

การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ระบาดในฟาร์มปลานิล โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

Diagnosis of Bacterial Fish Pathogens Outbreak in Tilapia Farms by PCR-RFLP

จตุรนต์ ป้องน้ำไผ่ และ ชนกนันต์ จิตมนัส*
Jaturon Pongnumpai and Chanagun Chitmanat*

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290
Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

*Corresponding author: Email: chanagun1@hotmail.com

(Received: 4 January 2017; Accepted: 24 April 2017)

Abstract: Bacterial fish diseases cause huge economic loss to the aquaculture business. An accurate and rapid diagnosis is essential for disease prevention and treatment. This study aimed to apply traditional and PCR-RFLP means for fish pathogen identification. It was found that the bacterial disease outbreak in cultured fish in northern Thailand were the results of mixed infections since some bacteria were simultaneously isolated from infected fish. The common bacteria were *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. Clinical signs, gross morphological changes, and wet mount could be used to identify some bacterial infection. PCR-RFLP is just another molecular tool for the identification of pathogenic bacteria which is more suitable to detect a viral infection. However, disease prevention by good management practices are needed as it is extremely difficult for fish disease treatment.

Keywords: Fish diseases, fish diagnosis, *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp.

บทคัดย่อ: โรคติดเชื้อแบคทีเรียสร้างความเสียหายให้กับธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำนวนมาก การตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็วจะมีส่วนช่วยในการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำ งานวิจัยนี้เป็นการจำแนกเชื้อแบคทีเรียดั้งเดิมเปรียบเทียบกับที่ตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จากการศึกษา พบว่า การตายของปลาในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาในภาคเหนือของประเทศไทยเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เพราะสามารถแยกเชื้อได้หลายชนิดพร้อมกัน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุด คือ *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas* sp. และ *Streptococcus* sp. เชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรวจสอบได้จากอาการของปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย หรือการทำสไลด์เปียก (wet mount) การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี เป็นเพียงตัวช่วยเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อโรค ซึ่งน่าจะเหมาะสมสำหรับการตรวจเชื้อไวรัสแฝงมากกว่า อย่างไรก็ตาม การป้องกันโรคโดยการบริหารจัดการเลี้ยงที่ดีเป็นสิ่งที่จำเป็น เนื่องจากการรักษาโรคสัตว์น้ำทำได้ยาก

คำสำคัญ: โรคปลา การตรวจวินิจฉัย *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp.

คำนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงปลานิลสร้างรายได้และก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากมาย ผลผลิตปลานิลในประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 7 ต่อปี แต่ปี พ.ศ. 2558 มีผลผลิตประมาณ 196,614 ตัน ซึ่งลดลงประมาณ 4% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2557 (เกรวสิน, 2559) อย่างไรก็ตาม ในช่วงปีที่ผ่านมาธุรกิจการเลี้ยงปลานิลประสบปัญหาอากาศร้อนจัด และภัยแล้งทำให้ขาดแคลนน้ำ ภูมิอากาศที่แปรปรวนมีผลกระทบรุนแรงต่อลูกปลารายอ่อน (คณนา, 2559) รวมทั้งปัญหาโรคระบาดจากเชื้อแบคทีเรีย สร้างความเสียหายอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะโรคเหงือกเน่า ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Flavobacterium columnare* ทำให้ปลาเกิดโรคคออักเสบ (columnaris) (Grabowski *et al.*, 2004; Decostere *et al.*, 1997) แล้วยังพบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Aeromonas* sp. และโรคตาโปนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. แบคทีเรียที่พบบ่อยเหล่านี้ยังสร้างความเสียหายให้กับการเลี้ยงปลาทุก กบ และปลาน้ำจืดอื่นๆ และมักพบบ่อยในบ่อที่เลี้ยงด้วยอาหารสดหรือการเลี้ยงแบบผสมผสาน ซึ่งเชื้อตัวนี้จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำอยู่แล้วโดยเฉพาะแหล่งที่มีสารอินทรีย์สูง ความเครียดไม่ว่าจะเป็นการขนส่ง การเคลื่อนย้าย ปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ การให้อาหารที่ไม่ดี การมีปรสิตเกาะเป็นจำนวนมาก ล้วนแต่เป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อแบคทีเรีย (ชนกันต์, 2548) Ismail *et al.* (2016) รายงานว่า อุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีและมีผลต่อการย่อย

สลายสารอาหารในน้ำ โดยเฉพาะอาหารที่เหลือและสิ่งขับถ่ายจากปลา ทำให้เกิดปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่สูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งการป้องกันการระบาดของโรค ทำได้โดยการลดความบอบช้ำจากการจับและคัดขนาดปลา ไม่เลี้ยงปลาหนาแน่น ใส่กระวงอย่าให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำ (Bullock *et al.*, 1986) ในขณะที่อุณหภูมิต่ำในช่วงฤดูหนาวทางภาคเหนือ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของปลานิล (เกตุณัฏฐ์ และคณะ, 2556)

มีรายงานความเสียหายจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นระยะๆ ทั่วประเทศไทย ส่งผลให้เกษตรกรมีความเสี่ยงต่อการขาดทุน Dong *et al.* (2015) สามารถแยกเชื้อจากปลานิลที่เป็นโรคระบาดประกอบด้วยแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *F. columnare*, *A. veronii*, *P. shigeloides*, *S. agalactiae* และ *V. cholera* และไวรัส 1 ชนิด คือ Iridovirus การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคปลานิลอาจจะตรวจสอบจากอาการของโรค การตรวจลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร ลักษณะทางชีวเคมี การย่อยสลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งทำโดยบุคลากรที่มีความชำนาญและใช้เวลานานในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีชีววิทยาโมเลกุลเข้ามาเป็นส่วนสำคัญในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคพีซีอาร์ (Altinok *et al.*, 2008) เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010) หรือเทคนิคพีซีอาร์-ดีจีจีจี (Ji *et al.*, 2004) โดยเฉพาะเทคโนโลยีในการเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์ลำดับ DNA จะมีความไว

ถูกต้องและแม่นยำสูง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ
การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ระบาดในฟาร์ม
ปลาใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จาก 16s rDNA เป็น
ตัวช่วยเพื่อจำแนกและยืนยันชนิดของเชื้อก่อโรคในปลา
นิล Darwish and Ismaiel (2005) รายงานว่า ยีน 16S
rDNA เป็นยีนที่มีวิวัฒนาการน้อยหรือตั้งอยู่ในบริเวณ
อนุรักษ์ (a highly conserved gene) ทำให้สามารถใช้ใน
การจำแนกชนิดแบคทีเรียได้ โดยข้อมูลที่ได้อาจจะช่วย
อธิบายสายพันธุ์และความรุนแรงของเชื้อที่ศึกษา

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

บันทึกอาการของปลาที่เป็นโรคจากฟาร์มเลี้ยง
ในกระชังและบ่อดินพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย
จากนั้นแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลา โดยข้อมูลของ
แหล่งที่มาแสดงไว้ในตารางที่ 1 จำแนกเชื้อแบคทีเรียจาก
ลักษณะรูปร่างเซลล์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น
เชื้อแบคทีเรียถูกเลี้ยงในอาหาร tryptic soy agar
(TSA)(Difco™), tryptic soy broth (TSB)(Difco™),
modified ordal agar (MOA) และ modified ordal broth
(MOB) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง
รวมจำนวนทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดในตาราง
ที่ 1

การสกัด DNA จากเชื้อแบคทีเรีย

ทำการสกัด genomic DNA จากเชื้อแบคทีเรีย
ด้วย genomic DNA mini kit (Invitrogen) ตามวิธีที่
แนะนำโดยบริษัท และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการ
สกัดไปหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพด้วยเครื่องวัด
การดูดกลืนแสง Spectrophotometer (Nanodrop 1000
spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)

การทำ polymerase chain reaction (PCR)

ทำการคัดลอกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ
16s rDNA จาก genomic DNA ที่สกัดได้ โดยทำปฏิกิริยา
ในปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย Dreamtaq green PCR
master mix 12.5 µl, forward primer 27F 1 µl, reverse
primer 1492R 1 µl, nuclease-free water 9.5 µl และ
DNA template 1 µl และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16s
rDNA ให้มีปริมาณมากพอสำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป ด้วย
ปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase chain reaction (PCR) ด้วย
specific primers โดยมีลำดับเบส ได้แก่

27F-5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

1492R-5' CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT 3'

หมายเหตุ M = A or C และ expected PCR
product มีขนาด 1470 bp

Table 1. List of bacterial strains collected from diseased fish

Isolate	source	Fish farming	date
BT1	Black tilapia, Srigun farm, Sansai, Chiang Mai	pond	10 January 2015
BT2	Black tilapia, Um-pon farm, Sansai, Chiang Mai	pond	15 February 2015
BT3	Black tilapia, Terapong farm, Sansai, Chiang Mai	pond	2 March 2015
RT1	Red tilapia, Jaturong farm, Chun, Phayao	cage	22 April 2015
RT2	Red tilapia, Sompong farm, Chun, Phayao	cage	22 April 2015
S36	Black tilapia, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai	pond	20 December 2014
AF	Black tilapia, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai	pond	20 December 2014

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่อง T100™ Thermal Cycler โดย thermocycle program โดยป้อน PCR reaction ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ (initial denaturation) จากนั้นจึงเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR จำนวน 30 รอบ โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) จากนั้นลดอุณหภูมิลงเหลือ 60 °C นาน 45 วินาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับแบบจำเพาะกับไพรเมอร์ (annealing) แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิอีกครั้งที่ 72 °C นาน 2 นาที เพื่อให้เกิดการเพิ่มความยาวให้สายนิวคลีโอไทด์ (extension) เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 °C นาน 5 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่อย่างสมบูรณ์ (final extension)

เทคนิค PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

ในปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ Hae III ปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย Hae III enzyme (Thermo scientific, Thailand) 1.5 µl, 10x Buffer restriction 1.5 µl, nuclease-free water 11 µl และ PCR reaction mixture 6 µl จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2-16 ชั่วโมง และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยป้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบรูปแบบของขนาดของแถบดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดจำเพาะด้วย restriction enzyme Hae III โดยนำ digested PCR product ไป run ใน 1.5% agarose gel

electrophoresis วิเคราะห์ภายใต้รังสี ultraviolet ในเครื่อง Gel Doc™ XR+ and ChemiDoc™ XRS+ imaging systems

ผลการศึกษา

ลักษณะอาการของปลาที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* อย่างรุนแรง จะพบว่า ปลาจะลอยหัวขึ้นบริเวณผิวน้ำหรือบริเวณที่มีการเติมอากาศ เหงือกเน่าโดยมีลักษณะคล้ายดินตะกอนเกาะบริเวณเหงือก (ภาพที่ 1) เมื่อตัดบริเวณเหงือกไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นกลุ่มของแบคทีเรียรูปท่อนยาว รวมตัวกันมีลักษณะคล้ายกองฟาง (ภาพที่ 2) ในขณะที่ลักษณะเด่นของปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ตามาโปน ขุนขาว มีการตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ ตามลำตัวหรือบริเวณตา บางตัวจะว่ายน้ำควงส่ว (ภาพที่ 3) ส่วนปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. มักจะเป็นการติดเชื้อแบบฉวยโอกาส หลังจากบอบช้ำจากการลากอวนหรือการจับ (ภาพที่ 4) หากนำแบคทีเรียไปย้อมสีแกรม จะเห็นแบคทีเรีย *F. columnare* เป็นแบคทีเรียแกรมลบติดสีชมพู มีเป็นลักษณะแท่งยาว ส่วนแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกันแต่จะสั้นกว่า ในขณะที่ *Streptococcus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมติดสีน้ำเงิน (ภาพที่ 5)

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกจากปลาที่เป็นโรคจากแหล่งต่างๆ ทั้งหมด 7 เชื้อ จำแนกชนิดโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ Hae III จะพบว่ารูปแบบการตัดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 6) คือ



Figure 1 The appearance of necrosis gills infected by *Flavobacterium columnare* infections

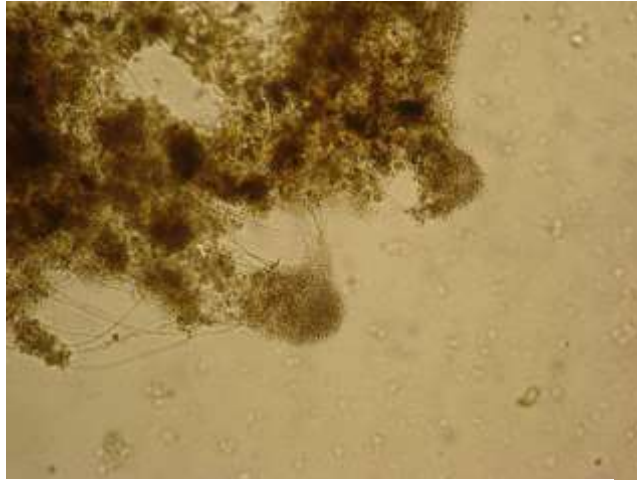


Figure 2. A wet mount of infected tissues observed under light microscopy (40x), the bacteria show a slow gliding movement, gathering into characteristic column-like masses or “haystacks”



Figure 3. Pin-point petechial hemorrhaging and exophthalmia caused by *Streptococcus* infection



Figure 4. Ulcer on skin of *Aeromonas* secondary infection

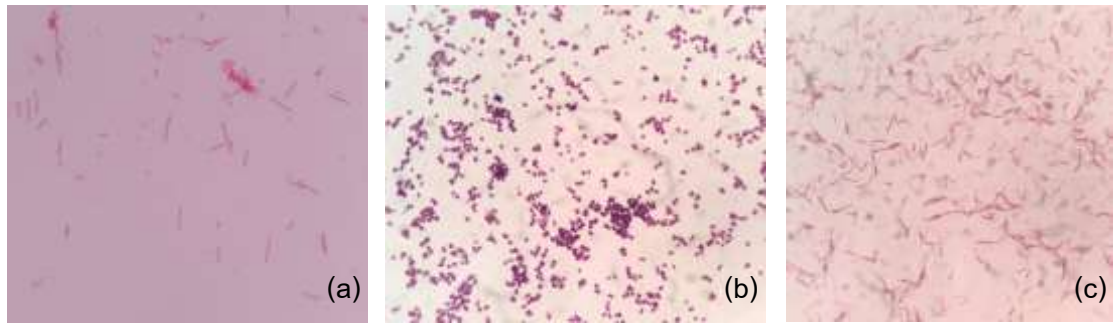


Figure 5. Morphological characteristics of a: *Flavobacterium columnare* b: *Streptococcus* sp. and c: *Aeromonas* sp. (100x)

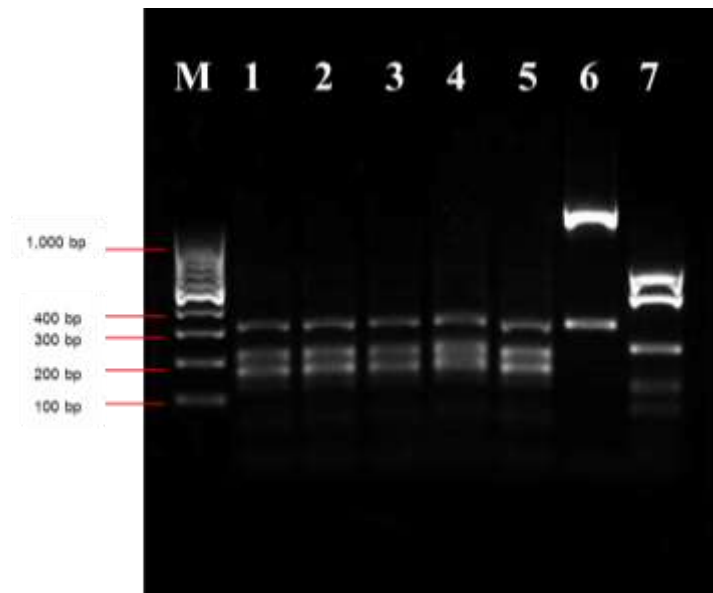


Figure 6. RFLP pattern after of the PCR-amplification products with the restriction enzyme, Hae III, Lane 1-5 = PCR-RFLP product of *Flavobacterium columnare* (BT1, BT2, BT3, RT4 และ RT2) Lane 6 = PCR-RFLP product of *Streptococcus* sp. (S36) Lane 7 = PCR-RFLP product of *Aeromonas* sp. (AF) M = 100 bp marker

การปรากฏแถบ 3 แถบ ขนาด 317, 210 และ 180 bp ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ปรากฏแถบ 2 แถบขนาด 1109 และ 346 bp ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. และการปรากฏแถบ 4 แถบ ขนาด 683, 629, 248 และ 170 bp ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. จึงแสดงให้เห็นว่า เทคนิค PCR-RFLP ในการวิจัยนี้ สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคออกเป็น 3 ชนิด และผลการแยกสายพันธุ์เชื้อก่อ

โรคในปลาโดยเทคนิค PCR-RFLP สอดคล้องกับการวินิจฉัยโรคจากผู้เชี่ยวชาญ

วิจารณ์

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าทุกตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียให้แถบ DNA ที่ 1470 bp และเมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตัดด้วย Hae III enzyme จะพบรูปแบบของการตัดเป็น 3 แบบ (ภาพที่ 6) คือการปรากฏของแถบ DNA

ขนาด 317, 210 และ 180 bp ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ปรากฏของแถบ DNA ขนาด 1109 และ 346 bp ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. และปรากฏของแถบ DNA ขนาด 839, 629, 248 และ 170 bp ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. จึงแสดงให้เห็นว่า เทคนิค PCR-RFLP ในงานวิจัยนี้ สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียออกเป็น 3 ชนิดได้อย่างชัดเจน และผลการแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR-RFLP นั้นทำได้รวดเร็วกว่าการแยกชนิดเชื้อโดยวิธีเดิม ๆ ที่ต้องรอให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนที่จะไปจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมี

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* เมื่อทดสอบโดยวิธี PCR-RFLP แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม เชื้อที่ใช้มีเพียง 5 ไอโซเลต ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีเพียงชนิดละ 1 ไอโซเลต ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า หากใช้เทคนิคนี้ตรวจวินิจฉัยโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. และ *Streptococcus* spp. แล้วอาจไม่ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่ปัจจุบันพบว่ามียังน้อย 2 ชนิดที่ก่อโรคในปลานิล คือ *S. iniae* และ *S. agalactiae* และเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่พบว่ามีอย่างน้อย 2 ซีโรไทป์ ที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคในปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทย

ปลาติดที่เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* หากอาการรุนแรงสามารถตรวจสอบได้จากลักษณะภายนอกของปลา หรือชุดบริเวณรอยโรคหรือตัดชิ้นเนื้อไปดูลักษณะการรวมตัวของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขาญณรงค์ (2559) กล่าวว่า การจำแนกโรคทำได้โดยสังเกตจากอาการและรอยโรค การทำการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย และการตรวจสอบหาเชื้อก่อโรคโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [polymerase chain reaction (PCR) technique] ขนกันต์ (2556) กล่าวว่าอาการทางคลินิกของปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ลำตัวปลามีสีด่างซีดเป็นแถบ ๆ มีเมือกมาก ครีบและเหงือกกร่อน อาจมีสีเหลือง

เกิดขึ้นบริเวณบาดแผล ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. จะว่ายน้ำเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร ครีบกร่อน มีการตกเลือด เกิดบาดแผล ท้องบวม ตับเหลือง มีการตกเลือดบริเวณลำไส้ จะทำให้ปลามีบาดแผลตามลำตัว ปลาที่ติดเชื้อจะแสดงอาการรุนแรงแบบเฉียบพลัน โดยมีลักษณะท้องมาน บวมน้ำ และเป็นแผลตื้นเรื้อรังหรือตายภายในระยะเวลา 3-5 วัน (Angka et al., 1995) และปลาที่เชื้อติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. จะมีตาขุ่นขาวและโปน ไม่ค่อยว่ายน้ำ ลอยนิ่ง บางตัวว่ายน้ำควงส่ว้น ซ่องซบท้ายบวมแดง มีหนองแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อ ตับและม้ามซีด เนื่องจากการตายของเซลล์ในอวัยวะดังกล่าว สามารถแยกเชื้อได้จากสมองเช่นกัน (นิลบล และคณะ, 2549)

จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* เนื่องจากไม่พบว่าเอนไซม์ตัดให้เกิดแถบดีเอ็นเอเพิ่มเติม แสดงว่า การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคนี้ อาจจะเป็นไปได้ เนื่องจากไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกจากพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทย นอกจากนี้ควรศึกษาถึงความไว (sensitivity) ของการตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วย

สรุป

เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่มีความถูกต้องรวดเร็วและแม่นยำ โดยเชื้อก่อโรคที่ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มี 3 ชนิด คือเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas* sp. และ *Streptococcus* sp.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูบบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร ศิษย์ก้นกุฏิ บัณฑิตวิทยาลัย คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนและสถานที่ทำการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เกตุณภัฏ ศรีไพโรจน์ รุ่งกานต์ กล้าหาญ พงศ์นรินทร์ เมฆขุนทด และ ทองอยู่ อุดเลิศ. 2556. การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ปลานิลที่เลี้ยงในจังหวัดพะเยา. วารสารเกษตร 29(2): 137-144.
- เกวลิน หนูฤทธิ์. 2559. สถานการณ์ปลานิลและผลิตภัณฑ์ปี 2556 และแนวโน้มปี 2557. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Doc/fishnews_169.pdf (12 ตุลาคม 2559).
- คณนา อาจสูงเนิน. 2559. การสำรวจรูปแบบการเพาะเลี้ยงปลาเชิงพาณิชย์ในหมู่บ้านปงหลวง อำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย. วารสารเกษตร 32(3): 409-419.
- ชนกันต์ จิตมนัส. 2548. โรคปลา. เอกสารประกอบการสอนคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่, 156 หน้า.
- ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. โรคปลานิล. เชียงใหม่สัตว์แพทย์สาร 11(1): 75-86.
- ชาญณรงค์ รอดคำ. 2559. โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.micro.vet.chula.ac.th/index.php/doc/doc_download/57- (13 ตุลาคม 2559).
- นิลบล กิจอันเจริญ ชูติมา หาญจวนิช และ นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2549. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. วารสารวิจัย มช. 11(1): 53-61.
- Altinok, I., E. Capkin and S. Kayis. 2008. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. Veterinary Microbiology 131(3-4): 332-338.
- Angka, S.L., T.J Lam and Y.M. Sin. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 130(2): 103-112.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Alperi, N. Buján, J.L. Romalde and M.J. Figueras. 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. Systematic and Applied Microbiology 33(3): 149-153.
- Bullock, G.L., T.C. Hsu and E.B. Shotts Jr. 1986. Columnaris disease of fishes. Fish Disease Leaflet 72, Fish and Wildlife Service, United States Department of Interior, Washington, D.C. 9 p.
- Darwish, A.M. and A.A. Ismaiel. 2005. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. Molecular and Cellular Probes 19(4): 267-274.
- Decostere, A., F. Haesebrouck and L.A. Devriese. 1997. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. Journal of Clinical Microbiology 35(1): 322-324.
- Dong, H.T., V.V. Nguyen, H.D. Le, P. Sangsuriya, S. Jitrakorn, V. Saksmerprom, S. Senapin and C. Rodkhum. 2015. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. Aquaculture 448: 427-435.

- Grabowski, L.D., S.E. LaPatra and K.D. Cain. 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. Journal of Fish Diseases 27(10): 573-581.
- Ji, N., B. Peng, G. Wang, S. Wang and X. Peng. 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. Journal of Microbiological Methods 57(3): 409-413.
- Ismail, N.I.A., M.N.A. Amal, S. Shohaimi, M.Z. Saad and S. Z. Abdullah. 2016. Associations of water quality and bacteria presence in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*. Aquaculture Reports 4: 57-65.
-