่วนยา oxytetracycline มีค่า MIC_{90} สูงกว่า MIC_{50} ถึง 16 เท่า โดยผลการทดสอบความไวรับของยา oxytetracycline มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 0.5 และ 8 μg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

จากผลการศึกษาสำหรับยา oxytetracycline มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} แตกต่างกันถึง 16 เท่า อาจเนื่องจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุการป่วยหรือตายของปลานิลจำนวนหนึ่งมีค่า MIC ที่สูงมากกว่าหรือเท่ากับ 4 μg/ml (ดังภาคผนวกที่ 6) และเมื่อพิจารณาจากประวัติข้อมูลเชื้อ (ภาคผนวกที่ 7) พบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสจำนวนหนึ่งได้รับจากตัวอย่างปลานิลที่ทางฟาร์มเคยมีการใช้ยา oxytetracycline จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ค่า MIC ของยา oxytetracycline มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} แตกต่างกันถึง 16 เท่า และมีเชื้อสเตรปโตคอคคัสบางส่วนมีค่า MIC ในระดับ intermediate susceptible และ resistant

MIC ของยาต้านจุลชีพ 4 ชนิดต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยจำนวน 50 isolates มีการกระจายตัวของข้อมูลดังรูปที่ 14-16 พบว่ายา amoxicillin, oxytetracycline, sulfadiazine/trimethoprim และ sulfadimethoxine/ormetoprim มีค่า MIC ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสส่วนใหญ่อยู่ระดับ susceptible (78-100%) แต่ยา oxytetracycline มีค่า MIC ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสบางส่วนอยู่ในระดับ intermediate susceptible (3.3%) และ resistant (18.4%) ดังรูปที่ 14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 Minimum Inhibitory Concentration 50% และ 90% (MIC_{50} และ MIC_{90}) ของยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด จากผลการทดสอบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัส ที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของไทย จำนวน 50 isolates

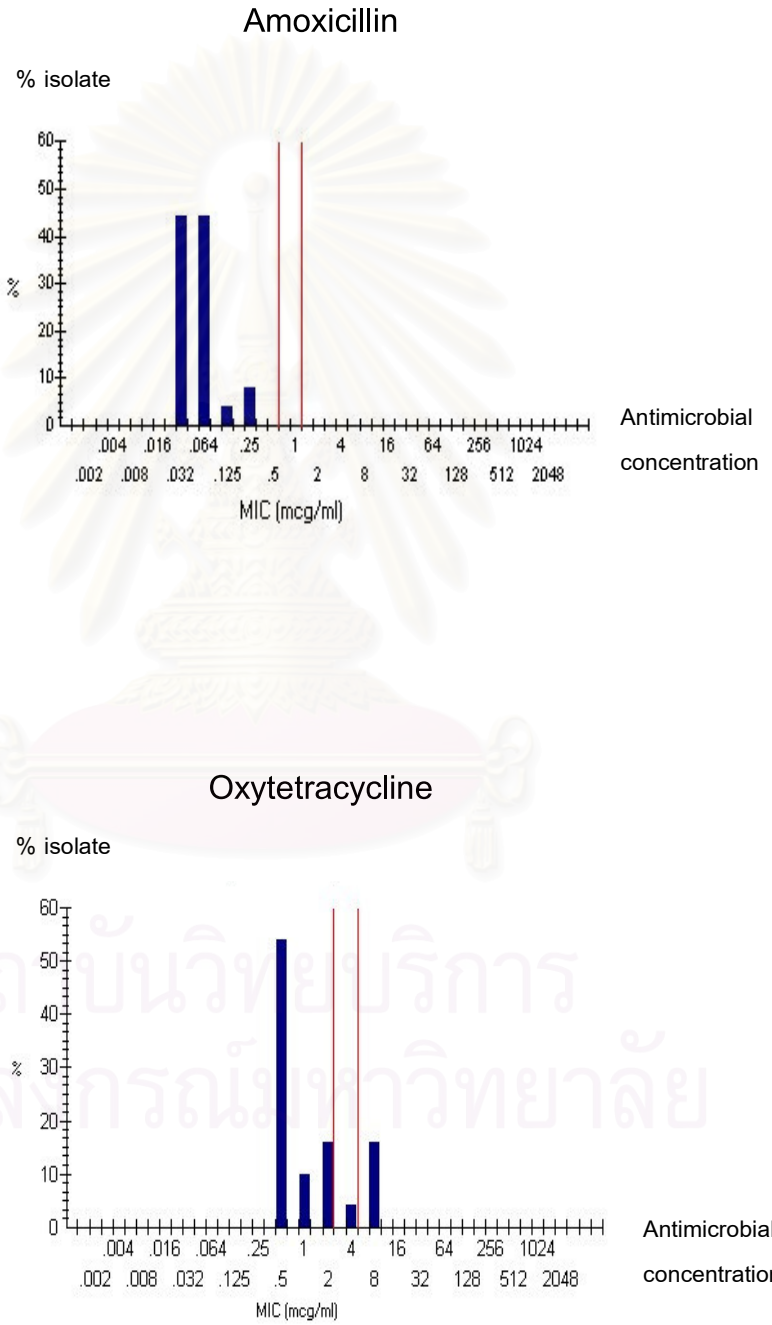
ยาต้านจุลชีพ	MIC (µg/ml)		
	MIC_{50} [1]	MIC_{90} [2]	MIC range
Amoxicillin	0.062	0.125	0.031-0.250
Oxytetracycline	0.500	8.000	0.500-8.000
Sulfadiazine/Trimethoprim (19:1)	2.375/0.125	4.750/0.25	0.285/0.015 – 9.50/0.50
Sulfadimethoxine/Ormetoprim (19:1)	2.375/0.125	4.750/0.25	0.15/0.008 – 4.750/0.25

[1] Minimum Inhibitory Concentration 50%

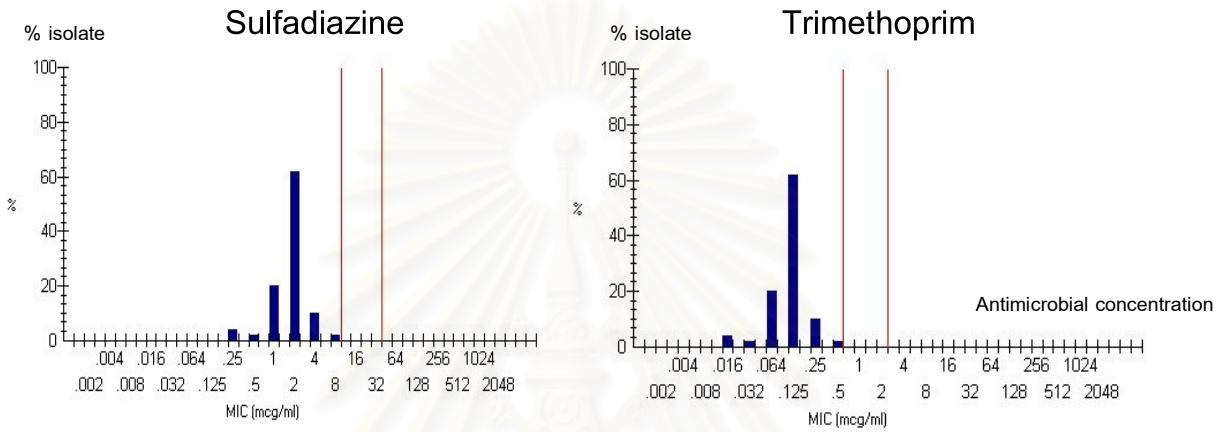
[2] Minimum Inhibitory Concentration 90%

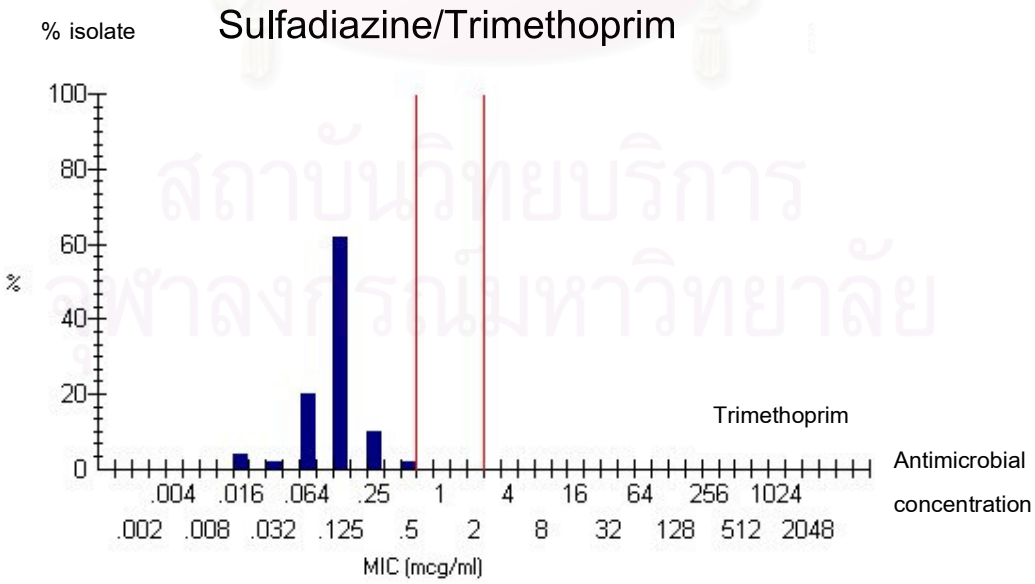
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 กราฟแสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration ของยาต้านจุลชีพ Amoxicillin, Oxytetracycline ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของโรคในปลานิลจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 50 isolates

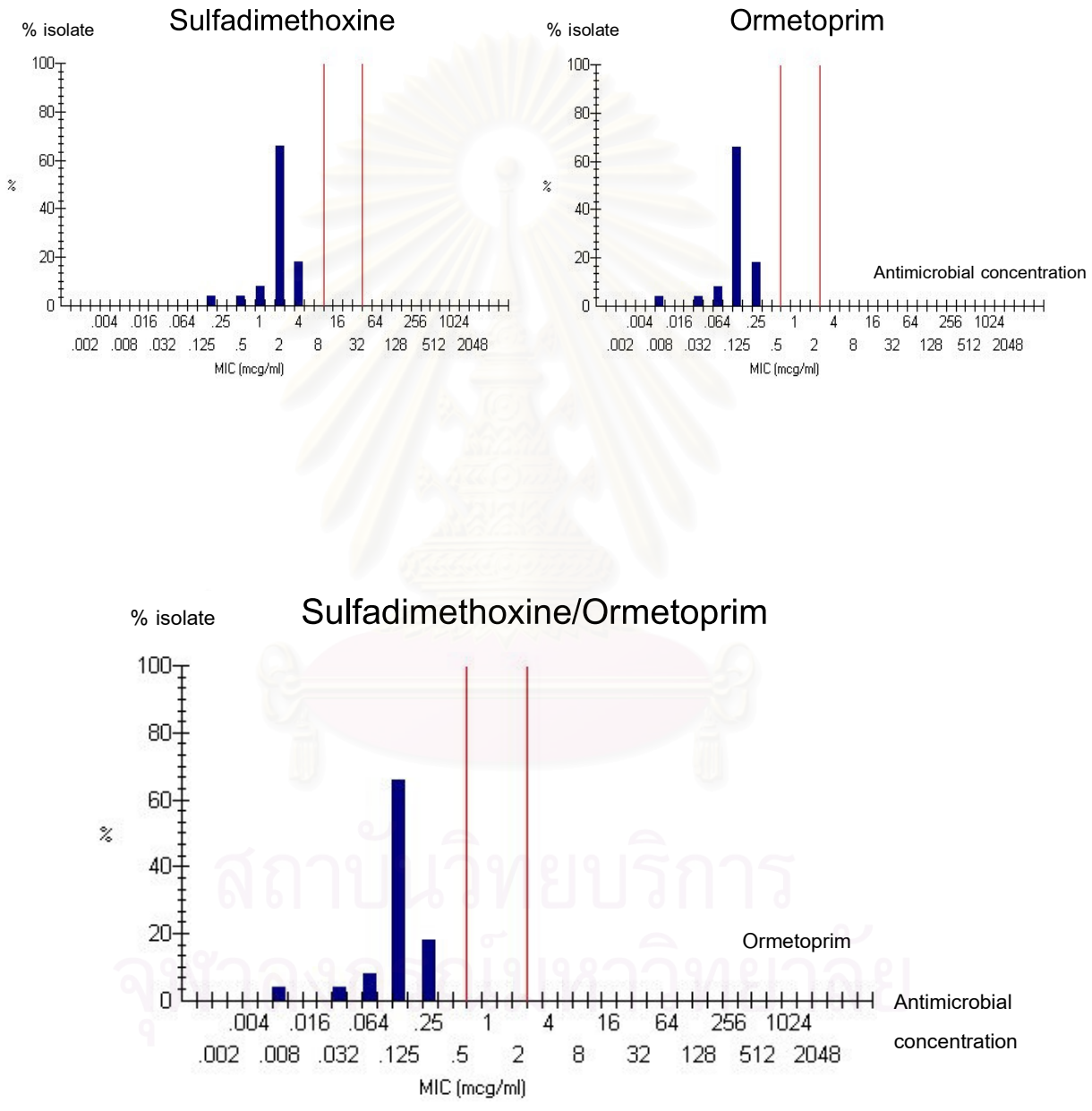


รูปที่ 15 กราฟแสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration ของยาต้านจุลชีพ Sulfadiazine/Trimethoprim ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของโรคในปลานิลจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 50 isolates





รูปที่ 16 กราฟแสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration ของยาต้านจุลชีพ Sulfadimethoxine/Ormetoprim ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของโรคในปลานิลจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 50 isolates



บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาลักษณะของการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยงของประเทศไทยพบ ลักษณะการว่ายน้ำผิดปกติแบบหมุนควง (spiraling หรือ spinning) เป็นอาการทางประสาทที่เชื้อแบคทีเรียแพร่เข้าสู่สมอง สีตามลำตัวเข้ม (melanosis) สูญเสียการทรงตัว (imbalance movement) ตาโปนอาจพบหนึ่งหรือสองข้าง (exophthalmos; pop-eye) กระจกตาขุ่นมัว (corneal opacity) และมีจุดเลือดออกทั่วร่างกายโดยเฉพาะรอบๆ ตา ครีบและกระพุ้งแก้ม (operculum) ส่วนรอยโรคภายในร่างกายพบ ม้ามมีขนาดใหญ่และบวม ตับ สมองและเนื้อเยื่อต่างๆ มีจุดเลือดออก (diffuse visceral hemorrhage) พบของเหลวสีน้ำเลือด (serosanguneous) ในช่องท้อง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Yanong และ Floyed (2005) ลักษณะอาการและรอยโรคดังกล่าวข้างต้นสาเหตุเกิดเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสมีลักษณะและคุณสมบัติ ได้แก่ พื้นผิวที่เป็นแอนติเจนของเชื้อ การสร้างสารพิษและการผลิตเอนไซม์ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคโดยเชื้อสามารถหลบเลี่ยงการถูกทำลายจากเซลล์เก็บกินและภูมิคุ้มกันในร่างกายทำให้เชื้อสามารถแทรกผ่านทางน้ำเหลืองและเลือดไปทั่วร่างกาย (septicemia) และสร้างสารพิษ ได้แก่ ฮีโมลไลซินหรือเรียกว่าสเตปโตไลซิน (Streptolysin) ทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำลายเนื้อเยื่อโดยรอบที่มีเชื้ออยู่ (Stokes and Ridgway, 1980)

การพิสูจน์ชนิดเชื้อจากปลานิลป่วยในประเทศไทยที่แสดงลักษณะอาการของโรคสเตรปโตคอคโคซิสจากลักษณะโคโลนีจำเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบเป็นเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นส่วนใหญ่ (81.67% ของเชื้อที่แยกได้จากการเกิดโรค 60 cases) และส่วนน้อย (18.33% ของเชื้อที่แยกได้จากการเกิดโรค 60 cases) เป็นเชื้อ *Streptococcus dys.ssp. equisimilis*, *Streptococcus porcinus* และ *Streptococcus constellatus* และการตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อทางชีวะโมเลกุลด้วยวิธี PCR พบเป็นเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นส่วนใหญ่ (83.33% ของเชื้อที่แยกได้จากการเกิดโรค 60 cases) และส่วนน้อยเป็น *Streptococcus iniae* (11.64% ของเชื้อที่แยกได้จากการเกิดโรค 60 cases) (ดังตารางที่ 8) ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสจากคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่จำเพาะกับบางตัวอย่างเชื้อที่แยกจากปลานิลป่วยเมื่อเทียบกับการตรวจวินิจฉัยเชื้อทางชีวะโมเลกุลด้วยวิธี PCR เนื่องจากการจำแนกชนิดเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นการพิจารณาลักษณะการแสดงออกต่างๆ ของเชื้อ (phenotypic traits) เช่น การผลิตสารพิษและเอนไซม์ ซึ่งชุดทดสอบ API 20STREP ประเมินลักษณะ phenotypic traits ตามตารางที่ 3 ของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเป็นชนิดต่างๆ และจำแนกชนิดเชื้อในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 8 เมื่อมีปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเชื้อ ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพการเก็บรักษาเชื้อ สภาพแวดล้อมการเพาะเชื้อ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น มีผลกระทบต่อการจำแนกชนิดเชื้อจากคุณสมบัติทางชีวเคมี (Quinn et al., 2003) ดังตารางที่ 7 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสชนิดต่างๆ ที่แยกจากปลานิลป่วยพบว่าเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มีลักษณะคุณสมบัติหลากหลายชนิดหรือเชื้ออื่นๆ เช่น *Streptococcus porcinus* และ *Streptococcus constellatus* เมื่อผ่านการตรวจวินิจฉัยยืนยันวิธี PCR แสดงเป็น *Streptococcus agalactiae* อย่างจำเพาะ (ดังตารางที่ 8) เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR เป็นการตรวจจากรหัสทางพันธุกรรม (genetic code) ซึ่งมีความจำเพาะสูงในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส

นอกจากนี้ผลการตรวจวินิจฉัยชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสจากคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่แสดงผลเป็น *Streptococcus iniae* ดังเช่นการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR แต่แปลผลการจำแนกเป็นเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus dys.ssp.equisimilis* (ดังตารางที่ 8) เนื่องจากชุดทดสอบ API 20STREP ไม่มีฐานข้อมูลของคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำอย่างสมบูรณ์จึงพบการแปลผลของชุดทดสอบ API 20STREP เป็นเชื้อชนิดอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียง จากผลการศึกษาสรุปคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus iniae* ที่ผ่านการตรวจวินิจฉัยยืนยันด้วยวิธี PCR ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus iniae* ที่ผ่านการตรวจวินิจฉัยยืนยันทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี PCR

Streptococcus iniae	คุณสมบัติทางชีวเคมี																				
	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	βHEM
S. iniae ATCC29178	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Isolated number 1	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Isolated number 50,51,52	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Isolated number 3,4,5	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

Isolated number 1, 50, 51, 52 : ตรวจวินิจฉัยด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นเชื้อ *Streptococcus dys.ssp.equisimilis*; Isolated number 3, 4, 5 : ตรวจวินิจฉัยด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

VP: acetoin production (Voges Proskauer), HIP: hydrolysis (hippuric acid), ESC: β-glucosidase hydrolysis (esculin), PYRA: pyrolidonyl arylamidase, αGAL: α-galactosidase, βGUR: β-giucuronidase, βGAL: β-galactosidase, PAL: alkaline phosphatase, RIB: acidification (ribose), ARA: acidification (arabinose), MAN: acidification (mannitol), SOR: acidification (sorbitol), LAC: acidification (lactose), TRE: acidification (trehalose), INU: acidification (inulin), RAF: acidification (raffinose), LAP: leucine aminopeptidase, AMN: acidification (amidon), ADH: arginine dihydrolase, GLYG: acidification (glycogen), βHEM: β-hemolysis

การตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสด้วยวิธี PCR พิจารณาการเรียงลำดับเบส (sequence) ของ 16sRNA gene เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของ 16sRNA gene ในแบคทีเรียแต่ละชนิดน้อย พบว่า primer ทั้ง 3 คู่เป็น sequence ที่สร้างจาก 16sRNA gene ได้แก่ C1 กับ C2 (Meiri-Bendek et al., 2002), F1 กับ IMOD (Martinez et al., 2001) และ Sin1 กับ Sin2 (Zlotkin et al.,1998) มีความจำเพาะต่อการตรวจวินิจฉัยชนิดเชื้อโดยพบขนาด PCR product ของเชื้อทดสอบตรงกับ positive control ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานและเป็นไปตามรายงานการศึกษา

การตรวจพบเชื้อ *Streptococcus iniae* จำนวน 7 ใน 60 cases จากปลานิลป่วยด้วยโรคสเตรปโตคอคโคซิสในจังหวัดมุกดาหาร หนองคาย และเพชรบุรี แสดงว่าโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยนั้นมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมายังคนที่สัมผัสปลาป่วย เนื่องด้วยเชื้อ *Streptococcus iniae* สามารถก่อโรคในปลาและติดเชื้อมาสู่คนผ่านทางปลา (zoonosis) (OIE[b], 2005) ดังรายงานการเกิดโรคจากตารางที่ 1 และองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Official international des epizooties, OIE) ระบุเชื้อ *Streptococcus iniae* ก่อให้เกิดโรคระบาดในสัตว์น้ำและติดต่อสู่คนที่สำคัญ แม้ว่าอาการที่พบในคนไม่รุนแรงถึงชีวิต คือ มีไข้ เป็นแผลหลุมบริเวณผิวหนัง แต่การเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสด้วยเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลาอาจไม่เป็นที่ยอมรับของตลาดผู้บริโภคโดยเฉพาะต่างประเทศ ในอนาคตประเทศผู้นำเข้าสินค้าผลิตภัณฑ์ปลานิลที่สำคัญของประเทศไทยได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และทวีปยุโรป อาจเข้มงวดด้านคุณภาพของปลานิลโดยกำหนดเกณฑ์มาตรฐานอย่างเช่นในประเทศออสเตรเรียกำหนดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำชนิดต่างๆ นำเข้าประเทศไม่ควรพบเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสและเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ก่อโรคสำคัญในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เมื่อผ่านการตรวจและประเมินความเสี่ยง (The Australian Ministry of Agriculture and Forestry, 1999) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นอาจเป็นอุปสรรคต่ออุตสาหกรรมการผลิตและส่งออกปลานิลของประเทศไทยในอนาคต ดังนั้นการจัดมาตรการควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาการผลิตและการส่งออกปลานิลของประเทศไทย เช่น การตรวจสุขภาพและเฝ้าระวังการเกิดโรคระบาดที่มีผลกระทบต่อการผลิตปลา การรักษาปลาป่วยและออกใบรับรองสุขภาพสัตว์น้ำ เป็นต้น

การควบคุมป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสด้วยการให้ยาต้านจุลชีพอาจช่วยลดความรุนแรงของโรคแต่การใช้ยาต้านจุลชีพจำเป็นต้องมีการทดสอบความไวของเชื้อต่อชนิดยาต้านจุลชีพก่อนนำมาใช้ เนื่องจากเชื้ออาจเกิดการดื้อยาทำให้ไม่ได้ผลการรักษาและทำให้ยาตกค้างในเนื้อปลา (WHO Technical Report Series, 1999) การทดสอบหาความไวรับของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุการป่วยหรือตายของปลานิลจำนวน 50 isolates ต่อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ amoxicillin, oxytetracycline, sulfadiazine/trimethoprim และ sulfadimethoxine/ormetoprim ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่ประเทศทางยุโรปและอเมริกาตอนเหนืออนุญาตให้ใช้ในปลาสำหรับเป็นอาหารสำหรับผู้บริโภค (WHO Technical Report Series, 1999) พบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยจำนวน 50 isolates มีค่า MIC ของยาทั้ง 4 ชนิดต่อเชื้อส่วนใหญ่อยู่ระดับ susceptible (78-100%) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Evan et al. (2000) แสดงว่ายาต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิดเหมาะสมสำหรับรักษาควบคุมป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล แต่การนำยาต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิดมาใช้ในการรักษา ควบคุมป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสจำเป็นต้องผ่านการศึกษาประสิทธิภาพของยาในปลานิลเพื่อเลือกใช้ปริมาณยาสำหรับรักษาโรคสเตรปโตคอคโคซิสอย่างถูกต้องเหมาะสมและศึกษาระยะเวลาหยุดเพื่อลดการตกค้างของยาที่มีผลกระทบต่อผู้บริโภค

สรุปและข้อเสนอแนะ จากการศึกษาและวิจัยเรื่องลักษณะของการเกิดโรคและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยง พบว่าโรคสเตรปโตคอคโคซิสเป็นปัญหาที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตปลานิลในประเทศไทยจากอัตราการตายสูงมากกว่า 70% ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงและผลผลิตไม่ได้มาตรฐานตามกำหนด นอกจากนี้เชื้อ *Streptococcus iniae* มีผลกระทบต่อสุขภาพผู้บริโภคโดยตรงเมื่อสัมผัสปลานิลป่วย ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ทราบลักษณะสำคัญของการเกิดโรคและสถาพภาพการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยงของประเทศไทย นอกจากนี้การศึกษาความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่อนุญาตให้ใช้ในปลาที่นำมาบริโภคเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของยาในสัตว์และระยะเวลาหยุดยาเหมาะสมต่อไป และควรศึกษาวิธีการควบคุมป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสต่างๆ เพิ่มเติมเพื่อการควบคุมป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลานิลเป็นที่ยอมรับมาตรฐานสากลและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.). 2547. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร : ปลานิล. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.). 2549. กฎระเบียบและมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบรับรองสินค้ากลุ่มสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th.

เจนนุช ว่องธวัชชัย, ญาณิน ลิมปานนท์, นุชนารถ ทิพย์มงคลศิปล์, มินตรา ลักขณา และ ศิลป์ชัย เพียรชอบ. 2549. รายงานวิจัยเรื่องสถานภาพของโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลที่เพาะเลี้ยง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2529. เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ฉบับที่ 98

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2544. เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง. ฉบับที่ 231

ประมง, กรม. 2544. เอกสารคำแนะนำการเพาะเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพมหานคร: ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 10 หน้า.

สินค้าส่งออก, กรม. 2548. สินค้าส่งออกผลิตภัณฑ์ประเภทปลานิล. กระทรวงพาณิชย์. แหล่งที่มา: http://www.ops2.moc.go.th/tradeth/cgihs/mainhs.asp

มารุต บุนนาค. 2547. อุตสาหกรรมสัตว์น้ำส่งออก. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (อัดสำเนา)

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ใครบุตร. 2547. เอกสารคำแนะนำการเพาะเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพมหานคร: ฝ่ายเผยแพร่สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง. กรมประมง. กระทรวง เกษตรและสหกรณ์. 31 หน้า.

อุษา บำรุงพืช. 2548. มาตรฐานการเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการส่งออก. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มประมงและผลิตภัณฑ์. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (อัดสำเนา)

ภาษาอังกฤษ

Americulture. 1999. Tilapia disease and water chemistry. [Online]. Available from: http://www.americulture.com/

Angulo, F. 1999. Use of antimicrobial agents in aquaculture : potential for public health impact. national aquaculture association. Center for Disease Control and Prevention (CDC).

Buller, N. B. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals : a practical identification manual. CABI publishing. Massachusetts. USA. 161.

Chang, P. H. and Plumb, J. A. 1996. Histopathology of experimental *Streptococcus spp.* Infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurua punctatus*. Journal of Fish Diseases. 19: 235-241.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. Ninth Informational Supplement-Sixth Edition. 19(1): 91-93.

Colorni, A., Diamant, A., Eldar, A., Kvitt, H. and Zlotkin, A. 2002. *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. Diseases of aquatic organisms. 49: 165-170.

Edward, J.N. 2000. Miscellaneous systemic bacteria infections: Diagnosis and treament. Fish Disease. Iowa state university press. USA. 158.

Evans, J.J., Shoemaker, C.A. and Klesius, P.H. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. Aquaculture. 189: 197-210.

Evans, J. J., Klesuis, P. H., Shoemaker, C. A., Sarawi, M. A. A., Landsberg, J., Duremdez., R., Marzouk and Zenki, S. A. 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: 505-513.

Evans, J.J., Klesuis, P.H. and Shoemaker, C.A. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitonal and bath immersion administration. Vaccine. 22. 3769-3773.

Facklam, R., Elliott, J., Shewmaker, L. and Reingold, A. 2005. Identification and characterization of sporadic isolate of *Streptococcus iniae* isolated from Humans. Journal of Clinical Microbiology. 43: 933-937.

FAO/WHO. 2001. Codex Alimentarius Volume 9A. Fish and Fishery Product, Codex standard for quick frozen finfish. Eviscerated or Uneviscerated.

GOH, S.H., Driedger, D., Gillett, S., Low, D.E., Hemmingsen, S.M., Amos, M., Chan, D., Lovgren, M., Willey, B.M., Shaw, C. and Smith, J.A. 1998. *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by Chaperonin 60 Gene identification method. Journal of Clinical Microbiology. 36: 2164-2166.

John, G. H., Noel, R. K., Peter, H. A. S, James, T. S., Stanley, T. W. 1994. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. USA. 532-558.

Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia. Aquaculture. 188: 237-246.

Martinez, C., Harel, J. and Gottschalk, M. 2001. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. The Canadian Journal of Veterinary research. 65: 68-72.

McKane, L and Kandel, J. 1996. Disease acquired through the skin: Streptococcal skin infection. Microbiology. 2nd edition. USA.

Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedmann, A., Leitner, G., Saran, A., Friedmans, S. and Kashi, Y. 2002. A PCR-based method for the detection in milk. Journal Dairy Science. 85: 1717-1723.

Nomoto, R., Munasinghe, L.I., Jin, D-H., Shimahara, H., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T. and Yoshima, T. 2004. Lancefied group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. Journal of Fish Diseases. 27: 679-686.

Official international des epizooties (OIE)[a]. 2005. Aquatic animal health code. 8th edition.

Official international des epizooties (OIE)[b]. 2005. Streptococcosis. The center for food security and public health. Iowa state university. USA.

Pasnik, D.J., Evans, J.J., Panangala, V.S., Klesius, P.H., Shelby, R.A. and Shoemaker, C.A. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. Journal of Fish Disease. 28: 205-212.

Quinn, P.J., Markey, B.K. and Maguire, D. 2003. Section I : Introductory bacteriology. Concise Review of Veterinary Microbiology. Blackwell Publishing. UK. 2-12.

Salar, S. 2005. First identification of *Streptococcus phocae* isolated from Atlantic Salmon. Journal of Clinical Microbiology. 43: 526-527.

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

Songer, J. G. and Post, K. W. 2005. The Genera Streptococcus and Enterococcus. Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease. Elsevier Saunders. China. 43-53.

Stokes, E. J. and Ridgway, G. L. 1980. Identification of bacteria: Streptococci. Clinical Bacteriology. 5th edition. Butler and Tanner Ltd., Britain. 115-127.

Talaro, K. and Talaro, A. 1996. The cocci of medical importance: Streptococci. Microbiology. 2nd edition. A Times Mirror Company. USA. 557-568.

The Australian Ministry of Agriculture and Forestry. 1999. Supplementary import risk analysis: Head-on, gill-in Australian salmonids for humans consumption.

Weinstein, M. R., Litt, M., Kertesz, D. A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., McGeer, A., Facklam, R., Ostach, C., Willey, B. M., Borczyk, A. and Low, D.E. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streococcus iniae*. The New England Journal of Medicine. 337(9): 589-594.

Wildgoose, W. H. 2001. Bacterial disease. BSAVA Manual of Ornamental fish. 2nd edition. Fordingbridge. UK. 185-193.

Wolf, J.B, 2006. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. [Online]. Available. http://www.research.umbc.edu/~jwolf/m1.htm#genomic%20DNA

World aquaculture. 2005. World production aquaculture. [Online]. Available. http://www.was.org/main

World Health Organization (WHO), Department of Communicable Disease Surveillance and Responses. 1999. WHONET5 Laboratory Database Software. Geneva.

WHO Technical Report Series. 1999. Food safety issues associated with products from aquaculture. Joint FAO/NACA/WHO study group. Geneva. 833.

Yanong, R. P. E and Floyd, R. F. 2005. Streptococcosis infectious of fish. [Online]. Available. http://www.edis.ifas.ufl.edu/FAO57

Zlotkin, A., Hershko, H. and Eldar, A. 1998. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Applied and environmental microbiology. 64: 4065-4067.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 : อาหารเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. **Tryptic Soy Agar (TSA)** : อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปสำหรับแบคทีเรีย

องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

Tryptone	15.0	g
Soya Peptone	5.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Agar	15.0	g

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ให้ครบ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร
2. ละลายส่วนประกอบโดยต้มใน water bath
3. นำไป sterile ด้วยเครื่อง autoclave ที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Pounds per Square inch, P.S.I) อุณหภูมิ 121 ^{O}C เป็นเวลา 15-20 นาที
4. เทลง Petri dish ที่ sterile แล้ว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ควรใช้ภายใน 14 วัน

2. **Mueller Hinton Agar (MHA)** : สำหรับการทดสอบความไวรับของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ

องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

Beef, dehydrated infusion from	300	g
Casein Hydrolysate	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17.0	g

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ให้ครบ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร
2. ละลายส่วนประกอบโดยต้มใน water bath
3. นำไป sterile ด้วยเครื่อง autoclave ที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Pounds per Square inch, P.S.I) อุณหภูมิ 121 ^{O}C เป็นเวลา 15-20 นาที
4. เทลง Petri dish ที่ sterile แล้ว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ควรใช้ภายใน 5 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Blood Agar : อาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment สำหรับแบคทีเรีย

วิธีการเตรียม

1. เตรียม Tryptic Soy Agar (TSA) หรือ Mueller Hinton Agar (MHA)
2. นำไป sterile ด้วยเครื่อง autoclave ที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Pounds per Square inch, P.S.I) อุณหภูมิ 121 ^{O}C เป็นเวลา 15-20 นาที
3. ผสมเลือด* ในอัตราส่วน 5-10% เขย่าให้เข้ากัน
4. เทลง Petri dish ที่ sterile แล้ว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ควรใช้ภายใน 14 วัน

---

* เลือดแกะที่ไม่เคยได้รับยาต้านจุลชีพชนิดใดๆมาก่อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 : ขั้นตอนการย้อมสีแกรมและ
การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสของเชื้อแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การย้อมแกรมสเตรน (Gram's Staining method)

A. สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี

1. Normal saline (0.75-0.8%NaCl)
2. Gram stain
   - 2.1 Crystal-violet
   - 2.2 Lugol solution (Gram's iodine)
   - 2.3 Decolorizer (Ethyl alcohol 70%)
   - 2.4 Safranin solution
3. oil (สำหรับกล้องจุลทรรศน์)
4. xylene
5. แอลกอฮอล์ 70% และ 95%

อุปกรณ์

1. แผ่นกระจก (slide)
2. wire loop
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. กล้องจุลทรรศน์ (microscopic)
5. กระดาษเช็ดเลนส์กล้องจุลทรรศน์

B. วิธีทำ

1. หยดน้ำเกลือ (Normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนแผ่นกระจก 1 หยด
2. ใช้ wire loop เขี่ยเชื้อที่สงสัยเป็นเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสลงบนหยดน้ำเกลือ
3. นำแผ่นกระจกผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง จนเชื้อที่เขี่ยบนแผ่นกระจกแห้ง
4. หยดสี Crystal-violet ให้ท่วมบริเวณเชื้อและวางทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
5. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด
6. หยดสี Gram's Iodine (Lugol solution) ให้ท่วมบริเวณเชื้อและวางทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
7. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด
8. หยด Decolorizer (Ethyl alcohol 70%) ให้ท่วมบริเวณเชื้อเป็นเวลา 2-3 วินาที
9. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด
10. หยดสี Safranin ให้ท่วมบริเวณเชื้อและวางทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที
11. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด
12. รอจนแผ่นกระจกแห้ง และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อดูการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียที่สงสัย

C. การอ่านผล

1. การติดสีแกรม
   - แบคทีเรียแกรมบวก : ติดสีน้ำเงิน
   - แบคทีเรียแกรมลบ : ติดสีแดง
2. ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย เช่น กลม (coccus), รี (rod) เป็นต้น
3. ขนาดเซลล์แบคทีเรีย
4. การจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย เช่น short chain, long chain, grape arrangement เป็นต้น

การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase

A. สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี

1. Hydrogenperoxide (H_2O_2) 3%
2. แอลกอฮอล์ 70% และ 95%

อุปกรณ์

1. แผ่นกระจก (slide)
2. wire loop
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์

B. วิธีทำ

1. นำเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase
2. หยด 3% ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ (hydrogenperoxide, H_2O_2) จำนวน 1 หยดบนแผ่นกระจกสะอาด
3. ใช้ wire loop เขี่ยเชื้อที่สงสัย ลง 3% ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์
4. สังเกตฟองอากาศ

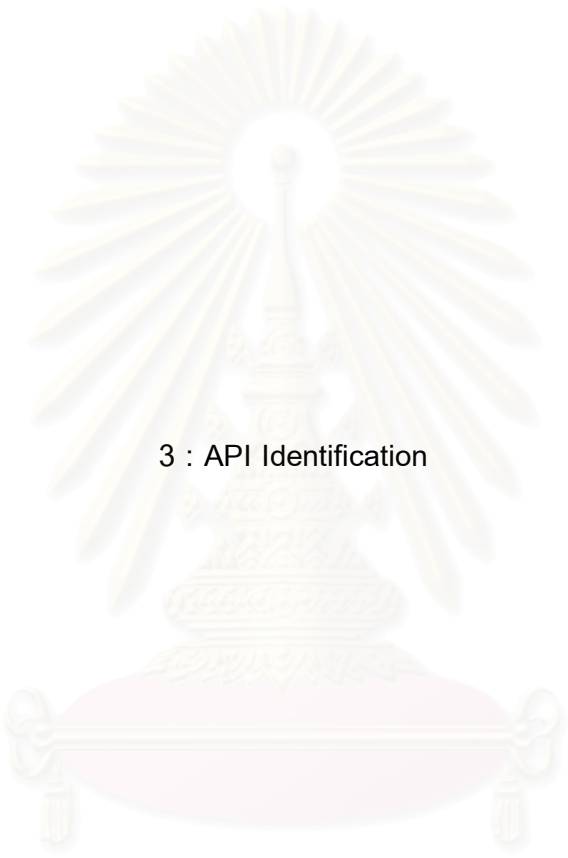
C. การอ่านผล

การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ catalase

เชื้อ Streptococcus ไม่สร้างเอนไซม์ catalase ดังนั้นผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase เป็น negative

- catalase test เป็น negative : ไม่เกิดฟองอากาศหลังหยด H_2O_2 3%
- catalase test เป็น positive : เกิดฟองอากาศขึ้นทันทีหลังหยด H_2O_2 3%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



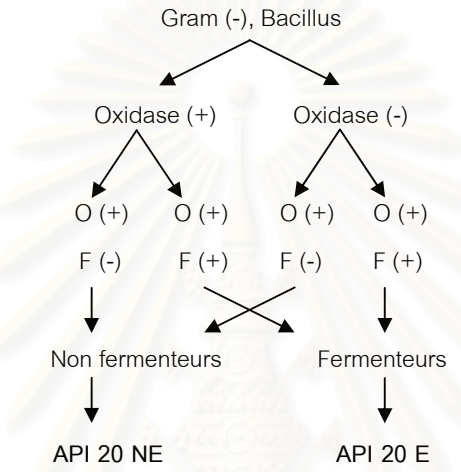
3 : API Identification

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

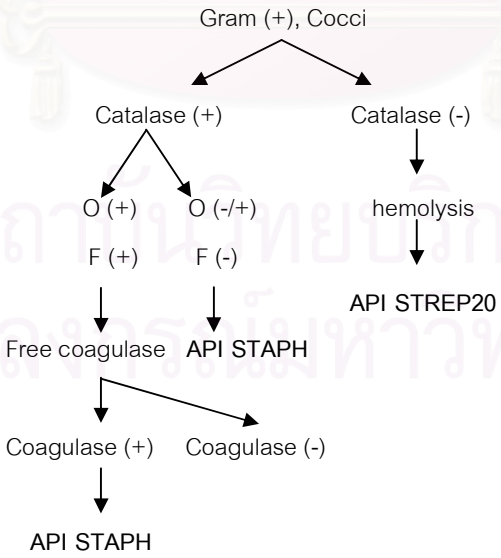
การตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API

การเลือกใช้ชุดทดสอบ API สำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการจำแนกเชื้อ ต้องพิจารณาจากผลการย้อมแกรม รูปร่างของเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ ดังนี้

แบคทีเรียแกรมลบ



แบคทีเรียแกรมบวก



หมายเหตุ : O, Oxidation; F,Fermentation

การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptococcus spp.* ด้วยชุดทดสอบ API STREP20

A. **สารเคมีและอุปกรณ์** (ดูรายละเอียดการเตรียมในหัวข้อ reagent and media)

สารเคมี

1. Normal saline (0.75-0.8%NaCl)
2. แอลกอฮอล์ 70% และ 95%
3. พาราฟินเหลว
4. McFarland standard : 4 McFarland
5. สารเคมีของชุดทดสอบ API STREP20 ประกอบด้วย
   - 5.1 GP medium (น้ำยาสีแดง)
   - 5.2 NIN reagent
   - 5.3 VP1 reagant
   - 5.4 VP2 reagent
   - 5.5 ZYM A reagent
   - 5.6 ZYM B reagent

อุปกรณ์

1. ชุดทดสอบ API STREP20 ประกอบด้วย แผ่นชุดทดสอบ และ incubation box
2. wire loop
3. micropipette
4. pipette tip
5. sterile test tube ขนาด 20 มล.
6. rack
7. incubator
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์

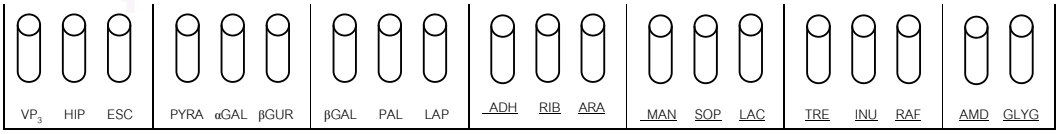
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B. วิธีทำ

1. นำเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่ผ่านการตรวจวินิจฉัยลักษณะของเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ พิจารณาลักษณะโคโลนี ย้อมสีแกรม และทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสม (blood agar) เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อและไม่ควร incubate นานเกิน 18-24 ชั่วโมง
2. การเตรียมแผ่นชุดทดสอบ
   1.1 ใส่น้ำกลั่น sterile ลงใน incubation box เพื่อให้เกิดความชื้นในปฏิกิริยาการทดสอบ
   1.2 ใส่แผ่นชุดทดสอบ API STREP20 ลงใน incubation box
   1.3 เขียนเบอร์ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ทดสอบ
3. ปรับความเข้มข้นเชื้อให้ได้ความขุ่นประมาณ 4 McFarland (ประมาณ 10^9 cells/ml) ด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
4. นำสารละลายเชื้อจากข้อ 3 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน GP medium (น้ำยาสีแดง ในชุดทดสอบ API STREP20) ผสมให้เข้ากัน
5. ใส่สารละลายเชื้อลงในแผ่นชุดทดสอบ API STREP20 ดังแผนภาพแสดง
   - ชุดทดสอบครึ่งแรกคือ VP จนถึง ADH : ดูดสารละลายในข้อ 3 ใส่ในชุดทดสอบ VP จนถึง LAP จนเต็ม ส่วน ADH ใส่สารละลายเชื้อจนเต็มและปิดด้วยพาราฟินเหลว เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาในสภาวะไม่มีออกซิเจน (ขณะใส่ควรระวังเกิดฟองอากาศในชุดทดสอบ)
   - ชุดทดสอบครึ่งหลังคือ RIB จนถึง GLYG : ดูดสารละลายในข้อ 4 ใส่ในชุดทดสอบจนเต็มและปิดด้วยพาราฟินเหลว
6. ปิดฝา incubation box นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 33-35 ^{O}C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารเคมี
   - VP test : ใส่สาร VP1 และ VP2 อย่างละ 1 หยด
   - HIP test : ใส่สาร NIN 2 หยด
   - PYRA, αGAL, βGUL, βGAL, PAL และ LAP test : ใส่สาร ZYM A และ ZYM B อย่างละ 1 หยด

   ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที และอ่านปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามตาราง และบันทึกผล (positive และ negative) ครั้งที่ 1
7. จากนั้น incubate ต่อที่อุณหภูมิ 33^{O}C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงและอ่านปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำและบันทึกผลครั้งที่ 2

แผนภาพชุดทดสอบ API STREP20



C. ตารางอ่านผลชุดทดสอบ API STREP20

Test	Reactions/enzymes	Result			
		Negative		Positive	
VP	Acetoin Production	ไม่เปลี่ยนสี		ชมพูแดง	
HIP	Hydrolysis	ไม่เปลี่ยนสี / น้ำเงินอ่อน		น้ำเงินเข้ม / ม่วง	
ESC	β-glucosidase	4 ชม.	24 ชม.	4 ชม.	24 ชม.
		ไม่เปลี่ยนสี/ เหลืองอ่อน	ไม่เปลี่ยนสี/ เหลืองอ่อน/ เทาอ่อน	ดำ/เทา	ดำ
PYRA	Pyrrolidonyl arylamidase	ไม่เปลี่ยนสี / ส้มอ่อน		ส้ม	
αGAL	α-galactocidase	ไม่เปลี่ยนสี		ม่วง	
βGUR	β-glucuronidase	ไม่เปลี่ยนสี		น้ำเงิน	
βGAL	β-galactocidase	ไม่เปลี่ยนสี / ม่วงอ่อน		ม่วง	
PAL	Alkaline phosphatase	ไม่เปลี่ยนสี / ม่วงอ่อน		ม่วง	
LAP	Leucine arylamidase	ไม่เปลี่ยนสี		ส้ม	
ADH	Arginine dihydrolase	เหลือง		แดง	
		4 ชม.	24 ชม.	4 ชม.	24 ชม.
RIB	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
ARA	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
MAN	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
SOR	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
LAC	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
TRE	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
INU	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
RAF	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
AMD	Acidification	แดง	ส้ม / แดง	ส้ม / เหลือง	เหลือง
GLYG	Acidification	แดง / ส้ม		เหลืองอ่อน	
βHEM	ดูจาก blood agar				

D. การวิเคราะห์ผล

นำผลบันทึกมาป้อนข้อมูลลงโปรแกรมและประมวลผลในเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์และจำแนกชนิดของ *Streptococcus spp.*

4 : การเตรียมยาต้านจุลชีพสำหรับทดสอบ

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยาต้านจุลชีพที่ใช้ทำการทดสอบ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Antimicrobials	Antimicrobial group	Manufacturer	Lot Number	Solvent	Concentration (stock solution) (µg/ml)
Amoxicillin	β-lactams	SIGMA	06041013546	0.1 N NaOH	5,120
Oxytetracycline	Tetracyclines	SIGMA	112H0123	0.1 N HCl	5,120
Sulfadiazine	Sulfonamides	SIGMA	S6387	0.1 N NaOH	12,160
Trimethoprim	Trimethoprim	SIGMA	T7883	ethanol (absolute)	3,200
Sulfadimethoxine	Sulfonamides	PHARMAQ	S200504044	0.1 N NaOH	12,160
Ormetoprim	Ormetoprim	PHARMAQ	S200501004	ethanol (absolute)	3,200

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลาย Amoxicillin และ Oxytetracycline

Antimicrobial Solution			Ratio (ml)		Intermidiate	Final concentration at
Step	Concentration (μg/ml)	Source (from step)	Antimicrobial Solution	Distilled water	concentration	1:10 dilution in MHA
1	5120	stock solution	-	-	5120	512
2	5120	1	1	1	2560	256
3	5120	1	1	3	1280	128
4	5120	1	1	7	640	64
5	640	4	1	1	320	32
6	640	4	1	3	160	16
7	640	4	1	7	80	8
8	80	7	1	1	40	4
9	80	7	1	3	20	2
10	80	7	1	7	10	1
11	10	10	1	1	5	0.500
12	10	10	1	3	2.500	0.250
13	10	10	1	7	1.250	0.125
14	1.25	13	1	1	0.625	0.062
15	1.25	13	1	3	0.312	0.031

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลาย Sulfadiazine/Trimethoprim และ Sulfadimethoxine/Ormetoprim (19:1)

Sulfadiazine/Trimethoprim (19:1)

Step	Antimicrobial Solution			Ratio (ml)		Intermediate Concentration		Final Concentration at 1:10 Dilution in MHA	
	Concentration (μg/ml)		Source	Antimicrobial Solution	Distilled water				
	Sdz	Trm				Sdz	Trm	Sdz	Trm
1	12,160	-	stock dilution	1	1	6080	-	-	-
2	-	3,200	stock dilution	1	9	-	320	-	-
3	6,080	320	1+2	1+1	-	3040	160	-	-
4	3,040	160	4	1	1	1520	80	152	8
5	3,040	160	4	1	3	760	40	76	4
6	3,040	160	4	1	7	380	20	38	2
7	380	20	6	1	1	190	10	19	1
8	380	20	6	1	3	95	5	9.500	0.500
9	380	20	6	1	7	47.500	2.500	4.750	0.250
10	47.5	2.5	9	1	1	23.750	1.250	2.375	0.125
11	47.5	2.5	9	1	3	11.875	0.625	1.178	0.062
12	47.5	2.5	9	1	7	5.938	0.313	0.589	0.031
13	5.9	0.31	12	1	1	2.969	0.157	0.285	0.015

Sulfadimethoxine/Ormetoprim (19:1)

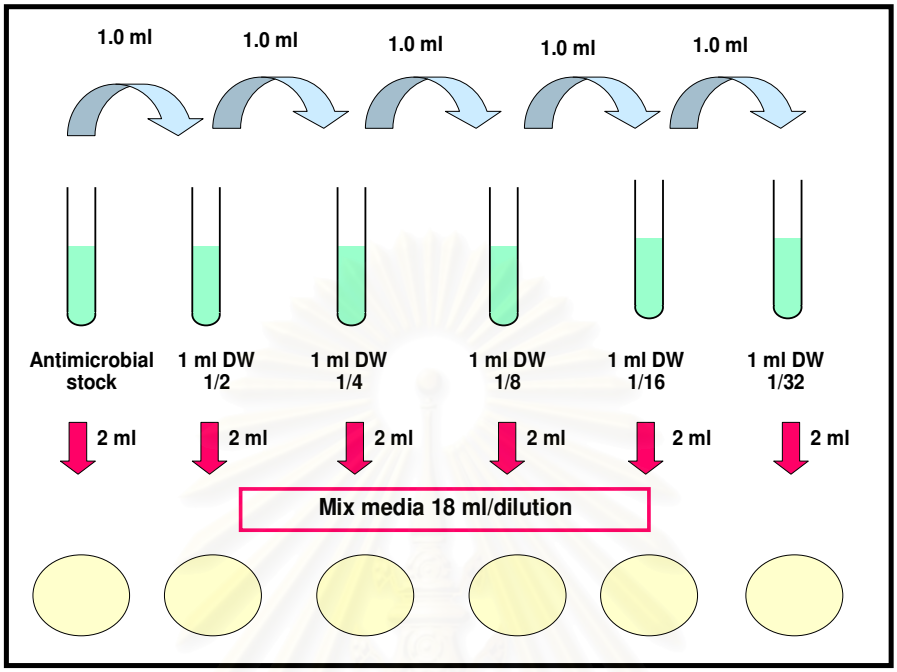
Step	Antimicrobial Solution			Ratio (ml)		Intermediate Concentration		Final Concentration at 1:10 Dilution in MHA	
	Concentration (μg/ml)		Source	Antimicrobial Solution	Distilled water				
	Sdz	Trm				Sdz	Trm	Sdz	Trm
1	12,160	-	stock dilution	1	1	6080	-	-	-
2	-	3200	stock dilution	1	9	-	320	-	-
3	6080	320	1+2	1+1	-	3040	160	-	-
4	3040	160	4	1	1	1520	80	152	8
5	3040	160	4	1	3	760	40	76	4
6	3040	160	4	1	7	380	20	38	2
7	380	20	6	1	1	190	10	19	1
8	380	20	6	1	3	95	5	9.50	0.500
9	380	20	6	1	7	47.500	2.500	4.750	0.250
10	47.50	2.50	9	1	1	23.750	1.250	2.375	0.125
11	47.50	2.50	9	1	3	11.875	0.625	1.178	0.062
12	47.50	2.50	9	1	7	5.938	0.313	0.589	0.031
13	5.94	0.31	12	1	1	2.969	0.157	0.285	0.015
14	5.94	0.31	12	1	3	1.520	0.078	0.152	0.008

Sdz – Sulfadiazine, Trm – Trimethoprim

Sdm – Sulfadimethoxine, Rmt – Ormetoprim

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการเตรียมยาต้านจุลชีพสำหรับทดสอบหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)



DW, distilled water

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผสมยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ คือ Mueller-Hinton (MHA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 : คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์เชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยแสดงคุณสมบัติชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสจากการทดสอบ โดยชุดทดสอบ API STREP20 (BioMeieux)

Characteristics	Isolate number																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Growth in air	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in air plus 5% CO_2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth anaerobically	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alpha-hemolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-hemolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of:																																		
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippurate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Esculin	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Acid from:																																		
Starch	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbital	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of:																																		
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alpha-Galactosidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-Glucuronidase	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrrolidonearylamidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

การพิสูจน์เชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยแสดงคุณสมบัติชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตคอคคัสจากการทดสอบ โดยชุดทดสอบ API STREP20 (BioMeieux) (ต่อ)

Characteristics	Isolate number																										Streptococcal standard	
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	58	59	60	61	62	*S. agalactiae* ATCC13813	*S. iniae* ATCC29178
Growth in air	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in air plus 5% CO_2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth anaerobically	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alpha-hemolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-hemolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of:																												
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hippurate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Acid from:																												
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbital	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of:																												
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Alpha-Galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Beta-Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrrolidonearylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

6 : Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
เมื่อทดสอบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Minimum Inhibitory Concentration (μg/ml) ของยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด

เมื่อทดสอบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย จำนวน 50 isolates

ID	Identification*	Region	AMX	OXY	SXT	ORS
1	*S. dys.susp.equisimilis*	Mukedaharn (2003)	0.0312	0.5	1.178/0.062	0.589/0.031
2	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0312	0.5	1.178/0.062	1.178/0.062
3	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0312	0.5	1.178/0.062	1.178/0.062
4	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0312	0.5	1.178/0.062	1.178/0.062
6	*S. agalactiae*	Prachinburi (2004)	0.0625	0.5	9.50/0.500	4.750/0.250
7	*S. agalactiae*	Prachinburi (2004)	0.0625	0.5	2.375/0.125	4.750/0.250
8	*S. porcinus*	Nakhonpathom (2004)	0.0625	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
9	*S. porcinus*	Nakhonpathom (2004)	0.1250	0.5	4.750/0.250	2.375/0.125
10	*S. porcinus*	Nakhonpathom (2004)	0.0625	0.5	4.750/0.250	4.750/0.250
11	*S. porcinus*	Nakhonpathom (2004)	0.0625	0.5	4.750/0.250	4.750/0.250
12	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	0.5	1.178/0.062	4.750/0.250
13	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	0.5	1.178/0.062	2.375/0.125
14	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.2500	0.5	1.178/0.062	2.375/0.125
15	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
17	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.2500	0.5	2.375/0.125	4.750/0.250
18	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	8.0	2.375/0.125	2.375/0.125
19	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	0.5	2.375/0.125	4.750/0.250
20	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	1.0	2.375/0.125	2.375/0.125
21	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
22	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0625	2.0	2.375/0.125	2.375/0.125
23	*S. porcinus*	Singburi (2004)	0.0312	>8	2.375/0.125	2.375/0.125
24	*S. agalactiae*	Singburi (2004)	≤0.0312	>8	2.375/0.125	2.375/0.125
25	*S. constellatus*	Singburi (2004)	0.0312	>8	2.375/0.125	2.375/0.125
26	*S. agalactiae*	Singburi (2004)	0.2500	>8	2.375/0.125	2.375/0.125
27	*S. agalactiae*	Khonkhan (2004)	≤0.0312	1.0	2.375/0.125	2.375/0.125
28	*S. agalactiae*	Khonkhan (2004)	≤0.0312	2.0	2.375/0.125	2.375/0.125
29	*S. agalactiae*	Khonkhan (2004)	0.1250	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
30	*S. agalactiae*	Khonkhan (2004)	0.0625	2.0	2.375/0.125	2.375/0.125

AMX, Amoxicillin; OXY, Oxytetracycline; SXT, Sulfadiazine/Trimethoprim (19:1); ORS, Sulfadimethoxine/Ormetoprim (19:1)

* Bacterial identification was based on API Strep® system (Biomeieux, France).

Minimum Inhibitory Concentration (μg/ml) ของยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด

เมื่อทดสอบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย

จำนวน 50 isolates (ต่อ)

ID	Identification*	Region	AMX	OXY	SXT	ORS
31	*S. agalactiae*	no information (2004)	0.0312	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
32	*S. agalactiae*	Kanchanaburi (2004)	0.0625	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
33	*S. agalactiae*	Kanchanaburi (2004)	≤0.0312	2.0	2.375/0.125	2.375/0.125
34	*S. agalactiae*	Kanchanaburi (2004)	≤0.0312	1.0	1.178/0.062	1.178/0.062
35	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2005)	0.0625	0.5	1.178/0.062	2.375/0.125
36	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2005)	0.0312	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
37	*S. porcinus*	Nakhonpathom (2005)	0.0625	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
40	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2005)	0.0312	0.5	2.375/0.125	2.375/0.125
41	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2005)	0.0625	0.5	4.750/0.250	2.375/0.125
42	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2005)	0.2500	2.0	2.375/0.125	2.375/0.125
43	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2006)	≤0.0312	4.0	2.375/0.125	4.750/0.250
44	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2006)	≤0.0312	8.0	4.750/0.250	4.750/0.250
45	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2006)	0.0625	8.0	2.375/0.125	2.375/0.125
46	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2006)	0.0625	4.0	1.178/0.062	2.375/0.125
47	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0312	2.0	2.375/0.125	2.375/0.125
49	*S. agalactiae*	Mukedaharn (2004)	0.0312	1.0	2.375/0.125	2.375/0.125
50	*S. dys.susp.equisimilis*	Nongkhai (2006)	0.0312	1.0	0.589/0.031	0.589/0.031
51	*S. dys.susp.equisimilis*	Nongkhai (2006)	≤0.0312	2.0	0.285/0.015	≤0.15/≤0.008
52	*S. dys.susp.equisimilis*	Nongkhai (2006)	≤0.0312	2.0	0.285/0.015	≤0.15/≤0.008
54	*S. agalactiae*	Phetchaburi (2006)	0.0312	8.0	2.375/0.125	2.375/0.125

AMX, Amoxicillin; OXY, Oxytetracycline; SXT, Sulfadiazine/Trimethoprim (19:1); ORS, Sulfadimethoxine/Ormetoprim (19:1)

* Bacterial identification was based on API Strep® system (Biomeieux, France).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7 : ประวัติเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากปลานิลป่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลป่วย ในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย

ID	Date	จังหวัด	อวัยวะที่ทำการแยกเชื้อ	ยาที่เคยใช้	Identification
1	25/12/2546	มุกดาหาร	ม้าม	No information	*S. dys.ssp.equisimilis**
2	6/2/2547	มุกดาหาร	ม้าม	AMX	*S. agalactiae*
3	6/2/2547	มุกดาหาร	ไต	AMX	*S. agalactiae*
4	6/2/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae*
5	6/2/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae*
6	3/5/2547	ปราจีนบุรี	ไต	No information	*S. agalactiae**
7	3/5/2547	ปราจีนบุรี	ไต	No information	*S. agalactiae**
8	12/5/2547	นครปฐม	ไต	No information	*S. porcinus**
9	12/5/2547	นครปฐม	ไต	No information	*S. porcinus**
10	12/5/2547	นครปฐม	ไต	No information	*S. porcinus**
11	12/5/2547	นครปฐม	ไต	No information	*S. porcinus**
12	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae **
13	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae**
14	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae**
15	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae**
16	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	No information	*S. agalactiae**
17	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	No information	*S. agalactiae**
18	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR	*S. agalactiae*
19	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR	*S. agalactiae*
20	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR	*S. agalactiae*
21	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ม้าม	ENR	*S. agalactiae**
22	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	AMX	*S. agalactiae*
23	31/5/2547	สิงห์บุรี	ไต	ENR, AMX, Fluoroquinolones	*S. porcinus**
24	31/5/2547	สิงห์บุรี	ไต	ENR, AMX, Fluoroquinolones	*S. agalactiae**
25	31/5/2547	สิงห์บุรี	ไต	ENR, AMX, Fluoroquinolones	*S. constellatus**
26	31/5/2547	สิงห์บุรี	ไต	ENR, AMX,Fluoroquinolones	*S. agalactiae**
27	28/5/2547	ขอนแก่น	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae**
28	28/5/2547	ขอนแก่น	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae**
29	28/5/2547	ขอนแก่น	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae**
30	28/5/2547	ขอนแก่น	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae**
31	7/6/2547	No information	ไต	No information	*S. agalactiae**

หมายเหตุ : NI-Not Identified; *, API data sheet available

ประวัติของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลป่วย ในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย

ID	Date	จังหวัด	อวัยวะที่ทำการแยกเชื้อ	ยาที่เคยใช้	Identification
32	14/6/2547	กาญจนบุรี	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae*
33	14/6/2547	กาญจนบุรี	ไต	ENR, AMX	*S. agalactiae*
34	9/7/2547	กาญจนบุรี	ไต	OTC (บ่อใหญ่), ENR (บ่อเล็ก)	*S. agalactiae*
35	07/7/48	เพชรบุรี	ไต	No information	*S. agalactiae**
36	07/7/48	เพชรบุรี	ไต	No information	*S. agalactiae**
37	07/10/48	นครปฐม	ไต	No information	*S. porcinus**
38	07/10/48	นครปฐม	ไต	No information	*S. agalactiae**
39	16/11/48	เพชรบุรี	ไต	Sulfamethoxazole/trimethoprim	*S. agalactiae**
40	16/11/48	เพชรบุรี	ไต	Sulfamethoxazole/trimethoprim	*S. agalactiae**
41	16/11/48	เพชรบุรี	ไต	Sulfamethoxazole/trimethoprim	*S. agalactiae**
42	30/11/48	เพชรบุรี	ไต	pyceze® 12 ชั่งโมง	*S. agalactiae**
43	30/1/49	เพชรบุรี	ไต	Sulphadoxine/Trimethoprim	*S. agalactiae**
44	30/1/49	เพชรบุรี	รังไข่	Sulphadoxine/Trimethoprim	*S. agalactiae**
45	28/2/49	เพชรบุรี	บดทั้งตัว	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
46	28/2/49	เพชรบุรี	บดทั้งตัว	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
47	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR	*S. agalactiae**
49	12-31/5/2547	มุกดาหาร	ไต	ENR	*S. agalactiae**
50	20/3/49	เพชรบุรี	ไต	ไม่เคยใช้ยา	*S. dys.ssp.equisimilis**
51	20/3/49	หนองคาย	ไต	ไม่เคยใช้ยา	*S. dys.ssp.equisimilis**
52	20/3/49	หนองคาย	ไต	ไม่เคยใช้ยา	*S. dys.ssp.equisimilis**
54	29/3/49	เพชรบุรี	บดทั้งตัว	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
55	29/3/49	เพชรบุรี	ไต	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
56	29/3/49	เพชรบุรี	ไต	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
57	29/3/49	เพชรบุรี	ไต	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
58	26/4/49	เพชรบุรี	ไต	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
59	26/4/49	เพชรบุรี	ไต	Oxytetracycline	*S. agalactiae**
60	5/7/49	สมุทรปราการ	ไต	ไม่เคยใช้ยา	*S. agalactiae**
61	5/7/49	สมุทรปราการ	ไต	ไม่เคยใช้ยา	*S. agalactiae**
62	5/7/49	สมุทรปราการ	ไต	ไม่เคยใช้ยา	*S. agalactiae**

หมายเหตุ : NI-Not Identified; *, API data sheet available

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวหทัยรัตน์ ไม้สัก เกิดเมื่อวันที่ 8 มิถุนายน พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2547 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย