การแยกวินิจฉัยและการก่อโรคของ
เชื้อคริสซีโอแบคทีเรียม อินโดโลจีเนส ในปลาทับทิม (โอรีโอโครมีส เอสพี)

นายอภิรัฐ วีราภรณ์ประสิทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF *CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES* IN RED TILAPIA (*OREOCHROMIS* SP.)

Mr. Apirat Weerapornprasit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology
Department of Veterinary Pathology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกวินิจฉัยและการก่อโรคของเชื้อคริสซีโอแบคทีเรียม อินโดโลจีเนส ในปลาทับทิม (โอรีโอโครมีส เอสพี)
โดย	นายอภิรัฐ วีราภรณ์ประสิทธิ์
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ชาญณรงค์ รอดคำ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นพดล พิฬารัตน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ชาญณรงค์ รอดคำ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นพดล พิฬารัตน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อรัญญา พลพรพิสิฐ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สำราญ บรรณจิรกุล)

อภิรัฐ วีราภรณ์ประสิทธิ์ : การแยกวินิจฉัยและการก่อโรคของเชื้อคริสซีโอแบคทีเรียม อินโดโลจีเนส ในปลาทับทิม (โอรีโอโครมีส เอสพี) (IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF *CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES* IN RED TILAPIA (*OREOCHROMIS* SP.)) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. น.สพ. ดร. ชาญณรงค์ รอดคำ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. น.สพ. ดร. นพดล พิฆารัตน์, 70 หน้า.

การศึกษานี้เพื่อวินิจฉัยและศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมในประเทศไทย จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยจำนวน 100 ตัวอย่างนำมาเพาะเชื้อแบคทีเรียจากตับ ม้าม ไต ได้แบคทีเรียโคโลนีสีเหลืองจำนวน 20 ไอโซเลทที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *C. indologenes* นำตัวอย่างแยกวินิจฉัยเชื้อด้วยลักษณะปรากฏและคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อและเลือกตัวอย่างที่มีผลใกล้เคียงกับเชื้อ *C. indologenes* จำนวน 5 ไอโซเลททำการวินิจฉัยลักษณะทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วนของ16s rRNAและหาลำดับเบสผลการทดสอบเชื้อ *C. indologenes* ทั้งหมด 5 ไอโซเลทพบว่า 4 ไอโซเลทมีความเหมือนของลำดับเบสที่ 99 % กับเชื้อ *C. indologenes* จากนั้นนำเชื้อ *C. indologenes* ทั้ง 4 ไอโซเลทมาทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อในห้องปฏิบัติการได้แก่ คุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อและเลือกเชื้อ 1 ไอโซเลทที่มีความรุนแรงมากที่สุดเพื่อใช้ทดสอบหาค่า LD_{50} ในปลาทับทิม โดยการฉีดเชื้อทางช่องท้องที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ $2.9x10^5$, $2.4x10^6$ and $1.4x10^7$ CFU/fish และสังเกตพฤติกรรมและบันทึกอัตราการตาย 10 วันหลังการฉีดเชื้อและคำนวณค่า LD_{50} จากการศึกษาพบว่าค่า LD_{50} ที่ระยะเวลา 10 วันเท่ากับ $2.78x10^6$ CFU/fish โดยปลาทับทิมทุกตัวที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* แสดงอาการทางคลินิก เช่น เบื่ออาหาร สูญเสียสมดุลย์ รวมถึงความผิดปกติภายในได้แก่ ม้ามโต ตับโต และความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาพบก้อนเนื้อตายแบบรุนแรงและการเพิ่มขึ้นของ melanomacrophage center (MMC) ในอวัยวะดังกล่าว ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *C. indologenes* สามารถเป็นเชื้อก่อโรคได้ในปลาทับทิม

ภาควิชา พยาธิวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5575330331 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY
KEYWORDS: CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES / PATHOGENICITY / RED TILAPIA / FISH DISEASE

APIRAT WEERAPORNPRASIT: IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF *CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES* IN RED TILAPIA (*OREOCHROMIS* SP.). ADVISOR: ASST. PROF. CHANNARONG RODKHUM, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NOPADON PIRARAT, Ph.D., 70 pp.

Chryseobacterium indologenes has been proposed as a main pathogen in diseased outbreaks in red tilapia farms from our pilot research. The aims of this study were to identify C. indologenes in diseased outbreaks and to study the pathogenicity of C. indologenes infection in red tilapia. One hundred diseased tilapias with clinical signs of septicemia were collected. Twenty isolates of yellow pigmented colonies recovered from liver, spleen, and kidney of diseased fish were suspected to be C. indologenes. All isolates were identified by phenotypic and biochemical characteristics. The results revealed the twenty isolates were identified as Chryseobacterium sp based on its biochemical property. Five isolates which biochemical characteristics closed to C. indologenes were further selected for genotypic identification by PCR amplification of partial 16s rRNA and sequencing. Four isolates which were 99 % homology to C. indologenes, were studied for pathogenicity using in vitro haemolytic and enzymatic activities. One isolate with highest pathogenicity was selected for virulence determination by LD_{50} test. Thirty healthy red tilapias were intraperitoneally challenged at three different bacterial concentrations. Mortality rate was observed after injection and calculated for dose dependent. The LD_{50} value was $2.78x10^{6}$ CFU/fish. During ten days-challenge period, moribund fish exhibited clinical signs of anorexia, loss of balance. Gross lesions showed the marked splenomegaly, hepatomegaly. Histopathological study revealed multiple granulomas , melano-macrophage centers. The results suggested that the pathogenic bacterium and can be a cause of infectious problem in red tilapia

Department: Veterinary Pathology Student's Signature .....
Field of Study: Veterinary Pathobiology Advisor's Signature .....
Academic Year: 2014 Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เพราะความเมตตากรุณาอย่างสูงจากอาจารย์หลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.น.สพ.ดร. ชาญณรงค์ รอดคำขอขอบพระคุณอย่างสูง สำหรับคำแนะนำปรึกษา ตรวจทานปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งเพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์ รวมทั้ง ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.น.สพ.ดร. นพดล ฟิฟารัตน์ สำหรับคำแนะนำส่วนพยาธิวิทยา

ขอขอบคุณ คุณสุภาพ กำลังแพทย์ สำหรับความช่วยเหลือคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคด้านการเพาะเชื้อและให้คำปรึกษาแนวทางการทำงาน นอกจากนี้ขอขอบคุณบุคลากรสนับสนุนวิชาการนิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจเพื่อให้งานวิจัยนี้บรรลุผลสำเร็จ

ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 25 สำหรับการสนับสนุนทุนในการทำวิจัยครั้งนี้ให้มีคุณภาพและบรรลุผลสำเร็จอย่างราบรื่น

ขอขอบพระคุณครอบครัววีราภรณ์ประสิทธิ์ ที่คอยเป็นกำลังใจตลอดมาและสกุลสินสมุทรในการสนับสนุนด้านเงินทุนในการเรียนและค่าใช้จ่ายทุกๆอย่างตลอดจนเพื่อนทุกคนที่ให้กำลังใจและอยู่เบื้องหลังของความสำเร็จในงานวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 คำสำคัญ..... 3

1.4 Keywords..... 3

1.5 คำถามสำหรับการวิจัย / สมมติฐานการวิจัย..... 3

1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย..... 4

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร..... 5

2.1 ประวัติของเชื้อ *C. indologenes*..... 5

2.2 ชีววิทยาของเชื้อ *C. indologenes*..... 6

2.3 ปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes*..... 7

2.3.1 คุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)..... 7

2.3.2 คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ต่างๆ (enzymatic activity) (Madigan et al.,2000)... 7

2.4 พยาธิวิทยาของการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ในปลา..... 9

2.5 ระบาดวิทยา..... 9

2.6 การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ..... 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.6.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะแยกเชื้อ 10
2.6.2 การแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* 11
2.6.3 การทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในห้องปฏิบัติการ 15
2.6.4 การทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* 15
บทที่ 3 วิธีการทดลองหรือระเบียบวิธีวิจัย 17
3.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะแยกเชื้อ *C. indologenes* 17
3.2 การแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย 19
3.2.1 การเตรียมปลาทับทิมป่วยเพื่อเก็บตัวอย่างจากอวัยวะภายใน 19
3.2.2 เพาะแยกเชื้อจากอวัยวะภายใน 19
3.2.3 การแยกวินิจฉัยเชื้อด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ 19
3.2.4 การตรวจยืนยันเชื้อ *C. indologenes* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ; PCR) และการหาลำดับเบส (Nucleotide sequencing) 20
3.3 การทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย 21
3.3.1 การทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (heamolytic activity) 21
3.3.2 คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ (enzyme activity) 22
3.4 การศึกษาการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม 23
5.3 สรุปผลการวิจัย 25
3.5 การศึกษาจุลพยาธิวิทยาในปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* 26
3.6 วิเคราะห์ผลการทดลอง 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง 29
4.1 การเก็บตัวอย่างอวัยวะจากปลาทับทิมป่วย 29

หน้า

4.2 ผลการศึกษาการแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย..... 31

4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยในห้องปฏิบัติการ..... 36

4.3.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (heamolytic activity)..... 36

4.3.2. ผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ (enzyme activity)..... 36

4.4 ผลการศึกษาการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมทดลอง... 39

4.5 ผลการศึกษาจุลพยาธิวิทยาในปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8..... 44

บทที่ 5 อธิปรายและสรุปผลการทดลอง..... 50

5.1 การแยกและพิสูจน์เชื้อ *C. indologenes*..... 50

5.2 การก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes*..... 51

5.3 สรุปผลการวิจัย..... 54

รายการอ้างอิง..... 55

ภาคผนวก..... 64

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงหน้าที่การทำงานของเอมไซม์ที่ส่งผลต่อปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* 8

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* 13

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลตัวอย่างปลาทับทิมป่วยที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา 18

ตารางที่ 4 รายละเอียดข้อมูลของ universal primer สำหรับใช้แยกชนิดเชื้อ 21

ตารางที่ 5แสดงการแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามรูปแบบการเลี้ยงของตัวอย่างปลาทับทิมป่วย 29

ตารางที่ 6 แสดงการแบ่งกลุ่มตัวอย่างจากข้อมูลและลักษณะทางกายภาพภายนอกและภายในของตัวอย่างปลาทับทิมป่วย 100 ตัวอย่าง 29

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิม จำนวน 20 เชื้อ 34

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิม จำนวน 20 เชื้อ 34

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยในห้องปฏิบัติการ 37

ตารางที่ 9 แสดงอัตราการตายของปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* 40

ตารางที่ 10 จำนวนปลาทับทิมที่พบรอยโรคภายนอกและภายในหลังจากได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 43

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1แสดงที่มาของตัวอย่างปลาทับทิมป่วยในบริเวณภาคกลางและภาคตะวันออกประเทศไทย... 17

รูปที่ 2 แสดงภาพกระชังในแม่น้ำ (รูปซ้าย) กระชังในบ่อดิน (รูปขวา)..... 17

รูปที่ 3 แสดงวิธีการวัด clear-zone โดยวัดจากขอบของโคโลนีถึงบริเวณขอบของ clear-zone ในการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ (enzyme activity) จากหัวลูกศรด้านหนึ่งไปถึงหัวลูกศรอีกด้านหนึ่ง..... 23

รูปที่ 4 แสดงรอยโรคภายนอกจากตัวอย่างของปลาทับทิมป่วย ได้แก่ ท้องบวม (วงกลม) ครีบเปื่อย(ลูกศร) (ด้านซ้าย) จุดเลือดออกตามลำตัว (วงกลม)(ด้านขวา)..... 30

รูปที่ 5 แสดงรอยโรคภายนอกจากตัวอย่างของปลาทับทิมป่วย ได้แก่ แผลหลุม (วงกลม) (ด้านซ้าย) ปื้นเลือดออกตามลำตัว (ลูกศร) (ด้านขวา)..... 30

รูปที่ 6 แสดงรอยโรคภายในจากตัวอย่างของปลาทับทิมป่วย ได้แก่ ตับโตและจุดเลือดออกบริเวณตับ (ลูกศร) (ด้านซ้าย) ม้ามโต (ลูกศร) (ด้านขวา)..... 30

รูปที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Shieh agar ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า..... 31

รูปที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า..... 32

รูปที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 % sheep blood agar ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า..... 32

รูปที่ 10 คุณสมบัติการสร้าง flexirubin ของเชื้อ *C. indologenes* ทดสอบกับน้ำยา 20% KOH โดยลักษณะของโคโลนีที่ให้ผลบวกนั้นสีของโคโลนีจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มถึงน้ำตาล..... 33

รูปที่ 11 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. indologenes* ด้วยการย้อมสีแกรม (กำลังขยาย 1000 เท่า).... 33

รูปที่ 12 แสดงภาพ PCR product ของเชื้อ *C. indologenes* บน agarose gel electrophoresis ขนาดประมาณ 1325 bp โดยใช้ forward primer UN-20 และ reverse primer R1438..... 35

รูปที่ 13 แสดงผลการศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ gelatinase (ด้านซ้าย) proteinase (ด้านขวา) โดยพบลักษณะ clear zone ของเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8..... 37

รูปที่ 14 แสดงผลการศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ lipase lecithinase ของเชื้อ *C. indologenes* ให้ผลบวก (ด้านซ้าย) และคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar แต่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (ด้านขวา)..... 38

รูปที่ 15 แผนภูมิแท่งแสดงการเปรียบเทียบผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ gelatinase และ proteinase ของเชื้อ *C. indologenes* ไอโซเลทต่างๆ..... 38

รูปที่ 16 กราฟเส้นแสดงระยะเวลาในการเริ่มแสดงอัตราการตายของปลาทับทิมหลังได้รับเชื้อ 41

รูปที่ 17 แผนภูมิแสดงอัตราการตายเฉลี่ยของปลาทับทิมหลังได้รับเชื้อ *C. indologenes* 41

รูปที่ 18 แสดงลักษณะรอยโรคภายในและภายนอกจากปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ 42

รูปที่ 19 จุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8..... 45

รูปที่ 20 จุลพยาธิวิทยาของม้ามปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8..... 47

รูปที่ 21 จุลพยาธิวิทยาของไตปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8..... 49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

ปลาทับทิมหรือปลานิลแดง (red tilapia, *Oreochromis* sp.) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ซึ่งปลาทับทิม (red tilapia) และปลานิล (nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืดสายพันธุ์หลักที่นิยมเพาะเลี้ยง (กรมประมง, 2555) โดยคิดเป็นร้อยละ 45 ของการเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมดในประเทศไทย เนื่องจากให้ผลผลิตและมีความต้านทานต่อโรคสูง เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย (สุดา ตัณฑวณิช 2554) รูปแบบการเลี้ยงปลาทับทิมของเกษตรกรมีหลายแบบ เช่น บ่อดิน บ่อซีเมนต์ กระชังไนลอนตาถี่ เป็นต้น ปัจจุบัน ผลผลิตปลาทับทิมยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคดังนั้นเกษตรกรจึงนำวิธีการต่างๆมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ เช่น การปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นมากส่งผลก่อให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจน ปัญหาคุณภาพน้ำต่างๆ ในการเลี้ยง (จิตมนัส, 2554) ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมที่มีความแปรปรวนสูง เช่น อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง ความเป็นกรดด่างที่มากหรือน้อยเกินไปมีโอกาสโน้มนำให้เกิดภาวะความเครียดและส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้ (Madigan et al., 2000) การที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อมอยู่ก่อนแล้วย่อมทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคขึ้นในฟาร์ม เช่น โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เป็นต้น โดยปัจจัยต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากความต้องการเพิ่มผลผลิตจำนวนมากเกินไปนี้เอง จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาสมีบทบาทมากขึ้นในการก่อโรคต่อสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มคริสซีโอแบคทีเรียมสปีชีส์ (*Chryseobacterium* sp.) (Bernardet et al., 2005) ซึ่งเป็นเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยพื้นที่ที่มีการรายงานของเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ในปลา เช่น อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และ ยุโรป (de Beer et al., 2006; Ilardi et al., 2009; Kampfer et al., 2011; Zamora et al., 2012b; Pridgeon et al., 2013) โดยเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ที่สามารถก่อโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *C. shigense, C. chaponense* (Kampfer et al., 2011; Zamora et al., 2012b) *C. piscola* (Ilardi et al., 2009) *C. piscium* (de Beer et al., 2006) และ *C. indologenes* (Pridgeon et al., 2013) เป็นต้น

เชื้อ *Chryseobacterium* sp. สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ที่พบภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Chou et al., 2011) โดยเฉพาะเชื้อ *C. indologenes* มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในมนุษย์พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. indologenes* จะแสดงอาการต่างๆ เช่น ปอดบวม ติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ส่วนการศึกษาในสัตว์ยังมีอย่างจำกัดเชื้อ *C. indologenes* ไม่มีการรายงานการก่อโรคในสัตว์เลี้ยงแต่สามารถแพร่กระจายได้ในสิ่งแวดล้อมในสัตว์น้ำและฟาร์มปลา (Bernardet et al., 2005) โดยในปี 2013 นักวิจัยจากประเทศสหรัฐอเมริกาได้ศึกษาแยกเชื้อและพิสูจน์ความรุนแรงของ *C. indologenes* รวมถึงรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. indologenes* ในปลา yellow perch (*Perca flavescens*) ที่ทดลองนั้นมีลักษณะเป็นแผลหลุมหรือแผลเปื่อยที่บริเวณผิวหนังและกล้ามเนื้อ (Pridgeon et al., 2013) และจากการรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้องจะเห็นได้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับความรุนแรงในการติดเชื้อ *C. indologenes* ในปลาชนิดต่าง ๆ ทั่วโลกยังมีอยู่อย่างจำกัด รวมถึงในประเทศไทยซึ่งยังไม่มีการประเมินความสำคัญในการก่อโรคดังกล่าวและยังไม่มีรายงานอุบัติการณ์การเกิดโรคในปลา ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาและมูลเหตุจูงใจในการวินิจฉัยและการศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม โดยทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยและยืนยันชนิดสปีชีส์ โดยการหาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิรวมถึงตรวจยืนยันด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา จากนั้นนำเชื้อทดสอบความรุนแรงในห้องปฏิบัติการโดยการหาค่า LD_{50} ที่ระยะเวลา 10 วันในปลาทับทิม และทำการศึกษาพยาธิสภาพของปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* ซึ่งผลที่ได้รับจากการศึกษานี้น่าจะมีความสำคัญต่อความเข้าใจเกี่ยวกับการก่อโรคของ *C. indologenes* ในปลาทับทิม เพื่อนำไปสู่การวินิจฉัยโรคในฟาร์มปลาทับทิมได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อีกทั้งยังสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนางานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมได้ต่อไป

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากปลาทับทิมที่ป่วยจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดต่างๆ

1.2.2 เพื่อทดสอบการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมและตรวจสอบพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น

1.3 คำสำคัญ

คริสซีโอแบคทีเรียม อินโดโลจีเนส ความสามารถในการก่อโรค ปลาทับทิม โรคปลา

1.4 Keywords

Chryseobacterium indologenes, pathogenicity, red tilapia, fish disease

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.5 คำถามสำหรับการวิจัย / สมมติฐานการวิจัย

1.5.1 เชื้อ *C. indologenes* สามารถแยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย

1.5.2 เชื้อ *C. indologenes* สามารถก่อโรคได้ในปลาทับทิม

1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย

คำถามสำหรับการวิจัย

1. เชื้อ *C. indologenes* สามารถแยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย
2. เชื้อ *C. indologenes* สามารถก่อโรคได้ในปลาทับทิม

วิธีการวิจัย

1. แยกและวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากปลาทับทิมป่วย โดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อและการพิสูจน์ยืนยันด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) พิจารณาจากลำดับเบสของยีน16s-rRNA ของเชื้อ *C. indologenes*
2. การศึกษาความรุนแรงของเชื้อจากไอโซเลทที่มีความรุนแรงสูงสุดในการทดสอบในห้องปฏิบัติการ
3. การศึกษาความรุนแรง LD_{50} ที่ระยะเวลา 10 วันของเชื้อไอโซเลทที่มีความรุนแรงสูงสุดในปลาทับทิมทดลองรวมถึงการศึกษาพยาธิสภาพจากตัวอย่างปลาทับทิมที่ตายจากการได้รับเชื้อ *C. indologenes*

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลคุณลักษณะทางจีโนไทป์ของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม
2. ข้อมูลเกี่ยวกับความรุนแรงของการติดเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม
3. ข้อมูลทางพยาธิวิทยาของการติดเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ประวัติของเชื้อ *C. indologenes*

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *Chryseobacterium indologenes* จัดอยู่ในอาณาจักร *Bacteria* ไฟลัม *Bacteroidetes* ชั้น *Flavobacteria* ลำดับ *Flavobacteriales* วงศ์ *Flavobacteriaceae* สกุล *Chryseobacterium* สปีชีส์ *indologenes* โดย *C. indologenes* หรือชื่อก่อนหน้านี้ *Flavobacterium indologenes* เดิมเคยมีรายงานว่าประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *C. balustinum C. gleum C. indologenes C. indolthticum C. meningosepticum* และ *C. scophthalm* (Von Graevenitz, 1995) หลังจากนั้นมีการรายงานสปีชีส์ใหม่มากมายจนปัจจุบันมีการรายงานมากถึง 59 สปีชีส์ (Euzeby, 2011) การก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* มีลักษณะการก่อโรคแบบฉกฉวยโอกาสพบได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยในมนุษย์พบครั้งแรกในปี 1993 แยกได้จากตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากหลอดลมในผู้ป่วยปอดอักเสบจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ (Bonten et al., 1993) ซึ่งเชื้อ *C. indologenes* เป็นเชื้อที่สามารถแยกได้มากที่สุดจากตัวอย่างส่งตรวจแต่เป็นเชื้อที่พบได้ยากในมนุษย์และไม่จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นแต่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดย *C. indologenes* สามารถเป็นสาเหตุในการติดเชื้อชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรียในกระแสเลือด ปอดอักเสบ สมองอักเสบ ซึ่งสามารถพบอุบัติการณ์ใน เด็กทารก ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องทุกช่วงกลุ่มอายุ (Kienzle et al., 2000) นอกจากนั้นยังพบการรายงานของเชื้อ *C. indologenes* ในสิ่งแวดล้อมหลายชนิด อาทิเช่น ดิน (Weon et al., 2008) พืช (Cho et al., 2010) น้ำจืด (Kim et al., 2008; Park et al., 2008) น้ำทะเล (Maravic et al., 2013) เป็นต้น ซึ่งการศึกษาการแยกเชื้อและการก่อโรคของเชื้อในสัตว์นั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยการก่อโรคมักจะเกิดในสัตว์ที่มีภาวะความเครียดหรือภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Chou et al., 2011) ซึ่งไม่พบการรายงานการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในสัตว์เลี้ยงแต่พบการแพร่กระจายของเชื้อในสิ่งแวดล้อมของสัตว์น้ำ (Bernardet et al., 2005) และพบการระบาดในฟาร์มปลา เช่น ปลา Yellow perch (Pridgeon et al., 2013) และสัตว์น้ำชนิดอื่นๆได้ เช่น กบนา กบบลูฟรอก (ชาญณรงค์ รอดคำ 2554) เป็นต้น การศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในปลายังมีอย่างจำกัด พบการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในปลา yellow perch ในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2013 ซึ่งลักษณะอาการที่แสดงออกหลังการได้รับเชื้อได้แก่ การสูญเสียการทรงตัว ความอยากอาหารลดลง และพบรอยโรค

แผลหลุมบริเวณลำตัวและโคนหาง (Pridgeon et al., 2013) นอกจากนั้นยังพบรายงานการก่อโรคในกบที่ติดเชื้อ *C. indologenes* ได้แก่ น้ำหนักลด ท้องบวมกาง บวมน้ำ กระจกตาขุ่นและอักเสบ (ชาญณรงค์ รอดคำ 2554)

2.2 ชีววิทยาของเชื้อ *C. indologenes*

เชื้อ *Chryseobacterium* sp. จัดอยู่ในวงศ์ *Flavobacteriaceae* ล่าสุดในปี 2011 พบการรายงานสปีชีส์ใหม่ๆ มากถึง 59 สปีชีส์ (Euzeby, 2011) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (trypticase soy agar) โคโลนีสีเหลืองนูน เรียบ มันเงา กลมขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร และบางโคโลนีรูปแบบไม่แน่นอน (Maravic et al., 2013) เชื้อสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 18 - 32 องศาเซลเซียส และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Mudarris et al., 1994) เมื่อนำเซลล์ย้อมสีแกรม จะเห็นลักษณะ รูปร่างแท่ง ติดสีแดง แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ โดยเชื้อ *C. indologenes* มีคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น เชื้อไม่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเอง (non-motile) เชื้อมีคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ catalase รวมถึงการสร้างเอนไซม์ cytochrome oxidase C และเมตาโบลิซึมน้ำตาลได้ในภาวะที่มีออกซิเจน (O/F test) นอกจากนั้นเชื้อ *C. indologenes* สามารถสร้าง flexirubin โดยการทดสอบด้วยน้ำยา 20% KOH โคโลนีเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มถึงน้ำตาล (Maravic et al., 2013) และเชื้อสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างพลังงาน (citrate test) และ สามารถสร้างสาร indole (indole test) และสร้างเอนไซม์ gelatinase ที่สลาย gelatinให้กลายเป็นของเหลว (gelatin liquefaction) และสามารถรีดิวซ์ nitrate (nitrate reduction test) คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (starch hydrolysis) และการทดสอบคุณสมบัติในการสร้าง acetylmethylcarbinol (acetoin) (LV test) ให้ผลบวกทั้งหมด ส่วนการทดสอบคุณสมบัติความทนเกลือของเชื้อพบว่าเชื้อสามารถทนเกลือได้ที่ 3% แต่ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในความเข้มข้นของเกลือที่ 5% เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey การทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลของเชื้อ เช่น arabinose, mannitol ให้ผลบวก แต่เชื้อไม่สามารถหมักน้ำตาล mannose, maltose ได้ (Bernardet et al., 2005; de Beer et al., 2006; Zamora et al., 2012b)

2.3 ปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes*

ในช่วงของการเกิดโรคเชื้อจะสร้างเอนไซม์ที่แตกต่างกันเพื่อจุดประสงค์ในการยืดอายุการติดเชื้อหรือการที่จะช่วยให้การติดเชื้อรุนแรงขึ้นในโฮสต์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ส่งผลต่อปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ (Madigan et al., 2000) ความสามารถในการเกิดโรคของแบคทีเรียจะถูกกำหนดโดยการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์และคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งส่งผลต่อปัจจัยความรุนแรง (Pavlov et al., 2004)

2.3.1 คุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

โดยปกติรูปแบบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียมี 3 แบบได้แก่ 1. Gamma – hemolysin แสดงถึงแบคทีเรียไม่สามารถสร้างสารพิษชนิด (hemolysin) เพื่อย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ดังนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar (BA) เชื้อที่ขึ้นจะไม่มีวงใสรอบโคโลนี (non- hemolysis) 2. Alpha – hemolysin สามารถสร้างสารพิษชนิด (hemolysin) เพื่อย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้แต่ไม่เข้มข้นจึงไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์โดยธาตุเหล็กในฮีโมโกลบินจะถูกออกซิไดซ์ทำให้อาหารรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียเห็นเป็นสีน้ำตาลหรือสีเขียวอ่อน (partial-hemolysis) 3. Beta – hemolysin bacteria แบคทีเรียสามารถสร้างสารพิษชนิด (hemolysin) เพื่อย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างเข้มข้นสามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์โดยรอบ ๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar มีขอบใสอย่างชัดเจน (complete-hemolysis) โดยการศึกษาพบว่าเชื้อ *C. indologenes* สามารถสร้างสารพิษชนิด (hemolysin) ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า – ฮีโมลัยซิน (beta-hemolysin) เมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นผสม 5 % เลือดแกะและพบว่าเชื้อไม่มีคุณสมบัติในการสร้างสารพิษชนิด (hemolysin) ในการย่อยเม็ดเลือดแดงแกรมม่า-ฮีโมลัยซิน (gramma-hemolysin) เมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นผสม 5% เลือดม้า (WYK, 2008)

2.3.2 คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ต่างๆ (enzymatic activity) (Madigan et al.,2000)

เป็นปัจจัยในการก่อความรุนแรงของเชื้อเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น ช่วยในการดำรงชีวิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการบุกรุกของเชื้อ เป็นต้น โดยเชื้อจะปลดปล่อยเอนไซม์ต่างๆออกมานอกเซลล์ก่อให้เกิดความรุนแรงต่อโฮสต์ ซึ่งคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ต่างๆสามารถนำมาใช้ในการประเมินศักยภาพของเชื้อที่ก่อให้ความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อได้ (WYK, 2008) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงหน้าที่การทำงานของเอมไซม์ที่ส่งผลต่อปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes*

ชนิดของเอมไซม์	หน้าที่ของเอนไซม์
Fibrinolysin	มีหน้าที่ทำลาย fibrin
Gelatinases	ประกอบด้วย Zinc ซึ่งไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นของ gelatine และ collagen
Lecithinase	ย่อยสลาย phospholipids ซึ่งสามารถพบในเยื้อหุ้มเซลล์ และสามารถทำลายเซลล์เป้าหมายหรือช่วยในการบุกรุกเซลล์เป้าหมาย
Lipases	ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์อื่น และทำให้เซลล์แตกซึ่งช่วยในการมีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรีย
Proteinases	มีหน้าเกี่ยวกับกระบวนการอักเสบและมีส่วนทำให้เกิดความรุนแรงในคนและสัตว์

จากหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆที่ระบุไว้ในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าปัจจัยความรุนแรงมีแนวโน้มแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

กลุ่มแรกประกอบด้วยเอนไซม์ที่มีหน้าที่ช่วยเชื้อโรคในการบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์เซลล์ เช่น fibrinolysin มีหน้าที่ในการลดการทำงานของ fibrin และ lecithinase ย่อยสลาย phospholipids ซึ่งสามารถพบในเยื้อหุ้มเซลล์และสามารถทำลายเซลล์เป้าหมายหรือช่วยในการบุกรุกเซลล์เป้าหมาย gelatinases ประกอบด้วย zinc ซึ่งไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นของ gelatine และ collagen ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ

กลุ่มที่สองประกอบด้วยเอนไซม์ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่ส่งเสริมในการดำรงชีวิตของเชื้อในโฮสต์เซลล์ เช่น lipase ร่วมกับเอนไซม์อื่นและทำให้เซลล์แตกซึ่งช่วยในการดำรงชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรียและ proteinases ที่ย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตของเชื้อ (Madigan et al., 2000) นอกจากนั้นวิธีการอื่น ๆ ที่สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* อื่นๆ เช่นการทดสอบความต้านทานต่อยาต้านจุลชีพและความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อ เป็นต้น (WYK, 2008)

2.4 พยาธิวิทยาของการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ในปลา

พบรายงานการศึกษาพยาธิวิทยาในปลา yellow perch ที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* ปลาแสดงอาการสูญเสียความอยากอาหาร และ สมดุลในการทรงตัว รวมถึงลักษณะรอยโรคจากการได้รับเชื้อ *C. indologenes* พบลักษณะการบวมบริเวณเหนือครีบก้น และแผลหลุมหรือแผลเปื่อยที่บริเวณผิวหนังและกล้ามเนื้อ (Pridgeon et al., 2013) โดยการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมในประเทศไทยและทั่วโลกนั้นยังไม่มีพบการรายงานดังกล่าว

2.5 ระบาดวิทยา

การรายงานการศึกษาเชื้อ *C. indologenes* ในมนุษย์นั้นพบอุบัติการณ์ในปี 1997 การรายงานพบการเพิ่มขึ้นในการติดเชื้อ *C. indologenes* ในผู้ป่วยโรงพยาบาลในประเทศไต้หวัน ซึ่งพบเชื้อในเลือดของผู้ป่วยจำนวน 36 คน (Hsueh et al., 1997) รวมถึงการศึกษาการระบาดของเชื้อ *C. indologenes* ในผู้ป่วย 215 คน โดยพบว่าตั้งแต่ปี 2013 พบการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ *C. indologenes* ในกระแสเลือดและปอดอักเสบ (Chen et al., 2013)

การระบาดของเชื้อในกลุ่ม *Chryseobacterium* sp. พบการรายงานการระบาดในปลาหลากหลายสปีชีส์ เช่น *C. scophthalmus* ในประเทศสก๊อตแลนด์ (Mudarris et al., 1994) *C. piscicola, C. arothri* และ *C. chaponense* ในทวีปยุโรปและอเมริกาใต้ (Campbell et al., 2008; Ilardi et al., 2009; Kampfer et al., 2011) *C. shigense* ในประเทศสเปน (Zamora et al., 2012b) *C. tructae* (Zamora et al., 2012c) *C. oncorhynchi* (Zamora et al., 2012a) *C. viscerum* (Zamora et al., 2012d) โดยชนิดของปลาที่พบการระบาดนั้นส่วนมากจะเป็นปลาที่เลี้ยงในเขตหนาวเช่น ปลาแซลมอน ปลาเรนโบว์เทราต์ จากนั้นในปี 2013 พบการระบาดของเชื้อ *C. indologenes*. ในปลา yellow perch (Pridgeon et al., 2013) รวมถึงการรายงานการพบเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างน้ำทะเลและสัตว์น้ำในทะเลในประเทศโครเอเชียอีกด้วย (Maravic et al., 2013) ทั้งนี้ยังไม่เคยพบว่ามีรายงานการระบาดของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม

โดยการรายงานในประเทศไทยนั้นพบการรายงานการแยกและวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างไรน้ำนางฟ้าที่เป็นโรคจุดดำ(หนูเดือน เมืองแสน 2549) และพบการระบาดของเชื้อ *C. indologenes* จากการแยกและระบุเชื้อจากตัวอย่างกบป่วยในฟาร์มบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย (สุดา ตัณฑวณิช 2554) รวมถึงรายงานการพิสูจน์และจำแนกลักษณะของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากกบพันธุ์ผสมที่ป่วยด้วยกลุ่มอาการทางประสาทและกระจกตาขุ่นขาว (ชาญณรงค์ รอดคำ 2554) ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานการพบเชื้อ *C. indologenes* ในปลา

แต่จากผลการศึกษาขั้นต้นสามารถเพาะแยกเชื้อ *C. indologenes* ได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยในประเทศไทย จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสามารถพบการแพร่กระจายของเชื้อ *C. indologenes* อย่างกว้างขวางในสัตว์น้ำในประเทศไทย

2.6 การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

2.6.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะแยกเชื้อ

ในปี 2011 โดยชาญณรงค์รายงานการแยกเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างกบที่ป่วยด้วยอาการคอเอียง กระจกตาขุ่น จากฟาร์มในจังหวัดเชียงใหม่ พิจิตร สุพรรณบุรี รวมจำนวน 18 ตัวโดยผ่าซากตามขั้นตอนดังนี้ ให้กบนอนหงาย ใช้ (forceps) ปากคีบ ดึงหนังหน้าท้องขึ้นให้ห่างจากอวัยวะภายในแล้วใช้กรรไกรตัดเปิดช่องเล็กๆจากนั้นใช้กรรไกรเปิดเลาะหน้าท้องต่อไปให้ยาวตั้งแต่บริเวณต้นขาขึ้นไปจนถึงบริเวณใต้คางกบและใช้กรรไกรตัดเปิดผนังหน้าท้องออกจนเห็นอวัยวะภายในและเก็บตัวอย่างจากอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ม้าม ไต หัวใจ และปอด โดยใช้สำลีพันปลายไม้ป้ายเชื้อจากอวัยวะเหล่านี้นำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสมเลือดแกะ 5 เปอร์เซ็นต์ และ MacConkey agar และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีที่มีลักษณะสีเหลืองอ่อน ที่แยกได้จากแต่ละอวัยวะนำลงเพาะแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผลการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเหลืองอ่อนจำนวน 18 ตัวอย่างจากกบนาและกบบลูฟรอกที่มีกลุ่มอาการคอเอียง กระจกตาขุ่น จำนวน 18 ตัว (ชาญณรงค์ รอดคำ 2554) ในปี 2013 โดย Pridgeon และคณะศึกษาแยกเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลา yellow perch ในประเทศสหรัฐอเมริกาจากการเก็บตัวอย่างปลา yellow perch จากฟาร์มในเดือนมกราคม ปี 2012 โดยเก็บปลาป่วยที่มีลักษณะ moribund เก็บตัวอย่างสดลงถังน้ำแข็งและทำการแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมงโดยห้องปฏิบัติการวิจัยทางสุขภาพสัตว์น้ำ ล้างตัวอย่างปลาบริเวณที่พบลักษณะแผลหลุมสามรอบด้วย PBS (phosphate buffer solution) จากนั้น นำขดลวดเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อสัมผัสกับบริเวณแผลหลุมและเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ shieh agar กับ tobramycin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Decostere et al., 1997) บ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 19 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบลักษณะโคโลนีจากตัวอย่าง 15 ตัวอย่างโดยพบ 13 ตัวอย่างจาก 15 ตัวอย่างพบเชื้อมีลักษณะโคโลนีสีเหลืองและ 2 ตัวอย่างพบลักษณะโคโลนีสีขาวนอกจากนี้ในปี 2013 โดย Maravic และคณะศึกษาแยกเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างน้ำทะเลและหอยชนิดต่างๆรวม 16 ตัวอย่าง โดยใช้ขวดผ่านการฆ่าเชื้อเก็บตัวอย่างน้ำ 1 เมตรจากชายฝั่งและลึกประมาณ 20 เซนติเมตรจากพื้นผิวน้ำทะเลจำนวน 4 ตัวอย่าง และใช้น้ำทะเลปริมาณ 10 มิลลิลิตรกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดของรู 0.22 ไมโครเมตรและนำเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และตัวอย่าง

จากหอยแมลงภู่เมดิเตอร์เรเนียน (*M. galloprovincialis* Lam.), หอยทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (*P. caerulea* L.) และเม่นทะเลสีม่วง (*P. lividus* Lam) จำนวนชนิดละ 4 ตัวอย่าง โดยหอยได้รับการขัดทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดเพื่อเอาเศษดินออกและฆ่าเชื้อแห้งด้วยการผ่านเปลวไฟ และเปิดหอยด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อโดยใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บเนื้อหอยและน้ำภายในตัวหอย และทำให้เป็นเนื้อเดียวด้วยกันด้วยเครื่อง osterizer เป็นเวลา 1 นาที ตัวอย่างทั้งหมดตรวจสอบภายใน 2 ชั่วโมงหลังการเก็บตัวอย่าง จากนั้นเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสม meropenem เพื่อป้องกันเชื้ออื่นๆในกลุ่ม water borne species เช่น *Pseudomonas* sp. , *Aeromonas* sp. บ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบโคโลนีสีเหลืองของเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่าง 12 ตัวอย่างพบทั้ง 12 ตัวอย่าง (12/12) จากน้ำทะเล หอยแมลงภู่เมดิเตอร์เรเนียนและหอยทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและ 3 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่าง (3/4) ของเม่นทะเลสีม่วง รวมพบเชื้อ *C. indologenes* จำนวน 15 ตัวอย่างจาก 16 ตัวอย่าง (15/16)โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม *Chryseobacterium* sp. ซึ่งอยู่ในวงศ์ *Flavobacteriaceae* นั้นได้มีการศึกษาและปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อมาโดยลำดับโดยมีจุดประสงค์เพื่อการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆโดยการเติมยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ในปี 1955 พบการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Cytophaga agar กับ polymyxin B 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร neomycin 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกบางชนิด โดยทำให้ประสิทธิภาพการคัดแยกเชื้อเร็วและแม่นยำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อคัดแยกชนิดอื่น (Anacker and Ordal, 1955) นอกจากนั้น ได้มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดแยกเชื้อวงศ์ *Flavobacteriaceae* อย่างต่อเนื่องและมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน ในปี 1997 เริ่มมีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ shieh agar ซึ่งผสมด้วย tobramycin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Decostere et al., 1997) นอกจากนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อ *Chryseobacterium* sp. อื่นๆ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติมยาปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น

2.6.2 การแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลและสัตว์ทะเล สีเหลืองนูนเรียบ มันเงา กลมขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร และบางโคโลนีมีรูปแบบไม่แน่นอน (Maravic et al., 2013) โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. indologenes* ย้อมติดสีแดง แกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนปลายมน (rod) ไม่สร้างสปอร์ คุณสมบัติทางชีวเคมีปฐมภูมิของเชื้อ เช่น เป็นเชื้อที่ไม่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเอง (non-motile) และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Mudarris et al., 1994) เชื้อสามารถสร้างเอมไซม์ catalase รวมถึงเอนไซม์ cytochrome oxidase C การทดลองคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียในการเมตาโบลิซึมน้ำตาลได้ในภาวะที่มีออกซิเจน (O/F test) ให้ผลบวก นอกจากนี้เชื้อ *C. indologenes* สามารถสร้าง

flexirubin โดยจากการทดสอบด้วยน้ำยา 20% KOH โคโลนีเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มถึงน้ำตาล (Maravic et al., 2013)

การศึกษาการแยกเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลา yellow perch สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar และ อาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar พบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ แบคทีเรียย้อมติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง โดยเชื้อสามารถสร้างเอมไซม์ catalase รวมถึงเอนไซม์ cytochrome oxidase C และ ย่อยสลาย protease (gelatin) โดยเทียบจากฐานข้อมูลของผลการทดสอบ API 20 NE พบ 10 ไอโซเลทมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. indologene* ที่ 67.2% - 99.9% จากตัวอย่าง 15เชื้อและอีก 3 เชื้อให้ผลคล้ายคลึงกับเชื้อ *Empedobacter brevis* (Pridgeon et al., 2013) ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อพบว่าเชื้อ *C. indologenes* สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar และ อาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar โดยลักษณะของโคโลนี สีเหลืองขาว ผิวเรียบมัน รูปร่างเป็นทรงกลม และลักษณะเซลล์ของเชื้อรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแดง แกรมลบ และสามารถเมตาบอไลท์คาร์โบไฮเดรตเฉพาะสภาวะที่มีอากาศ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ รวมถึงสามารถสร้างเอมไซม์ oxidase และ catalase และให้ผลบวกต่อการทดลอง starch hydrolysis และ gelatin hydrolysis และการทดสอบ casein hydrolysis ไม่สามารถสร้าง indole ได้และให้ผลลบต่อการทดสอบ urease และการทดสอบขบวนการออกซิเดชั่นและเฟอร์เมนเตชั่นของเชื้อต่อสารคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน รวมถึงข้อมูลของคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* อื่นๆ และการทดสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาลทั้ง 4 ชนิด คือ mannitol maltose ให้ผลบวกและ arabinose mannitol ให้ผลลบ (ชาญณรงค์ รอดคำ 2554) (ตารางที่ 2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes*

คุณสมบัติทางชีวเคมี	*C. indologenes* (de Beer et al., 2006) (Zamora et al., 2012c)	*C. indologenes* (ชาญณรงค์ รอดคำ 2554)
Gram stain	-	-
การเจริญเติบโตบน :		
Blood agar	+	+
MacConkey agar	+	+
Tolerance to 3.0% NaCl	-	ND
5.0% NaCl	-	ND
การย่อยสลาย :		
Starch	+	+
Gelatin	+	+
การตกตะกอนบน egg-yolk medium	+	ND
การสร้าง :		
Indole	+	-
Urease	-	-
การใช้ :		
Arabinose	-	ND
Mannose	+	ND
Mannitol	-	+
Maltose	+	+
Citrate	+	+
Nitrate	-	+

(ND) = non - detection

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โดยผลการศึกษาการเปรียบเทียบวิธีการแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ และ เทคนิค FAME (fatty amino methyl ester) พบว่า การใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อและเทคนิค FAME ประกอบกันสามารถใช้พิสูจน์เชื้อ *C. indologenes* ได้ในระดับจีนัส (Pridgeon et al., 2013) ถ้าต้องการความแม่นยำในการพิสูจน์ในระดับสปีชีส์ควรใช้ร่วมกับการศึกษาทางอณูชีววิทยายืนยันผลด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน 16s-rRNA หรือ 16s-23s rRNA ISR เช่น การพิสูจน์แยกเชื้อจากตัวอย่างปลา yellow perch ป่วยด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับเบสด้วยยีน 16s-23s rRNA ISR โดยใช้

forward primer Chry-16S-F (5'-GCATCAGCCATGGCGCGGTG-3') ที่ 1327-1347 bp ของ complete 16S rRNA sequence ของ *Chryseobacterium* sp. (GenBank accession number JQ740255) และ reverse primer Chry-23S-R (5'- CCTTAAGGATTTCTTTCCTA -3') ที่ 787-807 bp ของ 23S rRNA sequence ของ *Chryseobacterium piscicola* (GenBank accession number HM131451) ผสมส่วนประกอบของ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ดังนี้ Master Mix, 1x (Qiagen, Valencia, CA, USA)ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร forward primer 1 ไมโครลิตร reverse primer 1 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร Nuclease-free water ปริมาตร 9.5 ไมโครลิตร ต่อจากนั้นเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นตามลำดับ ดังนี้คือ มีวงจรอุณหภูมิ (thermal cycle) initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 30 รอบ เข้าสู่การ denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที annealing อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส 45 วินาที และขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) มาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้วุ้น agarose ความเข้มข้นร้อยละ1 และส่งหาลำดับเบส (USDA-ARS Mid South Genomivc Laboratory) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยผลการศึกษาการศึกษาเทคนิค PCR และการหาลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบ 13 ไอโซเลทมีลำดับเบสตรงกับเชื้อ *C. indologenes* strain B7 16s rRNA (GenBank accession number HQ259684) ที่ 99% และผลการศึกษาเทคนิค PCR และการหาลำดับเบสของยีน 16s-23s rRNA ISR (intergenic spacer region) พบ 13 ไอโซเลทมีลำดับเบสตรงกับเชื้อ *C. indologenes* strain ATCC 29897 16s-23s rRNA ISR (GenBank accession number EU014570) ที่ 88% (Pridgeon et al., 2013)

นอกจากนั้นผลการศึกษาการพิสูจน์แยกเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างกบ ที่พบอาการคอเอียง ตาขุ่น โดยเทคนิค PCR โดยพิจารณาจากลำดับเบสของยีน 16s-23s rRNA ISR โดยใช้ไพรเมอร์ 16s-23s rRNA – F (5'-TGCGGCTGGAACATCTCATT -3') ขนาด 20 bp และ16s-23s rRNA - R (5'-GTGCTCGGTTATCTCTTTGTG -3') ขนาด 21 bp โดยผสมส่วนประกอบของ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังนี้ 10X buffer solution ปริมาตร 5 ไมโครลิตร dNTPs ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร Forward primer 1 ไมโครลิตร Reverse primer 1 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร Nuclease-free water ปริมาตร 36.5 ไมโครลิตร ต่อจากนั้นเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นตามลำดับ ดังนี้คือ มีวงจรอุณหภูมิ (thermal cycle) initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 30 รอบ เข้าสู่การ denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing อุณหภูมิ

52 องศาเซลเซียส 1 นาที และขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำ PCR product มาวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้วุ้น agarose ความเข้มข้นร้อยละ1 ผสม1X TBE และเอททีเดียมโบรไมด์ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยทำปฏิกริยาเวลา 30 นาทีใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ โดยใช้ DNA มาตรฐานเป็นตัวชี้วัด (DNA ladder) อ่านผลจากแถบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอด้วยแสงยูวีจากเครื่อง gel documentation (Biorad, USA.) เปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA ladder) จากนั้นนำไปส่องตรวจภายใต้แสง อัลตร้าไวโอเลต และแยก DNA ออกจาก agarose gel ให้บริสุทธิ์และส่ง PCR product ที่บริสุทธิ์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และหาลำดับเบสและและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ผลการศึกษามีลำดับเบสตรงกับ *C. indologenes* ATCC 29897 16s-23s rRNA ISR ใน GenBank accession member EU 014570 มากกว่า 95 %(ชาญณรงค์ รอดคำ 2554)

2.6.3 การทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาด้านปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในปี 2000 ศึกษาเชื้อ *C. indologenes* ที่ แยกได้จากหลอดลมผู้ป่วยในการทดสอบความรุนแรงซึ่งได้แก่ คุณสมบัติการสร้างเอมไซม์ และคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ ทดสอบโดยการนำเชื้อเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอมไซม์ต่างๆ เช่น chondroitnase, coagulase, dnase, elastase, fibrinolysin, gelatinase, hyaluronidase, lecithinase, lipase, proteinase โดยเชื้อ *C. indologenes* สามารถสร้างเอมไซม์ fibrinolysin, gelatinase, lecithinase, lipase, proteinase ได้ (WYK, 2008) และคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยการเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar โดยใช้เลือดม้า และ เลือดแกะ โดยเชื้อ *C. indologenes* มีลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบแกรมม่า-ฮีโมลัยซิน (gamma-haemolysin) ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือดม้า และย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ เบต้า – ฮีโมลัยซิน (Beta-Heamolysin) ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือดแกะ (WYK, 2008) นอกจากนั้นวิธีการอื่น ๆ ที่ยังสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ของการเกิดโรคของสิ่งมีชีวิตที่มีการทดสอบความต้านทานต่อยาต้านจุลชีพและความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อ เป็นต้น

2.6.4 การทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes*

การศึกษาความรุนแรงในมนุษย์นั้น พบการรายงานในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. indologenes* ที่มีภาวะแบคทีเรียในกระแสเลือด ปอดบวม และเยื่อหุ้มสมองอักเสบและพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. indologenes* ที่มีภาวะแบคทีเรียในกระแสเลือดนั้นมีอัตราการตายสูงกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C.*

indologenes ที่มีภาวะปอดบวมคิดเป็นร้อยละ 67 % และ 35% ตามลำดับ (Chen et al., 2013) และการศึกษาความรุนแรงในปลาพบก่อให้เกิดอัตราการตาย 15 - 90 % โดยขึ้นอยู่กับชนิดสปีชีส์ รอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ในปลา พบลักษณะจุดเลือดออกที่ไตและลำตัว รวมถึงแผลหลุมบริเวณลำตัว โดยช่วงอายุของปลาที่มักเกิดการติดเชื้อ *Chryseobacterium* sp. นั้นได้แก่ ลูกปลาขนาดประมาณนิ้วมือ และ ปลาระยะเพาะฟัก (Loch and Faisal, 2014) โดยการศึกษาความรุนแรงของการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ดังต่อไปนี้ เช่น การศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อ *C. indologenes* ในปลา yellow perch ในประเทศสหรัฐอเมริกาปี 2013 โดยการนำเชื้อ *C. indologenes* ที่ผ่านการยืนยัน นำเชื้อเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth (TSB) บ่มเชื้อที่ 19 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมงเชื้อจะเจริญเติบโตอยู่ในช่วง Log phase ที่ค่าความดูดกลืนแสง (OD) ที่ 540 นาโนเมตรจะได้ความเข้มข้นของเชื้อที่ $6x10^7$ CFU/ml และแช่ปลา yellow perch ขนาด 2 กรัม ในความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดลองสามซ้ำ และการทดลองหาค่า LD_{50} โดยการฉีดเชื้อในความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ $6x10^7$- $3x10^8$ CFU/fish โดยฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร โดยการแช่ในยาสลบชนิด tricaine methanesulphonate ที่อัตราส่วน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตรก่อนการฉีดเชื้อ และบันทึกอัตราการตายหลังการได้รับเชื้อ 21 วัน และตัวอย่างปลา yellow perch ที่ตายจากการได้รับเชื้อทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างโดย เก็บตัวอย่างจากปลา yellow perch ที่ตายจากการได้รับเชื้อในอวัยวะ ไต และพิสูจน์แยกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ (API 20 NE) และคำนวณค่า LD_{50} จากอัตราการตายเพื่อหาความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* โดยพบอัตราการตาย 10 - 20% จากการทดสอบความรุนแรงของเชื้อด้วยการแช่และค่า LD_{50} หรือปริมาณเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดอัตราการตายร้อยละห้าสิบที่ระยะเวลา 21 วันเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/fish และค่า LD_{95} หรือค่าปริมาณเชื้อที่สามารถก่อให้อัตราการตายร้อยละ 95 ที่ระยะเวลา 21 วันเท่ากับ 3.2×10^8 CFU/fish (Pridgeon et al., 2013) ทำการศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างกบจำนวน 1 ไอโซเลทโดยการป้อนให้กินในกบทดลองจำนวน 50 ตัวน้ำหนัก 40 กรัมอายุเฉลี่ย 1 เดือน โดยใช้ความเข้มข้นในการทดลองได้แก่ $2.02x10^8$ $2.02x10^7$ $2.02x10^6$ $2.02x10^5$ CFU/ตัว ป้อนโดยใช้กระบอกฉีดยาพลาสติก ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ป้อนเข้าช่องปาก โดยตรงแล้วรอให้กบกลืนเองและสังเกตอาการหลังได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน ผลการทดลองไม่พบอัตราการตายหลังการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างกบป่วยจากอาการ กระจกตาขุ่น คอเอียง ในประเทศไทย (ชาญณรงค์ รอดคำ 2554)

บทที่ 3
วิธีการทดลองหรือระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะแยกเชื้อ *C. indologenes*

โดยเลือกเก็บตัวอย่างจากปลาทับทิมป่วยใกล้ตาย (Moribund fish) จำนวน 100 ตัวอย่างใน 6 จังหวัด ได้แก่ ราชบุรี กาญจนบุรี นครปฐม สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และ ฉะเชิงเทรา (ภาพที่ 1) ช่วงระยะเวลา ปี พ.ศ. 2556 ถึง 2557 โดยแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่างปลาทับทิมป่วยจากรูปแบบการเลี้ยงแบบกระชังในบ่อดินจำนวน 30 ตัวอย่างและกระชังในแม่น้ำ (ภาพที่ 2) จำนวน 70 ตัวอย่างรวม 100 ตัวอย่างโดยเก็บตัวอย่างปลาทับทิมที่มีลักษณะรอยโรคที่บ่งบอกการติดเชื้อในกระแสเลือด เช่น มีจุดเลือดออกบริเวณครีบและลำตัว ตาโปนและก้นปลิ้น เป็นต้น เก็บตัวอย่างปลาทับทิมลงถุงพลาสติกและจดบันทึกข้อมูลตัวอย่าง ได้แก่ ที่อยู่ฟาร์ม อัตราการตาย และลักษณะรอยโรคที่พบ จำนวนตัวอย่าง (ตารางที่ 3) จากนั้นเก็บลงกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งและขนส่งภายใน 3-4 ชั่วโมง หลังจากการเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บตัวอย่าง

รูปที่ 1แสดงที่มาของตัวอย่างปลาทับทิมป่วยในบริเวณภาคกลางและภาคตะวันออกประเทศไทย

รูปที่ 2 แสดงภาพกระชังในแม่น้ำ (รูปซ้าย) กระชังในบ่อดิน (รูปขวา)

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลตัวอย่างปลาทับทิมป่วยที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

จังหวัด	รูปแบบการเลี้ยง	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)	ลักษณะรอยโรคภายนอก	ลักษณะรอยโรคภายใน	จำนวนตัวอย่างปลาทับทิมป่วย (ตัว)
สมุทรสงคราม	กระชังในบ่อดิน	20%	ครีบเปื่อยและจุดเลือดออกตามลำตัว	-	10
สมุทรสาคร	กระชังในบ่อดิน	10%	ครีบเปื่อยและจุดเลือดออกตามลำตัว	-	10
นครปฐม	กระชังในแม่น้ำ	10%	ครีบเปื่อยและจุดเลือดออกตามลำตัว	ตับโตและจุดเลือดออกบริเวณตับ	10
ฉะเชิงเทรา	กระชังในบ่อดิน	20%	ครีบเปื่อยและจุดเลือดออก	ม้ามโต ตับโต	10
ราชบุรี	กระชังในแม่น้ำ	40%	ปื้นเลือดตามลำตัว แผลหลุมแผลหลุมตามลำตัว ครีบเปื่อย,จุดเลือดออกและปื้นเลือดตามลำตัว	-	20
กาญจนบุรี	กระชังในแม่น้ำ	60%	ปื้นเลือดและจุดเลือดออกตามลำตัว ครีบเปื่อย ท้องบวม	ตับโตและจุดเลือดออกบริเวณตับและไต,ม้าม	40

3.2 การแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย

การเตรียมตัวอย่างและแยกวินิจฉัยเชื้อจากตัวอย่างจากปลาทับทิมป่วย

3.2.1 การเตรียมปลาทับทิมป่วยเพื่อเก็บตัวอย่างจากอวัยวะภายใน

โดยขั้นตอนในการผ่าซากดังนี้ ใช้กรรไกรปลอดเชื้อสอดเข้าช่องเปิดเหนือครีบก้น และตัดตามแนวลำตัวถึงครีบอกจากนั้น ตัดเนื้อเยื่อบริเวณท้องออก และเมื่อตัดเนื้อบริเวณท้องสังเกตเห็นอวัยวะภายใน จากนั้น ตัดเนื้อปลาส่วนท้องขึ้นไปทางปาก และเก็บตัวอย่างจากอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต ม้าม และจดบันทึกลักษณะรอยโรคภายใน

3.2.2 เพาะแยกเชื้อจากอวัยวะภายใน

โดยใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้ว คีบชิ้นส่วนอวัยวะและลนไฟที่ผิวรอบนอกให้ทั่ว และใช้กรรไกรฆ่าเชื้อแล้วตัดเป็นชิ้นป้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด shieh agar ผสม tobramycin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Decostere et al., 1997) ประมาณ 1 ใน 4 ของพื้นที่อาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้ขดลวดเพาะเชื้อเผาไฟป้ายเป็นเส้นตรงหลายเส้นโดยเริ่มจากจุดที่ป้ายตัวอย่าง ต่อมาใช้ขดลวดเพาะเชื้ออันเดิม ขีดเส้นต่อจากเส้นเดิมหลายๆครั้ง ทำเช่นนี้ 3 - 4 ครั้งซึ่งปริมาณของจำนวนเชื้อจะน้อยลง ทำให้โคโลนีของเชื้อแยกจากกันชัดเจน โดย shieh agar ผสม tobramycin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Decostere et al., 1997) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อในวงศ์ *Flavobacteriaceae* และบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *C. indologenes* ซึ่งมีลักษณะ รูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตรมีกลิ่นคล้ายกลิ่นผลไม้ (Pridgeon et al., 2013) จากนั้นเพาะแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนำเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์มาใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการสร้างสาร flexirubin ของเชื้อโดยการทดสอบกับน้ำยา 20% KOH โคโลนีที่ให้ผลบวกนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของสีของโคโลนีโดยจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มถึงน้ำตาล (Maravic et al., 2013) รวมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. indologenes* ย้อมติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างแท่ง (Pridgeon et al., 2013)

3.2.3 การแยกวินิจฉัยเชื้อด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ

การทดลองคุณสมบัติการสร้างเอมไซม์ catalase ของเชื้อ (catalase test) การทดลองคุณสมบัติของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ cytochrome oxidase C (oxidase test) การทดลองคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียในการเมตาโบลิซึมน้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน (O/F test)

การทดลองคุณสมบัติของเชื้อในการเคลื่อนที่ (motility test) การทดสอบคุณสมบัติแบบทุติยภูมิ เช่น การทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างพลังงาน (citrate test) การทดสอบการสร้างสาร indole โดยเอนไซม์ tryptophanase (indole test) การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียรีดิวซ์ nitrate (nitrate reduction test) คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (starch hydrolysis) การทดสอบคุณสมบัติความทนเกลือของเชื้อในความเข้มข้นต่างๆ เช่น 3% และ 5% การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. indologenes* เช่น arabinose mannose, mannitol, maltose และวิเคราะห์ผล (de Beer et al., 2005; Zamora et al., 2012c)

3.2.4 การตรวจยืนยันเชื้อ *C. indologenes* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ; PCR) และการหาลำดับเบส (Nucleotide sequencing)

เตรียมเชื้อสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *C. indologenes* 1 โคโลนีเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *C. indologenes* มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี boiling method โดยนำเชื้อ 1 - 2 โคโลนีผสมกับน้ำ sterile ultra pure ปริมาตร 100 - 200 ไมโครลิตรและต้มแบคทีเรียในอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นแช่น้ำแข็งเป็น 5 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 rpm เวลา 5 นาที และเก็บชั้น supernatant ที่อยู่เหนือชั้นตะกอนเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และการหาลำดับเบส

นำไพรเมอร์ชนิด universe ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Darwish and Ismaiel, 2005) (ตารางที่4) ผสมส่วนประกอบของ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตรดังนี้ Gotag Green Master Mix, 1x (Promega, Medisom, WI, USA) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร Forward primer UN-20 0.5 ไมโครลิตร Reverse primer R1438 0.5 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ไมโครลิตร Nuclease-free water ปริมาตร 8.5 ไมโครลิตรต่อจากนั้นเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นตามลำดับดังนี้คือ มีวงจรอุณหภูมิ (thermal cycle) initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 นาที เข้าสู่การ denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที

จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที (Darwish and Ismaiel, 2005)

จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) มาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้วุ้น agarose ความเข้มข้นร้อยละ1 โดยทำปฏิกริยาเวลา 30 นาทีใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ โดยใช้ DNA มาตรฐานเป็นตัวชี้วัด (DNA ladder) อ่านผลจากแถบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอด้วยแสงยูวีจากเครื่อง gel documentation (Biorad, USA.) เปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA ladder) เพื่อแยกเชื้อ *Chryseobacterium* sp. สปีชีส์ต่างๆ เบื้องต้นและส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยการใช้ BLAST analysis tool เพื่อยืนยันสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่ใช้ทดสอบในกรณีที่พบว่าเชื้อตัวอย่างคือเชื้อ *C. indologenes* นั้น ลำดับพันธุกรรมของยีน 16s rRNA และเปรียบเทียบกับลำดับพันธุกรรมของ *C. indologenes* ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BioEditversion7.0.5.2(HYPERLINK"http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/"http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/)

ตารางที่ 4 รายละเอียดข้อมูลของ universal primer สำหรับใช้แยกชนิดเชื้อ *C. indologenes* (Darwish and Ismaiel, 2005)

เชื้อ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของผลิตภัณฑ์
C. indologenes	Forward primer UN-20	5'AGA GTT TGA TC (AC) TGG CTC AG'3	1325 bp
	Reverse primer R1438	3'GCC CTA GTT ACC AGT TTT AC5'	

3.3 การทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย

3.3.1 การทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (heamolytic activity) ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar ซึ่งถ้าเชื้อมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเชื้อจะมีการสร้างสารพิษ haemolysin เพื่อใช้ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะพบลักษณะ zone ใสขึ้นรอบๆโคโลนี (hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar โดยลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) แบ่งออกเป็นหลายแบบขึ้นอยู่กับปริมาณการสร้างสารพิษ haemolysin เช่น beta- haemolysis alpha-haemolysis gamma-haemolysis (WYK, 2008)

3.3.2 คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ (enzyme activity) ของเชื้อซึ่งมีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ได้แก่

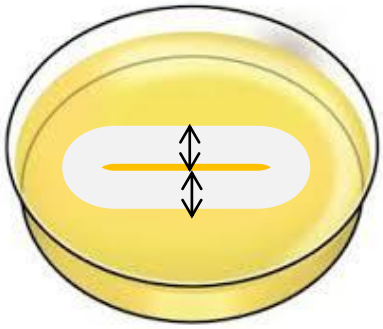
- ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ lipase , lecithinase (lecithovitelline test) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ egg yolk agar ซึ่งหากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ lipase lecithinase จะเกิด zone ขุ่นขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ egg yolk agar รอบๆ โคโลนีของเชื้อ (WYK, 2008)

- ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ fibrinolysin บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ผสม fibrinologen III ซึ่งหากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ fibrinolysin ผลบวกจะเกิดวงใสๆรอบๆโคโลนีขนาดมากกว่า 2 มิลลิเมตรขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ผสม fibrinologen III (WYK, 2008)

- ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ proteinases บนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar ซึ่งหากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ proteinases จะเกิด clear-zone ใสขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar รอบๆโคโลนี (WYK, 2008)

- ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ gelatinase บนอาหารเลี้ยงเชื้อ gelatin agar ซึ่งหากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ gelatinase จะเกิด zone ใสขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ gelatin agar รอบๆโคโลนี (WYK, 2008)

โดยนำเชื้อ *C. indologenes* ไอโซเลทต่างๆที่ผ่านการยืนยันด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับเบส (nucleotide sequencing) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 โคโลนีเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมงและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ (OD=540 nm) และใช้ calibrated loop จุ่มลงใน broth culture และขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ต่างๆขนาด 3 เซนติเมตรบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงทดสอบ 4 ซ้ำและบันทึกผลการทดลองว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้หรือไม่ รวมถึงค่าเฉลี่ยของขนาดของ clear zone ของแต่ละเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการวัดจากขอบของโคโลนีถึงบริเวณขอบของ clear-zone และหาค่าเฉลี่ยของขนาดของ clear-zone ของเชื้อ (ภาพที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงวิธีการวัด clear-zone โดยวัดจากขอบของโคโลนีถึงบริเวณขอบของ clear-zone ในการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ (enzyme activity) จากหัวลูกศรด้านหนึ่งไปถึงหัวลูกศรอีกด้านหนึ่ง

การทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar และใช้ calibrated loop จุ่มลงใน broth culture เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมงทดสอบ 2 ซ้ำ และบันทึกผลสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar ได้หรือไม่และรูปแบบในการย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolysis) (Madigan et al., 2000)

จากนั้นนำข้อมูลจากผลการทดลองปริมาณและชนิดของเอนไซม์ที่เชื้อสามารถสร้างได้รวมถึงชนิดของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงดังกล่าวใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *C. indologenes* จำนวน 1 เชื้อที่มีความรุนแรงสูงที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการก่อโรคของเชื้อและจุลพยาธิวิทยาจากการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมต่อไป

3.4 การศึกษาการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม

โดยการหาค่า Median lethal dose (LD_{50}) ที่ระยะเวลา 10 วันและรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. indologenes* โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.4.1 การเตรียมเชื้อก่อนการทดสอบโดยนำเชื้อ *C. indologenes* ที่คัดเลือกจากการทดสอบคุณลักษณะต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในห้องปฏิบัติการจำนวน 1 เชื้อจากนั้นนำเชื้อไอโซเลทดังกล่าวทำ *in vivo* passage ในปลาทับทิมทดลองจำนวน 1 รอบโดยการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องปลาทับทิมทดลองและเก็บเชื้อ *C. indologenes* จากตับ ไต ม้าม ของปลาทับทิมที่ตายจากการติดเชื้อ *C. indologenes* เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และบ่ม

ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* จำนวน 1 โคโลนีเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TSB เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อเพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อในการที่ทดสอบหาค่า LD_{50} โดยการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ เจือจางความเข้มข้นของเชื้อด้วยวิธี ten fold dilution โดยเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า แล้วจึงทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 2500 rpm เป็นเวลา 15 นาทีล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 % แล้ว 2 ครั้งเติมน้ำเกลือ 0.85 % ที่ฆ่าเชื้อ แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกับเชื้อ ก่อนนำไปวัดความขุ่น (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้ได้ค่า OD = 1 เจือจางแบคทีเรียลงครั้งละ 10 เท่าจนถึง 10^{-5} , 10^{-6} และ10^{-7} ดูดสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้น 0.1 ml หยดลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วเกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้แห้ง ทำการทดสอบ 2 ซ้ำต่อความเข้มข้นและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีและรายงานผลเป็น colony forming unit (CFU/ml) โดยจำนวนโคโลนีที่นับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนีต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ และนับโคโลนีที่ขึ้นบน plate เพื่อหาค่าเฉลี่ยที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ 10^5 10^6 10^7 CFU / ml จากนั้นนำไปทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes*

3.4.2 การเตรียมปลาทับทิมทดลอง โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองของเชื้อ *C. indologenes* ทั้ง 3 ความเข้มข้นโดยแต่ละกลุ่มใช้ปลาทับทิมทดลอง 10 ตัว ทำการทดลองสองซ้ำรวมใช้ปลาทับทิมจำนวน 80 ตัว โดยปลาทับทิมที่ใช้ในการทดลอง เป็นปลาทับทิมสุขภาพดีที่ซื้อจากฟาร์มที่ได้รับมาตรฐานจากกรมประมง เป็นลูกปลาขนาดประมาณนิ้วมือน้ำหนัก 20 - 25 กรัม นำมาเลี้ยงก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลองและเก็บตัวอย่างปลา 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อพิสูจน์หาเชื้อแบคทีเรียจากอวัยวะภายในก่อนทำการทดลอง เพื่อยืนยันว่าปลาทับทิมที่นำมาใช้เป็นปลาที่ปลอดเชื้อแบคทีเรียที่อวัยวะภายในโดยปลาทับทิมทั้งหมดถูกจัดให้อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน คือ ตู้ขนาด 24 x 18 x 18 อุณหภูมิเฉลี่ย 28 - 30 องศาเซลเซียส ให้อาหารปลาสำเร็จรูป 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวปลา วันละ 2 ครั้งและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน สังเกตพฤติกรรมของปลาทับทิมทดลองวันละ 2 ครั้ง และควบคุมระดับออกซิเจนในน้ำ 6 - 8 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยใช้หัวทรายให้อากาศตลอดเวลา ปลาทั้งหมดได้รับแสงธรรมชาติ

3.4.3 การทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่มกำหนดให้แต่ละกลุ่มได้รับสารละลายเชื้อ *C. indologenes* ในความเข้มข้นที่

แตกต่างกันผสมสารละลาย PBS ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรและ stock solution culture ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องรวม 0.1 มิลลิลิตร โดยกลุ่มที่ 1 - 3 ได้รับเชื้อโดยการฉีดสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 10^5 10^6 10^7 CFU/ml ตามลำดับ และ กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมฉีดสารละลาย PBS ที่ปราศจากเชื้อเข้าทางช่องท้อง บริเวณกึ่งกลางระหว่างครีบท้องและปล่อยปลาทับทิมลงตู้ทดลอง ภายหลังจากการฉีดเชื้อ ทำการเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 10 วัน สังเกตอาการและลักษณะรอยโรคที่เกิดขึ้นและบันทึกอัตราการตายสะสมเพื่อคำนวณหาค่า LD_{50} หรือ ค่าความเข้มข้นของเชื้อที่ก่อให้เกิดอัตราการตายในปลาทับทิมร้อยละห้าสิบในระยะเวลา 10 วันและยืนยันการติดเชื้อของปลาทับทิมที่ตายจากการได้รับเชื้อ *C. indologenes* โดยการนำอวัยวะ ตับ ม้าม ไต จากปลาทับทิมที่ตายเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และพิสูจน์เชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผลว่าปลาทับทิมตายจากเชื้อ *C. indologenes* จริงและวิเคราะห์ข้อมูลอัตราการตายตามวิธีการของ Reed, Muench H (1938) เพื่อหาค่า LD_{50} ในระยะเวลา 10 วันเมื่อสิ้นสุดการทดลองทำความสะอาดอุปกรณ์ที่สัมผัสเชื้อ *C. indologenes* โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ chloroxylenol (WYK, 2008) ในการฆ่าเชื้อและอุปกรณ์ต่างๆก่อนทิ้ง ส่วนปลาทดลองที่ผ่าซากแล้วจะเก็บใส่ถุงพลาสติกและนำส่งกำจัดซากที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.3 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยคิดเป็นร้อยละ 4 จากจำนวน 100 ตัวอย่างและสามารถประเมินความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* จากคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์และคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ในห้องปฏิบัติการรวมถึงการทดลองความรุนแรงของเชื้อในปลาทับทิมสรุปได้ว่า *C. indologenes* สามารถก่อโรคในปลาทับทิมได้โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาทับทิมได้รับเชื้อจนกระทั่งปรากฏอาการโดยเฉลี่ยเป็นเวลา 3 - 4 วันและมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาทับทิมได้รับเชื้อจนกระทั่งตายโดยเฉลี่ยเป็นเวลา 6 วันและมีค่าเฉลี่ย LD_{50} ที่ 10 วันอยู่ที่ 2.98×10^6 CFU/fish และเมื่อหลังจากปลาทับทิมได้รับเชื้อพบอาการ ว่ายน้ำเฉื่อยชา ความอยากอาหารลดน้อยลง สูญเสียการทรงตัว โดยลักษณะรอยโรคภายนอกพบ ลักษณะจุดเลือดออกบริเวณลำตัว ครีบเปื่อย ตกเลือด ท้องบวมมีการสะสมน้ำในช่องท้อง และลักษณะรอยโรคภายใน เช่น ตับ ม้ามโตและพบจุดเลือดออกในอวัยวะภายในรวมถึงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาพบลักษณะ granuloma กระจายทั่วไปในเนื้อเยื่อตับ ม้ามและไต

3.5 การศึกษาจุลพยาธิวิทยาในปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes*

เก็บตัวอย่างจากปลาทับทิมที่ตายหลังการได้รับเชื้อ *C. indologenes* โดยเลือกเก็บปลาใกล้ตายหรือตายไม่นานเกิน 30 นาทีนำมาผ่าซากและและบันทึกลักษณะรอยโรคจากอวัยวะภายในที่พบและเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาโดยมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ (specimen collection) จากปลาทับทิมที่ตายจากการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ได้แก่ ตับ ไต ม้าม โดยตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยมีดผ่าตัด ให้มีขนาดหนาไม่เกิน 0.3 เซนติเมตรเพื่อให้สารละลายคงสภาพบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้อย่างทั่วถึง

2. การตรึงเนื้อเยื่อ (fixation) โดยแช่ชิ้นเนื้อตัวอย่างในสารละลายคงสภาพบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อให้ดียิ่งขึ้น

3. การดึงน้ำออก (dehydration) เป็นวิธีการดึงน้ำออกจากเพื่อเตรียมตัวอย่างให้พร้อมที่จะให้ embedding media ซึมผ่านเข้าไปได้สารเคมีที่ใช้ในการดึงน้ำออกเรียกว่า dehydrant ได้แก่ ethyl alcohol ซึ่งมีคุณสมบัติดึงน้ำออกจากตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วไม่ทำให้ชิ้นเนื้อเปราะและไม่เป็นพิษต่อสุขภาพโดยแช่ตัวอย่างลงไปใน dehydrant

4. Clearing การนำสารเคมีใหม่เขามาแทนที่ dehydrant และสารเคมีนี้เป็นตัวที่ยอมให้ embedding media แทรกซึมเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ ตัวกลางนี้เรียกว่า clearing agant ซึ่งได้แก่ xylene ซึ่งคุณสมบัติของ clearing agent คือจะต้องเข้ากันได้กับ dehydrant และ embedding media โดยทำหน้าเป็นตัวเชื่อม clearing agent โดยจะไปดูดเอาแอลกอฮอล์ออกจากตัวอย่างก่อนเรียกว่า dealcoholization หลังจากนั้นจึงเอาตัวอย่างเข้าสู่ emdedding media เหตุที่ต้องทำเช่นนี้เพราะ dehydrant ไม่สามารถเข้ากับ embedding media ได้

5. Infiltration เป็นการ remove เอา clearing agent ออกจากตัวอย่างแล้วแทนที่ด้วย embedding media ซึ่ง embedding media เป็นสารที่จะช่วยนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อตลอดจนโครงสร้างภายใจเซลล์เนื้อเยื่อคงรูป และแข็งพอที่จะตัดเป็นแผ่นบางๆ ได้ embedding media มักนิยมใช้ พาราฟิน ในรูปแบบของเหลว พาราฟินที่เทลงจะแทรกซึมเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อ

6. Embedding นำตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการต่างๆมาแล้วข้างต้นมาฝังใน embedding media ที่เหลวและหล่อด้วยแม่พิมพ์ เมื่อทำให้อุณหภูมิของ embedding media ลดลงบล็อกที่ได้จะมีความแข็งพอที่จะตัดเป็นแผ่นได้ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ microtome การ embed ตัวอย่างอาจจะทำได้โดยการหล่อแต่ละตัวอย่างหรือหลายๆตัวอย่างในแม่พิมพ์วิธีการ embed กระทำโดยเอาตัวอย่างออกจาก embedding media ที่เหลววางตัวอย่างลงในแม่พิมพ์โดยวางด้านที่ต้องการจะตัดอยู่ด้านล่างและควรจะกดตัวอย่างให้ผิดหน้าแบนราบติดกับพื้นของแม่พิมพ์เสร็จและหล่อด้วย

embedding media เหลวให้เต็มแม่พิมพ์ปล่อยให้เย็นลงเมื่อ medium แข็งตัวจะได้บล็อกที่มีตัวอย่างอยู่ตรงกลาง

7. การตัดชิ้นเนื้อ (sectioning & attaching tissue section)

การตัดบล็อกชิ้นเนื้อ paraffin section การเตรียมตัวอย่างเป็นแผ่นบางๆ โดยวิธี embed ตัวอย่างในพาราฟินและตัดบล็อกพาราฟินด้วย microtome โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

7.1 Trimming คือ การตัดเอาพาราฟินที่อยู่รอบๆตัวอย่างทั้งสี่ด้านออก

7.2 Facing คือ วิธีการนำพาราฟินบล็อกที่ได้จากการ trim แล้วมาใส่ในช่องสำหรับยึดตัวอย่าง block holderและปรับหน้าตัดของบล็อกให้ด้านยาวขนานกับใบมีดของเครื่อง microtome เมื่อปรับได้เหมาะสมดีแล้วจึงหมุนสกรูที่ block holder เพื่อยึดบล็อกตัวอย่างให้แน่นพอ

7.3 Sectioning คือ การตัดบล็อกตัวอย่างด้วย microtome ก่อนจะตัดได้ต้องหมุนปุ่มปรับความหนาของ section ให้ได้ตามต้องการโดยความหนาอยู่ประมาณ 4-6 ไมครอน

7.4 Picking up section คือการนำเอา section ที่ตัดได้ไปวางไว้บนแผ่นกระจกสไลด์โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ลอย section บนผิวน้ำอุ่นในหม้อที่มีอุณหภูมิที่ 45-50 องศาเซลเซียสโดยน้ำอุ่นจะช่วยให้ section ขยายตัวออกได้เต็มที่ถ้า section ออกเป็นแผ่นๆเลือกเอาแผ่นที่ดีที่สุดโดยใช้กระจกสไลด์จุ่มในน้ำอุ่นเลื่อนกระจกสไลด์ไปแตะติดกับแผ่น section โดยให้ด้านข้างของแผ่น section ติดกับผิวหน้าของกระจกสไลด์จากนั้นค่อยเลื่อนกระจกเอียงเป็นมุม 45 องศาขึ้นจากน้ำอุ่นแผ่น section จะเกาะติดกับกระจกสไลด์ขึ้นมาโดยการยึดติดกับกระจกให้แน่นสามารถทำได้โดยใส่ gelatin ผงลงไปน้ำอุ่นให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5 % สารละลาย gelatin จะช่วยให้section ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ได้ดียิ่งขึ้น

7.5 Drying slide คือการให้ section ที่ติดอยู่บนแผ่นสไลด์แห้งโดยปล่อยวางไว้ให้แห้งในบรรยากาศอุณหภูมิห้อง

8. การย้อม (staining) นำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนขั้นต้นมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลีนและสีอีโอซิน (hematoxylin and eosin หรือ H&E) โดยการขจัดพาราฟิน (Deparaffinization) ในไซลีน 2 ครั้งครั้งละ 5 นาทีจากนั้นนำสไลด์ไปไว้ในแอลกอฮอล์ในความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 99.9% 95% 80% 70% ตามลำดับ โดยใช้เวลา 5 นาทีในแต่ละความเข้มข้นและนำสไลด์มาแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นทำการย้อมด้วยสีฮีมาท็อกไซลิน 1 นาทีและทำการล้างสีส่วนที่เกินด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดและทำการปรับสภาพเนื้อเยื่อให้เป็นกลาง (Neutralization) ด้วยการแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ในความเข้มข้นที่ 70% เวลา 5 นาทีและย้อมสีซ้ำด้วยสีอิโอซิน (Counter stain)

เป็นเวลา 30 วินาทีแล้วทำการการขจัดน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) โดยจุ่มสไลด์ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% และจุ่มสไลด์ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 99.9% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (Clearing) โดยจุ่มสไลด์ในบิวทานอล 2 ครั้งครั้งละ 5 นาที และจุ่มสไลด์ในไซลีนอีก 2 ครั้งละ 5 นาทีปิดกระจกปิดสไลด์โดยใช้สารละลายเปอร์เมาต์ (Permount)

9. การอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination & interpretation of tissue section) เพื่อศึกษาข้อมูลทางจุลพยาธิวิทยาของการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมโดยอาศัยการเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพยาธิวิทยาจากคู่มือ Systemic pathology of fish (Ferguson et al.,2006)โดยการสังเกตรอยโรคต่างๆทางจุลพยาธิวิทยาได้แก่ melanomacrophage, granuloma รวมถึงรูปแบบการตายของเซลล์

3.6 วิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลการแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากปลาทับทิมป่วยด้วยอาการของการติดเชื้อในกระแสโลหิตด้วยสถิติเชิงพรรณนาและการวิเคราะห์ความรุนแรงของการติดเชื้อ *C. indologenes* (LD_{50}) ในปลาทับทิมทดลองโดยใช้วิธีการ Reed & Muench (1938)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างอวัยวะจากปลาทับทิมป่วย

ตัวอย่างปลาทับทิมป่วยจาก 6 จังหวัดในภาคกลางและภาคตะวันออกในประเทศไทย จำแนกตามรูปแบบการเลี้ยงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่ รูปแบบกระชังในบ่อดินจำนวน 30 ตัวอย่าง, รูปแบบกระชังในแม่น้ำจำนวน 70 ตัวอย่างรวม 100 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) รวมถึงข้อมูลลักษณะทางกายภาพภายนอกของตัวอย่าง ครีบเปื่อย จุดเลือดออกบริเวณลำตัว ตาโปน ท้องบวม (ภาพที่ 4,5) และลักษณะทางกายภาพภายในเช่น ม้ามโต ตับโต จุดเลือดออกที่อวัยวะภายใน (ภาพที่ 6) (ตารางที่ 6)

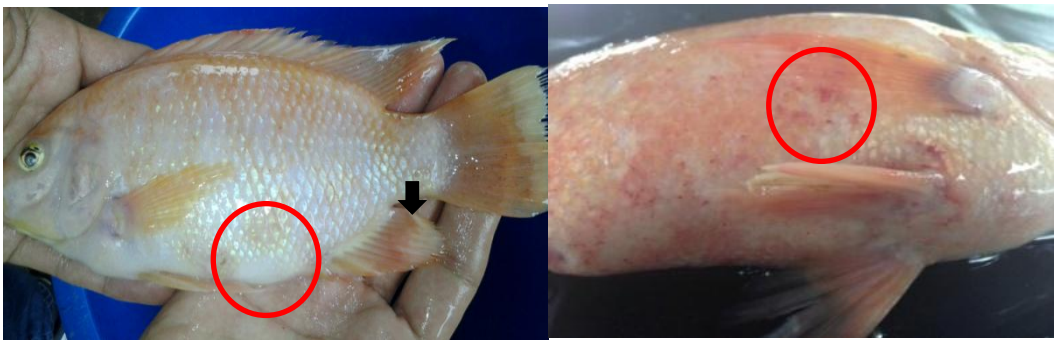
ตารางที่ 5 แสดงการแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามรูปแบบการเลี้ยงของตัวอย่างปลาทับทิมป่วย

รูปแบบการเลี้ยง	**จำนวนฟาร์ม**	**จำนวนตัวอย่าง**
กระชังในบ่อดิน	3	30
กระชังในแม่น้ำ	3	70
รวม	6	100

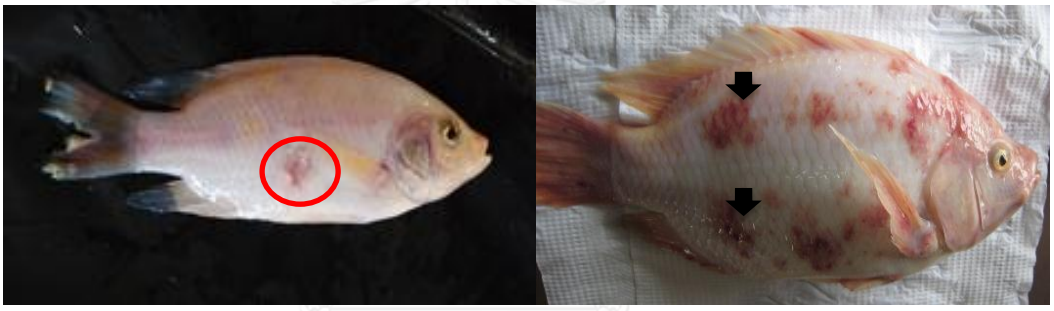
ตารางที่ 6 แสดงการแบ่งกลุ่มตัวอย่างจากข้อมูลและลักษณะทางกายภาพภายนอกและภายในของตัวอย่างปลาทับทิมป่วย 100 ตัวอย่าง

ข้อมูลและลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างปลาทับทิมป่วย	**จำนวนตัวอย่าง**
ลักษณะทางกายภาพภายใน	
ม้ามโต	50
ตับโต	70
จุดเลือดออกที่อวัยวะภายใน	70
ลักษณะทางกายภาพภายนอก	
ครีบเปื่อย	80
จุดเลือดออกบริเวณลำตัว	70
แผลหลุม	60
ท้องบวม	40

Chulalongkorn University



รูปที่ 4 แสดงรอยโรคภายนอกจากตัวอย่างของปลาทับทิมป่วย ได้แก่ ท้องบวม (วงกลม) ครีบเปื่อย (ลูกศร) (ด้านซ้าย) จุดเลือดออกตามลำตัว (วงกลม)(ด้านขวา)

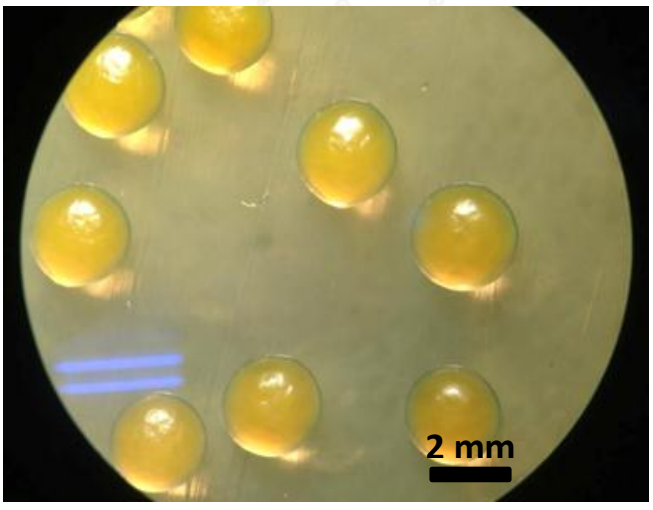


รูปที่ 5 แสดงรอยโรคภายนอกจากตัวอย่างของปลาทับทิมป่วย ได้แก่ แผลหลุม (วงกลม) (ด้านซ้าย) ปื้นเลือดออกตามลำตัว (ลูกศร) (ด้านขวา)

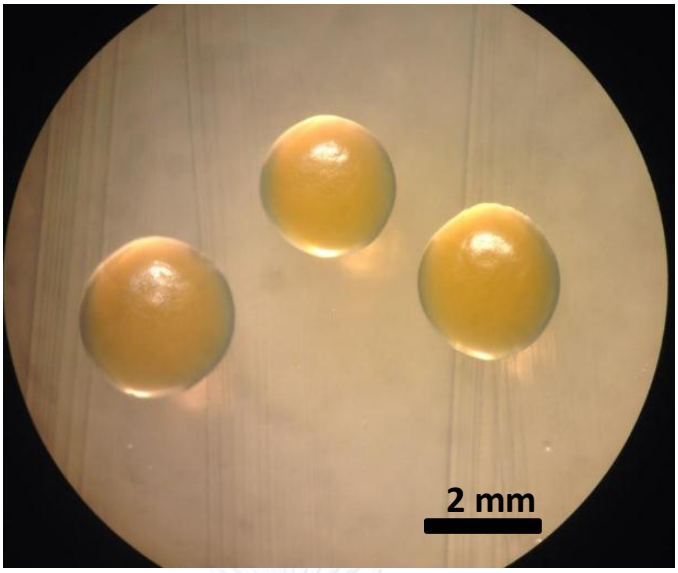
รูปที่ 6 แสดงรอยโรคภายในจากตัวอย่างของปลาทับทิมป่วย ได้แก่ ตับโตและจุดเลือดออกบริเวณตับ (ลูกศร) (ด้านซ้าย) ม้ามโต (ลูกศร) (ด้านขวา)

4.2 ผลการศึกษาการแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย

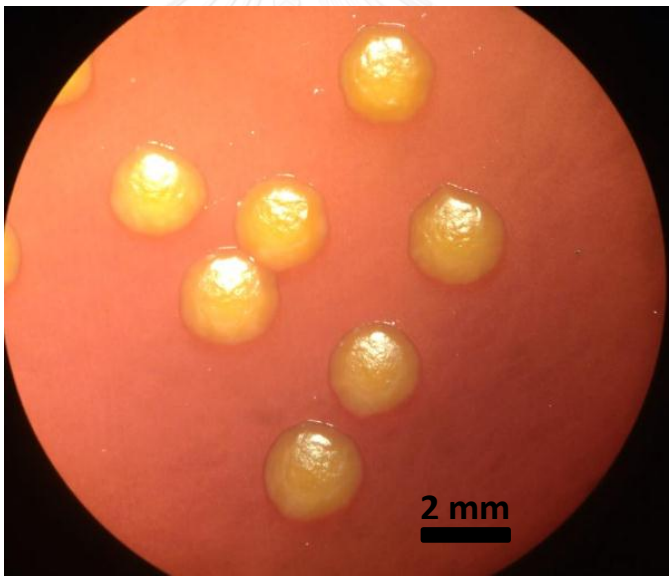
ผลการคัดเลือกเชื้อที่คาดว่าเป็นเชื้อ *C. indologenes* ตามลักษณะดังนี้โคโลนีมีขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร กลมนูน สีเหลือง ผิวหน้ามันวาว มีกลิ่นคล้ายผลไม้ สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ shieh agar ผสม tobramycin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Decostere et al., 1997) (ภาพที่ 7) ทำการคัดเลือกโคโลนีดังกล่าวจำนวน 1 - 2 โคโลนีจากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยเพื่อทดสอบคุณสมบัติของเชื้อได้ จากการศึกษาครั้งนี้พบจำนวนโคโลนีที่สงสัยทั้งหมด 36 เชื้อในตัวอย่างจำนวน 100 ตัวอย่างนำไอโซเลทที่ได้จำนวน 20 ไอโซเลททดสอบระบุคุณลักษณะเชื้อ *C. indologenes* ขั้นต้นด้วยการทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (ภาพที่ 8) และสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar (ภาพที่ 9) ร่วมกับการทดสอบคุณสมบัติการสร้าง flexirubin โดยการทดสอบกับน้ำยา 20% KOH (ภาพที่ 10) การย้อมสีแกรม ดูลักษณะเซลล์ติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างแท่ง ไม่สามารถสร้าง spore ได้ (ภาพที่ 11) สามารถแยกไอโซเลทดังกล่าวที่คาดว่าเป็น *C. indologenes* ได้จำนวน 20 เชื้อในตัวอย่างจำนวน 36 เชื้อต่อจากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเองให้ผลลบ ความสามารถในการสร้างเอมไซม์ catalase และ cytochrome oxidase C ให้ผลบวกและทดสอบขบวนการออกซิเดชั่นและเฟอร์เมนเตชั่นของเชื้อต่อสารคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน รวมถึงข้อมูลของคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* และการทดสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาลทั้ง 4 ชนิด คือ arabinose mannose mannitol maltose (ตารางที่ 7)



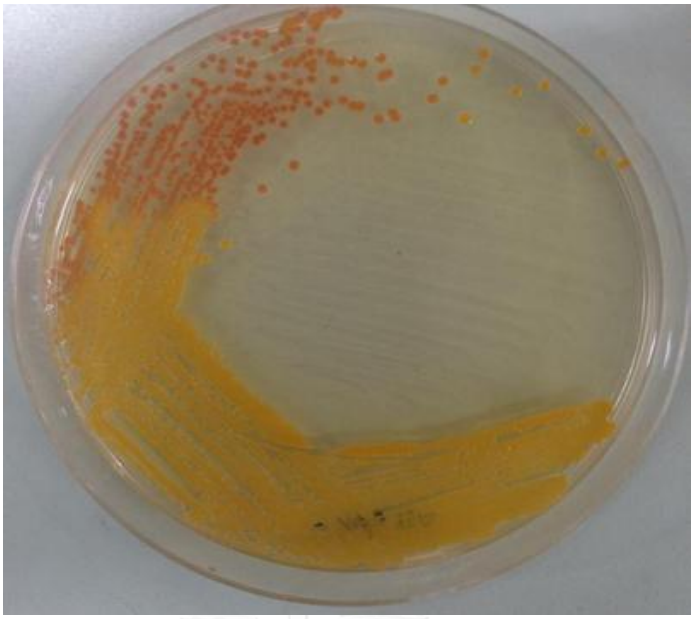
รูปที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ shieh agar ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า



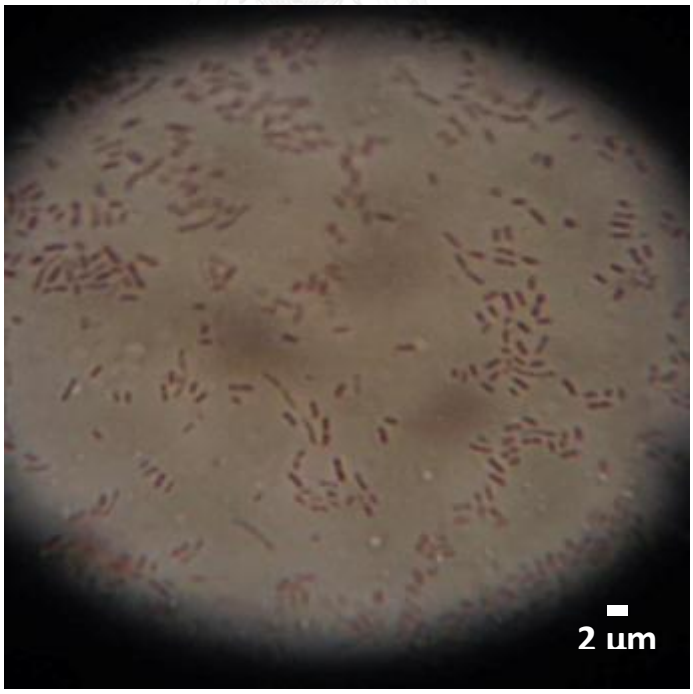
รูปที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า



รูปที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. indologenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 % sheep blood agar ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า



รูปที่ 10 คุณสมบัติการสร้าง flexirubin ของเชื้อ *C. indologenes* ทดสอบกับน้ำยา 20% KOH โดยลักษณะของโคโลนีที่ให้ผลบวกนั้นสีของโคโลนีจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มถึงน้ำตาล

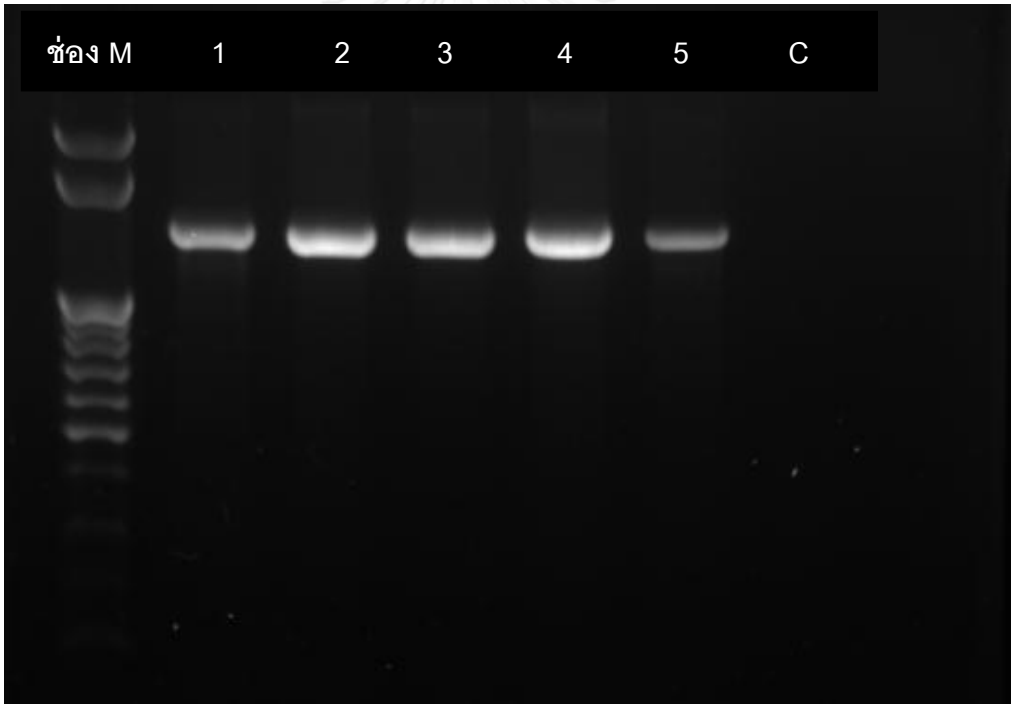


รูปที่ 11 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. indologenes* ด้วยการย้อมสีแกรม (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ C. *indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมจำนวน 20 เชื้อ

คุณสมบัติทางชีวเคมี	ไอโซเลท CU VET																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
สามารถเจริญเติบโตบน																				
MacConkey agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerance to 3.0% NaCl	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย :																				
Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การตะกอนบน egg-yolk medium	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การสร้าง :																				
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
การใช้ :																				
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	w	w	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Maltose	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Citrate	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

โดยจากข้อมูลในตารางสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลท CU VET 2 CU VET 7 CU VET 8 CU VET 9 CU VET 10 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. indologenes* และผลการศึกษาการพิสูจน์แยกเชื้อ *C. indologenes* ทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และพิจารณาจากลำดับเบสของยีน 16s-rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด universe primer เพื่อหาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะต่อ *C. indologenes* คือ forward primer UN-20 5'AGA GTT TGA TC (AC) TGG CTC AG'3) และ reverse primer R1438 3'GCC CTA GTT ACC AGT TTT AC5') (Darwish and Ismaiel, 2005) โดย PCR product ขนาด 1325 คู่เบส (ภาพที่ 12) และเมื่อนำ PCR product ทั้ง 5 เชื้อได้แก่ CU VET 2 CU VET 7 CU VET 8 CU VET 9 CU VET 10 หาลำดับเบสพบว่า PCR product มีลำดับเบสตรงกับ *C. indologenes* strain H2S10 16s ribosomal RNA gene, partial sequence และ *C. indologenes* strain MUT2 16s ribosomal RNA gene, partial sequence (accession number EU221399.1 และ JN8314444.1 ตามลำดับ*)* ที่ 99% จำนวน 4 เชื้อ ได้แก่ CU VET 2 CU VET 7 CU VET 8 CU VET 9 และ ลำดับเบสตรงกับ Candidatus *C. massilliae* (accession number AF531766 และ FJ812379) ที่ 99 % จำนวน 1 เชื้อ ได้แก่ CU VET 10



รูปที่ 12 แสดงภาพ PCR product ของเชื้อ *C. indologenes* บน agarose gel electrophoresis ขนาดประมาณ 1325 bp โดยใช้ forward primer UN-20 และ reverse primer R1438

ช่อง M คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอขนาด 3000 คู่เบส

ช่อง 1-5 คือ เชื้อ *Chryseobacterium* sp. CU VET 2 , CU VET 7, CU VET 8 , CU VET 9 , CU VET 10 ตามลำดับจากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย

ช่อง C คือ Nuclease free water (กลุ่มควบคุมลบ)

ดังนั้นจากผลการศึกษาการพิสูจน์แยกเชื้อ *C. indologenes* ด้วยคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อและทางจีโนไทป์ของเชื้อด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และพิจารณาจากลำดับเบสของยีน 16s-rRNA จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยใน 6 จังหวัดในประเทศไทยสามารถแยกเชื้อ *C. indologenes* ได้จำนวน 4 เชื้อได้แก่ CU VET 2 CU VET 7 CU VET 8 CU VET 9

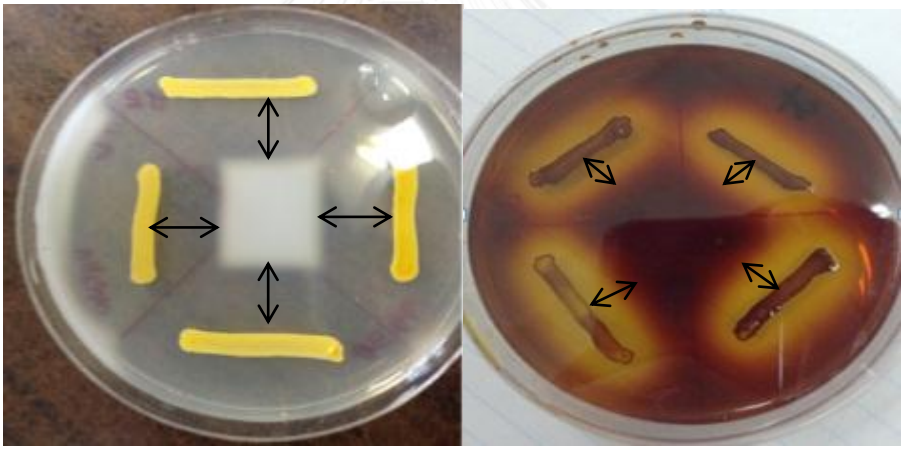
4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยในห้องปฏิบัติการ

4.3.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (heamolytic activity) ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar ผลการทดลองเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยสามารถขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar และแสดงคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ Gamma – hemolysin แสดงถึงเชื้อ *C. indologenes* ไม่สามารถสร้างสารพิษชนิด (hemolysin) เพื่อย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ดังนั้นเชื้อที่ขึ้นจะไม่มีวงใสรอบโคโลนี (non - hemolysis) (ภาพที่ 14)

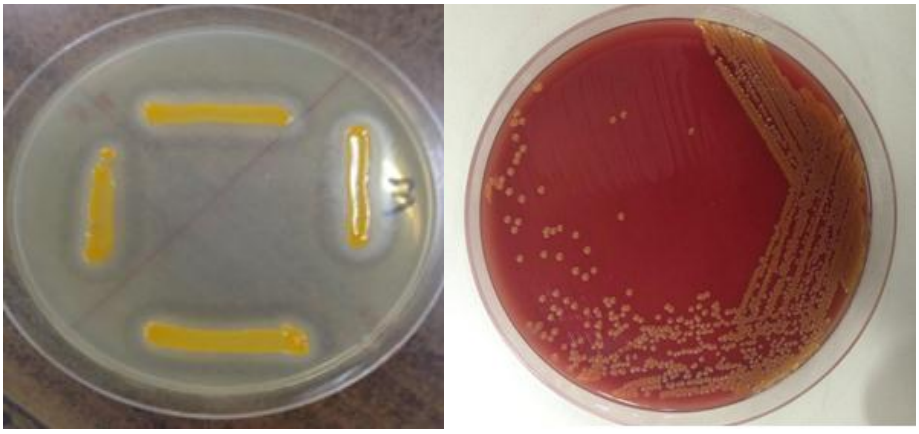
4.3.2. ผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ (enzyme activity) ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อซึ่งมีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ ได้แก่ ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ proteases บนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ proteases เกิด clear-zone ใสขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ gelatin agar รอบๆโคโลนีความกว้างตั้งแต่ 1 – 1.6 เซนติเมตร และการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ gelatinase บนอาหารเลี้ยงเชื้อ gelatin agar ซึ่งเชื้อ *C. indologenes* สามารสร้างเอนไซม์ gelatinase เกิด clear-zone ใส่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ gelatin agar รอบๆโคโลนีและความกว้างตั้งแต่ 0.7 – 1.1 เซนติเมตร (ภาพที่ 15) (ภาพที่ 13) และการสร้างเอนไซม์ lipase lecithinase (LV test) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ egg yolk agar เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ lipase lecithinase เกิด zone ขุ่นขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ egg yolk agar รอบๆโคโลนีของเชื้อให้บวก (ภาพที่ 14) รวมถึงการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ fibrinolysin บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ผสม fibrinologen III ซึ่งเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ fibrinolysin เกิดวงใสๆรอบๆโคโลนีขนาดมากกว่า 2 มิลลิเมตร (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยในห้องปฏิบัติการ

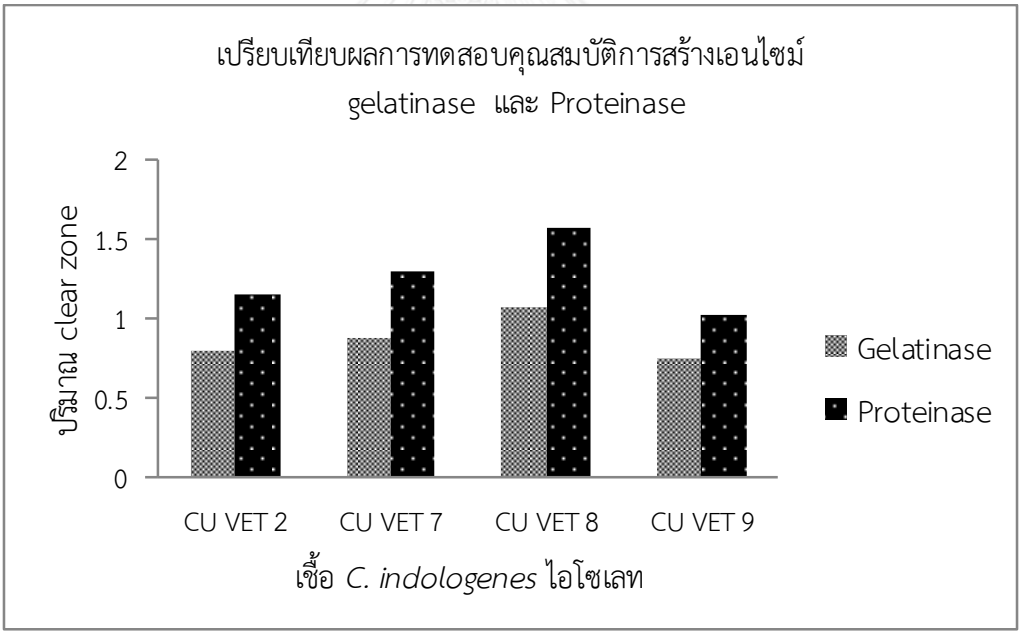
C. indologenes	คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์			คุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
	gelatinase	proteinase	lipase, lecitinase ,fibrinolysin	hemolysin
CU VET 2	0.8	1.15	+	-
CU VET 7	0.875	1.3	+	-
CU VET 8	1.075	1.575	+	-
CU VET 9	0.75	1.025	+	-



รูปที่ 13 แสดงผลการศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ gelatinase (ด้านซ้าย) proteinase (ด้านขวา) โดยพบลักษณะ clear zone ของเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8



รูปที่ 14 แสดงผลการศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ lipase lecithinase ของเชื้อ *C. indologenes* ให้ผลบวก (ด้านซ้าย) และคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar แต่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (ด้านขวา)



รูปที่ 15 แผนภูมิแท่งแสดงการเปรียบเทียบผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ gelatinase และ proteinase ของเชื้อ *C. indologenes* ไอโซเลทต่างๆ

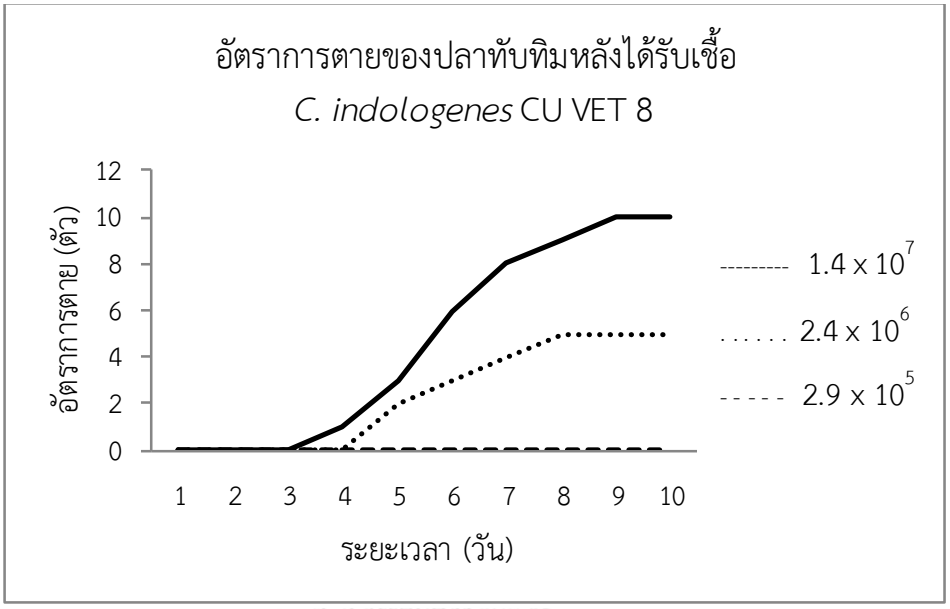
4.4 ผลการศึกษาการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมทดลอง

ผลการทดสอบโดยเริ่มต้นตั้งแต่ยืนยันจำนวนเชื้อสำหรับทดสอบด้วยเทคนิคการเจือจางความเข้มข้นของเชื้อด้วยวิธี ten fold dilution โดยเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการทดลองความรุนแรงนั้นได้แก่ 1.4×10^8 2.4×10^7 2.9×10^6 CFU/ ml หรือ 1.4×10^7 2.4×10^6 2.9×10^5 CFU/fish และฉีดเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อปลาทับทิมหนึ่งตัวเข้าทางช่องท้องหลังจากนั้นบันทึกผลอัตราการตายของปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อในความเข้มข้นที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 10 วัน (ตารางที่ 8) โดยระยะเวลาที่ปลาทับทิมเริ่มแสดงอัตราการตายหลังได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 ในระยะเวลา 10 วันในระดับความเข้มข้นที่ 4×10^7 CFU/fish ตั้งแต่วันที่ 3 หลังได้การรับเชื้อและตายอย่างต่อเนื่องและระดับความเข้มข้นที่ 2.4×10^6 CFU/fish ปลาทับทิมเริ่มแสดงอัตราการตายในวันที่ 4 ของการทดลองและตายอย่างต่อเนื่องในระดับความเข้มข้นที่ 2.9×10^5 CFU/fish ไม่พบอัตราการตายของปลาทับทิมทดลองหลังได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 (ภาพที่ 16) โดยอัตราการตายของปลาทับทิมในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1.4×10^7 CFU/fish อัตราการตายคิดเป็นร้อยละ 93.33 และ ความเข้มข้นที่ 2.4×10^6 CFU/fish อัตราการตายร้อยละ 46.66 และความเข้มข้นที่ 2.9×10^5 CFU/fish อัตราการตายร้อยละ 0 จากข้อมูลดังกล่าวค่า LD_{50} ที่ระยะเวลา 10 วันของปลาทับทิมที่ได้รับ *C. indologenes* CU VET เท่ากับ2.78×10^6 CFU/fish (ภาพที่ 17)

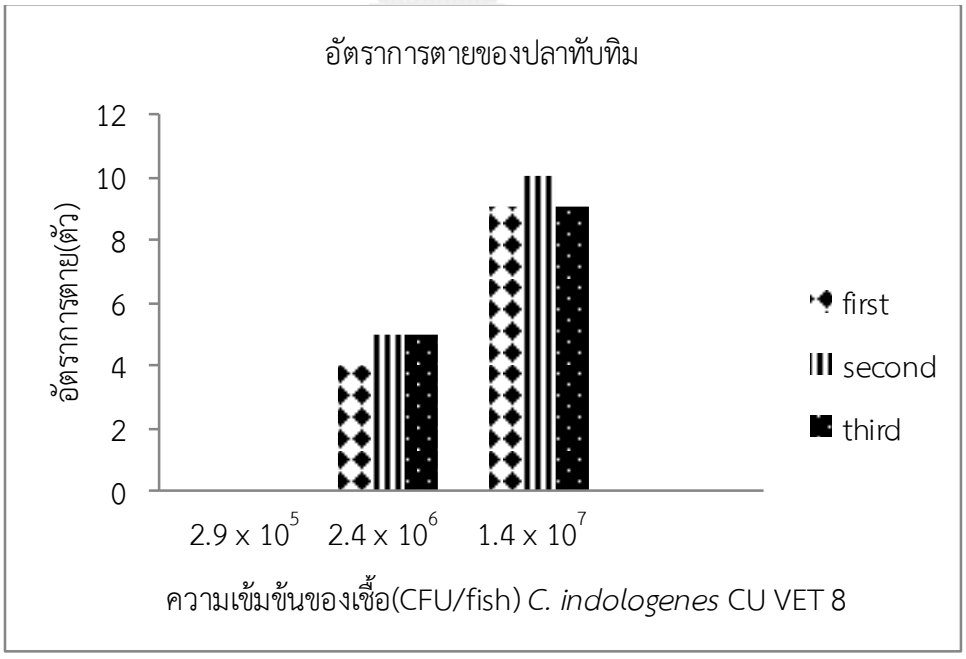
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 10 แสดงอัตราการตายของปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes*

อัตราการตายของปลาทับทิมที่ติดเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 (10 วัน)	ความเข้มข้นของเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 (10^n) CFU/fish									จำนวนปลาทับทิมที่ตรวจพบเชื้อ *C. indologenes* จากตับ ม้าม ไต ของปลาที่ได้รับ *C. indologenes* CU VET 8	
	อัตราการตายของปลาทับทิมที่ติดเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3				
	$1.4x10^7$	$2.4x10^6$	$2.8x10^5$	$1.4x10^7$	$2.4x10^6$	$2.8x10^5$	$1.4x10^7$	$2.4x10^6$	$2.8x10^5$	จำนวนปลา	เปอร์เซ็นต์
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
4	-	1	-	1	-	-	1	-	-	2/3	66.67%
5	2	1	-	2	2	-	1	1	-	9/9	100%
6	2	1	-	3	1	-	1	1	-	9/9	100%
7	2	1	-	2	1	-	2	-	-	8/8	100%
8	2	-	-	1	1	-	2	-	-	6/6	100%
9	1	-	-	1	-	-	1	2	-	5/5	100%
10	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2/2	100%
รวม	9/10	4/10	0/10	10/10	5/10	0/10	9/10	5/10	0/10	41/42	98%

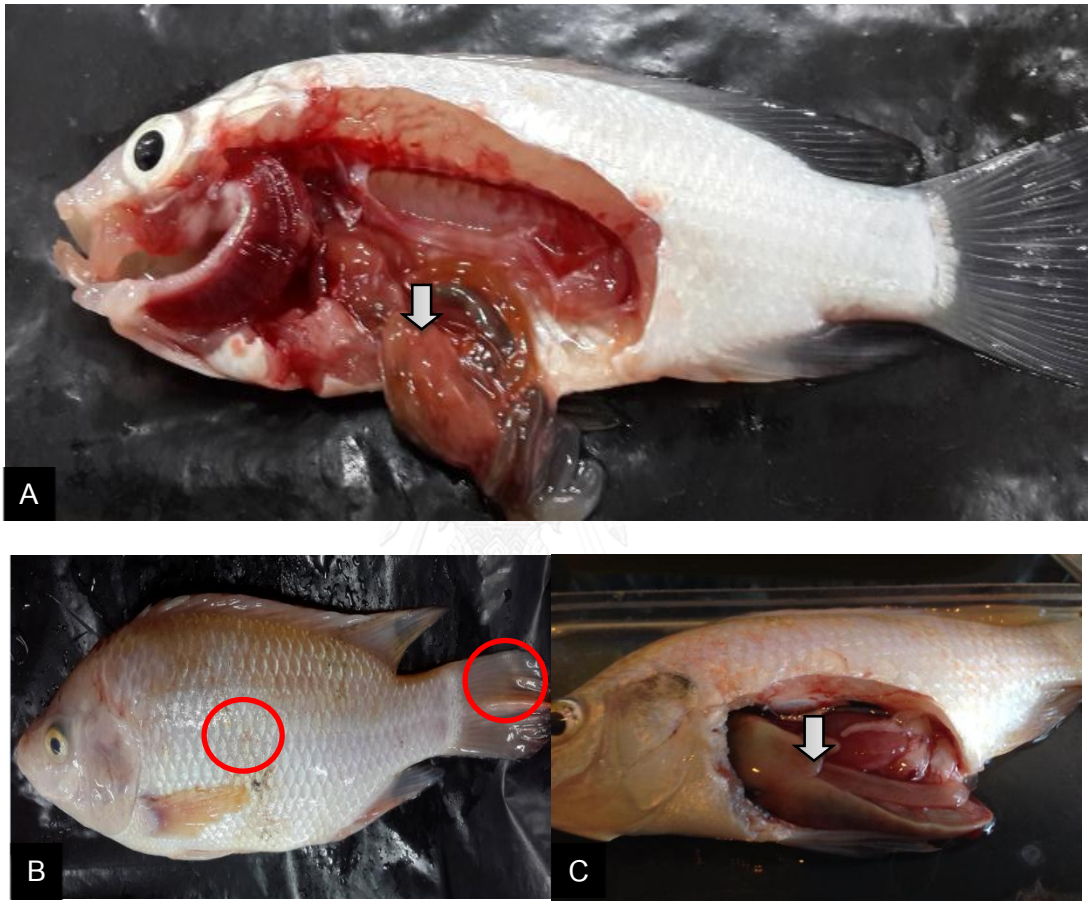


รูปที่ 16 กราฟเส้นแสดงระยะเวลาในการเริ่มแสดงอัตราการตายของปลาทับทิมหลังได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8



รูปที่ 17 แผนภูมิแสดงอัตราการตายเฉลี่ยของปลาทับทิมหลังได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8

อาการทางคลินิกของปลาทับทิมหลังการได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 พบลักษณะอาการ ว่ายน้ำเฉื่อยชา ความอยากอาหารลดน้อยลง สูญเสียการทรงตัว โดยมีรอยโรคภายนอก เช่น จุดเลือดออกบริเวณลำตัว ครีบเปื่อย ตกเลือด ท้องบวมมีการสะสมน้ำในช่องท้อง และลักษณะรอยโรคภายใน เช่น ตับ ม้ามโตและพบจุดเลือดออกที่อวัยวะภายใน (ภาพที่ 18) จากนั้นนำปลาทับทิมที่ตายจากการได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 ทำการศึกษาจุลพยาธิวิทยา



รูปที่ 18 แสดงลักษณะรอยโรคภายในและภายนอกจากปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8

(A) ปลาทับทิมปกติ ตับปกติ (ลูกศร)

(B) รอยโรคภายนอกในปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 ได้แก่ ครีบเปื่อย (วงกลม) จุดเลือดออกบริเวณลำตัว (วงกลม)

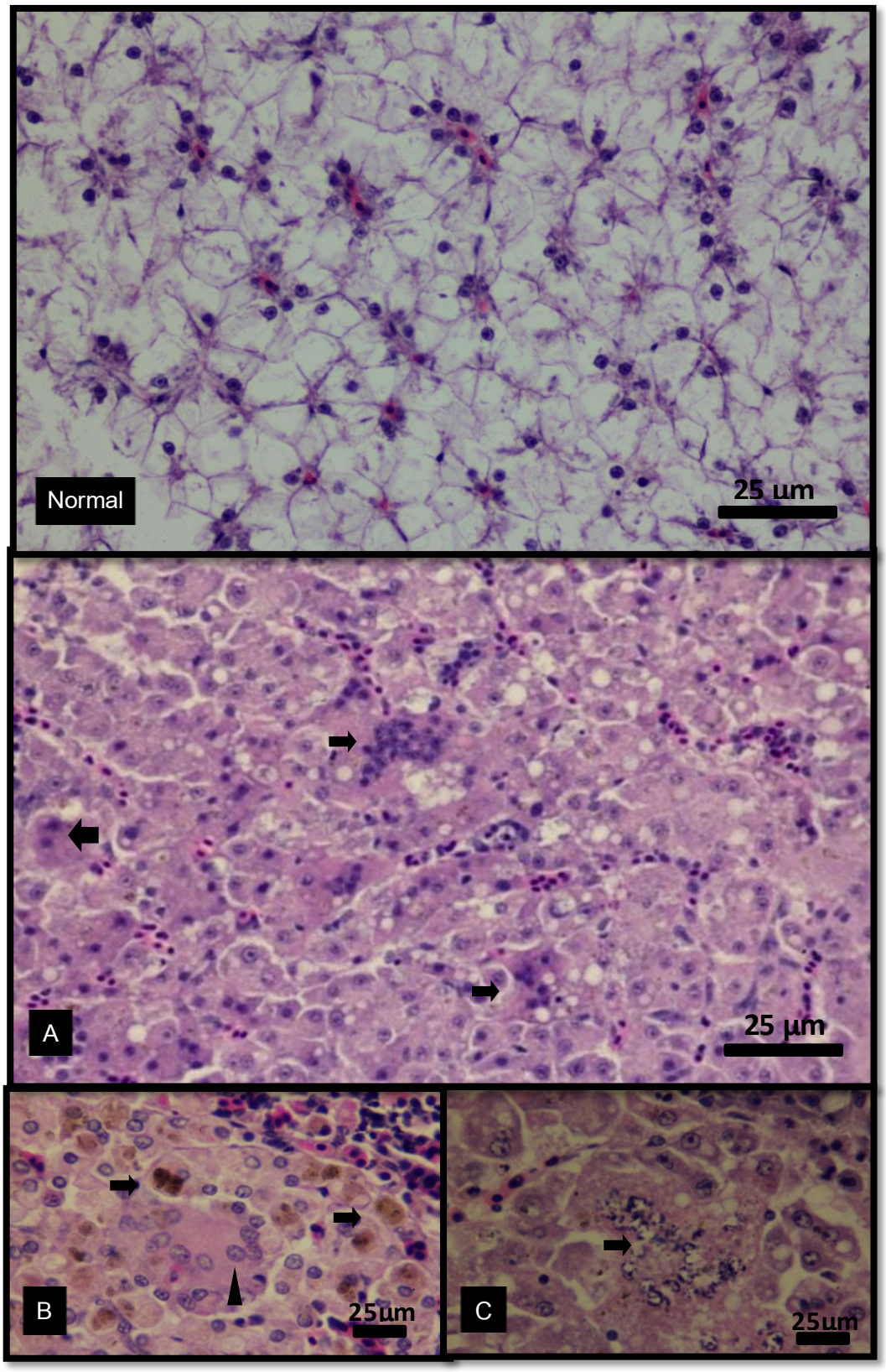
(C) และรอยโรคภายใน เช่น ตับโตและจุดเลือดออกที่ตับ (ลูกศร)

ตารางที่ 11 จำนวนปลาทับทิมที่พบรอยโรคภายนอกและภายในหลังจากได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8

ลักษณะรอยโรคที่พบในปลาทับทิมทดลอง		วันหลังการได้รับเชื้อ *C. indologenes* CUVET 8									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ผิวหนัง	แผลหลุม	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1
	ท้องบวม	-	-	-	-	-	-	2	6	3	2
	จุดเลือดออก	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
หาง	ปื้นเลือด	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	ครีบเปื่อย	-	-	-	-	-	-	5	6	4	2
ตับ	ขยายขนาด	-	-	-	1	9	8	8	-	-	-
	คั่งเลือด	-	-	-	-	9	7	-	-	-	2
	จุดเลือดออก	-	-	-	1	8	7	6	6	2	2
ม้าม	ขยายขนาด	-	-	-	2	3	5	6	6	-	-
	คั่งเลือด	-	-	-	-	-	-	5	4	4	2
	จุดเลือดออก	-	-	-	-	-	-	8	5	1	2
ไต	ขยายขนาด	-	-	-	-	-	-	2	4	5	-
	คั่งเลือด	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	จุดเลือดออก	-	-	-	-	-	-	-	3	-	1
รวมจำนวนปลาที่ตายจากการได้รับเชื้อ		0	0	0	3	9	9	8	6	5	2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.5 ผลการศึกษาจุลพยาธิวิทยาในปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8



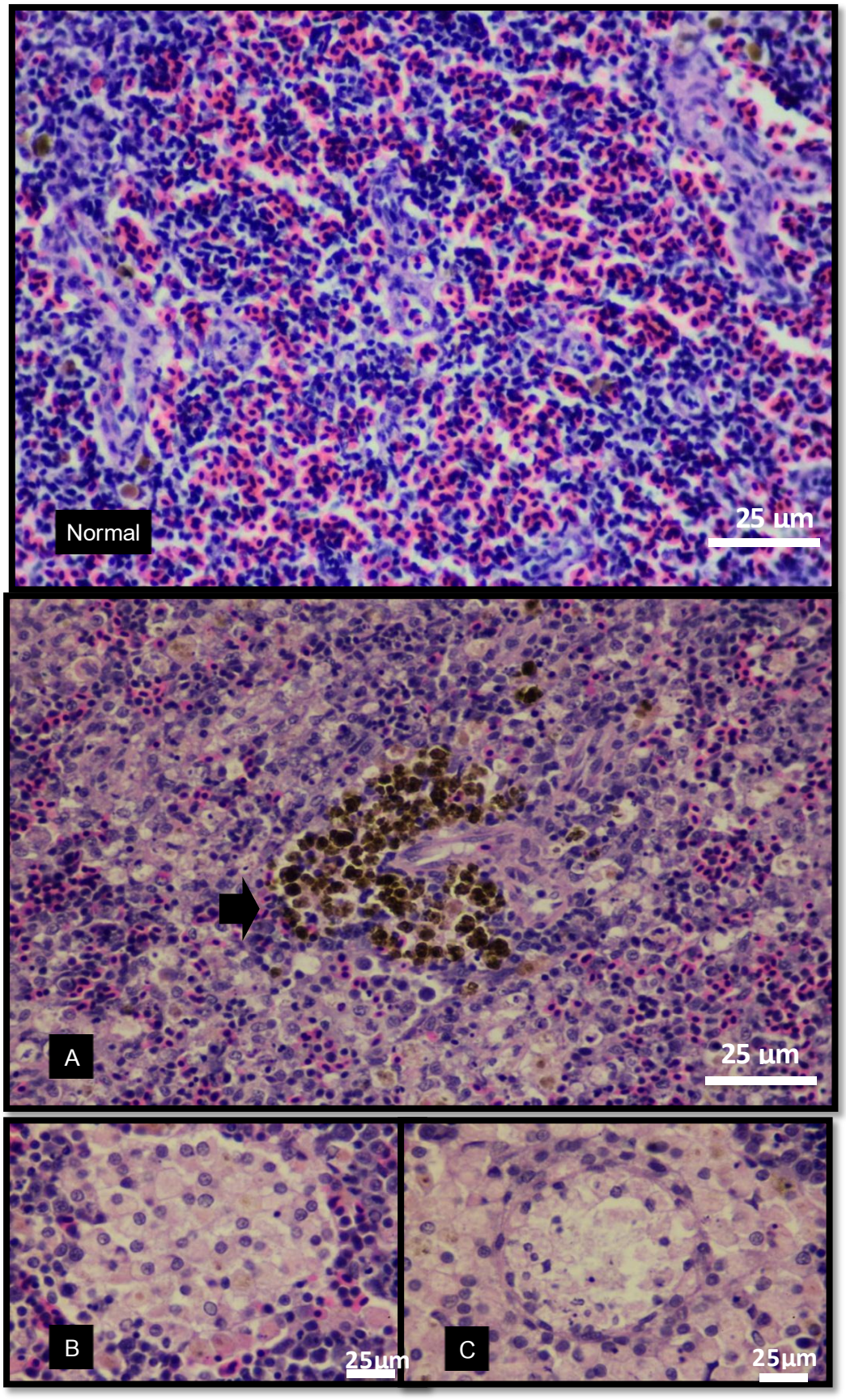
รูปที่ 19 จุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8

A) เนื้อเยื่อตับของปลาทับทิมติดเชื้อ *C. indologenes* (H & E) พบการเสื่อมและตายของเซลล์ตับอย่างรุนแรง เซลล์ตับบวม ขยายใหญ่ เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เห็นขอบเขตของเซลล์ตับและ sinusoid ไม่ชัดเจน บางบริเวณเซลล์ตับมารวมตัวกันเป็นลักษณะสองนิวเคลียส bi-nucleated cell หรือแบบ multinucleated giant cells (ลูกศร) และพบการเสื่อมของเซลล์ตับชนิดที่มีการสะสมไขมันภายในเซลล์มากกว่าปกติร่วมด้วย (กำลังขยาย 4000 เท่า)

B) ภาพขยายใหญ่ ของเซลล์ตับที่เข้ามารวมตัวกันแบบ multinucleated giant cells (หัวลูกศร) และพบ melano-macrophage (ลูกศร) เซลล์แมคโครฟาจชนิดที่มีสีน้ำตาลเข้มภายในไซโตพลาสม เพิ่มจำนวนมากในบริเวณที่เซลล์ตับตาย (กำลังขยาย 4000 เท่า)

C) ภาพแสดงการตายของเซลล์ตับที่มารวมกันคล้ายลักษณะ giant cells อย่างรุนแรง นิวเคลียสมีลักษณะแตกออกเป็นชิ้น (Karyorrhexis) (ลูกศร) และมีการแตกสลายของนิวเคลียส (Karyolysis) (กำลังขยาย 4000 เท่า)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University


Normal
25 um
A
25 um
B
25µm
C
25µm

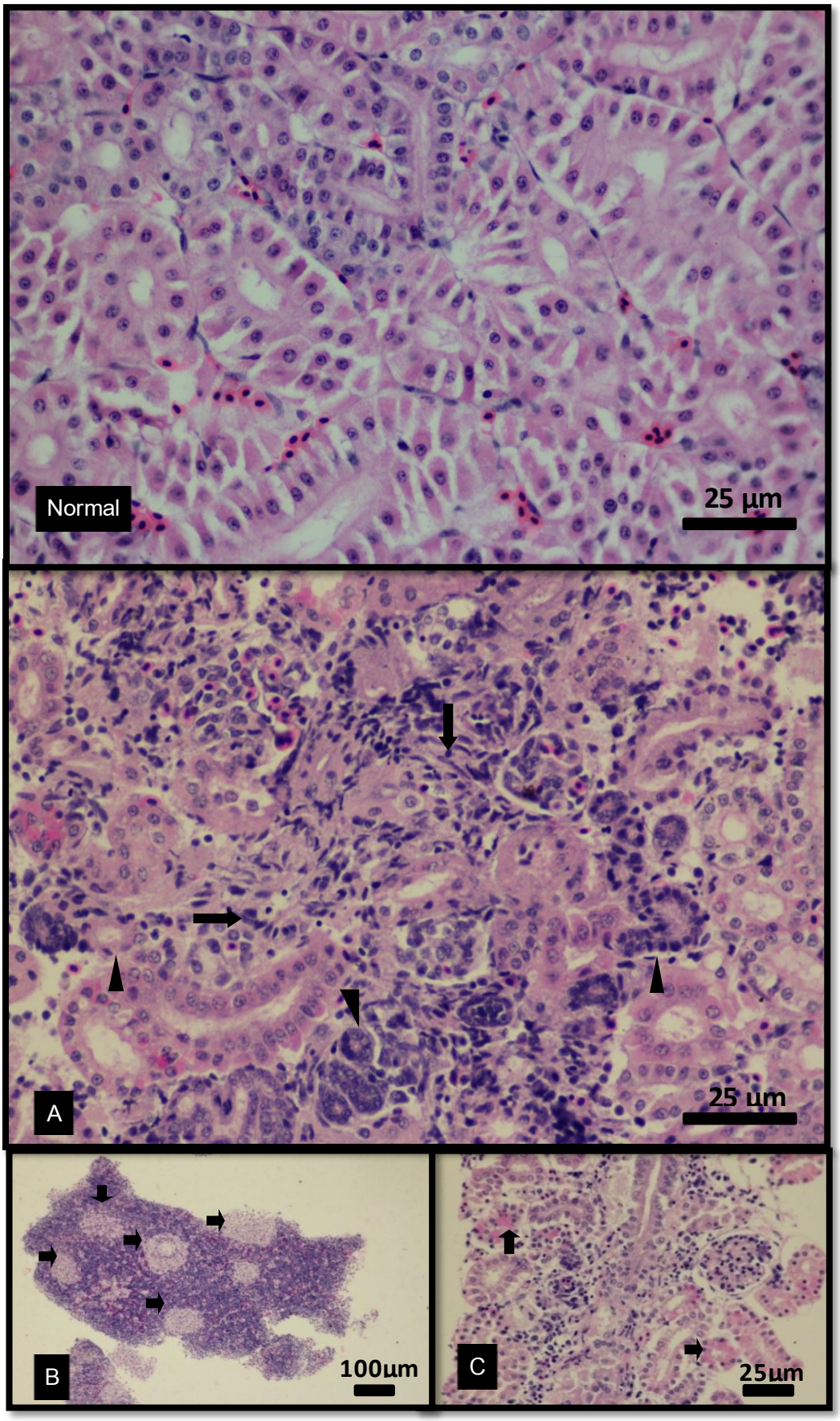
รูปที่ 20 จุลพยาธิวิทยาของม้ามปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8

A) ม้ามมีขนาดใหญ่พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมคโครฟาจจำนวนมาก ไซโตพลาสมมีขนาดใหญ่ขึ้นชัดเจน พบเศษเซลล์ที่ตายติดสีน้ำเงินเข้มภายในไซโตพลาสมของเซลล์แมคโครฟาจ รวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนและเพิ่มขนาดของ melanomacrophage center ติดสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศร)(กำลังขยาย 4000 เท่า)

B) ภาพขยายใหญ่แสดงลักษณะของการอักเสบชนิด granuloma ของม้าม ประกอบด้วยเซลล์ macrophage ที่เก็บกินเชื้อ *C. indologenes* อยู่ภายในไซโตพลาสมจำนวนมากอยู่บริเวณตรงกลางและล้อมรอบด้วยเซลล์อักเสบชนิด mononuclear lymphocytes (กำลังขยาย 4000 เท่า)

C) ภาพขยายใหญ่แสดงลักษณะการอักเสบชนิด granuloma แบบกึ่งเรื้อรัง พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาส ล้อมรอบเนื้อตายบริเวณตรงกลาง แมคโครฟาจมีการเพิ่มจำนวนและขยายขนาดมากขึ้น (กำลังขยาย 4000 เท่า)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University


Normal
25 µm
A
25 µm
B
100µm
C
25µm

รูปที่ 21 จุลพยาธิวิทยาของไตปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8

A) ภาพแสดงการเสื่อมและตายของเซลล์เยื่อบุท่อไตมีลักษณะบวมท่อไตมีลักษณะบิดเบี้ยวเห็นขอบเขตของท่อภายใน (lumen) ไม่ชัดเจนมีการแทรกของเซลล์อักเสบชนิดไฟโบรบลาส (fibroblast) (ลูกศร) เข้ามาระหว่างเซลล์เยื่อบุท่อไตที่เสื่อมและตาย พบการเพิ่มการสร้างเซลล์เยื่อบุท่อไตขึ้นใหม่จำนวนมาก (regenerative tubules) (หัวลูกศร) และพบลักษณะของการเสื่อมแบบมีแคลเซียมสะสมในบางท่อไตร่วมด้วย (กำลังขยาย 4000 เท่า)

B) บริเวณไตส่วนหน้า (head kidney) พบลักษณะการอักเสบแบบ granuloma (ลูกศร) เป็นจำนวนมาก (กำลังขยาย 1000 เท่า)

C) ภาพแสดงการเสื่อมและตายของเซลล์ท่อไตแบบ hyaline degeneration ติดสีแดงจำนวนมาก (กำลังขยาย 4000 เท่า)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
อธิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การแยกและพิสูจน์เชื้อ *C. indologenes*

จากผลการศึกษาการแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยพบโคโลนีที่สงสัยทั้งหมด 36 เชื้อจากตัวอย่างจำนวน 100 ตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ shieh agar ผสม tobramycin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสามารถแยกเชื้อที่คาดว่าเป็นเชื้อ *C. indologenes* ได้จำนวน 20 เชื้อจากตัวอย่างจำนวน 36 เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยเชื้อ *C. indologenes* สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ shieh agar ผสม tobramycin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ในการแยกเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างสามารถพบการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นๆได้สูง ฉะนั้นการเติมยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างน้ำทะเลและหอยโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสม meropenem ในการแยกเชื้อ (Bernardet et al., 2005; Maravic et al., 2013) นอกจากนี้ผลการศึกษาความไวรับต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. indologenes* พบว่าเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังนี้ imipenem piperacillin meropenem (WYK, 2008) จึงสามารถนำยาปฏิชีวนะดังนี้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อใช้เป็น selective media ในการพิสูจน์แยกเชื้อ *C. indologenes* นอกจากนี้ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ อาทิเช่น อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเพาะก็มีความสำคัญ ฉะนั้นจึงควรศึกษาขั้นตอนและวิธีการในการแยกเชื้อ *C. indologenes* เพิ่มเติม สำหรับผลการศึกษาการพิสูจน์เชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีจากตัวอย่างเชื้อ *Chryseobacterium* sp. จำนวน 20 เชื้อพบว่าเป็นเชื้อ *C. indologenes* จำนวน 5 เชื้อที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการแยกเชื้อ *C. indologenes* ออกจากเชื้อ *Chryseobacterium* sp. อื่นๆ ได้แก่ การทดสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาลทั้ง 4 ชนิด คือ arabinose mannose mannitol maltose พบว่าเชื้อ *C. indologenes* ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้น้ำตาล mannose maltose แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล arabinose mannitol ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* ในมนุษย์ (de Beer et al., 2006; Zamora et al., 2012a) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีอาจจะไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุดในการพิสูจน์เชื้อ *C. indologenes* เนื่องจากผลการศึกษาการทดสอบทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และการหาลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบเชื้อ *C. indologenes* เพียง 4 เชื้อจากจำนวน 5 เชื้อที่ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *C. indologenes* จากผลการทดสอบคุณสมบัติทาง

กายภาพและชีวเคมีในขั้นต้น มีลำดับเบสตรงกับเชื้อ *C. indologenes* (GenBank accession number EU221399.1 และ JN8314444.1*)* ที่ 99% โดยที่เชื้อจำนวน 1 เชื้อมีลำดับเบสตรงกับ Candidatus *C. massilliae* (GenBank accession number AF531766 และ FJ812379) ที่ 99 % จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* นั้นยังไม่สามารถนำมาใช้ในการแยกแยะเพื่อใช้ในการพิสูจน์เชื้อได้ในระดับสปีชีส์ ดังนั้นหากต้องการพิสูจน์เชื้อในระดับสปีชีส์จึงควรใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และการหาลำดับเบส 16s rRNA ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานการพิสูจน์แยกเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลา yellow perch ป่วยโดยผลการศึกษาคุณสมบัติชีวเคมีของเชื้อ *C. indologenes* ด้วย API 20 NE พบเชื้อ *C. indologenes* จำนวน 10 เชื้อจากจำนวน 15 เชื้อและผลการศึกษาเทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และการหาลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบ 13 เชื้อมีลำดับเบสตรงกับเชื้อ *C. indologenes* การศึกษาในครั้งนี้ประกอบกับผลการศึกษาจากรายงานอื่นๆจึงพอสรุปได้ว่าการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีมีอำนาจในการพิสูจน์เชื้อ *C. indologenes* น้อยกว่าวิธีการทางอณูชีววิทยา ทั้งนี้อาจเนื่องจากความหลากหลายของสปีชีส์ของ *Chryseobacterium* sp.

5.2 การก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes*

5.2.1 การทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยด้วยคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงพบว่าให้ผลลบในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar และผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase proteinase lipase lecitinase fibrinolysin นอกจากนี้ผลการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ชนิด gelatinase proteinase สามารถสร้างเอนไซม์ในแต่ละเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกันในปริมาณเชื้อที่เท่ากัน ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกันการรายงานก่อนหน้านี้รายงานความรุนแรงของเชื้อ *Chryseobacterium* sp. จำนวน 14 สปีชีส์จากคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ chondroitnase coagulase dnase elastase hyaluronidase gelatinase protenase, lipase lectinase fibronolysin พบเชื้อ *C. indologenes* ที่แยกได้จากหลอดลมของผู้ป่วยสามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase proteinase lipase lecitinase fibrinolysin จากตัวอย่างเชื้อ *Chryseobacterium* sp. จำนวน 14 สปีชีส์แต่ผลการศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *C. indologenes* จากหลอดลมของผู้ป่วยด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar ไม่สอดคล้องกับผลการศึกษานี้เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงให้ผลบวก และให้ผลลบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% horse blood อีกด้วย ฉะนั้นคุณสมบัติในย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *Chryseobacterium* sp. จึงจัดเป็นปัจจัยในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในมนุษย์แต่จากผลการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C.*

indologenes ในปลาทับทิมไม่พบว่าเชื้อมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแต่สามารถก่อความรุนแรงได้ในปลาทับทิม จึงอาจอนุมานได้ว่าคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงไม่มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมหรือเชื้ออาจจะมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของปลาซึ่งประเด็นนี้ยังไม่มีการทำการศึกษา ฉะนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิม

5.2.2 การศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* ในปลาทับทิมผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 โดยการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องในความเข้มข้นต่างๆ คือ 1.4×10^7 2.4×10^6 2.9×10^5 CFU/fish พบอัตราการตายของปลาทับทิมตลอดระยะเวลา 10 วันแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 โดยการอัตราการตายเริ่มจากวันที่ 3 ของการทดลองและเกิดการตายใกล้เคียง 100% หรือประมาณ 93.33 % ในวันที่ 10 หลังจากการได้รับเชื้อที่ความเข้มข้น 1.4×10^7 CFU/fish และมีค่า LD_{50} ที่ 10 วัน เท่ากับ 2.98×10^6 CFU/fish นอกจากนี้การศึกษาความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ นั้น อาทิเช่น ผลการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อ *C. indologenes* ในปลา yellow perch ที่ 6×10^7- 3×10^8 CFU/fish พบอัตราการตายที่ 21 วันหลังการฉีดเชื้อพบปลาบางส่วนยังคงมีชีวิต โดยรายงานความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* จากค่า LD_{50} ที่ 21 วันเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/fish (Pridgeon et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามค่า LD_{50} ของเชื้อ *C. indologenes* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเปรียบเทียบความรุนแรงกับการทดสอบอื่นๆที่เคยมีการรายงานเนื่องจากปัจจัยต่างๆในการทดลองที่แตกต่างกัน อาทิเช่น ระยะเวลาในการทดลอง ช่องทางที่ปลาได้รับเชื้อ รวมถึงเชื้อในแต่ละพื้นที่มีความรุนแรงมากน้อยต่าง ยิ่งไปกว่านั้นพบการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคของ *C. indologenes* ในกบนาซึ่งแสดงอาการทางประสาทและตาขุ่นขาวในประเทศไทยโดยการป้อนเชื้อทางช่องปากในกบที่ความเข้มข้น 2.02×10^8 2.02×10^7 2.02×10^6 2.02×10^5 CFU/ตัว ผลการศึกษาดังกล่าวรายงานไม่พบอัตราการตายของกบ 3 เดือนหลังการได้รับเชื้อ (ชาญณรงค์ รอดคำ, 2554) จากผลการการศึกษาดังกล่าวแสดงถึงความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. indologenes* ในสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความรุนแรงที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและช่วงอายุของโฮสต์ รวมถึงการรายงานการศึกษาลักษณะอาการทางคลินิกของปลาทับทิมหลังการได้รับเชื้อ *C. indologenes* พบลักษณะอาการ ว่ายน้ำเฉื่อยชา ความอยากอาหารลดน้อยลง สูญเสียการทรงตัว ทั้งนี้ลักษณะรอยโรคภายนอก เช่นลักษณะจุดเลือดออกบริเวณลำตัว ครีบเปื่อย ตกเลือด ท้องบวมมีการสะสมน้ำในช่องท้องและลักษณะรอยโรคภายใน เช่น ตับ ม้ามโตและพบจุดเลือดออกในอวัยวะภายในพบรอยโรคภายนอก ตับโตและพบจุดเลือดออกที่ตับ ม้ามโต ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับรอยโรคที่พบในปลาทับทิมที่ติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคฮีโมราจิก เซปซิคซีเมีย (Haemorrhagic septicemia) อาทิเช่น เชื้อ *Aeromonas hydrophila* *Edwardsiella tarda* *Pseudomonas septicemia* *Vibrio* sp. อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้จากผลการทดลองนี้ว่าเชื้อ *C. indologenes* สามารถก่อโรคได้ในปลาทับทิม (Conroy.G and Conroy.D, 2008) เป็นต้น นอกจากนี้ปลาทับทิมที่ตายจากการได้รับเชื้อ *C. indologenes* CU VET 8 ทำการการยืนยันด้วยการแยกเชื้อจากอวัยวะภายในของปลาทับทิมและเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และยืนยันด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งอาจจะมีความแม่นยำใน

การยืนยันน้อยโดยอ้างอิงจากผลการศึกษาการแยกวินิจฉัยเชื้อ *C. indologenes* ฉะนั้นควรทำการยืนยันเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการยืนยันเชื้อ *C. indologenes* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น PCR และการหาลำดับเบส เป็นต้น

5.2.3 ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* นั้นยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยและทั่วโลกการศึกษานี้จัดเป็นการรายงานผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปลาทับทิมที่ได้รับเชื้อ *C. indologenes* รายงานแรกโดยพบลักษณะการอักเสบชนิด granuloma กระจายทั่วไปในเนื้อเยื่อตับ ม้าม และไต เนื้อเยื่อตับมีการตอบสนองต่อการติดเชื้ออย่างรุนแรงโดยพบลักษณะเซลล์ตับตายและรวมตัวกันเป็นลักษณะสองนิวเคลียสหรือ multi - nucleated giant cells ซึ่งลักษณะรอยโรคดังกล่าวสามารถพบได้ในปลาทับทิมที่ติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆในปลาทับทิม เช่น จากการศึกษาจุลพยาธิวิทยาจากการได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลาทับทิมพบลักษณะ melano-macrophage center (MMC) ที่อวัยวะตับและม้ามและเกิดการเลือดคั่งบริเวณเส้นเลือดภายในอวัยวะม้ามและไตและ macrophage แพร่กระจายมากบริเวณตับ (Suanyuk Naraid, 2010) นอกจากนี้จากการศึกษาจุลพยาธิวิทยาจากการได้รับเชื้อ *Francisella asiatica* ในปลาทับทิมพบลักษณะ ไตและม้ามขยายตัวและพบลักษณะของการอักเสบแบบ granuloma นอกจากนี้ยังสามารถพบ macrophage ในบริเวณที่เกิดม้ามอักเสบ (Jeffery et al., 2010) ซึ่งลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับจุลพยาธิวิทยาของการได้รับเชื้อ *C. indologenes* ในการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ในปลาทับทิมแต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาจุลพยาธิวิทยาในปลาทับทิมหรือปลาชนิดอื่น จึงไม่สามารถศึกษาเปรียบเทียบรอยโรค หรือความรุนแรงในการก่อโรคได้ จากผลการศึกษานี้สามารถพบเชื้อในกลุ่ม *Chryseobacterium* sp. และ *Flavobacterium* sp. เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ shieh agar จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วย ซึ่งการพบเชื้ออื่นๆร่วมในฟาร์มที่มีปลาทับทิมป่วยอาจจะเป็นสาเหตุร่วมส่วนหนึ่งที่ทำให้ปลาทับทิมแสดงอาการป่วยรุนแรงมากขึ้น เช่น การศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อ *C. piscicola* ร่วมกับ *F. psychrophilum* ในความเข้มข้นต่ำ 2.5×10^6 CFU/fish สามารถก่อให้เกิดอัตราการตายสูงถึง 100% ในปลาแซลมอน (Ilardi et al., 2009) ยิ่งไปกว่านั้นในปี 2013 ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับที่มีการเก็บตัวอย่างปลาทับทิมเพื่อมาศึกษานี้ ได้มีรายงานการพบเชื้อ *Flavobacterium columnare* จากตัวอย่างที่เก็บได้จากการระบาดของโรคในฟาร์มปลาทับทิมในประเทศไทยด้วย (Dong et al., 2014) ซึ่งจากการศึกษาการติดเชื้อร่วมต่างๆดังกล่าวแสดงให้ถึงความรุนแรงที่มากขึ้นของการติดเชื้อร่วมจึงควรมีการศึกษาทดลองต่อไปในอนาคตเพื่อศึกษาการติดเชื้อร่วมของ *C. indologenes* กับเชื้ออื่นๆ เช่น *F. columnare* ว่าการติดเชื้อดังกล่าวสามารถเพิ่มความรุนแรงอัตราการตายในปลาทับทิมได้หรือไม่

5.3 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. indologenes* จากตัวอย่างปลาทับทิมป่วยคิดเป็นร้อยละ 4 จากจำนวน 100 ตัวอย่างและสามารถประเมินความรุนแรงของเชื้อ *C. indologenes* จากคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์และคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ในห้องปฏิบัติการรวมถึงการทดลองความรุนแรงของเชื้อในปลาทับทิมสรุปได้ว่า *C. indologenes* สามารถก่อโรคในปลาทับทิมได้โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาทับทิมได้รับเชื้อจนกระทั่งปรากฏอาการโดยเฉลี่ยเป็นเวลา 3 - 4 วันและมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาทับทิมได้รับเชื้อจนกระทั่งตายโดยเฉลี่ยเป็นเวลา 6 วันและมีค่าเฉลี่ย LD_{50} ที่ 10 วันอยู่ที่ 2.98×10^{6} CFU/fish และเมื่อหลังจากปลาทับทิมได้รับเชื้อพบอาการ ว่ายน้ำเฉื่อยชา ความอยากอาหารลดน้อยลง สูญเสียการทรงตัว โดยลักษณะรอยโรคภายนอกพบ ลักษณะจุดเลือดออกบริเวณลำตัว ครีบเปื่อย ตกเลือด ท้องบวมมีการสะสมน้ำในช่องท้อง และลักษณะรอยโรคภายใน เช่น ตับ ม้ามโตและพบจุดเลือดออกในอวัยวะภายในรวมถึงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาพบลักษณะ granuloma กระจายทั่วไปในเนื้อเยื่อตับ ม้ามและไต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Anacker RL and Ordal EJ. 1955. Study of a bacteriophage infecting the *myxobacterium Chondrococcus columnaris*. J Bacteriol. 70(6): 738-741.

Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, Grisez L, Tailliez P, Bizet C, Nowakowski M, Kerouault B and Swings J. 2005. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. Syst Appl Microbiol. 28(7): 640-660.

Bonten MJ, van Tiel FH, van der Geest S, Smeets HG, Stobberingh EE and Gaillard CA. 1993. Topical antimicrobial prophylaxis of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. Microbiological observations. Infection. 21(3): 137-139.

Campbell S, Harada RM and Li QX. 2008. *Chryseobacterium arothri* sp. nov., isolated from the kidneys of a pufferfish. Int J Syst Evol Microbiol. 58(Pt 1): 290-293.

Chen FL, Wang GC, Teng SO, Ou TY, Yu FL and Lee WS. 2013. Clinical and epidemiological features of *Chryseobacterium indologenes* infections: analysis of 215 cases. J Microbiol Immunol Infect. 46(6): 425-432.

Cho SH, Lee KS, Shin DS, Han JH, Park KS, Lee CH, Park KH and Kim SB. 2010. Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaerae* sp. nov. Syst Appl Microbiol. 33(3): 122-127.

Chou DW, Wu SL, Lee CT, Tai FT and Yu WL. 2011. Clinical characteristics, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of patients with *Chryseobacterium indologenes* bacteremia in an intensive care unit. Jpn J Infect Dis. 64(6): 520-524.

Conroy.G and Conroy.D. 2008. important infectious and parasitic disease of farmed tilapias. In: Schering-Plough Animal Health, UK.

Darwish AM and Ismaiel AA. 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. Mol Cell Probes. 19(4): 267-274.

de Beer H, Hugo CJ, Jooste PJ, Vancanneyt M, Coenye T and Vandamme P. 2006. *Chryseobacterium piscium* sp. nov., isolated from fish of the South Atlantic Ocean off South Africa. Int J Syst Evol Microbiol. 56(Pt 6): 1317-1322.

de Beer H, Hugo CJ, Jooste PJ, Willems A, Vancanneyt M, Coenye T and Vandamme PA. 2005. *Chryseobacterium vrystaatens*e sp. nov., isolated from raw chicken in a chicken-processing plant. Int J Syst Evol Microbiol. 55(Pt 5): 2149-2153.

Decostere A, Haesebrouck F and Devriese LA. 1997. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. J Clin Microbiol. 35(1): 322-324.

Euzeby J. 2011. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 60, part 12, of the IJSEM. Int J Syst Evol Microbiol. 61(Pt 3): 477-478.

Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Ho SW and Luh KT. 1997. Susceptibilities of *Chryseobacterium indologenes* and *Chryseobacterium meningosepticum* to cefepime and cefpirome. J Clin Microbiol. 35(12): 3323-3324.

Ilardi P, Fernandez J and Avendano-Herrera R. 2009. *Chryseobacterium piscicola* sp. nov., isolated from diseased salmonid fish. Int J Syst Evol Microbiol. 59(Pt 12): 3001-3005.

Jeffery KR, Stone D, Feist SW and Verner-Jeffreys DW. 2010. An outbreak of disease caused by Francisella sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. Dis Aquat Organ. 91(2): 161-165.

Kampfer P, Fallschissel K and Avendano-Herrera R. 2011. *Chryseobacterium chaponense* sp. nov., isolated from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). Int J Syst Evol Microbiol. 61(Pt 3): 497-501.

Kienzle N, Muller M and Pegg S. 2000. *Aeromonas* wound infection in burns. Burns. 26(5): 478-482.

Kim KK, Lee KC, Oh HM and Lee JS. 2008. *Chryseobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from a water reservoir. Int J Syst Evol Microbiol. 58(Pt 3): 533-537.

Chulalongkorn University

Loch T and Faisal M. 2014. *Chryseobacterium aahli* sp. nov., isolated from lake trout (*Salvelinus namaycush*) and brown trout (*Salmo trutta*), and emended descriptions of *Chryseobacterium ginsenosidimutans* and *Chryseobacterium gregarium*. Int J Syst Evol Microbiol. 320-331.

Madigan MP, Troisi R, Potischman N, Brogan D, Gammon MD, Malone KE and Brinton LA. 2000. Characteristics of respondents and non-respondents from a case-control study of breast cancer in younger women. Int J Epidemiol. 29(5): 793-798.

Maravic A, Skocibusic M, Samanic I and Puizina J. 2013. Profile and multidrug resistance determinants of *Chryseobacterium indologenes* from seawater and marine fauna. World J Microbiol Biotechnol. 29(3): 515-522.

Mudarris M, Austin B, Segers P, Vancanneyt M, Hoste B and Bernardet JF. 1994. *Flavobacterium scophthalmum* sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus L.*). Int J Syst Bacteriol. 44(3): 447-453.

Park SC, Kim MS, Baik KS, Kim EM, Rhee MS and Seong CN. 2008. *Chryseobacterium aquifrigidense* sp. nov., isolated from a water-cooling system. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 607-611.

Pavlov D, de Wet CM, Grabow WO and Ehlers MM. 2004. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. Int J Food Microbiol. 92(3): 275-287.

Pridgeon JW, Klesius PH and Garcia JC. 2013. Identification and virulence of *Chryseobacterium indologenes* isolated from diseased yellow perch (*Perca flavescens*). J Appl Microbiol. 114(3): 636-643.

Suanyuk Naraid NS, Nopparat Tanmark, Terutoyo Yoshida, Toshiaki Itami,. 2010. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 41-348

Von Graevenitz A. 1995. Manual of Clinical Microbiology. american society for microbiology. 520-532.

Weon HY, Kim BY, Yoo SH, Kwon SW, Stackebrandt E and Go SJ. 2008. *Chryseobacterium soli* sp. nov. and *Chryseobacterium jejuense* sp. nov., isolated from soil samples from Jeju, Korea. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 470-473.

WYK ERV. 2008. Virulence factors and clinically relevant characteristics of *chryseobacterium* species. University of the free state.

Zamora L, Fernandez-Garayzabal JF, Palacios MA, Sanchez-Porro C, Svensson-Stadler LA, Dominguez L, Moore ER, Ventosa A and Vela AI. 2012a. *Chryseobacterium oncorhynchi* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Syst Appl Microbiol. 35(1): 24-29.

Zamora L, Vela AI, Palacios MA, Dominguez L and Fernandez-Garayzabal JF. 2012b. First isolation and characterization of *Chryseobacterium shigense* from rainbow trout. BMC Vet Res. 8: 77.

Zamora L, Vela AI, Palacios MA, Sanchez-Porro C, Moore ER, Dominguez L, Ventosa A and Fernandez-Garayzabal JF. 2012c. *Chryseobacterium tructae* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Syst Appl Microbiol. 35(5): 315-319.

Zamora L, Vela AI, Palacios MA, Sanchez-Porro C, Svensson-Stadler LA, Dominguez L, Moore ER, Ventosa A and Fernandez-Garayzabal JF. 2012d. *Chryseobacterium viscerum* sp. nov., isolated from diseased fish. Int J Syst Evol Microbiol. 62: 2934-2940.

กรมประมง ส. 2555. โครงการยกระดับมาตรฐานฟาร์มปลานิลเพื่อการส่งออก. In.

จิตมนัส ช. 2554. โรคปลานิล. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 75-86.

ชาญณรงค์ รอดคำ สก, นพดล ฟิศารัตน์. 2554. การพิสูจน์และจำแนกลักษณะของเชื้อคริสโอแบคทีเรีย อินโดโลจีเนสที่แยกได้จากกบพันธุ์ผสมที่ป่วยด้วยกลุ่มอาการทางประสาทและตาขุ่นขาว. เวชสารสัตวแพทย์. 91-105.

สุดา ตัณฑวณิช เส, วรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ , จารี ผลชนะ , วารินี ปัญญาวชิร , ฐิติพร หลาวประเสริฐ , จิราภรณ์ บำรุงกิจ. 2554. โรคปลานิล. สถาบันวิจัยสุขภาพน้ำจืดกรมประมง. 4-12.

หนูเดือน เมืองแสน สเ, สุรศักดิ์ ศิริพรรอดุลศิลป์. 2549. โรคจุดน้ำของไรน้ำนางฟ้าและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 30-44.

ภาษาไทย

ชนกันต์ จิตมนัส, 2556. โรคปลานิล : เชียงใหม่สัตวแพทย์สาร หน้า 75-86

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง.2554 : สถิติการประมงปี 2554. กรมประมง.ค้นจาก http://www.fishries.go.th/it- stat/yearbook/

หนูเดือน เมืองแสน, สุวรรณนา เนียมสนิท, สุรศักดิ์ ศิริพรรอดุลศิลป์,2549 : โรคจุดดำของไรน้ำนางฟ้าและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 39-44

สุรเสน ศรีริกานนท์, 2552 : โรคกบนาจากฟาร์มเลี้ยงกบในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย : วารสารมหาวิทยาลัย นราธิวาสราชนครินทร์ หน้า 3

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 2555 : โครงการยกระดับมาตรฐานฟาร์มปลานิลเพื่อการส่งออก. ค้นจาก http://www.fishries.go.th/freshwater/web3/

สุดา ตัณฑวณิช, เต็มดวง สมศิริ, วรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ, จารี ผลชนะ, วารินี ปัญญาวชิร, ฐิติพร หลาวประเสริฐ, จิราภรณ์ บำรุงกิจ. 2554 : โรคปลานิล กรุงเทพมหานคร:สถาบันวิจัยสุขภาพน้ำจืดกรมประมง หน้า 4-12

ชาญณรงค์ รอดคำ, สุภาพ กำลังแพทย์, นพดล พิฬารัตน์. 2554 : การพิสูจน์และจำแนกลักษณะของเชื้อคริสโอแบคทีเรียม อินโดโลจีเนสที่แยกได้จากกบพันธุ์ผสมที่ป่วยด้วยกลุ่มอาการทางประสาทและตาขุ่นขาว : เวชสารสัตวแพทย์หน้า 91-105

ภาษาอังกฤษ

Anacker RL and Ordal EJ. 1955. Study of a bacteriophage infecting the *myxobacterium Chondrococcus columnaris*. J Bacteriol. 70(6): 738-741.

Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, Grisez L, Tailliez P, Bizet C, Nowakowski M, Kerouault B and Swings J. 2005. Polyphasic study of *Chryseobacterium*

strains isolated from diseased aquatic animals. Syst Appl Microbiol. 28(7): 640-660.

Bonten MJ, van Tiel FH, van der Geest S, Smeets HG, Stobberingh EE and Gaillard CA. 1993. Topical antimicrobial prophylaxis of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. Microbiological observations. Infection. 21(3): 137-139.

Campbell S, Harada RM and Li QX. 2008. *Chryseobacterium arothri* sp. nov., isolated from the kidneys of a pufferfish. Int J Syst Evol Microbiol. 58(Pt 1): 290-293.

Chen FL, Wang GC, Teng SO, Ou TY, Yu FL and Lee WS. 2013. Clinical and epidemiological features of *Chryseobacterium indologenes* infections: analysis of 215 cases. J Microbiol Immunol Infect. 46(6): 425-432.

Cho SH, Lee KS, Shin DS, Han JH, Park KS, Lee CH, Park KH and Kim SB. 2010. Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaerae* sp. nov. Syst Appl Microbiol. 33(3): 122-127.

Chou DW, Wu SL, Lee CT, Tai FT and Yu WL. 2011. Clinical characteristics, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of patients with *Chryseobacterium indologenes* bacteremia in an intensive care unit. Jpn J Infect Dis. 64(6): 520-524.

Conroy.G and Conroy.D. 2008. important infectious and parasitic disease of farmed tilapias. In: Schering-Plough Animal Health, UK.

Darwish AM and Ismaiel AA. 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. Mol Cell Probes. 19(4): 267-274.

de Beer H, Hugo CJ, Jooste PJ, Vancanneyt M, Coenye T and Vandamme P. 2006. *Chryseobacterium piscium* sp. nov., isolated from fish of the South Atlantic Ocean off South Africa. Int J Syst Evol Microbiol. 56(Pt 6): 1317-1322.

de Beer H, Hugo CJ, Jooste PJ, Willems A, Vancanneyt M, Coenye T and Vandamme PA. 2005. *Chryseobacterium vrystaatens*e sp. nov., isolated from raw chicken in a chicken-processing plant. Int J Syst Evol Microbiol. 55(Pt 5): 2149-2153.

Decostere A, Haesebrouck F and Devriese LA. 1997. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. J Clin Microbiol. 35(1): 322-324.

Euzeby J. 2011. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 60, part 12, of the IJSEM. Int J Syst Evol Microbiol. 61(Pt 3): 477-478.

Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Ho SW and Luh KT. 1997. Susceptibilities of *Chryseobacterium indologenes* and *Chryseobacterium meningosepticum* to cefepime and cefpirome. J Clin Microbiol. 35(12): 3323-3324.

Ilardi P, Fernandez J and Avendano-Herrera R. 2009. *Chryseobacterium piscicola* sp. nov., isolated from diseased salmonid fish. Int J Syst Evol Microbiol. 59(Pt 12): 3001-3005.

Jeffery KR, Stone D, Feist SW and Verner-Jeffreys DW. 2010. An outbreak of disease caused by Francisella sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. Dis Aquat Organ. 91(2): 161-165.

Kampfer P, Fallschissel K and Avendano-Herrera R. 2011. *Chryseobacterium chaponense* sp. nov., isolated from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). Int J Syst Evol Microbiol. 61(Pt 3): 497-501.

Kienzle N, Muller M and Pegg S. 2000. *Aeromonas* wound infection in burns. Burns. 26(5): 478-482.

Kim KK, Lee KC, Oh HM and Lee JS. 2008. *Chryseobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from a water reservoir. Int J Syst Evol Microbiol. 58(Pt 3): 533-537.

Loch T and Faisal M. 2014. *Chryseobacterium aahli* sp. nov., isolated from lake trout (*Salvelinus namaycush*) and brown trout (*Salmo trutta*), and emended descriptions of *Chryseobacterium ginsenosidimutans* and *Chryseobacterium gregarium*. Int J Syst Evol Microbiol. 320-331.

Madigan MP, Troisi R, Potischman N, Brogan D, Gammon MD, Malone KE and Brinton LA. 2000. Characteristics of respondents and non-respondents from a case-

control study of breast cancer in younger women. Int J Epidemiol. 29(5): 793-798.

Maravic A, Skocibusic M, Samanic I and Puizina J. 2013. Profile and multidrug resistance determinants of *Chryseobacterium indologenes* from seawater and marine fauna. World J Microbiol Biotechnol. 29(3): 515-522.

Mudarris M, Austin B, Segers P, Vancanneyt M, Hoste B and Bernardet JF. 1994. *Flavobacterium scophthalmum* sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus L.*). Int J Syst Bacteriol. 44(3): 447-453.

Park SC, Kim MS, Baik KS, Kim EM, Rhee MS and Seong CN. 2008. *Chryseobacterium aquifrigidense* sp. nov., isolated from a water-cooling system. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 607-611.

Pavlov D, de Wet CM, Grabow WO and Ehlers MM. 2004. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. Int J Food Microbiol. 92(3): 275-287.

Pridgeon JW, Klesius PH and Garcia JC. 2013. Identification and virulence of *Chryseobacterium indologenes* isolated from diseased yellow perch (*Perca flavescens*). J Appl Microbiol. 114(3): 636-643.

Suanyuk Naraid NS, Nopparat Tanmark, Terutoyo Yoshida, Toshiaki Itami,. 2010. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 41-348

Von Graevenitz A. 1995. Manual of Clinical Microbiology. american society for microbiology. 520-532.

Weon HY, Kim BY, Yoo SH, Kwon SW, Stackebrandt E and Go SJ. 2008. *Chryseobacterium soli* sp. nov. and *Chryseobacterium jejuense* sp. nov., isolated from soil samples from Jeju, Korea. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 470-473.

WYK ERV. 2008. Virulence factors and clinically relevant characteristics of *chryseobacterium* species. University of the free state.

Zamora L, Fernandez-Garayzabal JF, Palacios MA, Sanchez-Porro C, Svensson-Stadler LA, Dominguez L, Moore ER, Ventosa A and Vela AI. 2012a. *Chryseobacterium oncorhynchi* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Syst Appl Microbiol. 35(1): 24-29.

Zamora L, Vela AI, Palacios MA, Dominguez L and Fernandez-Garayzabal JF. 2012b. First isolation and characterization of *Chryseobacterium shigense* from rainbow trout. BMC Vet Res. 8: 77.

Zamora L, Vela AI, Palacios MA, Sanchez-Porro C, Moore ER, Dominguez L, Ventosa A and Fernandez-Garayzabal JF. 2012c. *Chryseobacterium tructae* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Syst Appl Microbiol. 35(5): 315-319.

Zamora L, Vela AI, Palacios MA, Sanchez-Porro C, Svensson-Stadler LA, Dominguez L, Moore ER, Ventosa A and Fernandez-Garayzabal JF. 2012d. *Chryseobacterium viscerum* sp. nov., isolated from diseased fish. Int J Syst Evol Microbiol. 62: 2934-2940.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1) Shieh agar

Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Sodium acetate	10	มิลลิกรัม
$BaCL_2.H_2O$	10	มิลลิกรัม
K_2HPO_4	0.1	กรัม
KH_2PO_4	50	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	6.7	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	1.0	มิลลิกรัม
$NaHCO_3$	50	มิลลิกรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

2) Trypticase soy agar

Trypticase	15	กรัม
Phytone	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3) Trypticase soy broth

Trypticase	17	กรัม
Phytone	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotasium phosphate	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

4) Blood agar

Beef extract agar	1000	มิลลิลิตร
Defibrinated blood (sheep)	200	มิลลิลิตร

5) LV agar (egg yolk agar)

Lecithovitellin solution	100	มิลลิลิตร
Meat extract agar	900	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6) Fibrinolysin

Nutrient agar	100	มิลลิลิตร
Fibrinologen III	280	มิลลิกรัม

7) Starch agar

Potato starch	10	กรัม
Distilled water	50	มิลลิลิตร
Meat extract agar	1000	มิลลิลิตร

8) Gelatin agar

Gelatin	4	กรัม
Distilled water	50	มิลลิลิตร
Beef extract agar	1000	มิลลิลิตร

9) 0.85% normal saline

Sodium chloride	0.85	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

10) 70% glycerol

Glycerol	35	มิลลิลิตร
Distilled water	20	มิลลิลิตร

11) Broth sugar

Peptone	10	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
Bromthymol blue	0.2	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

12) Citrate utilization medium

Sodium citrate	3	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Cysteine hydrochloride	0.1	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.4	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
$Na_2S_2O_3$	0.08	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
Phenol red ,0.2 % solution	6	มิลลิลิตร

13) Indole broth

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Disstilled water	1000	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

14) Macconkey agar

Peptone	17	กรัม
Proteose peptone	3	กรัม
Bile salt	1.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
Lactose	10	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Cystal violet	0.001	กรัม

15) Motility test media

Beef extract	3	กรัม
Gelysate peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	4	กรัม
Distilled water	1000	กรัม

16) Nitrate broth

KNo_3	1	กรัม
Meat extract broth	1000	มิลลิลิตร

17) Urea medium

KH_2PO_4	9.1	กรัม
Na_2HPO_4	9.5	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Urea	20	กรัม
Phenol red, 0.2%aq.sol.	5	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

18) Peptone solution diluents (PDS)

Peptone	1	กรัม
Sodium chloride	8.5	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอภิรัฐ วีราภรณ์ประสิทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ปี 2554

ผลงานที่นำเสนอในงานวิชาการ มีดังนี้

1 IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENESIN RED TILAPIA (OREOCHROMIS SP.) ในงานประชุมวิชาการ 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9) ในวันที่ 24-28 พฤจิกายน พ.ศ. 2557 ณ เมืองโอจิมิน ประเทศเวียดนาม

2 IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENESIN RED TILAPIA (OREOCHROMIS SP.) ในโครงการสัมมนา GRAND PROGESS PRESENTATION ครั้งที่ 1 หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิตและหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยาและภาควิชาจุลชีววิทยา วันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2557 ห้องสาธิต ตึก 60 ปี คณะสัตวแทพยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University