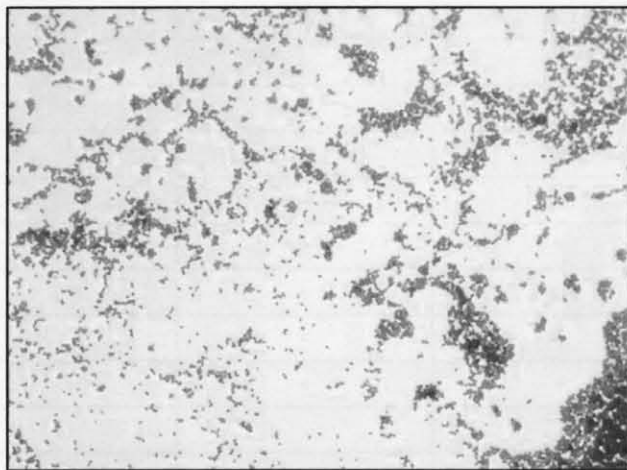


บทที่ 4

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp.

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ซึ่งแยกได้จากสมองปลาไหล พบว่าเป็นแบคทีเรียที่เซลล์มีรูปร่างกลม (spherical) เรียงต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ติดสีน้ำเงิน (Gram positive) (ภาพที่ 1) มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากระพงขาว (เฉลิมและคณะ, 2548) แต่แตกต่างกันที่คุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้จัดอยู่ในกลุ่ม beta-haemolytic streptococci ซึ่งสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่เชื้อ *Streptococcus* sp. ที่แยกได้จากปลากระพงไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ จัดเป็น gamma-haemolytic streptococci ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และภาพที่ 2



ภาพที่ 1 แสดงสัณฐานวิทยา (morphology) และการติดสีย้อม (Gram positive) ของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับเชื้อ *Streptococcus* ชนิดอื่น ๆ

Test	<i>Strep. sp.</i> Nile Tilapia (Present study)	<i>Strep. 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



ภาพที่ 2 แสดงการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 STREP (bioMerieux, France)

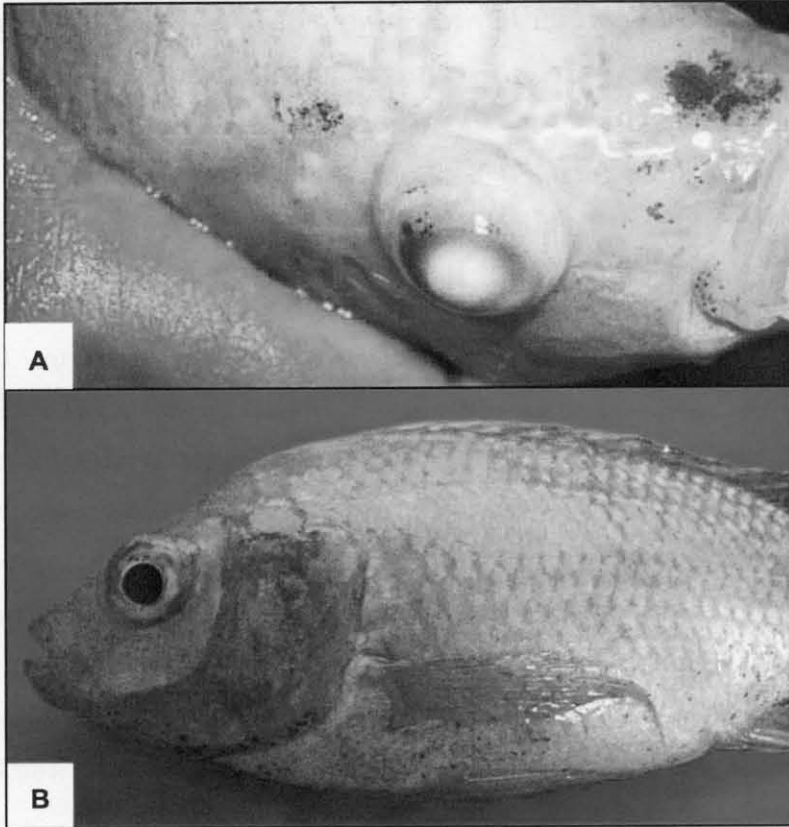
2. ปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (Median lethal dose, LD₅₀)

จากการทดลองฉีดสารละลายของเชื้อ *Streptococcus* sp. เข้าช่องท้องปลาใน ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ทำให้ปลาตาย ครึ่งหนึ่งภายในระยะเวลา 14 วัน (Median Lethal Concentration; LD₅₀) พบว่าปลาที่ได้รับการฉีด เชื้อ *Streptococcus* sp. แสดงอาการผิดปกติที่สามารถสังเกตได้ ได้แก่ สีตัวซีดลง ว่ายน้ำช้า ท้อง บวม และตาโปน (ภาพที่ 3) มีการตายเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 14 วันของการทดลอง และสามารถ แยกเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้จากสมองของปลาตาย โดยที่อัตราการตายของปลาจะสัมพันธ์กับ ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ฉีดเข้าตัวปลา และจากการคำนวณตามวิธีการของ Reed & Muench (1938) พบว่าค่า LD₅₀ ที่ 14 วันของเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 6.0×10^6 cfu/ml

ค่า LD₅₀ เป็นดัชนีที่ใช้ในการบ่งบอกความรุนแรงของเชื้อ ซึ่งจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติของเชื้อ สายพันธุ์ ปัจจัยสิ่งแวดล้อม และชนิดและขนาดของปลารวมถึง ความสามารถในการยอมรับเชื้อ (susceptibility) มีรายงานความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่อปลากระพงขาวน้ำหนักประมาณ 4.97 กรัม (โดยวิธีการฉีด) มีค่า LD₅₀ ที่ 14 วัน เท่ากับ 1.937×10^3 cfu/ml (เฉลิมและคณะ, 2548) หรือจากรายงานการศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ต่อปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักประมาณ 89.54 กรัม (โดยวิธีการฉีด) ที่พบว่า มีค่า LD₅₀ ที่ 10 วัน สูงสุดเท่ากับ 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) นอกจากนี้ Eldar และคณะ (1995) ยังพบว่าสามารถเพิ่มความรุนแรงของเชื้อในปลา นิลลูกผสมได้โดยการ passage เชื้อแบบ brain to brain (จากสมองของปลาดูตัวหนึ่งไปยังอีกตัว หนึ่ง) ซึ่งตามปกติพบว่าเชื้อ *Streptococcus shiloi* และ *Streptococcus difficile* ที่เลี้ยงบนอาหาร

ฝ้ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวิสุนทร

เลี้ยงเชื้อจะมีค่า LD₅₀ เท่ากับ 10⁷ - 10⁸ cfu แต่หลังจากการทำ passage ในปลา 3 ครั้ง ความรุนแรงของเชื้อจะเพิ่มขึ้น (LD₅₀ มีค่า 10² - 10⁵ cfu)



ภาพที่ 3 แสดงอาการตาโปนและชूनขาว (A) สีตัวซีดลงและท้องบวม (B) ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

3. การศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ผ่านช่องทางการติดเชื้อ (route of infection) ที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในการก่อให้เกิดโรคในปลานิลผ่านช่องทางการติดเชื้อ (route of infection) ที่แตกต่างกัน พบว่าปลานิลที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องจะมีอัตราการตายสะสมภายใน 14 วัน สูงสุด (28.88%) รองลงมาเป็นวิธีการแช่ (13.33%) และการผสมอาหาร (6.67%) ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการตายของปลาทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อผ่านการฉีดเข้าช่องจมูก และการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วยเลย ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าช่องทางการได้รับเชื้อของปลาสัมพันธ์กับการยอมรับเชื้อและอัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2 และ

ภาพที่ 4) โดยเฉพาะการฉีดเข้าช่องท้อง ซึ่งเป็นช่องทางที่ปลามีโอกาสได้รับเชื้อในปริมาณสูงสุด เมื่อเทียบกับช่องทางอื่น ๆ แม้ว่าวิธีการนี้ไม่ได้เป็นช่องทางการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ผ่านน้ำ (waterborne transmission) ตามธรรมชาติ มีรายงานว่าเชื้อ *Streptococcus iniae* จากน้ำจะเข้าสู่ตัวปลาโดยผ่านทางเหงือก หรือช่องจมูก ก่อนที่จะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะอื่น ๆ รวมถึงส่วนของสมอง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า การแพร่กระจายของเชื้อ *Streptococcus iniae* ภายในเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมถึงการแสดงอาการในปลายังขึ้นอยู่กับช่องทางการได้รับเชื้อด้วย (Evans et al., 2001; McNulty et al., 2003) และมีความเป็นไปได้ที่ช่องทางการติดเชื้อที่แตกต่างกัน หรือชนิดของเชื้อ *Streptococcus* ที่ต่างกันจะมีผลต่อเส้นทางการแพร่กระจายของเชื้อในตัวปลาด้วย

จากรายงานของ Shoemaker และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาผลของความหนาแน่น และปริมาณเชื้อต่ออัตราการตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus iniae* พบว่าที่ระดับความหนาแน่นเดียวกันอัตราการการตายของปลาที่ได้รับเชื้อผ่านวิธีการแช่ (immersion) และวิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย (cohabitation) ไม่มีความแตกต่างกัน ผลการศึกษครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Perera และคณะ (1997) ที่พบว่าวิธีการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* โดยวิธีการเลี้ยงร่วม ไม่สามารถก่อให้เกิดการตายของปลานิลทดลองเลย แต่พบว่าการติดเชื้อโดยการกิน (oral infection) หรือส่งผ่านทางเดินอาหารโดยตรงสามารถชักนำให้เกิดการตายในปลาทดลองได้ สอดคล้องกับรายงานของ Minami (1979) ที่พบว่าการกินปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Streptococcosis ในปลา yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)

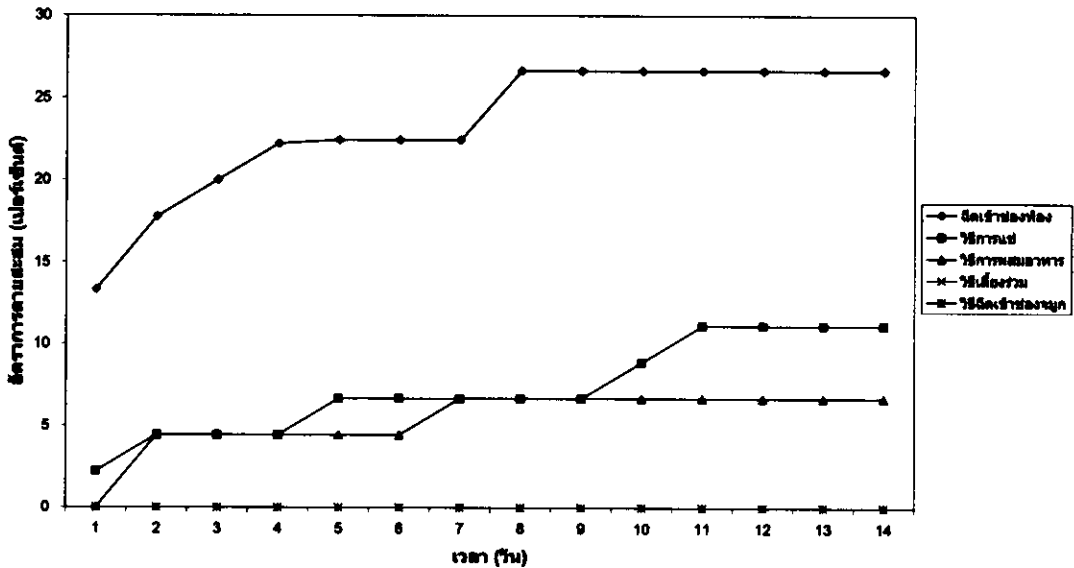
จากผลการศึกษาครั้งนี้แม้จะสามารถสรุปได้ว่าความรุนแรงของการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิลแดงแปลงเพศสัมพันธ์โดยตรงกับช่องทางการติดเชื้อ แต่ก็ยังมีความหลากหลายและแตกต่างกันไปในแต่ละการทดลอง ซึ่งอาจจะเป็นผลจากปัจจัยอื่น ๆ ดังนั้นในการศึกษาความรุนแรงของโรค Streptococcosis จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพิจารณาถึงปัจจัยร่วมอื่น ๆ ด้วย เช่น ชนิดของปลา ความหนาแน่นในการเลี้ยง ปริมาณเชื้อ ตลอดจนปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการตายสะสมของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. ผ่านช่องทางการติดเชื้อที่แตกต่างกัน

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 followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P = 0.05$

ความรุนแรงของเชื้อ *Streptococcus* sp. จากช่องทางการติดเชื้อที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4 แสดงอัตราการตายสะสมภายในเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. ผ่านช่องทางการติดเชื้อที่แตกต่างกัน

4. ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค Streptococcosis

4.1 ความหนาแน่นของการเลี้ยง

จากการศึกษาผลของความหนาแน่นของการเลี้ยงที่แตกต่างกันสามระดับต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่าภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบหนาแน่นสูง (17 กรัม/ลิตร) ปลานิลจะมีอัตราการตายสะสมเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ภายในเวลา 14 วัน สูงกว่าที่ระดับความหนาแน่นปานกลาง (12 กรัม/ลิตร) และความหนาแน่นต่ำ (8 กรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อที่ระดับความหนาแน่นต่ำและความหนาแน่นปานกลาง ทั้งกลุ่มที่ถูกชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงร่วม อย่างไรก็ตามพบว่าที่ความหนาแน่นของการเลี้ยงระดับเดียวกัน (ยกเว้นที่ระดับความหนาแน่นสูง) การชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดจะก่อให้เกิดอัตราการตายของปลาในระดับที่สูงกว่าวิธีการเลี้ยงร่วม (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5,6)

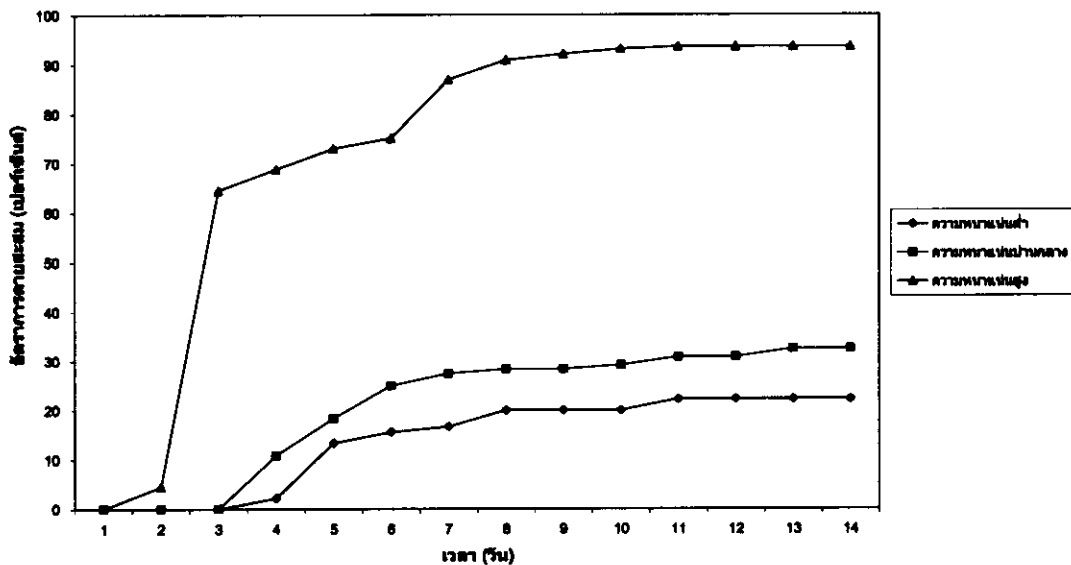
ตารางที่ 3 แสดงผลของความหนาแน่นของการเลี้ยงต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ

ระดับความหนาแน่น	อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)	
	วิธีการฉีด	วิธีการเลี้ยงร่วม
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 followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P = 0.05$

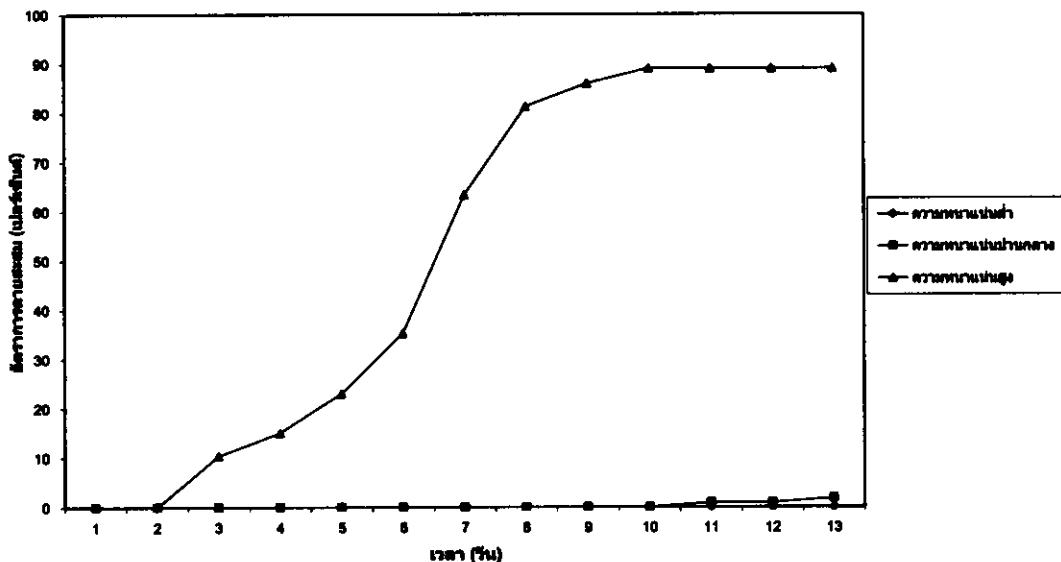
ผลจากการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าความหนาแน่นของการเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ ซึ่งจะสังเกตได้ว่าที่ระดับความหนาแน่นของการเลี้ยงปานกลาง การชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วยจะก่อให้เกิดอัตราการตายของปลาน้อยมาก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

ผลของความหนาแน่นต่อการยอมรับเชื้อ (โดยวิธีการฉีด)



ภาพที่ 5 แสดงอัตราการตายสะสมภายในเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยวิธีการฉีดที่ระดับความหนาแน่นของการเลี้ยงแตกต่างกัน

ผลของความหนาแน่นต่อการยอมรับเชื้อ (โดยวิธีการเลี้ยงร่วม)



ภาพที่ 6 แสดงอัตราการตายสะสมภายในเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย ที่ระดับความหนาแน่นของการเลี้ยงแตกต่างกัน

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*

แม้ว่าในสภาพการเลี้ยงปลานิลในบ่อจริง ๆ จะเลี้ยงที่ระดับความหนาแน่นที่ค่อนข้างสูง ประมาณ 30 - 300 กรัม/ลิตร แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความหนาแน่นของการเลี้ยงที่ระดับตั้งแต่ 17 กรัม/ลิตร จะส่งผลให้ปลานิลแดงแปลงเพศสามารถยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. และมีอัตราการตายที่สูงขึ้นมาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้การลดความหนาแน่นของการเลี้ยงปลานิลเป็นมาตรการหนึ่งในการจัดการการเลี้ยงเพื่อลดการแพร่กระจายและการติดต่อกันของเชื้อ *Streptococcus* ในฟาร์มเลี้ยงปลานิลแบบพัฒนา (intensive farm) ได้

4.2 อุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่าภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) ปลานิลจะมีอัตราการตายสะสมเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ภายในเวลา 14 วัน สูงกว่าที่ระดับอุณหภูมิต่ำ (24 องศาเซลเซียส) หรืออุณหภูมิกปกติ (27 องศาเซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งกลุ่มที่ถูกชักนำให้มีการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด และการเลี้ยงร่วม โดยเฉพาะกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยวิธีการฉีด พบว่าอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่าปกติ จะเป็นปัจจัยโน้มนำให้ปลาเกิดการติดเชื้อและมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยปลาที่ติดเชื้อสูงจะมีอัตราการตายสูงถึง 100% และ 60% ตามลำดับ ในขณะที่ผลของอุณหภูมิของน้ำที่ต่ำกว่าปกติ ไม่มีอิทธิพลต่อการยอมรับเชื้อของปลานิลกลุ่มที่ติดเชื้อจากการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วย เมื่อเทียบกับผลจากอุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้น (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7,8)

ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chang and Plumb (1996) ที่พบว่าปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) จะมีอัตราการตายสูงกว่าปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า (25 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิจะมีผลโดยตรงต่อการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของปลา โดยทั่วไปอุณหภูมิที่สูงขึ้น แต่ยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม (physiological range) ต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำแต่ละชนิด จะกระตุ้นให้การตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น

ได้อย่างรวดเร็ว และในระดับที่สูง ในขณะที่อุณหภูมิต่ำจะกีดการทำงานของ T helper cell ของปลา ทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง แต่ผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาจะขึ้นกับชนิดของปลาด้วย เช่น พบว่าภูมิคุ้มกันของปลา carp ซึ่งอยู่ในเขตอบอุ่นจะถูกกดเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่ปลาที่อยู่ในเขตหนาว การกดภูมิคุ้มกันจะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส (Bly and Clem, 1992; Roberts, 2001) กลไกการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของปลาที่เปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิจะมีผลต่อความสามารถในการยอมรับเชื้อ (susceptibility) ของปลาโดยตรง

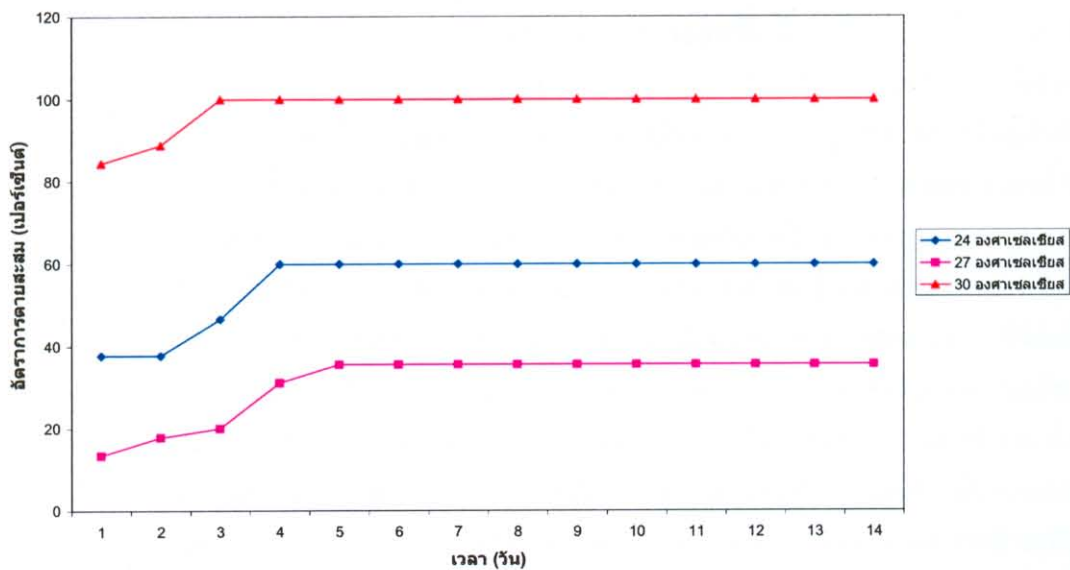
อุณหภูมิน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการกำหนดจากช่วงของอุณหภูมิกติในสภาพจริงของการเลี้ยงปลาที่ผันแปรไปตามสภาพอากาศ หรือฤดูกาล เช่น ในช่วงกลางวัน หรือกลางคืน หรือวันที่มีฝนตก เป็นต้น ข้อมูลผลของอุณหภูมิต่อความรุนแรงของโรค Streptococcosis นี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการระบบการเลี้ยงเพื่อป้องกันการระบาดของโรค โดยเฉพาะในช่วงเปลี่ยนฤดูกาล ที่อุณหภูมิน้ำมักจะเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้าง

ตารางที่ 4 แสดงผลของอุณหภูมิน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดง แปลงเพศ

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

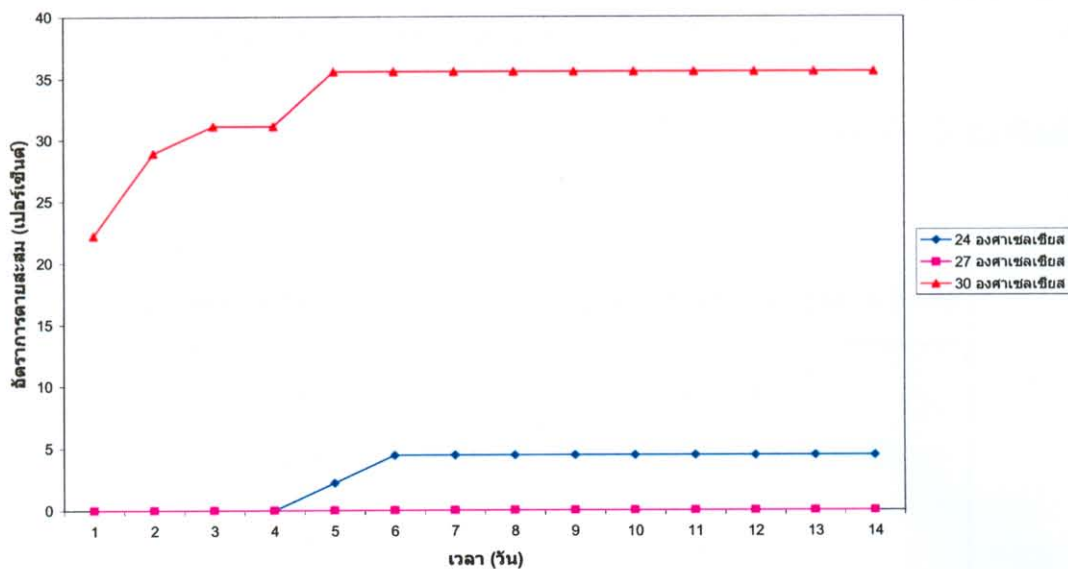
Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P = 0.05$

ผลของอุณหภูมิต่อการยอมรับเชื้อ (โดยวิธีการฉีด)



ภาพที่ 7 แสดงอัตราการตายสะสมภายในเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยวิธีการฉีดที่ระดับอุณหภูมิของน้ำแตกต่างกัน

ผลของอุณหภูมิต่อการยอมรับเชื้อ (โดยวิธีการเลี้ยงร่วม)



ภาพที่ 8 แสดงอัตราการตายสะสมภายในเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกับปลาป่วยที่ระดับอุณหภูมิของน้ำแตกต่างกัน

4.3 ความเค็ม

จากการศึกษาผลของความเค็มของน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่าภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ความเค็มสูง (10 และ 15 ppt) ปลานิลจะมีอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ภายในเวลา 14 วัน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับที่เลี้ยงที่ความเค็มต่ำ (0 และ 10 ppt) ในขณะที่อัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อที่ระดับความเค็มระหว่าง 0 และ 5 ppt (31.10% และ 24.50%) หรือระหว่าง 10 และ 15 ppt (11.13% และ 8.90%) ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 5 และภาพที่ 9) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Chang and Plumb (1996) ที่รายงานว่าปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 30 ppt จะมีอัตราการตายสูงกว่าปลาที่เลี้ยงที่ความเค็ม 0 และ 15 ppt ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างของอัตราการตายของปลาที่ความเค็ม 0 และ 15 ppt ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่แม้ว่าปลานิลเป็นปลาที่สามารถทนต่อความเค็มได้ในช่วงกว้าง แต่ที่ระดับความเค็ม 30 ppt อาจเป็นระดับความเค็มที่อยู่นอกช่วงที่เหมาะสม (physiological range) ต่อการดำรงชีวิตของปลานิล ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลไม่สามารถต้านทานต่อการติดเชื้อได้ ในขณะที่ระดับความเค็มต่ำ (10 -15 ppt) สามารถช่วยลดอัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีความเค็ม ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรจึงลดลงไปด้วย

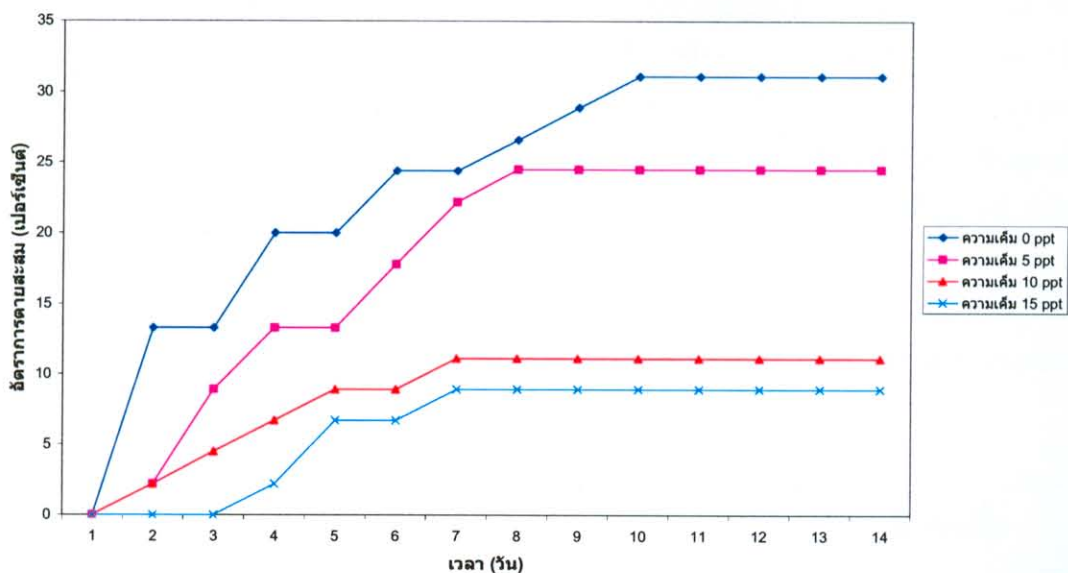
ผลจากการศึกษาค้างนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการระบบการเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศได้ โดยอาจเลี้ยงปลานิลในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10 -15 ppt เพื่อป้องกันการเกิดโรคและลดความสูญเสียที่อาจจะเกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

ตารางที่ 5 แสดงผลของความเค็มของน้ำต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. 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 followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P = 0.05$

ผลของความเค็มต่อการยอมรับเชื้อ



ภาพที่ 9 แสดงอัตราการตายสะสมภายในเวลา 14 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเค็มของน้ำแตกต่างกัน

5. องค์ประกอบเลือดและระดับแอนติบอดีของปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

จากการศึกษาผลของการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดในปลานิลแดงแปลงเพศ โดยการฉีดสารละลายความเข้มข้น 6×10^6 cfu/ml เข้าบริเวณช่องท้อง พบว่าภายในเวลา 14 วัน ปลาที่ได้รับเชื้อมีการแสดงอาการของโรค เช่น สีตัวซีดลง ท้องบวม ดาโปน แต่มีอัตราการตายค่อนข้างต่ำ หลังจากการเก็บเลือดในวันที่ 14 ของการติดเชื้อและนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด พบว่าปลาที่ติดเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดที่ตรวจสอบ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณฮีโมโกลบิน และโปรตีนในน้ำเลือด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 6) ทั้งนี้ มีความเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดอาจสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ เนื่องจาก *Streptococcus* sp. ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความรุนแรงน้อย และก่อให้เกิดอัตราการตายในปลาที่ติดเชื้อมาก่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นลักษณะของการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) ปลาจึงสามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อได้ดี และองค์ประกอบเลือดที่อาจเปลี่ยนแปลงเนื่องมาจากการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในระยะแรก ๆ สามารถกลับคืนสู่ภาวะปกติได้หลังจากวันที่ 14 สอดคล้องกับรายงานของ เนลิมและคณะ (2548) ที่ศึกษาในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่พบว่าค่าองค์ประกอบเลือด เช่น ปริมาณเม็ดเลือด ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน หรือซีรัมโปรตีนของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. ซึ่งมีค่า LD₅₀ เท่ากับ 1.937×10^3 cfu/ml จะลดต่ำลงเมื่อเทียบ

กับปลาปกติ ตามระยะเวลาของการติดเชื้อ แต่มีแนวโน้มกลับคืนสู่ระดับปกติในวันที่ 14 ของการติดเชื้อ ผลการศึกษาในลักษณะเดียวกันยังมีรายงานในปลาสลิคหิน (*Siganus canaliculatus*) โดย Foo และคณะ (1985) ในขณะที่พบว่าค่าองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศใกล้ตายจากการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่มีความรุนแรงสูง (LD₅₀ เท่ากับ 3.60×10^1 cfu/ml) จะลดลงกว่า 50% เมื่อเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม ในวันที่ 14 ของการติดเชื้อ และไม่มีแนวโน้มกลับคืนสู่ระดับปกติ (นเรศ และคณะ, 2548) จึงมีความเป็นไปได้ที่ความรุนแรงของเชื้ออาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด

ตารางที่ 6 แสดงค่าองค์ประกอบเลือดและระดับแอนติบอดีของปลานิลแดงแปลงเพศปกติ เปรียบเทียบกับปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

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 ± S.D.) followed by the same letter in a row do not differ significantly at $P = 0.05$

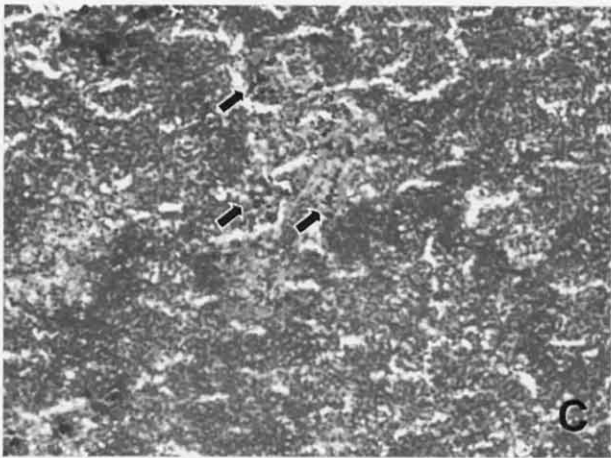
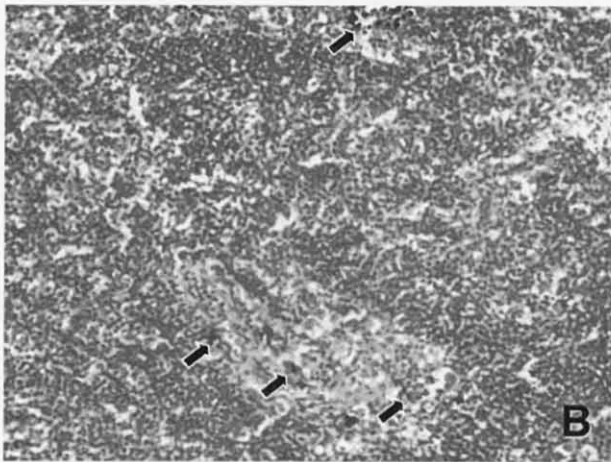
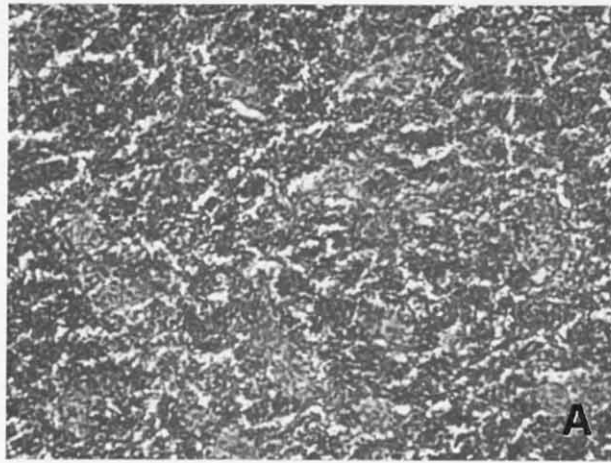
นอกจากนี้ผลการศึกษาายังพบว่าปลานิลแดงแปลงเพศที่รอดตายจากการติดเชื้อมีระดับของแอนติบอดี (antibody titre) ต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. สูงถึง 15.33 หน่วย เมื่อเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม (2.40 หน่วย) ซึ่งแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อในระดับนี้สามารถป้องกันปลาจากการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Eldar และคณะ (1997) ที่รายงานว่าปลา rainbow trout ที่ได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus iniae* จะมีระดับของแอนติบอดี (antibody titre) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันป้องกันการติดเชื้อ (protective immune response) สูงถึง 30 หน่วย ผลของระดับแอนติบอดีที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มปลาที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. จากการศึกษาครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้วัคซีนของเชื้อ *Streptococcus* sp. กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในปลานิลแดงแปลงเพศเพื่อป้องกันความสูญเสียเนื่องจากโรค Streptococcosis มีรายงานการพัฒนาวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลานิล พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้อง จะมีอัตราการรอดหลังจากชักนำให้มีการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* สูงถึง 93.7%

(Klesius *et al.*, 2000) หรือปลาไนล์ที่ได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยการฉีดเข้าช่องท้อง จะมีอัตราการรอดหลังจากชักนำให้มีการติดเชื้อประมาณ 80% (Evans *et al.*, 2004)

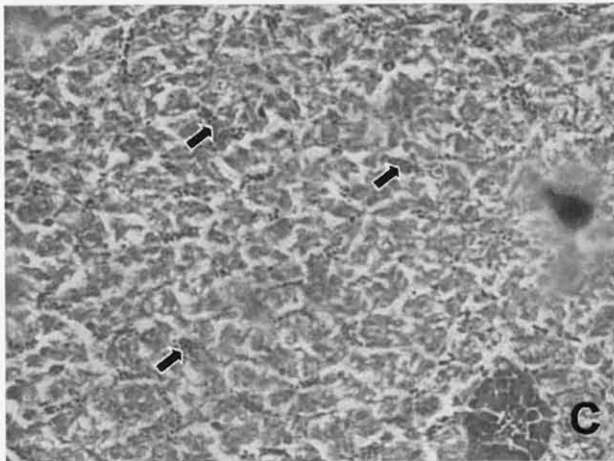
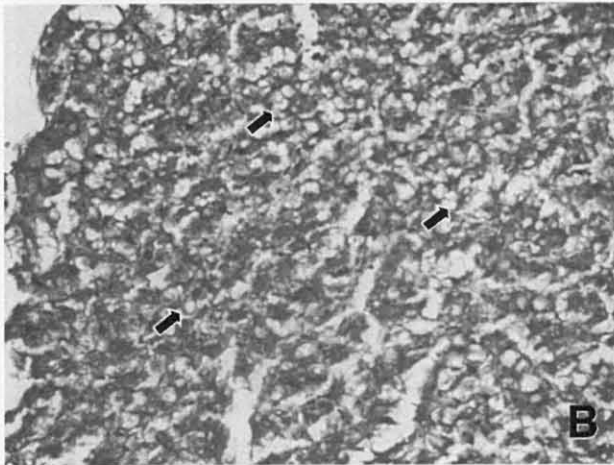
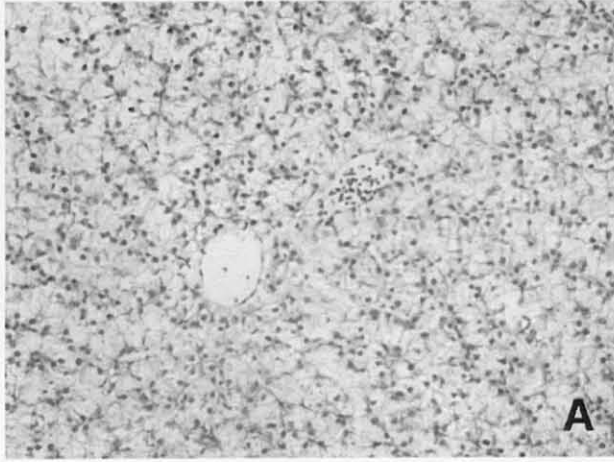
6. พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

จากการศึกษาพยาธิสภาพของการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลาไนล์แดงแปลงเพศ พบความผิดปกติของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยเฉพาะ ม้าม ตับ และสมอง โดยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ได้แก่ บริเวณเนื้อเยื่อม้าม พบ melanomacrophage และมีการสะสมของเมลานิน (melanisation) ที่มากผิดปกติ เนื้อเยื่อตับ พบการตาย (necrosis) หรือการสลาย (degeneration) ของเซลล์ตับ (hepatocyte) มีแวคิวโอล (vacuolization) แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ และมีการคั่งของเลือด (congestion) หรือการตกเลือด (haemorrhage) บริเวณตับ นอกจากนี้ยังพบการตาย (necrosis) ของเซลล์บริเวณสมอง และพบการคั่งของเม็ดเลือดแดง (congestion) ในเนื้อเยื่อสมอง (ภาพที่ 10 - 12) ซึ่งพยาธิสภาพที่พบในปลาไนล์แดงแปลงเพศจากการศึกษาครั้งนี้คล้ายคลึงกับพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่รายงานโดยเฉลิม และคณะ (2548) หรือปลาไนล์แดงแปลงเพศที่ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (นเรศ และคณะ, 2548) หรือในปลาไนล์ และปลา rainbow trout ที่ติดเชื้อ *Streptococcus shiloi* และ *Streptococcus difficile* (Eldar *et al.*, 1995)

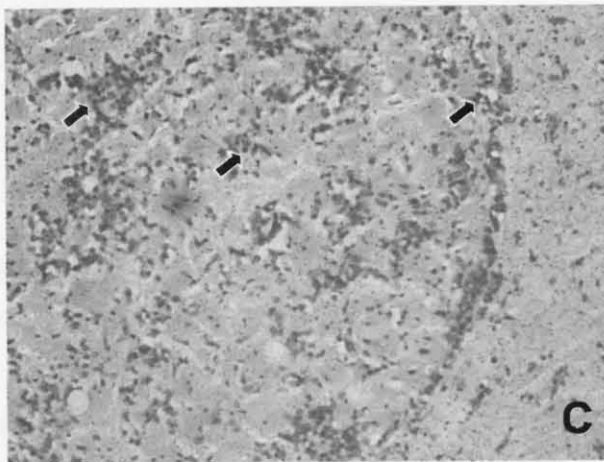
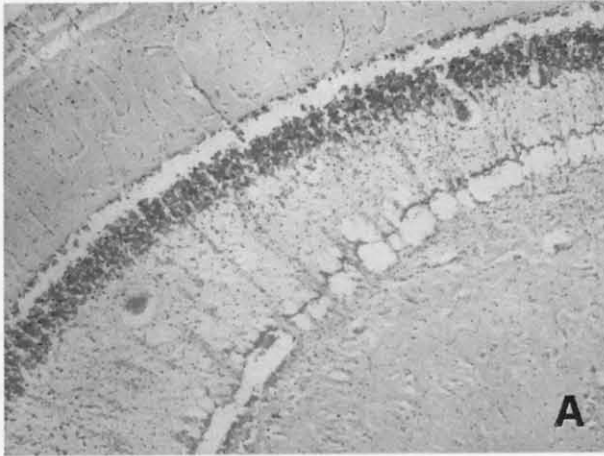
พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจะเป็นดัชนีบ่งชี้ความรุนแรงของการติดเชื้อ ปลาที่ติดเชื้อส่วนใหญ่มักจะตายหลังจากที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากของเนื้อเยื่อ จนโครงสร้างต่าง ๆ ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เป็นผลให้ร่างกายของปลาเสียหาย ผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่าสมองของปลาไนล์เป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญของเชื้อ *Streptococcus* sp. ซึ่งสอดคล้องกับอาการภายนอกของปลาที่ติดเชื้อรุนแรง ซึ่งมักพบว่ก่อนการตาย ปลาที่ติดเชื้อมักมีอาการทางประสาท เช่น ไม่สามารถทรงตัวได้ หรือว่ายน้ำผิดปกติ และสามารถแยกเชื้อ *Streptococcus* sp. จากสมองปลาได้



ภาพที่ 10 A แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อชั้นปกติกของปลาชนิดแดงแปลงเพศ
B, C พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อชั้นปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยพบ melanomacrophage
และมีการสะสมของเมลานิน (melanisation) ที่มากผิดปกติ (ครีซี) (H&E staining, 400x)



ภาพที่ 11 A แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อตัมปกติของปลานิลแดงแปลงเพศ
 B พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตัมปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยพบการตาย (necrosis) และการสลายของเซลล์ตัม และมีแควคิวโอลแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตัม (vacuolization) (ครีซี)
 C พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตัมปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยพบการคั่งของเม็ดเลือดแดง (congestion) (ครีซี) (H&E staining, 400x)



ภาพที่ 12 A แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อสมองปกติของปลานิลแดงแปลงเพศ
 B พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสมองปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยพบการคั่งของเม็ดเลือดแดง (congestion) (ศรชี้)
 C พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสมองปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยพบการตายของเซลล์นิวเคลียสหดตัว (ศรชี้) (H&E staining, 400x)