



Keywords : Sex-reversed red tilapia, *Oreochromis niloticus*, Streptococcosis, *Streptococcus* spp., Environmental factor, Blood parameter

Abstract

Streptococcus spp. have been reported to cause streptococcosis accompanied with high economic losses in cultured freshwater and marine fish in many countries. In Thailand, streptococcosis was mainly reported in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sea bass (*Lates calcarifer*). However, the information related to disease outbreak is still limited. Thus, the studies on factors affecting streptococcosis in sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus*) were carried out. The results showed the virulence of *Streptococcus* spp. was in relation to routes of infection. An intraperitoneal injection has been suspected to affect the mortality rate of fish exposed to *Streptococcus* spp. We demonstrated environmental conditions, such as high stocking density (from 17 g/l) and extreme water temperature (24 or 30 °C) had a significant effect on streptococcal disease mortality in tilapia exposed to *Streptococcus* spp. by both intraperitoneal and cohabitation. However, significant reduction in mortality was seen in infected fish reared in high salinity (10 and 15 ppt). No significant difference between infected fish and control was observed in blood parameters investigated, such as red blood cell count, haematocrit, haemoglobin or serum protein content. However, fish survived from streptococcal infection exhibited higher antibody titre against *Streptococcus* spp. It is concluded that environmental conditions play important factors affecting susceptibility and mortality of *Streptococcus* spp. in infected sex-reversed tilapia. A health management strategy would be to reduce fish density and increase salinity thus lowering streptococcal disease mortality.

บทคัดย่อ

โรค Streptococcosis ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Streptococcus* spp. เป็นโรคที่มีความรุนแรง ก่อให้เกิดอัตราการตายค่อนข้างสูงในปลานิล แต่ข้อมูลเกี่ยวกับโรค Streptococcosis ในประเทศไทยยังมีรายงานค่อนข้างน้อย การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิลแดงแปลงเพศ ซึ่งได้แก่ ปริมาณเชื้อ วิธีการเข้าสู่ตัวปลาของเชื้อ รวมถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ความหนาแน่นในการเลี้ยง ความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด และอัตราการตายของปลา ผลการศึกษาพบว่าความรุนแรงของการติดเชื้อ และการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. ของปลานิลแดงแปลงเพศจะสัมพันธ์กับช่องทางการได้รับเชื้อ โดยพบว่าวิธีการฉีดเชื้อเข้าตัวปลาจะเป็นวิธีที่ทำให้ปลาทดลองมีการตายในระดับสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นในการเลี้ยง (ที่ระดับ 17 กรัมต่อลิตร ขึ้นไป) และอุณหภูมิ (สูงหรือต่ำกว่า 27 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้ปลามีอัตราการตายจากการติดเชื้อสูงขึ้น แต่ความเค็มของน้ำที่ 10 - 15 ppt จะช่วยลดความสูญเสียจากการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิลได้ เชื้อ *Streptococcus* spp. ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดที่ตรวจสอบ ซึ่งได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณฮีโมโกลบิน หรือโปรตีนในน้ำเลือด ของปลานิลแดงแปลงเพศที่วันที่ 14 ของการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามกลับพบว่าปลาที่รอดตายจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. มีระดับของแอนติบอดี (antibody titre) เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับการจัดการสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศอย่างเหมาะสม และนำไปสู่การกำหนดแนวทางในการป้องกันและควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดความสูญเสียที่อาจเกิดขึ้นจากโรค Streptococcosis

บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี เป็นที่นิยมของผู้บริโภค ทำให้การเพาะเลี้ยงปลานิลได้แพร่ขยายออกไปในทุกพื้นที่ของประเทศ ข้อมูลจากกองสถิติการประมง รายงานว่าปลานิลเป็นปลาน้ำจืดจากการเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณการผลิตสูงสุดมาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2534 จนถึงปัจจุบัน โดยมีผลผลิตรวมทั้งประเทศปีละประมาณ 76,000 ตัน และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย และเป็นปลาที่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้เป็นอย่างดี เนื่องจากความเครียด และคุณภาพน้ำมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรค ปลานิลจึงได้ชื่อว่าเป็นปลาที่ทนโรค (disease-resistant) ชนิดหนึ่ง ทำให้ในอดีตที่ผ่านมาจึงมีการรายงานการเกิดโรคในปลานิลค่อนข้างน้อย แต่ปัจจุบันการเลี้ยงปลานิล โดยเฉพาะปลานิลแปลงเพศ ได้กลายเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ผลผลิตปลานิลยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด เกษตรกรส่วนใหญ่จึงเร่งเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ โดยการปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นมากขึ้น ส่งผลให้สภาพแวดล้อมภายในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสม ทำให้ปลาเกิดความเครียดได้ง่าย และเป็นโรคในที่สุด ในบรรดาโรคติดเชื้อทั้งหมดที่มีรายงานในปลานิล พบว่าโรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นโรคที่มีความสำคัญอันดับต้นๆ เนื่องจากมีความรุนแรงและมักก่อให้เกิดอัตราการตายค่อนข้างสูงในปลานิลที่ติดเชื้อ โดยเฉพาะโรค Streptococcosis ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* spp. อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับโรค Streptococcosis ในปลานิลในประเทศไทยยังมีรายงานน้อยๆ ที่มีอุบัติการณ์ของโรคนี้เกิดขึ้นบ่อยครั้ง และยังพบว่าการระบาดของโรค Streptococcosis ในปลานิลมักจะสัมพันธ์กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง โดยเฉพาะความหนาแน่นในการเลี้ยง และอุณหภูมิของน้ำ แต่ยังไม่มีความชัดเจน

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิล ซึ่ง

ได้แก่ ปริมาณเชื้อ วิธีการเข้าสู่ตัวปลาของเชื้อ (route of infection) รวมถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ความหนาแน่นในการเลี้ยง ความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำที่มีผลต่อการติดเชื้อและอัตราการตายของปลา ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด และภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการป้องกันและควบคุมโรค Streptococcosis ในปลานิลอย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ที่ปลอดจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 15 กรัม จากฟาร์มเพาะเลี้ยงในเขตจังหวัดพัทลุง โดยเลี้ยงไว้ในตู้ทดลองความจุ 80 ลิตร เพื่อปรับให้ปลาคู่คุ้นเคยกับสภาพการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 3 มื้อ

2. การตรวจสอบคุณสมบัติของโคโลนีและชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* spp.

นำเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากสมองของปลานิลป่วยในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) มาเขียนบนอาหาร TSA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติของโคโลนี รวมทั้งคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical properties) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 STREP (BioMerieux, France)

3. การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. บริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาเขียนในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทอาหาร

เลี้ยงเชื้อส่วนบนออก แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำเกลือ 0.85% และเจือจางสารละลายเชื้อที่ได้ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ให้มีปริมาณของเชื้อตามต้องการ

4. การหาปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (Median lethal dose, LD₅₀)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 7 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 6 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุ 80 ลิตร และเตรียมสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเชื้อ 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ และ 10⁷ colony forming unit (cfu) ด้วยน้ำเกลือ 0.85% เพื่อใช้ฉีดเข้าตัวปลาในแต่ละกลุ่มทดลอง ฉีดเชื้อปริมาตรตัวละ 0.2 มิลลิลิตร เข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) ส่วนชุดควบคุมจะฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% แทนสารละลายเชื้อแบคทีเรีย บันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน แล้วนำไปคำนวณหาค่า LD₅₀ ที่ 14 วัน ตามวิธีการของ Reed & Muench (1938) ค่า LD₅₀ ที่ได้นี้จะใช้เป็นปริมาณเชื้ออ้างอิงสำหรับการชักนำให้ปลานิลติดเชื้อในการทดลองต่อไป

5. การศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยชักนำให้เกิดการติดเชื้อด้วยวิธีต่างๆ

5.1 วิธีการฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลอง และเตรียมสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับค่า LD₅₀ เพื่อใช้ฉีดเข้าตัวปลาในแต่ละกลุ่มทดลอง ฉีดเชื้อปริมาตรตัวละ 0.2 มิลลิลิตร เข้าบริเวณช่องท้อง ชุดควบคุมจะทำการฉีดน้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อ บันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน

5.2 วิธีการแช่ (Bath exposure)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลอง และ

เตรียมสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับค่า LD₅₀ เตรียมสารละลายเชื้อลงไปในตัวของแต่ละชุดทดลอง โดยชุดควบคุมจะมีการปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่ไม่มีการเติมเชื้อ บันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน

5.3 วิธีการผสมอาหาร (Oral exposure)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลอง และเตรียมอาหารผสมเชื้อ ตามวิธีการของ Bromage และ Owens (2002) โดยนำอาหารเม็ดมาบดให้เป็นผงละเอียดแล้วผสมลงในสารละลาย 10% เจลาติน เตรียมสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LD₅₀ ลงไปผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วตัดออกเป็นชิ้นๆ ให้มีขนาดชิ้นละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปให้ปลาในชุดทดลองกินตัวละ 1 ชิ้น ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนปลาในชุดควบคุมให้กินอาหารผสมเจลาตินที่ไม่มีเชื้อ บันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน

5.4 วิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาที่ติดเชื้อ (Cohabitation)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลอง ชักนำให้เกิดการติดเชื้อในปลาชุดทดลองโดยการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องปลานิลจำนวน 5 ตัว ตามวิธีการใน 5.1 ปล่อยให้มีการแสดงอาการของโรค แล้วนำปลาที่เป็นโรคหรือตายใหม่ๆ ไปใส่ในตู้ปลาสำหรับชุดทดลอง cohabitation หลังจากเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง จึงนำปลาที่ติดเชื้อออกจากตู้ทดลอง บันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน โดยในชุดควบคุมจะไม่มีการนำปลาที่ติดเชื้อเลี้ยงร่วมกับปลาปกติ

5.5 วิธีการฉีดเข้าช่องจมูก (Nare inoculation)

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลอง และเตรียมสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับค่า LD₅₀ ฉีด

สารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นเข้าบริเวณช่องจมูกของปลาแต่ละตัวในปริมาณตัวละ 10 ไมโครลิตร ชุดควบคุมจะมีการปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่ใช้น้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อ ปลอยปลากลับลงในตู้ทดลอง บันทึกอัตราการตายของปลาทุกวันจนครบ 14 วัน

6. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมกับการเกิดโรค Streptococcosis

6.1 ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยง

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 กลุ่ม การทดลอง กลุ่มแรกสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด กลุ่มที่สองสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงรวม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 3 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) โดยที่แต่ละชุดทดลองมีความหนาแน่นของปลาแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ความหนาแน่นต่ำ (8 กรัม/ลิตร) ความหนาแน่นปานกลาง (12 กรัม/ลิตร) และความหนาแน่นสูง (17 กรัม/ลิตร) ชักนำให้ปลาในแต่ละกลุ่มการทดลองเกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงรวม ตามลำดับ บันทึกอัตราการตายของปลาในแต่ละวันจนครบ 14 วัน

6.2 ผลของอุณหภูมิ

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 2 กลุ่ม การทดลอง กลุ่มแรกสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด กลุ่มที่สองสำหรับการชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงรวม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย 6 ชุดการทดลอง (ชุดทดลอง 3 ชุด และชุดควบคุม 3 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) โดยแต่ละชุดทดลองจะเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ อุณหภูมิต่ำ (24 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิปกติ (27 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) ชักนำให้ปลาในแต่ละชุดทดลองเกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงรวม ในแต่ละระดับอุณหภูมิจะมีชุดควบคุม บันทึกอัตราการตายของปลาในแต่ละวันจนครบ 14 วัน

6.3 ผลของความเค็มของน้ำ

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศจำนวน 8 ชุด

การทดลอง (ชุดทดลอง 4 ชุด และชุดควบคุม 4 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) โดยแต่ละชุดทดลองจะเลี้ยงปลาที่ความเค็มของน้ำแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 5, 10 และ 15 ppt ชักนำให้ปลาในแต่ละชุดทดลองเกิดการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงรวม ในแต่ละระดับความเค็มจะมีชุดควบคุม โดยที่ชุดควบคุมจะไม่มีการนำปลาที่ฉีดเชื้อเลี้ยงรวมกับปลาปกติ บันทึกอัตราการตายของปลาในแต่ละวัน เปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคเนื่องจากผลของความเค็มของน้ำที่แตกต่างกัน

7. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและระดับแอนติบอดี

เตรียมปลานิลแดงแปลงเพศโดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด การทดลอง (ชุดทดลอง 1 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว) ใส่ในตู้ทดลอง ปลาในชุดทดลองจะถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องส่วนชุดควบคุมฉีดน้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อเลี้ยงปลาต่อไปในตู้ทดลองเป็นเวลา 14 วัน แล้วทำการเก็บเลือดปลาทั้งหมดนำไปวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบเลือดต่างๆ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าองค์ประกอบเลือดระหว่างปลาที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อกับปลาปกติในชุดควบคุม ดังต่อไปนี้

7.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte counts)

ตามวิธีการของ Blaxhall และ Daisley (1973) โดยนำเลือดปลามาเจือจาง 100 เท่า หยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) นับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และรายงานผลในหน่วยเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (cells/mm³)

7.2 ค่าฮีมาโตคริต (Haematocrit, packed cell volume)

บรรจุเลือดปลาเข้าสู่หลอดฮีมาโตคริต (microhaematocrit tubes) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง microhaematocrit centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที วัดระดับของ packed cell volume เทียบกับปริมาณของเลือดทั้งหมด รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ (percent haematocrit)

7.3 ปริมาณฮีโมโกลบิน (Haemoglobin determination)

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินของเลือดปลาจะใช้วิธีการของ Larsen และ Snieszko (1961) คำนวณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในหน่วยกรัมต่อเดซิลิตร (g/dl) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของฮีโมโกลบินมาตรฐาน (human haemoglobin)

7.4 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (Serum protein)

นำเลือดปลาที่เจาะได้ ทั้งให้เกิดการแข็งตัว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของน้ำเลือด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (standard albumin)

7.5 การวัดระดับแอนติบอดี (Antibody titre)

โดยวิธี microtitration agglutination โดยสังเกตการกระจายของแบคทีเรียบริเวณกันหลุมที่เกิดจากการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างเชื้อกับแอนติบอดี หลุมที่ไม่มีแอนติบอดีจะสังเกตเห็นการตกตะกอนของแบคทีเรียคล้ายเม็ดทรายบริเวณกันหลุม ระดับของแอนติบอดีคำนวณได้จากค่าส่วนกลับของ dilution factor

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลองจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. สันฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* spp.

จากการศึกษาสันฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งแยกได้จากสมองปลานิล พบว่าเป็นแบคทีเรียที่เซลล์มีรูปร่างกลม (spherical) เรียงต่อกันเป็นสายสั้นๆ ติดสีน้ำเงิน (Gram's positive) มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลา

กะพงขาว (เฉลิมและคณะ, 2548) แต่แตกต่างกันที่คุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่ม beta-haemolytic streptococci ซึ่งสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่เชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลากระพงไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1

2. ปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (Median lethal dose, LD₅₀)

จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่งภายในระยะเวลา 14 วัน พบว่าปลาที่ได้รับการฉีดเชื้อ *Streptococcus* spp. แสดงอาการผิดปกติที่สามารถสังเกตได้ ได้แก่ สีตัวซีดลง ว่ายน้ำช้า ท้องบวม และตาโปน (ภาพที่ 1) มีการตายเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 14 วัน



ภาพที่ 1 อาการตาโปนและบุนขาว (A) สีตัวซีดลง และท้องบวม (B) ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp.

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้
เปรียบเทียบกับเชื้อ *Streptococcus* ชนิดอื่นๆ

Test	<i>S. spp.</i> Nile Tilapia (Present study)	<i>S. sp.</i> Sea bass (เฉลิมและคณะ, 2548)	<i>S. iniae</i> Tilapia hybrid (Perera <i>et al.</i> , 1994)	<i>S. agalactiae</i> Nile Tilapia (นเรศและคณะ, 2548)
Cell morphology	Spherical	Spherical	Spherical	Spherical
Gram's staining	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Haemolysis	<i>Beta</i>	<i>Gamma</i>	<i>Beta</i>	<i>Alpha</i>
Acetoin production (Voges-Proskauer)	+	-	ND	+
Hydrolysis (Hipuric acid)	-	-	-	+
Beta-glucosidase hydrolysis (Esculin)	+	+	ND	-
Pyrrolidonyl Arylamidase	-	+	ND	-
Alpha-Galactosidase	-	-	ND	+
Beta-Glucuronidase	-	-	ND	+
Beta-Galactosidase	-	-	ND	-
Alkaline Phosphatase	-	-	ND	+
Leucine Aminopeptidase	-	-	ND	+
Arginine Dihydrolase	+	+	+	+
Acidification (Ribose)	+	+	ND	+
Acidification (Arabinose)	-	-	-	-
Acidification (Mannitol)	-	+	+	-
Acidification (Sorbitol)	-	-	-	-
Acidification (Lactose)	-	-	-	-
Acidification (Trehalose)	-	+	-	+
Acidification (Inulin)	-	-	-	-
Acidification (Raffinose)	-	-	-	-
Acidification (Amidon)	-	ND	ND	-
Acidification (Glycogen)	-	-	ND	-

+ = positive

- = negative

ND = not determined

ของการทดลอง และสามารถแยกเชื้อ *Streptococcus* spp. ได้จากสมองของปลาตาย โดยที่อัตราการตายของปลาจะสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ฉีดเข้าตัวปลาและจากการคำนวณ พบว่าค่า LD₅₀ ที่ 14 วันของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เท่ากับ 6.0×10^6 cfu

ค่า LD₅₀ เป็นดัชนีที่ใช้ในการบ่งบอกความรุนแรงของเชื้อ ซึ่งจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติของเชื้อ ตลอดจนความสามารถในการยอมรับเชื้อ (susceptibility) ของสัตว์น้ำ มีรายงานความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* spp. ต่อปลากะพงขาวน้ำหนักประมาณ 4.97 กรัม (โดยวิธีการฉีด) มีค่า LD₅₀ ที่ 14 วันเท่ากับ 1.937×10^3 cfu/ml (เฉลิมและคณะ, 2548) หรือจากรายงานการศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ต่อปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักประมาณ 89.54 กรัม (โดยวิธีการฉีด) ที่พบว่าค่า LD₅₀ ที่ 10 วันสูงสุดเท่ากับ 36 cfu (นเรศและคณะ, 2548) สอดคล้องกับรายงานของ Rasheed and Plumb (1984) ที่พบว่าค่า LD₅₀ ที่ 7 วัน ของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ต่อปลา Gulf killifish (*Fundulus grandis*) เท่ากับ 75 cfu หรือจากการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล พบว่ามีค่า LD₅₀ ที่ 7 วัน เท่ากับ $1.9 \times 10^{3.3}$ cfu (Evans et al., 2002)

3. การศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยชักนำให้เกิดการติดเชื้อด้วยวิธีต่างๆ

จากการศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* spp. ในการก่อให้เกิดโรคในปลานิลผ่านช่องทางการติดเชื้อที่ต่างกัน พบว่าปลานิลที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องจะมีอัตราการตายสะสมภายใน 14 วัน สูงสุด (28.88%) รองลงมาเป็นวิธีการแช่ (13.33%) และการผสมอาหาร (6.67%) ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการตายของปลาทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อผ่านการฉีดเข้าช่องจมูก และการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วยเลย ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าช่องทางการได้รับเชื้อของปลาสัมพันธ์กับการ

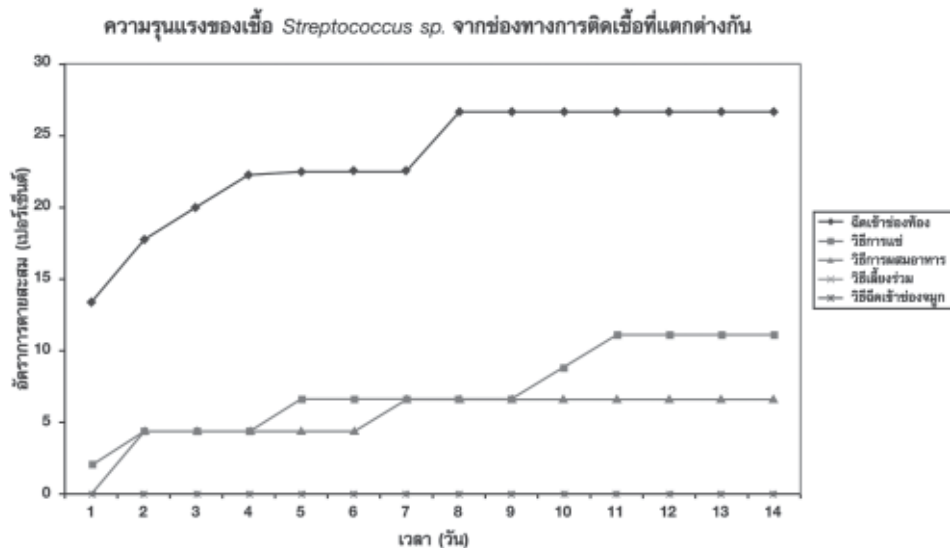
ยอมรับเชื้อและอัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp. อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) โดยเฉพาะการฉีดเข้าช่องท้อง ซึ่งเป็นช่องทางที่ปลามีโอกาสได้รับเชื้อในปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับช่องทางอื่นๆ แม้ว่าวิธีการนี้ไม่ได้เป็นช่องทางการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ผ่านน้ำ (waterborne transmission) ตามธรรมชาติ มีรายงานว่าเชื้อ *S. iniae* จากน้ำจะเข้าสู่ตัวปลาโดยผ่านทางเหงือก หรือช่องจมูก ก่อนที่จะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะอื่นๆ รวมถึงส่วนของสมอง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ *S. iniae* ภายในเนื้อเยื่อต่างๆ รวมถึงการแสดงอาการในปลายังขึ้นอยู่กับช่องทางการได้รับเชื้อด้วย (Evans et al., 2001; McNulty et al., 2003) และมีความเป็นไปได้ที่ช่องทางการติดเชื้อที่แตกต่างกัน หรือชนิดของเชื้อ *Streptococcus* ที่ต่างกันจะมีผลต่อเส้นทางการแพร่กระจายของเชื้อในตัวปลาด้วย

ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Perera และคณะ (1997) ที่พบว่าวิธีการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *S. iniae* โดยวิธีการเลี้ยงร่วม ไม่สามารถก่อให้เกิดการตายของปลานิลทดลองเลย แต่พบว่าการติดเชื้อ

ตารางที่ 2 อัตราการตายสะสมของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยชักนำให้เกิดการติดเชื้อด้วยวิธีต่างๆ

ช่องทางการติดเชื้อ	อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)
การเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย	0 ^a
การฉีดเข้าช่องจมูก	0 ^a
การผสมอาหาร	6.67 ± 0^b
วิธีการแช่	13.33 ± 0^c
การฉีดเข้าช่องท้อง	28.88 ± 7.69^d

Values (mean $\pm$ S.D) followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P \leq 0.05$



ภาพที่ 2 อัตราการตายสะสมเป็นเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. ผ่านช่องทางการติดเชื้อที่แตกต่างกัน

โดยผ่านการกิน (oral infection) หรือส่งผ่านทางเดินอาหารโดยตรงสามารถชักนำให้เกิดการตายในปลาทดลองได้ สอดคล้องกับรายงานของ Minami (1979) ที่พบว่า การได้กินปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp. เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Streptococcosis ในปลา yellow-tail (*Seriola quinqueradiata*) อย่างไรก็ตาม แม้จะสามารถสรุปได้ว่าความรุนแรงของการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิลแดงแปลงเพศสัมพันธ์โดยตรงกับช่องทางการติดเชื้อ แต่ก็ยังมีความหลากหลายและแตกต่างกันไปในแต่ละการทดลอง ซึ่งอาจจะเป็นผลจากปัจจัยอื่นๆ ดังนั้นในการศึกษาความรุนแรงของโรค Streptococcosis จึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงปัจจัยร่วมอื่นๆ ด้วย เช่น ชนิดของปลา ความหนาแน่นในการเลี้ยง ปริมาณเชื้อ ตลอดจนปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ

4. ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค Streptococcosis

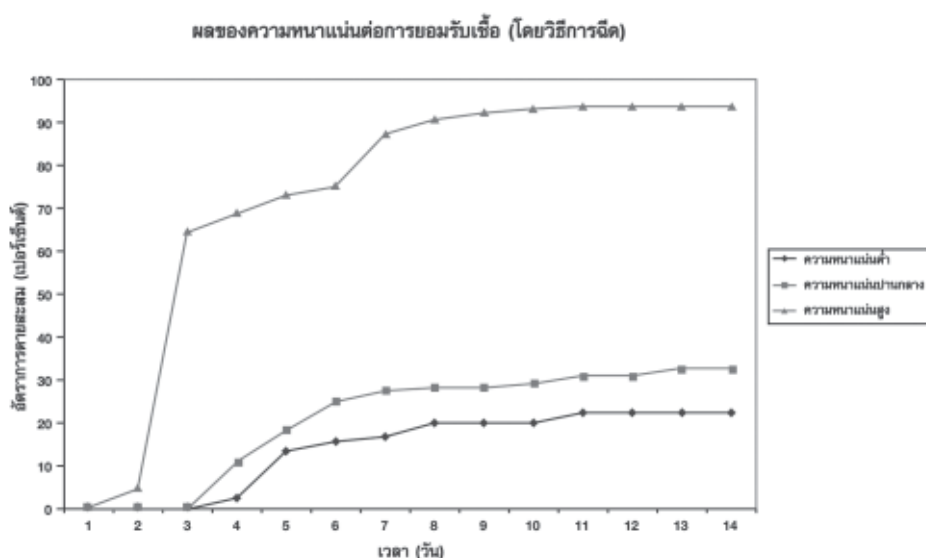
4.1 ความหนาแน่นของการเลี้ยง

จากการศึกษาผลของความหนาแน่นของการเลี้ยงที่แตกต่างกันสามระดับต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่า ภายใต้อาการเลี้ยงแบบหนาแน่นสูง (17 กรัม/ลิตร) ปลาจะมีอัตราการตายสะสมเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ภายในเวลา 14 วัน สูงกว่าที่ระดับความหนาแน่นปานกลาง (12 กรัม/ลิตร) และความหนาแน่นต่ำ (8 กรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อที่ระดับความหนาแน่นต่ำและความหนาแน่นปานกลาง ทั้งกลุ่มที่ถูกชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงร่วม อย่างไรก็ตาม พบว่าที่ความหนาแน่นของการเลี้ยงระดับเดียวกัน (ยกเว้นที่ระดับความหนาแน่นสูง) การชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดจะก่อให้เกิดอัตราการตายของปลาในระดับที่สูงกว่าวิธีการเลี้ยงร่วม (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3,4)

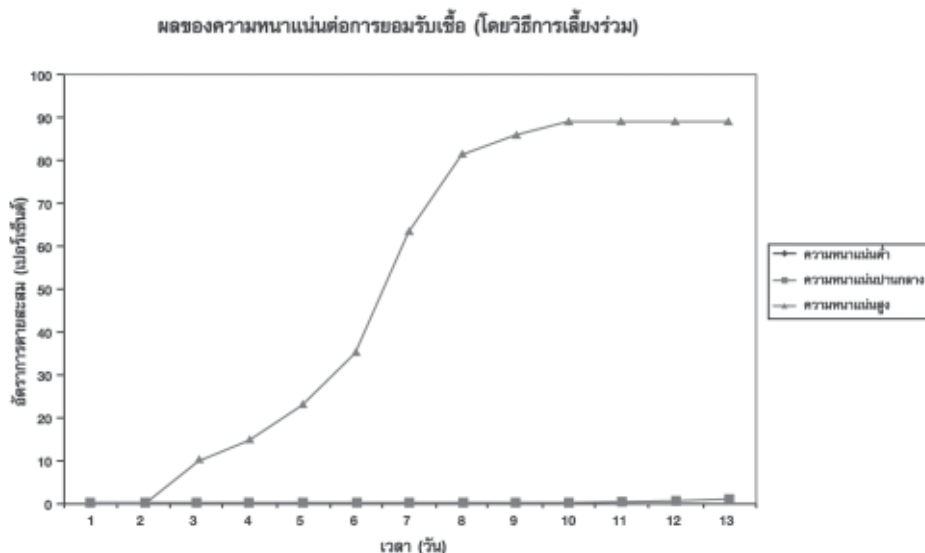
ตารางที่ 3 ผลของความหนาแน่นของการเลี้ยงต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ

ระดับความหนาแน่น	อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)	
	วิธีการฉีด	วิธีการเลี้ยงรวม
ความหนาแน่นต่ำ (8 กรัม/ลิตร)	22.23 ± 7.7 ^a	0 ^a
ความหนาแน่นปานกลาง (12 กรัม/ลิตร)	32.50 ± 3.8 ^a	1.8 ± 3.1 ^a
ความหนาแน่นสูง (17 กรัม/ลิตร)	93.63 ± 5.9 ^b	89.0 ± 7.8 ^b

Values (mean ± S.D) followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P \leq 0.05$



ภาพที่ 3 อัตราการตายสะสมเป็นเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยวิธีการฉีดที่ระดับความหนาแน่นของการเลี้ยงแตกต่างกัน



ภาพที่ 4 อัตราการตายสะสมเป็นเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย ที่ระดับความหนาแน่นของการเลี้ยงแตกต่างกัน

ผลจากการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าความหนาแน่นของการเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ ซึ่งจะสังเกตได้ว่าที่ระดับความหนาแน่นของการเลี้ยงปานกลาง การชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วยจะก่อให้เกิดอัตราการตายของปลาน้อยมาก (1.8%) เมื่อเทียบกับการชักนำการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด แต่เมื่อปลาอยู่ในสภาพความหนาแน่นของการเลี้ยงสูง อัตราการตายของปลากลุ่มที่เลี้ยงร่วม (cohabitation) กลับเพิ่มสูงขึ้นถึง 89% ในระดับที่ใกล้เคียงกับการตายของปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อ

สอดคล้องกับการศึกษาของ Shoemaker และคณะ (2000) ที่รายงานว่าความหนาแน่นของการเลี้ยงจะสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อ *Streptococcus iniae* โดยวิธีการแช่ (immersion) โดยที่อัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อที่ระดับความหนาแน่นต่ำ

(5.6 กรัม/ลิตร) เท่ากับ 4.8% ที่ระดับความหนาแน่นปานกลาง (11.2 กรัม/ลิตร) เท่ากับ 28.4% และที่ระดับความหนาแน่นสูง (22.4 กรัม/ลิตร) เท่ากับ 25.6% และสรุปว่าความหนาแน่นของการเลี้ยงตั้งแต่ 11.2 กรัม/ลิตร ขึ้นไป จะเพิ่มอัตราการตายของปลาเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus iniae*

แม้ว่าในสภาพการเลี้ยงปลานิลในบ่อจริงๆ จะเลี้ยงที่ระดับความหนาแน่นที่ค่อนข้างสูง ประมาณ 30 - 300 กรัม/ลิตร แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความหนาแน่นของการเลี้ยงที่ระดับตั้งแต่ 17 กรัม/ลิตร จะส่งผลให้ปลานิลแดงแปลงเพศสามารถยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. และมีอัตราการตายที่สูงขึ้นมาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้การลดความหนาแน่นของการเลี้ยงปลานิลเป็นมาตรการหนึ่งในการจัดการการเลี้ยงเพื่อลดการแพร่กระจายและการติดต่อของเชื้อ *Streptococcus* ในฟาร์มเลี้ยงปลานิลแบบพัฒนา (intensive farm) ได้

4.2 อุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่าภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) ปลานิลจะมีอัตราการตายสะสมเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ภายในเวลา 14 วัน สูงกว่าที่ระดับอุณหภูมิต่ำ (24 องศาเซลเซียส) หรืออุณหภูมิปกติ (27 องศาเซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งกลุ่มที่ถูกชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงร่วม โดยเฉพาะกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด พบว่าอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่าปกติ จะเป็นปัจจัยโน้มนำให้ปลาเกิดการติดเชื้อและมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยปลาจะมีอัตราการตายสูงถึง 100% และ 60% ตามลำดับ ในขณะที่ผลของอุณหภูมิของน้ำที่ต่ำกว่าปกติ ไม่มีอิทธิพลต่อการยอมรับเชื้อของปลานิลกลุ่มที่ติดเชื้อจากการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย เมื่อเทียบกับผลจากอุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้น (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5,6)

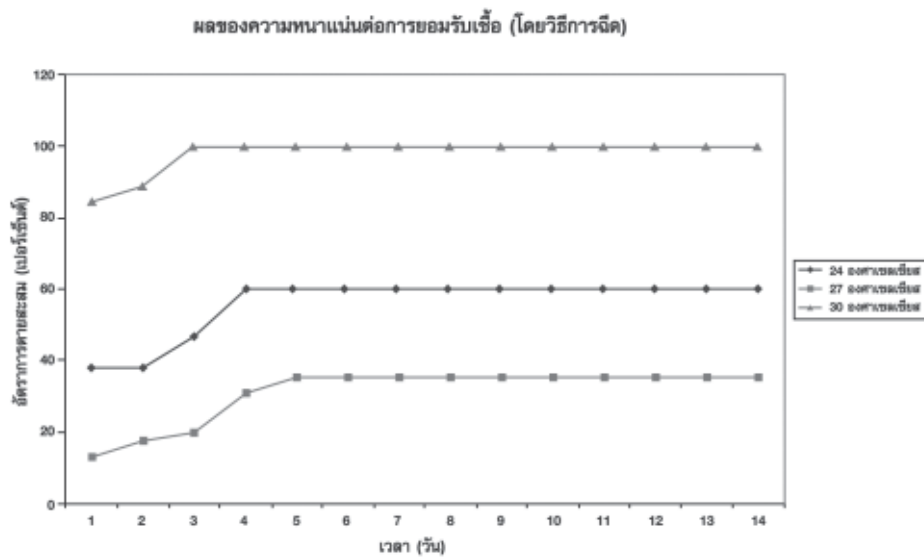
ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chang and

Plumb (1996) ที่พบว่าปลานิล (*O. niloticus*) ที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) จะมีอัตราการตายสูงกว่าปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า (25 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิจะมีผลโดยตรงต่อการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของปลา โดยทั่วไปอุณหภูมิที่สูงขึ้น แต่ยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม (physiological range) ต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำแต่ละชนิด จะกระตุ้นให้การตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว และในระดับที่สูง ในขณะที่อุณหภูมิต่ำจะกีดการทำงานของ T helper cell ของปลา ทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง แต่ผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาจะขึ้นกับชนิดของปลาด้วย เช่น พบว่าภูมิคุ้มกันของปลา carp ซึ่งอยู่ในเขตอบอุ่นจะถูกกดเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่ปลาที่อยู่ในเขตหนาว การกดภูมิคุ้มกันจะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส (Bly and Clem, 1992; Roberts, 2001) กลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาที่เปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิจะมีผลต่อความสามารถในการยอมรับเชื้อ (susceptibility) ของปลาโดยตรง

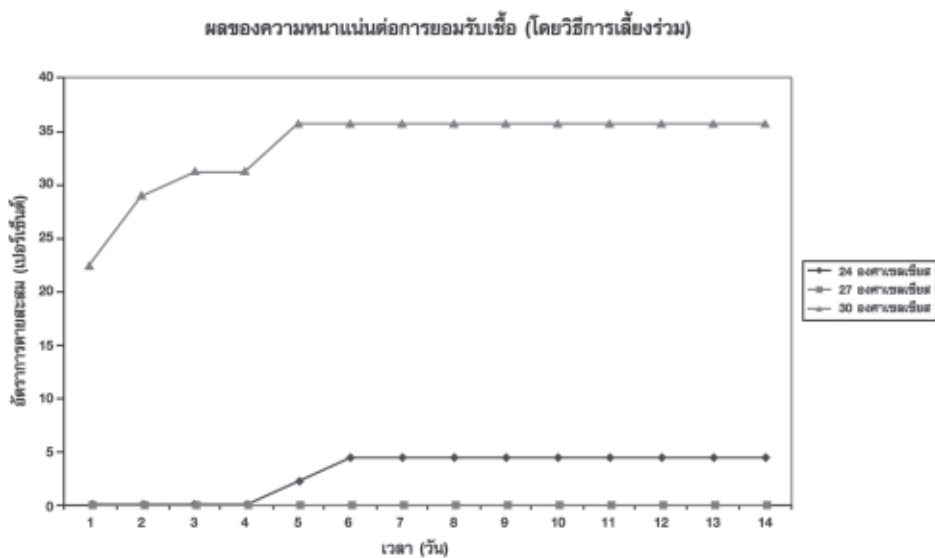
ตารางที่ 4 ผลของอุณหภูมิของน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ

อุณหภูมิ	อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)	
	วิธีการฉีด	วิธีการเลี้ยงร่วม
อุณหภูมิต่ำ (24 องศาเซลเซียส)	60.00 ± 13.33 ^a	4.45 ± 3.85 ^a
อุณหภูมิปกติ (27 องศาเซลเซียส)	33.33 ± 17.66 ^b	0.0 ± 0.0 ^a
อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส)	100 ± 0.0 ^c	35.53 ± 16.78 ^b

Values (mean ± S.D) followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P \leq 0.05$



ภาพที่ 5 อัตราการตายสะสมเป็นเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยวิธีการฉีดที่ระดับอุณหภูมิของน้ำแตกต่างกัน



ภาพที่ 6 อัตราการตายสะสมเป็นเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วยที่ระดับอุณหภูมิของน้ำแตกต่างกัน

อุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการกำหนดจากช่วงของอุณหภูมิปกติในสภาพจริงของการเลี้ยงปลาที่ผันแปรไปตามสภาพอากาศหรือฤดูกาล เช่น ในช่วงกลางวัน หรือกลางคืน หรือวันที่มีฝนตก เป็นต้น ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความรุนแรงของโรค Streptococcosis นี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการระบบการเลี้ยงเพื่อป้องกันการระบาดของโรค โดยเฉพาะในช่วงเปลี่ยนฤดูกาลที่อุณหภูมิของน้ำมักจะเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้าง

4.3 ความเค็ม

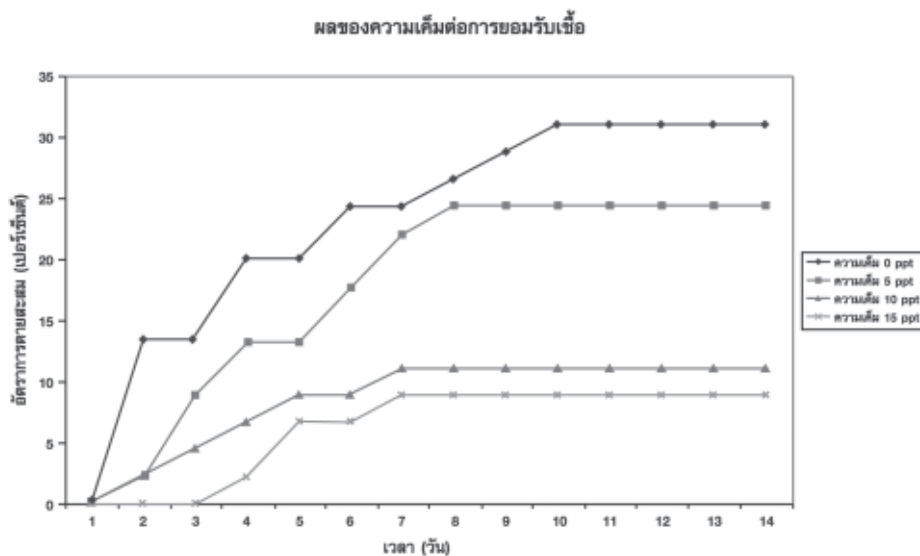
จากการศึกษาผลของความเค็มของน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศพบว่าภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ความเค็มสูง (10 และ 15 ppt) ปลานิลจะมีอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ภายในเวลา 14 วัน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ (0 และ 10 ppt) ในขณะที่อัตราการตายของปลาที่

ติดเชื้อที่ระดับความเค็มที่ 0 และ 5 ppt (31.10% และ 24.50%) หรือที่ 10 และ 15 ppt (11.13% และ 8.90%) ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 5 และภาพที่ 7) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Chang and Plumb (1996)

ตารางที่ 5 ผลของความเค็มของน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ

ระดับความเค็มของน้ำ	อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)
0 ppt	31.10 ± 16.81 ^a
5 ppt	24.50 ± 3.87 ^a
10 ppt	11.13 ± 7.68 ^b
15 ppt	8.90 ± 3.81 ^b

Values (mean ± S.D) followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P \leq 0.05$



ภาพที่ 7 อัตราการตายสะสมเป็นเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ระดับความเค็มของน้ำแตกต่างกัน

ที่รายงานว่าปลานิล (*O. niloticus*) ที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 30 ppt จะมีอัตราการตายสูงกว่าปลาที่เลี้ยงที่ความเค็ม 0 และ 15 ppt ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างของอัตราการตายของปลาที่ความเค็ม 0 และ 15 ppt ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่แม้ว่าปลานิลเป็นปลาที่สามารถทนต่อความเค็มได้ในช่วงกว้าง แต่ที่ระดับความเค็ม 30 ppt อาจเป็นระดับความเค็มที่อยู่นอกช่วงที่เหมาะสม ต่อการดำรงชีวิตของปลานิล ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลไม่สามารถต้านทานต่อการติดเชื้อได้ ในขณะที่ระดับความเค็มต่ำ (10 และ 15 ppt) สามารถช่วยลดอัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีความเค็ม ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคลงไปด้วย

ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการระบบการเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศได้โดยอาจเลี้ยงปลานิลในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10 และ 15 ppt เพื่อป้องกันการเกิดโรคและลดความสูญเสียที่อาจจะเกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp.

5. องค์ประกอบเลือดและระดับแอนติบอดีของปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp.

จากการศึกษาผลของการติดเชื้อ *Streptococcus*

spp. ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดในปลานิลแดงแปลงเพศ โดยการฉีดสารละลายเชื้อความเข้มข้น 6×10^6 cfu เข้าบริเวณช่องท้อง พบว่าภายในเวลา 14 วัน ปลาที่ได้รับเชื้อมีการแสดงอาการของโรค เช่น สีตัวซีดลง ท้องบวม ตาโปน แต่มีอัตราการตายค่อนข้างต่ำ หลังจากการเก็บเลือดในวันที่ 14 ของการติดเชื้อและนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด พบว่าปลาที่ติดเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดที่ตรวจสอบ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณฮีโมโกลบิน และโปรตีนในน้ำเลือด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 6) เป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดอาจสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ เนื่องจาก *Streptococcus* spp. ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความรุนแรงน้อย และก่อให้เกิดอัตราการตายในปลาที่ติดเชื้อค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นลักษณะของการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) ปลาจึงสามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อได้ดี และองค์ประกอบเลือดที่อาจเปลี่ยนแปลงเนื่องมาจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ในระยะแรกๆ สามารถกลับคืนสู่ภาวะปกติได้หลังวันที่ 14 สอดคล้องกับรายงานของ เกลิมและคณะ (2548) ที่ศึกษาในปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่พบว่าค่าองค์ประกอบเลือด เช่น ปริมาณเม็ดเลือด ค่า

ตารางที่ 6 ค่าองค์ประกอบเลือดและระดับแอนติบอดีของปลานิลแดงแปลงเพศปกติเปรียบเทียบกับปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp.

ค่าองค์ประกอบเลือด	ปลากลุ่มควบคุม	ปลากลุ่มติดเชื้อ
ปริมาณเม็ดเลือดแดง (10^6 cells/mm ³)	1.11 ± 0.43^a	1.22 ± 0.56^a
เปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต	25.20 ± 4.89^a	26.30 ± 5.77^a
ปริมาณฮีโมโกลบิน (g/dl)	4.96 ± 1.18^a	4.89 ± 1.11^a
โปรตีนในน้ำเลือด (μg/ml)	44.23 ± 6.61^a	45.71 ± 9.09^a
ระดับแอนติบอดี (Antibody titre)	2.40 ± 0.50^a	15.33 ± 2.46^b

Values (mean $\pm$ S.D) followed by the same letter in a row do not differ significantly at $P \leq 0.05$

สีมาโตคริต สีโมโกลบิน หรือซีรัมโปรตีนของปลา
กะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. ซึ่งมีค่า LD₅₀
เท่ากับ 1.937×10^3 cfu/ml จะลดต่ำลงเมื่อเทียบกับ
ปลาปกติ ตามระยะเวลาของการติดเชื้อ แต่มีแนวโน้ม
กลับคืนสู่ระดับปกติในวันที่ 14 ของการติดเชื้อ ผลการ
ศึกษาในลักษณะเดียวกันยังมีรายงานในปลาสลิหิน
(*Siganus canaliculatus*) โดย Foo และคณะ (1985)
ในขณะที่พบว่าค่าองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดง
แปลงเพศที่ล้มตายจากการติดเชื้อ *Streptococcus*
agalactiae ที่มีความรุนแรงสูง (LD₅₀ เท่ากับ 3.60×10^1
cfu/ml) จะลดลงกว่า 50% เมื่อเทียบกับปลาในกลุ่ม
ควบคุม ในวันที่ 14 ของการติดเชื้อ และไม่มีแนวโน้ม
กลับคืนสู่ระดับปกติ (เนเรศ และคณะ, 2548) จึงมีความ
เป็นไปได้ที่ความรุนแรงของเชื้ออาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มี
ผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด

นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าปลานิลแดงแปลง
เพศที่รอดตายจากการติดเชื้อมีระดับของแอนติบอดีต่อเชื้อ
Streptococcus spp. สูงถึง 15.33 หน่วย เมื่อเทียบกับ
ปลาในกลุ่มควบคุม (2.40 หน่วย) ซึ่งแอนติบอดีที่
จำเพาะต่อเชื้อในระดับนี้สามารถป้องกันปลาจากการติดเชื้อ
Streptococcus spp. ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ
Eldar และคณะ (1997) ที่รายงานว่าปลา rainbow trout
ที่ได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus iniae* จะมีระดับ
ของแอนติบอดี (antibody titre) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกัน
ป้องกันการติดเชื้อ (protective immune response) สูง
ถึง 30 หน่วย ผลของระดับแอนติบอดีที่เพิ่มสูงขึ้นใน
กลุ่มปลาที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* spp. จากการศึกษา
ครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้วัคซีนของเชื้อ
Streptococcus spp. กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีใน
ปลานิลแดงแปลงเพศเพื่อป้องกันความสูญเสียเนื่องจาก
โรค Streptococcosis มีรายงานการพัฒนาวัคซีนของ
เชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลานิล พบว่าปลาที่ได้รับ
วัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้อง จะมีอัตราการรอดหลังจาก
ชักนำให้มีการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* สูงถึง 93.7%
(Klesius et al., 2000)

สรุปผลการศึกษา

1. เชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ใช้ในการศึกษา
ครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่ม beta-haemolytic streptococci
ความรุนแรงของเชื้อต่อปลานิลแดงแปลงเพศซึ่งวัดจากค่า
LD₅₀ ที่ 14 วัน เท่ากับ 6.0×10^6 cfu การยอมรับเชื้อ
Streptococcus spp. ของปลานิลแดงแปลงเพศ และ
ความรุนแรงของการเกิดโรคจะสัมพันธ์กับช่องทางการได้
รับเชื้อโดยตรง โดยพบว่าวิธีการฉีดเชื้อเข้าตัวปลาจะเป็น
สาเหตุของอัตราการตายของปลาทดลองในระดับสูงสุดเมื่อ
เปรียบเทียบกับช่องทางอื่นๆ เช่น วิธีการแช่ การผสม
อาหาร หรือการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย

2. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะคุณภาพน้ำ ได้แก่
ความหนาแน่น (ที่ระดับ 17 กรัมต่อลิตร ขึ้นไป) อุณหภูมิ
(สูงหรือต่ำกว่า 27 องศาเซลเซียส) และความเค็มของน้ำ
มีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus*
spp. ของปลานิลแดงแปลงเพศ โดยเฉพาะเมื่อมีการ
เปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำไปจากสภาวะปกติ เช่น ความ
หนาแน่นสูง อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าปกติ ส่งผลให้ปลา
มีอัตราการตายจากการติดเชื้อสูงขึ้น พบว่าในสภาวะปกติ
การเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย จะเป็นช่องทางการติดเชื้อที่มี
ผลต่อการเกิดโรคในปลานิลต่ำสุด แต่เมื่อสภาพแวดล้อม
เปลี่ยนแปลงไป จะส่งผลให้ปลามีอัตราการตายเนื่องจากการ
ติดเชื้อผ่านการเลี้ยงร่วมสูงมากขึ้น ซึ่งสะท้อนให้เห็น
ถึงความสำคัญของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการ
ยอมรับเชื้อและการเกิดโรค Streptococcosis นอกจากนี้
การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ โดย
เฉพาะความเค็มของน้ำที่เพิ่มขึ้น (10 และ 15 ppt) สามารถ
ช่วยลดความสูญเสียจากการเกิดโรค Streptococcosis
ในปลานิลได้เป็นอย่างดี ซึ่งสามารถนำไปเป็นแนวทางใน
การป้องกันการเกิดโรคนี้ได้ในระบบการเลี้ยง

3. เชื้อ *Streptococcus* spp. ไม่มีผลต่อการ
เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดที่ตรวจสอบ ได้แก่ ปริมาณ
เม็ดเลือดแดง ค่าสีมาโตคริต ปริมาณสีโมโกลบิน หรือ
โปรตีนในน้ำเลือด ของปลานิลแดงแปลงเพศในวันที่ 14
ของการติดเชื้อ มีความเป็นไปได้ว่าที่เวลาดังกล่าวอาจ

เป็นช่วงที่การเปลี่ยนแปลงของค่าองค์ประกอบเลือดต่างๆ ได้กลับคืนสู่สภาวะปกติแล้ว และความรุนแรงของเชื้อ อาจสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่รอดตายจากการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ยังมีระดับของแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วยเมื่อเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม

เอกสารอ้างอิง

- เฉลิม หวันหมาน, ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง และกิจการ สุภมาตย์. 2548. โรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). ว. สงขลานครินทร์ วทท. (ฉบับพิเศษ 1): วาริชศาสตร์ 27, 291-305.
- นเรศ ช้วนยุค, หิรัญ กังแฮ, เรวดีร คงประดิษฐ์ และกิจการ สุภมาตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ว. สงขลานครินทร์ วทท. (ฉบับพิเศษ 1): วาริชศาสตร์ 27, 307-319.
- Blaxhall, P. C. and Daisley, K. W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5, 771-781.
- Bly, J. E. and Clem, L. W. 1992. Temperature and teleost immune functions. Fish Shellfish Immunol. 2, 159-171.
- Bromage, E. S. and Owens, L. 2002. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. Dis. Aquat. Org. 52, 199-205.
- Chang, P. H. and Plumb, J. A. 1996. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Applied Aquaculture 6, 39-45.
- Eldar, A., Horovitz, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Vet. Immunol. Immunopathol. 56, 175-183.
- Evans, J. J., Klesius, P. H., Gilbert, P. M., Shoemaker, C. A., Al Sarawi M. A., Landsberg, J., Duremdez, R. Al Marzouk, A. and Al Zenki, S. 2002. Characterization of Beta-hemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. J. Fish Dis. 25, 505-513.
- Evans, J. J., Shoemaker, C. A. and Klesius, P. H. 2001. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid stripe bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) following nare inoculation. Aquacult. 233-243.
- Foo, J. T. W., Ho, B. and Lam, T. J. 1985. Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. Aquaculture 49, 185-195.
- 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 (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 188, 237-246.
- Larsen, H. N. and Snieszko, S. F. 1961. Comparison of various methods of determination of haemoglobin in trout blood. Progve Fish Cult. 23, 8-17.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- McNulty, S. T., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Evans, J. J. 2003. *Streptococcus iniae*

- infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. Aquaculture 220, 165-173.
- Minami, T. 1979. *Streptococcus* sp. pathogenic to cultured yellowtail, isolated from fishes for diets. Fish Pathol. 14, 15-19.
- Perera, R. P. Collins, M. D., Johnson, S. K. and Lewis, D. H. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea*. J. Aquat. Anim. Health 6, 335-340.
- Perera, R. P., Johnson, S. K. and Lewis, D. H., 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. Aquaculture 152, 25-33.
- Rasheed, V. and Plumb, J. 1984. Pathogenicity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). Aquaculture 37, 97-105.
- Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Am. J. Hyg. 27, 493-497.
- Roberts, R. J. 2001. Fish Pathology. London, W. B. Saunders. 472 pp.
- 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.