รายงานการวิจัย

การติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของ Tilapia lake virus (TiLV) และเชื้อแบคทีเรีย
ก่อโรคสำคัญในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Nature co-infection of Tilapia lake virus (TiLV) and major
pathogenic bacteria in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

อุมาพร ขิมมากทอง Umaporn Khimmakthong
สุไหลหมาน หมาดโหยด Sulaiman Madyod

คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562

การติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของ Tilapia lake virus (TiLV) และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

อุมาพร ขิมมากทอง, สุไหลหมาน หมาดโหยด

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช
133 หมู่ 5 ต.ทุ่งใหญ่ อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช 80240

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส TiLV และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญ 3 ชนิด ในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำตาปี โดยในการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างปลานิลที่คาดว่าติดเชื้อไวรัส TiLV จากกระชังปลานิลในแม่น้ำตาปีที่เคยมีประวัติตรวจพบเชื้อ TiLV จากนั้นนำปลานิลไปพิสูจน์ว่ามีการติดเชื้อไวรัส TiLV จริงด้วยวิธี Nested RT-PCR แล้วจึงนำเฉพาะปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV จริงไปตรวจสอบการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธีพีซีอาร์ จากการทดลองพบว่า มีปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV 10 ตัว จากตัวอย่างทั้งหมด 22 ตัว และเมื่อนำทั้ง 10 ตัว ไปตรวจสอบหาเชื้อ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ในไต พบว่า มีการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส TiLV และเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* 1 ตัว คิดเป็น 10% และมีการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส TiLV และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* อีก 2 ตัว คิดเป็น 20%

คำสำคัญ: แบคทีเรีย การติดเชื้อร่วม ปลานิล ทีไอแอลวี

Nature co-infection of Tilapia lake virus (TiLV) and major pathogenic bacteria in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Umaporn Khimmakthong, Sulaiman Madyod

Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thungyai sub-district, Thungyai district, Nakhon Si Thammarat province, 80240, Thailand

Abstract

The purpose of this research is to study the natural co-infection of TiLV virus and 3 important pathogenic bacteria in Nile tilapia raised in floating cages in Tapi River. In the experiment, the samples of Nile tilapia that are expected to be infected with the TiLV virus from the tilapia cage in the Tapi River that had a history of TiLV infection were collected. Nile tilapia was tested for true TiLV infection by Nested RT-PCR. Then, only the Nile tilapia infected TiLV virus was examined in co-infection with 3 pathogenic bacteria, *S. agalactiae*, *A. hydrophila* and *F. columnare* by PCR. The experiment found that from all 22 samples, there were 10 Nile tilapia that infected with TiLV virus. When all 10 infected Nile tilapia were examined for *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, and *F. columnare* infection in the kidneys. It was found that 1 fish have the natural co-infection of TiLV viruses and the bacteria *A. hydrophila*, equivalent to 10%. And 2 fish have a natural co-infection of TiLV viruses and other bacteria that not *S. agalactiae*, *A. hydrophila* and *F. columnare*, equivalent to 20%.

Keywords: bacteria, co-infection, Nile tilapia, TiLV

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้ หากไม่ได้การสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอขอบคุณนางสาวสุภาพร หนูชู นักวิทยาศาสตร์ที่ช่วยผู้วิจัยในบางส่วนของผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในกระชัง แถบแม่น้ำตาปี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างมาทำวิจัยในครั้งนี้

นอกจากนี้ ขอขอบพระคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่อนุเคราะห์เครื่องมือวิจัย และห้องปฏิบัติการในการใช้ทำวิจัย โดยห้องปฏิบัติการที่ผู้วิจัยใช้ในการทำวิจัยคือ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์ และเครื่องมือวิจัย ณ ศูนย์วิจัยสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จนงานวิจัยประสบผลสำเร็จ

อุมาพร ขิมมากทอง

มีนาคม 2563

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญภาพ	v
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
วิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลและการอภิปรายผล	11
สรุปผลการวิจัย	17
เอกสารอ้างอิง	18

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ปลานิล *Oreochromis niloticus*	3
2	ลักษณะภายนอกของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* (a) ตาขุ่นมัว (b) บาดแผลที่ผิวหนัง (c) การตกเลือดบนผิวหนัง (d) เกล็ดหลุดร่อน	6
3	ลูกปลานิลหางกร่อนจากการติดเชื้อแบคทีเรียฟลาโวแบคทีเรียม	6
4	ปลานิลมีตาโปนขุ่นขาว เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส	7
5	ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิล 22 ตัว ด้วยวิธี Nested RT-PCR	11
6	ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิล 6 ตัว ด้วยวิธี Nested RT-PCR	11
7	ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18s rRNA ในดีเอ็นเอของปลานิล 22 ตัว ด้วยวิธี PCR	12
8	ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากเหงือกและไตของปลานิล 6 ตัว ด้วยวิธี PCR	13
9	ผลการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากเหงือกและไตของปลานิล 6 ตัว ด้วยวิธี PCR	14
10	ผลการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ในไตของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV ด้วยวิธี PCR	15

บทนำ

ปลานิลเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย (กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2560) ในช่วงเดือน ม.ค.-ต.ค. ปี 2559 ไทยส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับปลานิลสูงถึง 6,903.4 ตัน คิดเป็นมูลค่า 518.6 ล้านบาท ซึ่งปริมาณลดลงกว่าช่วงเดียวกันของปีก่อนถึง 16.2 เปอร์เซ็นต์ (เกวลิน, 2559) หนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปริมาณของปลานิลลดลงคือการเกิดโรคระบาด Tilapia lake virus (TiLV) เป็นเชื้อไวรัสที่อยู่ในตระกูล Orthomyxovirus โดยมีรายงานการระบาดของ TiLV ในปลานิลครั้งแรกในประเทศอิสราเอล เอกวาดอร์ โคลัมเบีย และอียิปต์ ในปี 2014 (Ferguson et al., 2014; Eyngor et al., 2014) และเริ่มมีรายงานการแพร่ระบาดของ TiLV ในประเทศไทยครั้งแรกในปี 2015 โดยพบในฟาร์มพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันตก ตะวันออก และตะวันออกเฉียงเหนือของไทย อัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อสูงถึง 90% (Surachetpong et al., 2017) สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรและประเทศไทยเป็นอย่างมาก

อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อไวรัสหลายชนิด มักเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตร่วมด้วย จึงทำให้ปลาที่ป่วยมีอัตราการตายสูง แบคทีเรียก่อโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายอย่างมากให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิล ได้แก่ *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* นอกจากนี้การติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ยังทำให้ปลามีลักษณะอาการภายนอกคล้ายกันกับการติดเชื้อ TiLV การตรวจสอบพบว่าปลามีการติดเชื้อ TiLV ไม่ได้หมายความว่าการตายที่เกิดขึ้นมาจากไวรัสเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากการติดเชื้อร่วมกันกับแบคทีเรียอีกหนึ่งชนิด หรือมากกว่าหนึ่งชนิดในเวลาเดียวกัน ส่งผลให้สุดท้ายอัตราการตายของปลาสูงมาก

งานวิจัยชิ้นนี้จะทำการศึกษาการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของไวรัส TiLV และแบคทีเรียสำคัญอีก 3 ชนิด คือ *S. agalactia*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ในปลานิล โดยจะทำการเก็บตัวอย่างปลานิลที่คาดว่าติดเชื้อ TiLVจากกระชังปลานิลในแม่น้ำตาปีที่เคยมีประวัติตรวจพบเชื้อ TiLV จากนั้นนำปลาที่พิสูจน์แล้วว่ามีการติดเชื้อ TiLV จริงไปตรวจสอบการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดข้างต้นด้วยวิธีพีซีอาร์ งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลที่จะได้ทราบถึงสาเหตุการตายที่แท้จริงเพื่อนำไปสู่การหาแนวทางในการแก้ไขที่ถูกต้องและทันท่วงที

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส TiLV และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญ 3 ชนิด ในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำตาปี

การตรวจเอกสาร

ปลานิล

ปลานิล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Linn.) มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาลและมีลาดพาดขวาง 9-10 แถบ ครีบหลัง ครีบก้นและครีบหางมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวาง ครีบหลังมีอันเดียวประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน บนแถบเส้นข้างลำตัวมีเกล็ด 33 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงแนวส่วนหน้าของครีบก้น 13 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่ 1 จุด ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี มีอุปนิสัยกินอาหารทั้งพืชและสัตว์ สามารถกินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ ซากอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เน่าเปื่อย รวมทั้งจุลินทรีย์และพืชน้ำต่างๆ เป็นปลาที่กินอาหารในเวลากลางวันและหยุดกินอาหารในเวลากลางคืน กินอาหารได้ทั้งที่ผิวน้ำ กลางน้ำ และก้นบ่อ (กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2560)

รูปที่ 1 ปลานิล *Oreochromis niloticus* (Hauser-Davis et al., 2015)

ปลานิลเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย ประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลานิลเพียงร้อยละ 5 ของผลผลิตปลานิลทั้งหมด ฉะนั้นการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจากตลาดปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในเดือน ต.ค. 59 ไทยส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ 604.7 ตัน มูลค่า 41.7 ล้านบาท ทั้งปริมาณและมูลค่าลดลง -1.2% และ -4.3% ตามลาดับ เมื่อเทียบกับเดือนก่อน ในช่วง ม.ค.-ต.ค. 59 ไทยส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ 6,903.4 ตัน มูลค่า 518.6 ล้านบาท ทั้งปริมาณและมูลค่าลดลง -16.2% และ -13.6% ตามลาดับ เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันปีก่อน โดยมีรูปแบบจากสัดส่วนมูลค่าการส่งออก คือ ปลาทั้งตัวแช่แข็ง 61.0% เนื้อปลาแช่แข็ง 36.9% ปลามีชีวิตและพันธุ์ปลา 1.1% เนื้อปลาแช่

เย็น 0.7% และปลานิลสดแช่เย็น 0.3% ส่งออกไปยังตลาดสหรัฐฯ 39.2% กลุ่มตะวันออกกลาง 29.0% กลุ่มยุโรป 16.7% แคนาดา 5.0% กลุ่มแอฟริกา 3.2% กลุ่มอาเซียน 2.6% เกาหลีใต้2.0% และประเทศอื่นๆ 2.3% (เกวลิน, 2559)

Tilapia lake virus (TiLV)

Tilapia lake virus disease (TiLVD) เป็นโรคไวรัสที่เกิดขึ้นใหม่ในปลานิลระบุว่าเป็นไวรัส Orthomyxo-like (RNA) virus ชนิดใหม่ที่ชื่อว่า Tilapia lake virus (TiLV) มีการบันทึกการเกิดโรคอย่างเป็นทางการเมื่อเร็วๆ นี้ในเอกวาดอร์และอิสราเอลในปี พ.ศ. 2556 และ 2557 (Ferguson et al., 2014) ไวรัสดังกล่าวทำให้เกิดการตายเป็นจำนวนมากในปลานิลที่เลี้ยงในประเทศอิสราเอลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552 (Eyngor et al., 2014) และต่อมาพบมีการติดเชื้อในประเทศโคลัมเบีย (Tsofack et al., 2017) และ Egypt (Fathi et al., 2017) และล่าสุดจากประเทศไทย (Dong et al., 2017; Surachetpong et al., 2017) การระบาดของโรคส่งผลให้อัตราการตายเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 9.2 ถึง 90% โดยในลูกปลานิลและปลาวัยรุ่นจะมีโอกาสเกิดการอ่อนแอกว่าปลาที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งแตกต่างจากโรคไวรัสชนิดอื่นๆ ไวรัส TiLV ยังมีการแพร่ระบาดอยู่ในหลายประเทศซึ่งยังไม่มีการรายงาน

รายชื่อประเทศที่มีความเสี่ยงสูงในการแพร่ระบาดของไวรัส TiLV คือ แอลจีเรีย บาห์เรน บังคลาเทศ เบลเยียม บุรุนดี แคนาดา จีน คองโก เอลซัลวาดอร์ เยอรมนี กัวเตมาลา อินเดีย อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น จอร์แดน ลาว มาเลเซีย เม็กซิโก โมซัมบิก พม่า เนปาล ไนจีเรีย ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ โรมาเนีย รวันดา ซาอุดิอาระเบีย สิงคโปร์ แอฟริกาใต้ ศรีลังกา สวิสเซอร์แลนด์ แทนซาเนีย โตโก ตูนิเซีย ตุรกี เติร์กเมนิสถาน ยูกันดา ยูเครน สหอาหรับเอมิเรต สหราชอาณาจักร สหรัฐ เวียดนาม และแซมเบีย (Asia Regional Aquatic Animal Health Programme, 2017)

เมื่อเร็วๆ นี้มีการรายงานการให้มีการเฝ้าระวังของไวรัส TiLV ในประเทศไทย และได้มีการพัฒนาการตรวจสอบด้วยวิธี semi-Nested RT-PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบและได้ผลอย่างรวดเร็ว (Dong et al. 2017) นอกจากนี้กลุ่มตัวอย่างที่เก็บสะสมจากการระบาดของโรคในโรงเพาะฟักหลายแห่งในประเทศไทย ในช่วงปี พ.ศ. 2555-2557 ยังได้รับการทดสอบพบว่าให้ผลเป็นบวกของไวรัส TiLV (ข้อมูลที่ไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการพบของไวรัส TiLV ในประเทศไทยมีมาก่อนที่ไวรัสจะกลายเป็นที่รู้จักในปี 2556 ส่วนสาเหตุการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด

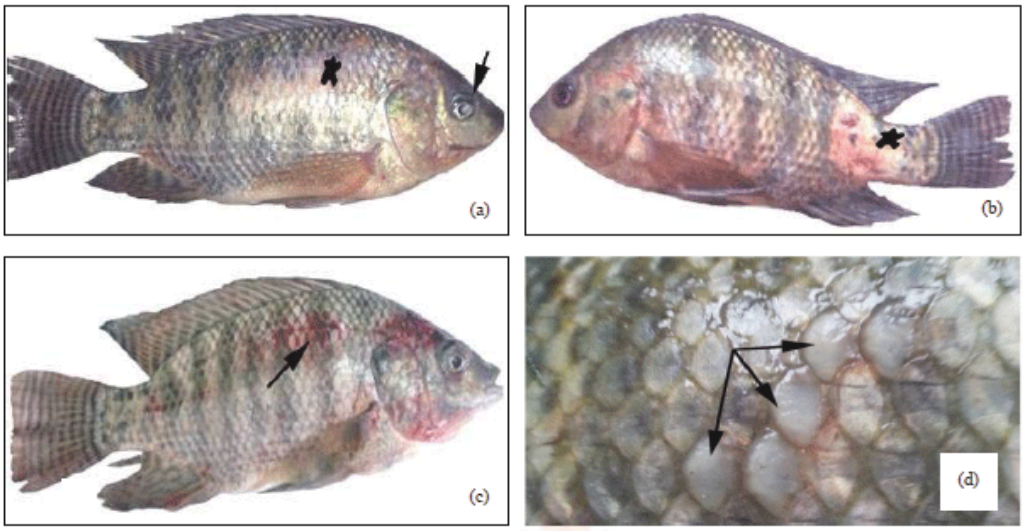
Surachetpong และคณะ (2017) ได้ทำการตรวจสอบการระบาดของโรคในปลานิลดำและปลานิลแดง ที่ตายโดยไม่ทราบสาเหตุ จำนวน 32 ฟาร์มในช่วง ปี 2015-2016 (แต่ละฟาร์มมีอัตราการตายมากกว่า 1 %) ในภาคกลาง ภาคตะวันตก และตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เป็นปลาที่ตายหลังจากลงเลี้ยงในกระชังแล้ว 1 เดือน มีขนาดตั้งแต่ 1-50 กรัม มีอัตราการตายที่ 20-90% และการตายจะมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแทรกซ้อนของแบคทีเรียและปรสิต มีอัตราการตายสูงสุดภายใน 14 วัน หลังจากพบปลาตายครั้งแรก และจากการนำตัวอย่างสมองของปลาที่ตายไปตรวจสอบหาสาเหตุการติดเชื้อไวรัส TiLV พบว่าให้ผลเป็นบวกของการติดเชื้อ TiLV จากวิธีการทางพีซีอาร์ จำนวน 6 ยีน (โดยใช้ไพรเมอร์

ที่ผ่านการออกแบบจากฐานข้อมูลใน genebank: accession no. KX631921–36) และจากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อจากประเทศไทยกับประเทศอิสราเอล พบว่าองค์ประกอบทางพันธุกรรมของไวรัส TiLV ตัวใหม่ที่เกิดในประเทศไทยนี้คล้ายคลึงกับยีนของ orthomyxoviruses ที่ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ และเป็นไวรัสกลุ่มอาร์เอ็นเอไวรัส ซึ่งจากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าไวรัสที่แยกได้จากประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกันกับ TiLVจากอิสราเอล และบ่งชี้ว่าไวรัสนี้กระจายอยู่ทั่วทวีป เนื่องจากมีการเลี้ยงปลานิลเป็นหลัก การควบคุม TiLV ควรได้รับการป้องกันและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เช่น การป้องกันด้านความปลอดภัยทางชีวภาพที่เข้มงวด การพัฒนาวัคซีน และการเลือกพันธุ์ปลานิลที่ให้ความต้านทาน

ลักษณะอาการของปลาที่ติดเชื้อ จะพบบาดแผลถลอกที่ผิวหนัง และเกิดเป็นแผลหลุมที่มีการกระจายหลายจุดจนถึงขยายเป็นแผลขนาดใหญ่ เลนส์ตาขาวขุ่น และตาจมบุ๋มลงในเบ้าตา (Eyngor et al., 2014) ปลาที่เป็นโรคยังแสดงอาการสูญเสียการทรงตัว เคลื่อนไหวช้า เบื่ออาหาร สีลำตัวซีด และตายในที่สุด (Dong et al., 2017) ลักษณะทางพยาธิสภาพของสมอง พบการบวมน้ำ มีเลือดออกที่เส้นประสาทรับแสงในเยื่อหุ้มสมอง มีเลือดคั่งจากเส้นเลือดฝอยแตกในสมอง เนื้อสีขาวและเนื้อเทา ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับ พบการบวมของเนื้อเยื่อตับ และเกิดการแยกของเนื้อเยื่อตับ (Dong et al., 2017)

Aeromonas hydrophila

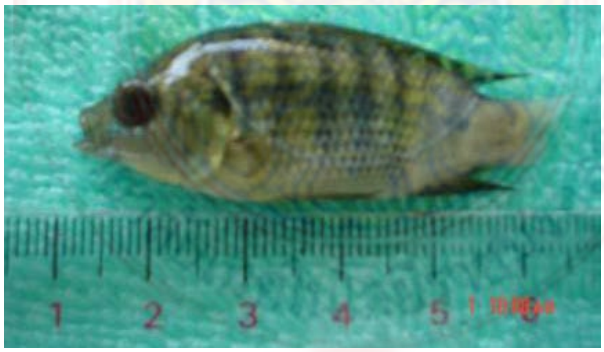
เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่มี ความแตกต่างขอระดับความรุนแรงสูงในแต่ละ Serotype (ชาญณรงค์ มปป) โรคที่เกิดจากเชื้อแอโรโมแนส เป็นโรคที่มีก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและมักพบบ่อยในบ่อที่เลี้ยงโดยให้อาหารสดหรือการเลี้ยงแบบผสมผสาน จะพบเชื้อแบคทีเรียนี้ในแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง สาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อ ได้แก่ ความเครียดหรือการบาดเจ็บจากการขนส่งการเคลื่อนย้าย ปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ การให้อาหารที่มีคุณภาพไม่เหมาะสมรวมทั้งบาดแผลที่เกิดจากปรสิต ปลาติดเชื้อจะว่ายน้ำเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร ครีบกร่อน มีการตกเลือด เกิดบาดแผล ท้องบวม ตับเหลืองมีการตกเลือดบริเวณลำไส้ (ชนกันต์ 2556)



รูปที่ 2 ลักษณะภายนอกของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* (a) ตาขุ่นมัว (b) บาดแผลที่ผิวหนัง (c) การตกเลือดบนผิวหนัง (d) เกล็ดหลุดร่อน (El-Barbary, 2017)

Flavobacterium columnare

โรคคอลัมนาริส เกิดจากเชื้อฟลาโวแบคทีเรียม (*F. columnare*) ชื่อเดิมคือ แฟลกซิแบคเตอร์ (Flexi-bacter columnaris) โรคนี้มักเกิดจากปัจจัยต่างๆ เหนี่ยวนำ เช่น ความเครียดจากการขนส่ง โดยเฉพาะในช่วงหน้าร้อน และการเปลี่ยนแปลงอากาศกะทันหันอาการทางคลินิก ลำตัวปลามีสีด่างซีดเป็นแถบๆ มีเมือกมาก ครีบและเหงือกกร่อน อาจมีสีเหลืองเกิดขึ้นบริเวณบาดแผลการป้องกันการระบาดของโรค ทำได้โดยการลดความบอบช้ำจากการจับและคัดขนาดปลาไม่เลี้ยงปลาหนาแน่นเฝ้าระวังอย่าให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำ (ชนกันต์ 2556)



รูปที่ 3 ลูกปลานิลหางกร่อนจากการติดเชื้อแบคทีเรียฟลาโวแบคทีเรียม (ชนกันต์ 2556)

Streptococcus agalactiae

โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* spp.) อาการของปลาที่เป็นโรคมีตาขุ่นขาวและโปนไม่ค่อยว่ายน้ำ ลอยนิ่ง บางตัวว่ายน้ำควงสว่าน ช่องขับถ่ายบวมแดง พบระบาดรุนแรงในหน้า

ร้อน สามารถทำให้ปลาตายจำนวนมากในเวลาอันสั้นหากมีการติดเชื้อรุนแรง Mian et al. (2009) รายงานว่า อัตราการตายจากโรคนี้พบสูงเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงกว่า 26 °C โรคติดเชื้อนี้สามารถติดต่อจากปลาที่เป็นโรคที่อาศัยอยู่ในบ่อหรือกระชัง มีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่พยายามพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ (Evans et al., 2004; Pridgeon and Klesius, 2011; Klesius et al., 2000) ซึ่งผลที่ได้ยังไม่ชัดเจน บางวัคซีนจะป้องกันโรคได้จำเพาะ *S. iniae* แต่ไม่ป้องกันโรคติดเชื้อจาก *S. agalactiae* (Evans et al., 2004)

รูปที่ 4 ปลานิลมีตาโปนขุ่นขาว เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (ชนกันต์ 2556)

สำหรับวัคซีนปลานิลในประเทศไทย นิลุบลและคณะ (นิลุบล และคณะ 2549) ทดลองให้วัคซีนเชื้อตายแก่ปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง ในแม่น้ำชี จ.มหาสารคาม พบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตรารอดสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ได้ยกย่องผลงานวิจัยวัคซีนป้องกันโรคสเตร็ปโตค็อกโคซิสในปลานิลภายใต้การควบคุมของ ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผลงานวิจัยเด่นประจำปี 2553 (สำนักงานสารสนเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2553) ผลจากการวิจัยนี้ทำให้ได้วัคซีนที่สามารถฉีดเข้าไปในตัวปลานิลขนาดตัวตั้งแต่ 10 กรัม ไปจนถึงระดับปลาพ่อพันธุ์แม่พันธุ์จากการใช้วัคซีนดังกล่าวสามารถสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้นานไม่ต่ำกว่า 6 เดือน ซึ่งเพียงพอต่อระยะเวลาการเลี้ยงจนถึงขนาดตลาดซึ่งมักจะใช้ระยะเวลาประมาณ 4-5 เดือน โดยมีต้นทุนค่าวัคซีนเพิ่มขึ้นเพียงตัวละ 50 สตางค์เท่านั้น ในขณะที่ลูกปลาที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันมีโอกาสรอดจากการเลี้ยงในกระชังถึงร้อยละ 80-87 จัดว่าคุ้มค่าทางเศรษฐกิจอย่างมาก เป็นทางออกที่ดีสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิล และเป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงปลานิล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างปลานิล

ตัวอย่างปลานิลที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัส TiLV จากกระชังปลานิลในแม่น้ำตาปี ใช้วิธีสุ่มตัวอย่างแบบเฉพาะเจาะจง (purposive sampling) โดยจะเก็บตัวอย่างจากฟาร์มปลานิลที่เคยมีประวัติว่าติดเชื้อไวรัส TiLV (อ้างอิงข้อมูลจากงานวิจัยก่อนหน้าเรื่อง ประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ Tilapia lake virus (TiLV) ในปลานิลด้วยวิธี nested RT-PCR และ semi-nested RT-PCR) จำนวน 28 ตัว โดยเก็บตัวอย่างปลาที่มีอาการภายนอกคือ พบบาดแผลถลอกที่ผิวหนัง และเกิดเป็นแผลหลุมที่มีการกระจายหลายจุดจนถึงขยายเป็นแผลขนาดใหญ่ เลนส์ตาขาวขุ่น และตาจมบุ๋มลงในเบ้าตา ปลาสูญเสียการทรงตัว เคลื่อนไหวช้า เบื่ออาหาร สีลำตัวซีด ทำให้ปลาตายอย่างสงบโดยฉีด ให้ MS-222 เกินขนาด เข้าไปที่สมองของปลา ตรวจสอบการตายของปลาโดยสังเกตว่าไม่มีการขยับของเหงือกเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยแยกเอาเฉพาะอวัยวะเป้าหมายคือ ตับ ม้าม ไต และสมอง ด้วยอุปกรณ์ผ่าตัดที่ปลอดเชื้อ และเทคนิคปลอดเชื้อ ส่วนของสมองแยกใส่ใน TRIzol reagent (Invitrogen) และนำไปแช่ในตู้ -80 °C จนกว่าจะนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ ส่วนตับ ม้าม ไต เก็บรวมกัน แช่ในตู้ -20 °C จนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอ ซากของปลาที่เหลือนำไปทำลายทิ้งด้วยวิธีการเผา

นำสมองของปลามาสกัดอาร์เอ็นเอ จากนั้นตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัส TiLV ด้วยวิธี semi-nested RT-PCR แล้วเอาเฉพาะปลาที่ยืนยันแล้วว่าติดเชื้อไวรัส TiLV จริงเท่านั้น ไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียต่อไป

2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอตามคู่มือการสกัดจากบริษัท ของ TRIzol reagent โดยมีขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้ บดตัวอย่างอวัยวะใน TRIzol reagent แล้วนำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวใสส่วนบนถ่ายใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มล. เขย่าอย่างแรง แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอ และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 0.5 มล. นำไปปั่นที่ 7500xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง ระเหยของเหลวออก ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำปราศจาก RNase วัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometers

3. การสกัดดีเอ็นเอ

เมื่อเลี้ยงเชื้อครบเวลา 16 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธีการต้ม (ดัดแปลงจาก Pathmanathan *et al*., 2003) โดยนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ในน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงนี้จะถูกและเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำพีซีอาร์ต่อไป

4. การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี Nested RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2. มาทำ One step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ TiLV outer-F: ACC CTT GTA GAG TCG AGG CA, TiLV outer-R: TTT GGA GAT CGA CGG GGT TG และ SuperScript One-step RT/Platinum Taq mix (Invitrogen) นำไปเพิ่มปริมาณในเครื่องพีซีอาร์ แล้วนำไปทำการตรวจสอบผลโดยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis จนได้แถบของดีเอ็นเอที่จำเพาะ และมีขนาดตรงกับที่ออกแบบไว้

นำผลิตผลที่ได้จากการทำ One step RT-PCR มาทำพีซีอาร์อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ TiLV inner-F: ACT GTG CTT TCC AGA GTC GC กับ TiLV inner-R: GTG CTC AAA GTT CCT CGC CT แล้วนำไปทำการตรวจสอบผลโดยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis จนได้แถบของดีเอ็นเอที่จำเพาะ และมีขนาดตรงกับที่ออกแบบไว้

5. การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อแต่ละตัวคือ สำหรับเชื้อ *S. Agalactiae* ไพรเมอร์ที่ใช้คือ SA-F: AATCAAGCCCAGCAAATGGC และ SA-R: TGCCTTTACATC GTTAACTTGAGC สำหรับเชื้อ *A. hydrophila* ไพรเมอร์ที่ใช้คือ AH-F: GATCCGTGGCAACAATGACG และ AH-R: TCGTAACGCAGGGTGACATC สำหรับเชื้อ *F. columnare* ไพรเมอร์ที่ใช้คือ FC-F: AGTCTCGTAGCTCAGCTGGT และ FC-R: TTTTGCTTATTGG CATCCCCC โดยใน 1 หลอดปฏิกิริยา (25 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร, forward primer ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร, reverse primer ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร และ 5x PCR master Mix (GeneMark, Taiwan) 5 ไมโครลิตร สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ใน แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis

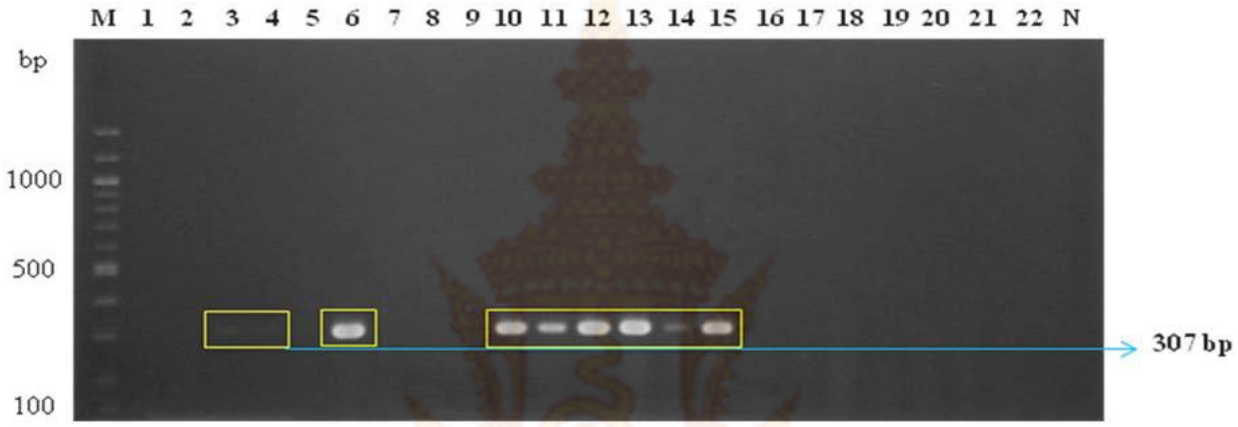
6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี Nested RT-PCR และ การติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธี PCR จะแสดงในรูปแบบของผลิตผลพีซีอาร์เทียบกับ 100 bp markers ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ผลและการอภิปรายผล

1. การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี Nested RT-PCR

รอบที่ 1 ทำการเก็บตัวอย่างปลานิลที่สงสัยว่าจะติดเชื้อไวรัส TiLV มาจำนวน 22 ตัว นำตัวอย่างปลาทั้งหมดมาตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี Nested RT-PCR พบว่ามีปลาที่ติดเชื้อ 9 ตัว ได้แก่ ปลาตัวที่ 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 โดยดูจากแถบดีเอ็นเอขนาด 307 bp ดังแสดงในรูปที่ 5

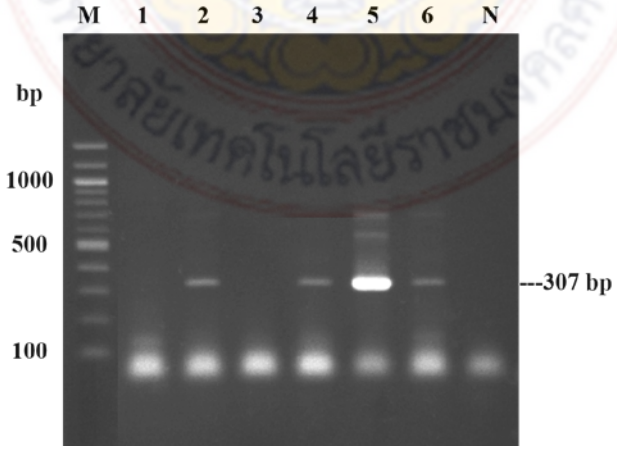


รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิล 22 ตัว ด้วยวิธี Nested RT-PCR

M = 100 bp marker

N = negative control

1-22 = ผลิตภัณฑ์ Nested RT-PCR ที่ใช้อาร์เอ็นเอจากสมองของตัวอย่างที่ 1-22 ตามลำดับ



รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิล 6 ตัว ด้วยวิธี Nested RT-PCR

M = 100 bp marker

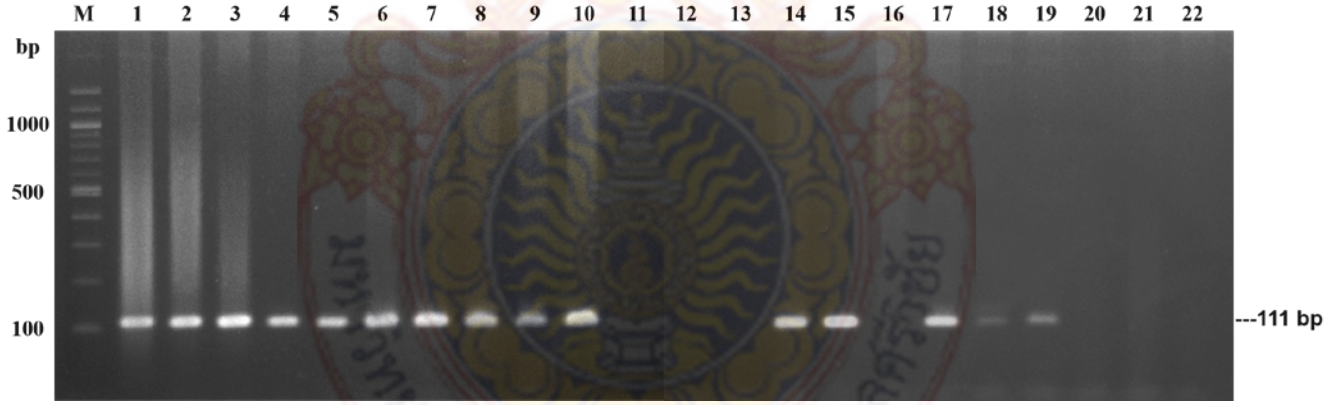
N = negative control

1-6 = ผลิตภัณฑ์ Nested RT-PCR ที่ใช้อาร์เอ็นเอจากสมองของตัวอย่างที่ 1-6 ตามลำดับ

รอบที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างปลานิลที่สงสัยว่าจะติดเชื้อไวรัส TiLV มาจำนวน 6 ตัว นำตัวอย่างปลาทั้งหมดมาตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี Nested RT-PCR พบว่ามีปลาที่ติดเชื้อ TiLV 4 ตัว ได้แก่ ปลาตัวที่ 2, 4, 5 และ 6 โดยได้แถบดีเอ็นเอขนาด 307 bp ดังแสดงในรูปที่ 6

2. การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นที่สกัดได้ด้วยวิธี PCR

รอบที่ 1 นำไตของตัวอย่างทั้ง 22 ตัว ไปสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการเพิ่มปริมาณยีน 18s rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ ผลปรากฏว่าตัวอย่างที่ 11, 12, 13, 16, 20, 21 และ 22 ไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 111 bp ของยีน 18s rRNA ขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 7 นั่นหมายความว่าดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ 11, 12, 13, 16, 20, 21 และ 22 ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้ ดังนั้นตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัส TiLV ที่จะนำไปตรวจสอบการติดเชื้อของแบคทีเรียต่อจึงเหลือเพียง 6 ตัวอย่าง คือ 3, 4, 6, 10, 14 และ 15

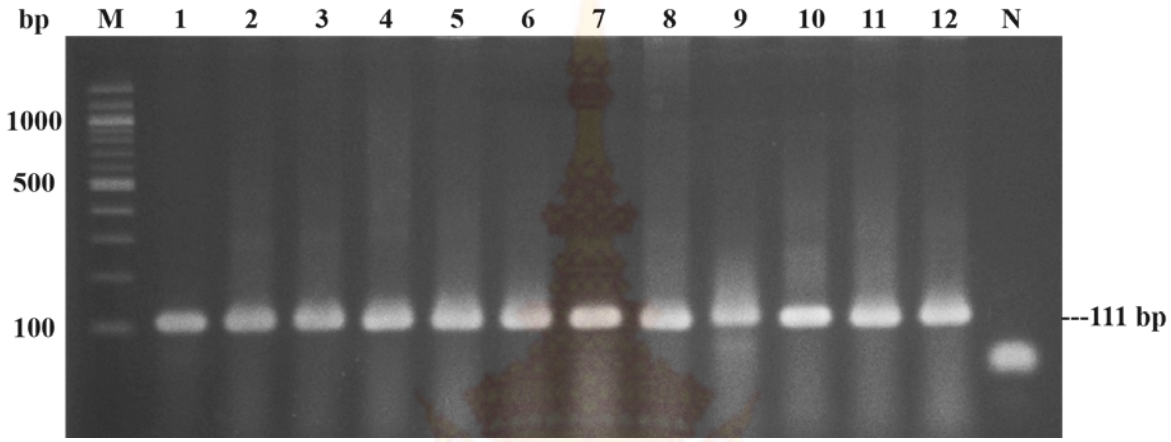


รูปที่ 7 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18s rRNA ในดีเอ็นเอของปลานิล 22 ตัว ด้วยวิธี PCR

M = 100 bp marker

1-22 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน18s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากไตของปลานิล ตัวอย่างที่ 1-22 ตามลำดับ

รอบที่ 2 นำเหงือก และไตของตัวอย่างทั้ง 6 ตัว ไปสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการเพิ่มปริมาณยีน 18s rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ ผลปรากฏว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 111 bp ของยีน 18s rRNA ขึ้นในทุกตัวอย่าง แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ทุกตัวอย่างมีปริมาณมากพอที่จะนำไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากเหงือกและไตของปลานิล 6 ตัว ด้วยวิธี PCR

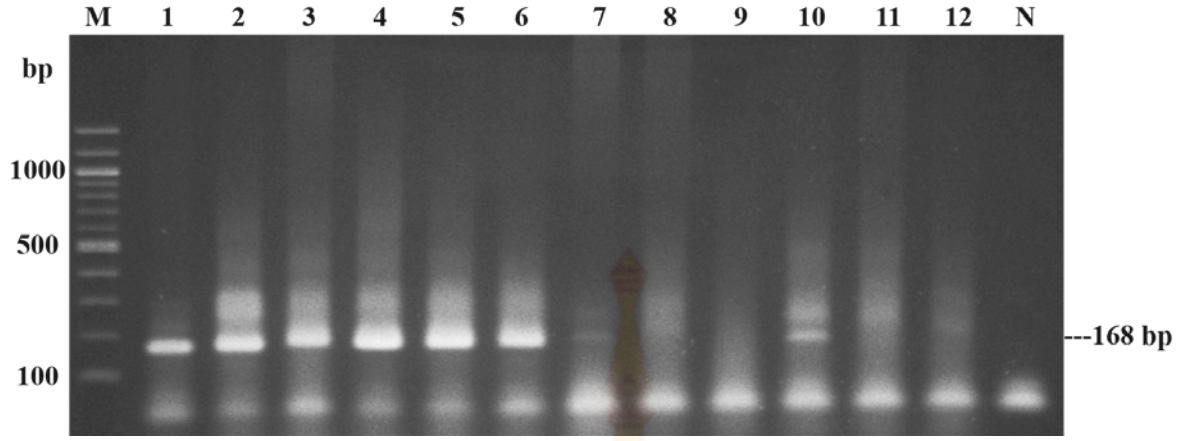
M = 100 bp marker

N = negative control

1-6 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน18s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากเหงือกของปลานิล ตัวอย่างที่ 1-6 ตามลำดับ

7-12 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน18s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากไตของปลานิล ตัวอย่างที่ 1-6 ตามลำดับ

จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาตรวจสอบการมีอยู่ของแบคทีเรีย โดยการเพิ่มจำนวนยีน 16s rRNA ซึ่งเป็นยีนที่ออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับ 16s rRNA ของแบคทีเรียทุกชนิด ด้วยวิธี PCR ผลปรากฏว่าในเหงือก พบแถบดีเอ็นเอของ 16s rRNA ขนาด 168 bp ในทุกตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อแบคทีเรียอยู่ที่เหงือกของปลานิลทั้ง 6 ตัว ในขณะที่ ในไต พบแถบดีเอ็นเอของ 16s rRNA ในตัวอย่างที่ 1 และ 4 เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียที่บริเวณไตของปลานิลตัวที่ 1 และ 4 เท่านั้น แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด



รูปที่ 9 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากเหงือกและไต ของปลานิล 6 ตัว ด้วยวิธี PCR

M = 100 bp marker

N = negative control

1-6 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน16s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากเหงือกของปลานิล ตัวอย่างที่ 1-6 ตามลำดับ

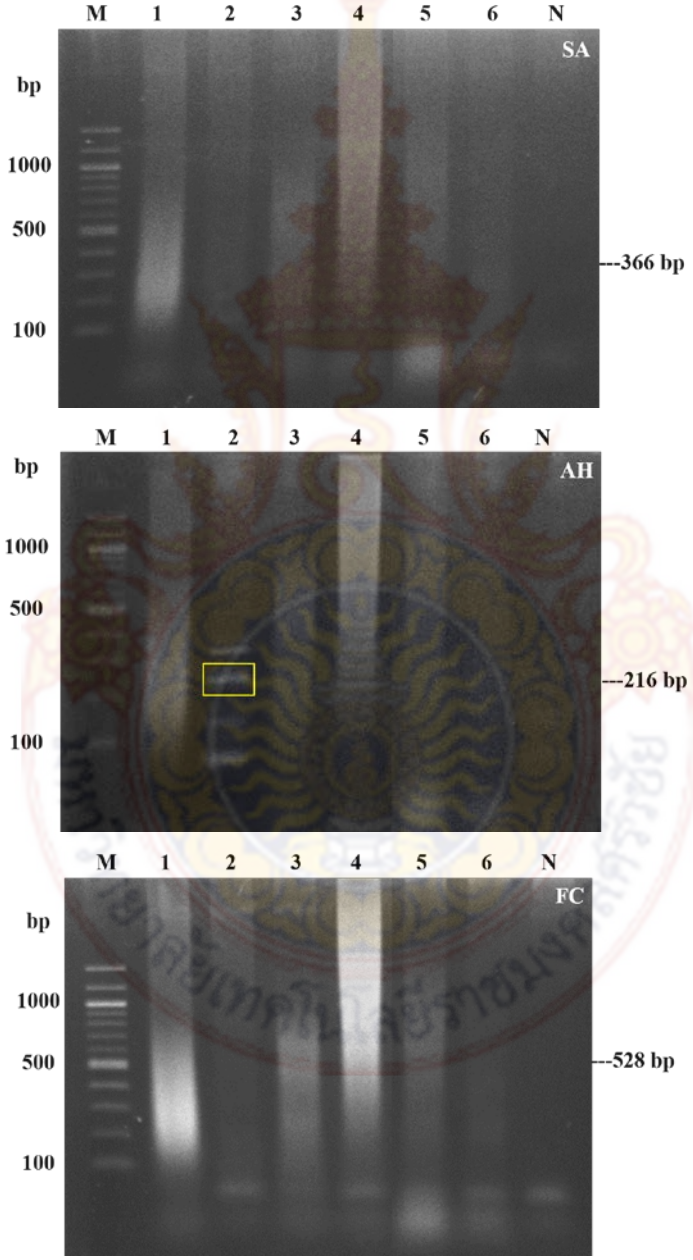
7-12 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน16s rRNA ในดีเอ็นเอที่สกัดจากไตของปลานิล ตัวอย่างที่ 1-6 ตามลำดับ

3. การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธี PCR

รอบที่ 1 เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากไตของปลานิลทั้ง 6 ตัวที่ติดเชื้อไวรัส TiLV คือปลานิลตัวที่ 3, 4, 6, 10, 14 และ 15 มาตรวจสอบการติดเชื้อของแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. agalactiae* (SA), *A. hydrophila* (AH) และ *F. columnare* (FC) ผลปรากฏว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* คือตัวอย่างปลาตัวที่ 4 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอของ AH ขนาด 216 bp ในขณะที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของ SA และ FC ในตัวอย่างใดเลย ดังแสดงในรูปที่ 10 ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตามธรรมชาติ สามารถพบการติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัส TiLV และแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้

รอบที่ 2 เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเหงือกและไตของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV ซึ่งมีทั้งหมด 4 ตัว ตรวจตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโดยเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA พบว่าในเหงือกเป็นบวกทุกตัวอย่าง แต่เนื่องจากเหงือกเป็นส่วนที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก และเป็นส่วนที่คอยดักจับเชื้อโรคไม่ให้เข้าสู่ร่างกายของปลา ดังนั้น การพบว่ามีแบคทีเรียอยู่ที่เหงือกของปลาทุกตัวจึงเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้ ในส่วน

ของไตซึ่งเป็นอวัยวะภายใน การพบแบคทีเรียที่ไตเป็นการบ่งบอกถึงการติดเชื้อของปลา และเมื่อนำไตของปลาที่ติดเชื้อไวรัส TiLV มาตรวจสอบยีน 16s rRNA พบว่ามี 2 ตัว ที่ให้ผลเป็นบวก แต่เมื่อนำมาตรวจสอบการติดเชื้อของแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. agalactiae* (SA), *A. hydrophila* (AH) และ *F. columnare* (FC) ผลปรากฏว่า ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างใดเลย (ไม่แสดงรูป) นั่นหมายความว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ร่วมกับการติดไวรัส TiLV เกิดขึ้นในปลาทั้งสองตัว



รูปที่ 10 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* ในไตของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV ด้วยวิธี PCR

M = 100 bp marker

N = negative control

1-6 (SA) = ผลิตภัณฑ์ PCR ของ SA (*S. agalactiae*) ในดีเอ็นเอที่สกัดจากไตของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV ทั้ง 6 ตัว

1-6 (AH) = ผลิตภัณฑ์ PCR ของ AH (*A. hydrophila*) ในดีเอ็นเอที่สกัดจากไตของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV ทั้ง 6 ตัว

1-6 (FC) = ผลิตภัณฑ์ PCR ของ FC (*F. columnare*) ในดีเอ็นเอที่สกัดจากไตของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV ทั้ง 6 ตัว

จากผลการทดลองทั้งสองรอบ มีปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV รวมกันทั้งสิ้น 10 ตัว โดยมีการติดเชื้อร่วมของเชื้อไวรัส TiLV และแบคทีเรีย *A. hydrophila* 1 ตัว คิดเป็น 10% และมีการติดเชื้อร่วมของเชื้อไวรัส TiLV และแบคทีเรียชนิดอื่น ที่ไม่ใช่ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* อีก 2 ตัว (ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้ออะไร) คิดเป็น 20%

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยทั้งหมดสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่า การติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส TiLV และเชื้อแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ โดยจากการทดลอง เป็นการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส TiLV และเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* จำนวน 10% และเป็นการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส TiLV และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *F. columnare* อีก 20% ซึ่งการติดเชื้อร่วมนี้จะส่งผลให้ปลามีอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้น แนวทางการป้องกันที่ดีในอนาคตจึงควรเป็นวิธีการที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคได้หลายชนิดร่วมกัน

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2559. สินค้าปลานิล&ผลิตภัณฑ์ประจำเดือนธันวาคม. เข้าถึงจาก www.fisheries .go.th/strategy/UserFiles/files/nin%2012-59(2).pdf. วันที่สืบค้น 23 เม.ย. 61

ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. โรคปลานิล**.** เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 11: 75-86.

ชาญณรงค์ รอดคำ. มปป.โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา (Bacterial diseases of fish). เอกสารประกอบการสอนวิชาโรคสัตว์น้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิลุบล กิจอันเจริญ, ชุติมา หาญจวณิช และนงนุช สุวรรณเพ็ง. 2549. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีน ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. วารสาร วิจัย มข 11: 53-61.

สำนักงานสารสนเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2553. ผลงานวิจัยจากคณาจารย์จุฬาฯ 5 ใน 12 ผลงาน วิจัยเด่น สกว. ปี 2553. เข้าถึงจาก http://www.chula.ac.th/idcucm1/groups/guniverity/documents/cu_researchawards/cu_p012011. pdf. วันที่สืบค้น 23 เม.ย. 61

Asia Regional Aquatic Animal Health Program. 2017. Tilapia Lake Virus (TiLV) – an Emerging Threat to Farmed Tilapiain the Asia-Pacific Region. Copyright NACA; May 2017.

Dong, H.T., Siriroob, S., Meemetta, W., Santimanawong, W., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., Vanichviriyakit, R. and Senapin, S. 2017. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-Nested RT-PCR for detection. Aquaculture 476: 111-118.

El-Barbary, M. I. 2017. Serum biochemical and histopathological changes associated with *Aeromonas hydrophila* isolated from *Oreochromis niloticus* and *Sparus aurata* with multiple antibiotic resistance index. J Biol Sci 17(5): 222-234.

Evans, J. J., Klesius, P. H., and Shoemaker, C. A. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by

intraperitoneal and bath immersion administration. Vaccine 22(27- 28): 3769-3773.

Eyngor, M., Zamostiano, R., Tsofack, J.E.K., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinman, S., Lev, M., Hurvitz, A., Galeotti, M.,Bacharach, E. and Eldar, A. 2014. Identification of novel RNA virus lethal to tilapia. J Clinical Microbiology 52: 4137-4146.

Fathi, M., Dickson, C., Dickson, M., Leschen, W., Baily, J., Muir, F., Ulrich, K., and Weidmann, M. 2017. Identification of tilapia lake virus in Egypt in Nile tilapia affected by summer mortality syndrome. Aquaculture 473: 430-432.

Ferguson, H.W., Kabuusu, R., Beltran, S., Reyes, E., Lince, J.A. and del Pozo, J. 2014. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report. J Fish Dis 37: 583-589.

Hauser-Davis, R.A., Lavradas, R.T., Lavandier, R.C., Rojas, E.G.A., Guarino, A.W.S. and Ziolli, R.L. 2015. Accumulation and toxic effects of microcystin in tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a eutrophic Brazilian lagoon. Ecotoxicology and Environmental Safety 112: 132-136.

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 (3-4): 237-246.

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

Pridgeon, J. W., and Klesius, P. H. 2011. Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Vaccine 29(35): 5986-5993.

Surachetpong, W., Janetanakit, T., Nonthabenjawan, N., Tattiyapong, P., Sirikanchana, K. and Amonsin, A. 2017. Outbreaks of tilapia lake virus

infection, Thailand, 2015-2016. Emerging Infectious Diseases 23(6): 1031-1033.

Tsofack, J.E.K., Zamostiano, R., Watted, S., Berkowitz, A., Rosenbluth, E., Mishra, N., Briese, T., Lipkin, W.I., Kabuusu, R.M., Ferguson, H., del Pozo, J., Eldar, A., and Bacharach, E. 2017. Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol 55(3): 759-767.