



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในปลานิลต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae*”

โดย นางสาวพุทธรัตน์ เป้าประเสริฐกุล และคณะ

สิงหาคม 2552

สัญญาเลขที่DBG5080006....

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในปลานิลต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae*”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|--|---|
| 1.นางสาวพุทธรรัตน์ เป้าประเสริฐกุล... |สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง..... |
| 2.นางสาวเบญจพร สัมฤทธิ์เวช..... |สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง..... |
| 3.นางเต็มดวง สมศิริ..... |สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง..... |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Strain differences are known as major factor that highly influence to different levels of disease resistance in teleost and several other organisms. The key element for controlling phenotypic characteristic against pathogen invasion is an immune related gene which can be investigated through gene expression study. This research was aimed to evaluate the expression profiles of three immune related genes: interleukin-1 β (IL-1 β), hepcidin and non specific cytotoxic cell receptor protein-1 (NCCRP-1) in three different strains of tilapia (*Oreochromis niloticus*): Chitralada1, Chitralada3 and red tilapia post challenge with Gram positive bacteria, *Streptococcus agalactiae*, the causative agent of Streptococcosis disease. Challenge results showed that Chitralada3 and Chitralada1 tilapia exhibited the highest and lowest percentage of survival rate, respectively. Differences in expression profiles post bacterial infection were found in three tilapia strains. The expressions of three immune related genes in Chitralada3 tilapia, Streptococcosis resistant strain in this study, were rapidly induced and continuously maintained for longer period than the other two strains. Additional finding indicated that tilapia possibly responded to *S. agalactiae* invasion via non-specific immunity.

Keywords: IL-1 β , hepcidin, NCCRP-1, Tilapia, *Streptococcus agalactiae*, Gene expression

บทคัดย่อ

สายพันธุ์จัดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระดับความต้านทานโรคของปลาและสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งมีผลสืบเนื่องมาจากการควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรค ส่งผลให้ระดับการตอบสนองต่อเชื้อแตกต่างกันซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากรูปแบบการแสดงออกของยีน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันสามชนิดได้แก่ interleukin-1 β (IL-1 β), hepcidin และ non specific cytotoxic cell receptor protein-1 (NCCRP-1) ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) สามสายพันธุ์ได้แก่ จิตรลดา1 จิตรลดา3 และนิลแดง ที่ผ่านการทดสอบความรุนแรงและการติดเชื้อ (challenge) ด้วยแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus agalactiae* อันเป็นสาเหตุของโรค Streptococcosis ผลการ challenge พบว่า สายพันธุ์ จิตรลดา3 และจิตรลดา1 มีอัตราการรอดสูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งสามชนิดในการศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงของระดับยีนหลังจากปลาได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซึ่งรูปแบบการแสดงออกของยีนจะแตกต่างตามชนิดสายพันธุ์ของปลานิล โดยพบว่าปลานิลจิตรลดา3ที่มีแนวโน้มทนต่อโรคสูง หลังได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามชนิดอย่างชัดเจน รวดเร็วและระดับยีนจะคงอยู่ได้นานกว่าปลานิลอีกสองสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าปลานิลมีแนวโน้มของการตอบสนองต่อเชื้อ *S. agalactiae* ที่เข้าสู่ร่างกายโดยใช้ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity)

คำสำคัญ: IL-1 β , hepcidin, NCCRP-1, ปลานิล, *Streptococcus agalactiae*, การแสดงออกของยีน

Executive summary

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในปลานิลสายพันธุ์ต่างๆ ต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อให้เกิดโรค Streptococcosis โดยมีสมมติฐานว่าสายพันธุ์มีส่วนเกี่ยวข้องกับระดับความต้านทานโรคอันเป็นผลสืบเนื่องมาจากการควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรค ดังนั้นรูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้ในสายพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่อโรคต่างกันก็จะมีรูปแบบที่ไม่เหมือนกัน จากสมมติฐานและวัตถุประสงค์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผู้วิจัยได้แบ่งการดำเนินงานของโครงการฯ ออกเป็น 2 กิจกรรม ได้แก่ กิจกรรมการทดสอบความรุนแรงและการติดเชื้อ (*challenge*) *Streptococcus agalactiae* และกิจกรรมการศึกษาสายพันธุ์ปลานิลต้านทานโรค *S. agalactiae* ซึ่งสามารถสรุปผลงานที่ได้ดังนี้

กิจกรรมการทดสอบความรุนแรงและการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้ดำเนินการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างปลานิลป่วย เชื้อที่ได้จะนำมาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางชีวภาพ และใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียที่ได้คือ *S. agalactiae* การศึกษาครั้งนี้มีจำนวนเชื้อที่รวบรวมได้จนถึงปัจจุบันทั้งสิ้น 16 isolates หลังจากรวบรวมเชื้อแล้ว นำเชื้อที่ให้ค่าการทำลายเม็ดเลือดคีมมาใช้ในการทดสอบ LD₅₀ เพื่อการ *challenge* ในปลานิลทั้งสามสายพันธุ์ในกิจกรรมต่อไป

กิจกรรมการศึกษาสายพันธุ์ปลานิลต้านทานโรค *S. agalactiae* ได้รวบรวมสายพันธุ์ปลานิล 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 1 สายพันธุ์จิตรลดา 3 และปลานิลแดง เพาะและอนุบาลลูกปลาทั้งสามสายพันธุ์ให้ปลอดเชื้อ *S. agalactiae* นำปลาที่ได้มาใช้ในการ *challenge* ด้วยเชื้อที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น เพื่อหาปลานิลสายพันธุ์ที่มีอัตราการรอดดีที่สุด และนำตัวอย่างที่ได้จากการ *challenge* มาศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในยีนสามชนิด ได้แก่ IL-1β, hepcidin และ NCCRP-1 ผลการทดลองพบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีนในปลานิลที่ตอบสนองต่อ *S. agalactiae* จะแตกต่างกันตามชนิดสายพันธุ์ปลานิล ระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามชนิดเพิ่มขึ้นหลังปลานิลมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยเฉพาะในปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ที่มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มอย่างรวดเร็วและคงอยู่ได้นานกว่าอีกสองสายพันธุ์ และปลานิลมีการตอบสนองต่อเชื้อ *S. agalactiae* ที่เข้าสู่ร่างกายโดยใช้ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific/innate immunity)

การแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในปลานิลต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลานิล(*Oreochromis niloticus*) มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา เป็นปลาที่มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายเนื่องจากเติบโตเร็วและมีราคาดี จากสถิติกรมประมงปี 2545 รายงานว่าปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีการเลี้ยงเป็นอันดับหนึ่ง ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลานิลในปี 2548 มีมูลค่าถึง 3,247.162 ล้านบาท อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลยังสามารถขยายตัวเพิ่มได้อีกเนื่องจากความต้องการของตลาดต่างประเทศยังมีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปัจจัยส่งเสริมความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำประการหนึ่งคือ การปรับปรุงให้สัตว์น้ำชนิดนั้นมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีและมีความต้านทานโรคสูง ในส่วนของปลานิลกรมประมงได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ “ปลานิลจิตรลดา 3” ที่ให้อัตราการเจริญเติบโตดีกว่าสายพันธุ์จิตรลดาเดิม และได้ส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ในการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวาง

อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบในการเลี้ยงปลานิลระยะ 3-4 ปีที่ผ่านมา คือโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมในกลุ่ม *Streptococcus* sp โดยเฉพาะ *S. agalactiae* ที่มีการระบาดมากในเขตร้อนเช่นประเทศไทย และก่อความรุนแรงมากในปลานิล ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียอย่างสูงต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิล การป้องกันโรสดังกล่าวอาจทำได้โดยใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกับวิตามิน แต่ผลเสียที่ตามมาคือการตกค้างของยาและอาจเกิดการดื้อยาในตัวปลาได้ มีผลกระทบต่อความปลอดภัยของอาหาร และไม่เป็นที่ยอมรับในการส่งออกในบางประเทศ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการป้องกันและรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวนี้ได้

จากการศึกษาวิจัยในปลาและสิ่งมีชีวิตหลายชนิดพบว่าสายพันธุ์มีส่วนเกี่ยวข้องกับระดับความต้านทานโรค ซึ่งมีผลสืบเนื่องมาจากการควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรค (immune related genes) ตลอดจนการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้นๆ ปลาจัดอยู่ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำซึ่งมีระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบที่มีมาแต่กำเนิดหรือแบบไม่จำเพาะ (non-specific or innate immunity) และแบบจำเพาะ (specific or adaptive immunity) การตอบสนองต่อโรคโดยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาจะเริ่มระยะแรกได้ตั้งแต่หลังจากเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายจนถึงประมาณ 5-4 วันโดยการใช้เซลล์จำเพาะบางชนิด หรือกลุ่มสารโปรตีน/สารเคมี เป็นต้น หลังจากนั้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจะเริ่มมีบทบาทในการกำจัดเชื้อโรคจากการสร้างแอนติบอดีของปลา

ซึ่งกลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่กล่าวข้างต้นนี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับเชื้อ (host) และชนิดจุลชีพหรือเชื้อ (pathogen) ที่ก่อให้เกิดโรคนั้นๆ สายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูง หรือทนโรค (resistant strain) จะมีความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพกว่าสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค (susceptible strain) ส่งผลให้รูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression) ในการตอบสนองต่อการเกิดโรคของทั้งสองสายพันธุ์หลังจากการติดเชื้อก็จะแตกต่างกันด้วย ตัวอย่างยีนที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ ยีนในกลุ่ม cytokine และ chemokine ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นสื่อหรือตัวกลาง (mediator) ที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันอย่างรวดเร็วและยับยั้งปฏิกิริยาหลังเกิดกระบวนการอักเสบ (inflammation) จากการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายหรือการติดเชื้อ

สำหรับในประเทศไทย ยังไม่พบว่ามีรายงานการทดสอบการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในสายพันธุ์ต่างๆของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ซึ่งมีด้วยกันหลายสายพันธุ์ ถึงแม้ว่าปลานิลจิตรลดา 3 จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี แต่จากการเลี้ยงในฟาร์มของเกษตรกรพบว่าอัตราการตายที่เกิดในปลานิลสายพันธุ์นี้ค่อนข้างสูง ในขณะที่ปลานิลจิตรลดาสายพันธุ์ดั้งเดิม (จิตรลดา 1) และนิลแดงซึ่งเป็นปลานิลอีกสองสายพันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงพบว่าอัตราการตายจากการติดเชื้อ *Streptococcus* อยู่ในระดับต่ำกว่าปลานิลจิตรลดา 3 โดยปลานิลจิตรลดา 1 และนิลแดงได้นำเข้ามาในประเทศไทยก่อนปลานิลจิตรลดา 3 จึงอาจเป็นไปได้ว่าสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดีกว่าปลานิลจิตรลดา 3 จึงมีการตั้งสมมติฐานว่าทั้งสองสายพันธุ์อาจเป็นปลานิลที่มีความสามารถในการทนโรคนี้อีกดีกว่าปลานิลจิตรลดา 3

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสายพันธุ์ปลานิลที่ให้อัตรารอดดีที่สุดต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในสภาพควบคุมโดยใช้ปลานิลทั้งหมดสามสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์จิตรลดา 1 จิตรลดา 3 และนิลแดง นอกจากนี้จะศึกษาถึงการแสดงออกของยีนสามชนิดได้แก่ interleukin1-β (IL-1β), hepcidin และ non-specific cytotoxic cell receptor protein-1 (NCCRP-1) ซึ่งยีนทั้งหมดในการวิจัยครั้งนี้จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ งานวิจัยครั้งนี้จะได้มาซึ่งข้อมูลสายพันธุ์ที่จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลานิล และได้ข้อมูลเบื้องต้นที่จะทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับยีนและกลไกการกำจัดเชื้อ *S. agalactiae* ของปลานิลในประเทศไทย อันจะช่วยในการวางแผนป้องกันและแก้ปัญหาโรคดังกล่าวให้ได้ผลและมีประสิทธิภาพในระยะยาวอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบการรอดตายปลานิลจิตรลดา จิตรลดา 3 และนิลแดง ต่อการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในสภาพควบคุม
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคในสายพันธุ์ปลานิลที่ให้อัตรารอดดีที่สุดและต่ำสุด หลังจากติดเชื้อ *S. agalactiae*

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาที่ได้นำเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2508 โดยสมเด็จพระจักรพรรดิอากิฮิโตะแห่งประเทศญี่ปุ่นเมื่อครั้งดำรงตำแหน่งมกุฎราชกุมาร ทรงทอดถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช หลังจากนั้นได้มีการเพาะขยายพันธุ์ปลานิลโดยกรมประมง และแจกจ่ายให้แก่เกษตรกรเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก ปลานิลสายพันธุ์ดังกล่าวนี้รู้จักกันในนามของ “ปลานิลจิตรลดา” ในปี 2541 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมงได้แจกจ่ายและส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยง “ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3” ซึ่งพัฒนามาจากปลานิลสายพันธุ์ “GIFT” ที่ได้รับมาจากหน่วยงาน ICLARM ประเทศฟิลิปปินส์ ปลานิล GIFT เกิดจากการผสมของปลานิล *O. niloticus* จากแหล่งต่างๆทั่วโลกจำนวน 8 สายพันธุ์ ปลานิลจิตรลดา 3 เป็นที่นิยมเลี้ยงมากเนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี (ยุพินท์ และ พันธศักดิ์ 2543)

อย่างไรก็ดีได้เกิดโรคระบาดในปลานิลที่เรียกว่า “Streptococcosis” และโรคดังกล่าวได้เพิ่มความรุนแรงในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา Perera *et al.* (1994) รายงานความรุนแรงของโรคนี้ว่าสามารถทำให้ปลาตายได้สูงถึง 75% หากเกิดโรคนี้กับปลาที่เลี้ยงในระบบปิด สาเหตุของโรค Streptococcosis เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมในกลุ่ม *Streptococcus* spp โรคนี้สามารถเกิดได้กับปลาหลายชนิด สำหรับปลานิลในช่วงแรกของการเกิดโรคจะพบในเฉพาะปลาขนาดใหญ่ แต่ในปัจจุบันที่การระบาดของโรคเพิ่มมากขึ้นจะพบว่าปลานิลทุกขนาดสามารถติดเชื้อ *S. spp* และตายได้ ลักษณะภายนอกทั่วไปของปลาที่ติดโรคคือ ตาขุ่น ตาบอดหรือตกเลือดภายในลูกตา บางครั้งอาจพบว่าได้คาง หรือช่องขั้บถ่ายมีอาการบวมแดง มีน้ำเลือดภายในช่องท้อง อาการของโรคนี้จะผันแปรไปตามชนิดของปลา มีทั้งไม่แสดงอาการ เป็นอย่างถึงเฉียบพลัน หรือแสดงอาการของโรคช้าและเรื้อรังเป็นระยะเวลานานกว่าปลาจะตาย

แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็นหลายชนิดตามคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณลักษณะที่เป็นโครงสร้างบนผิวเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติเจนหรือคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา เชื้อ *Streptococcus* ที่เป็นสาเหตุของโรคในสัตว์น้ำมี 2 ชนิดคือ *S. iniae* และ *S. agalactiae* ซึ่งชนิดแรก

จะไม่มีคุณสมบัติทางเซรั่มวิทยาแอนติเจนที่ผิวเซลล์ตั้งแต่กรุ๊ป A ถึง V ส่วนชนิดหลังมีแอนติเจนที่ผิวเซลล์เป็นกรุ๊ป B (นิลบล, 2544; นิลบล และคณะ, 2545; Sneath *et al.*, 1986; Eldar *et al.*, 1994; Hawke, 2000; Evans *et al.*, 2002) มีรายงานการเกิดโรคปลานิลในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยว่ามาจากเชื้อ *Streptococcus* ที่มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในกลุ่ม β -haemolysis ส่วนทางภาคใต้มีรายงานการระบาดของเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง (นิลบล และคณะ, 2545; นเรศ และคณะ, 2548)

การกำจัดเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายจะทำให้ได้เร็วหรือช้า ขึ้นอยู่กับความสามารถและประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในการที่จะควบคุมและกำจัดการแพร่ของเชื้อ โดยเฉพาะในระยะแรกที่ปลาได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย Shoemaker *et al.* (1997) ได้เปรียบเทียบความสามารถของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (macrophage) ในปลาคูโกอเมริกัน (*Ictalurus* sp) ต่อการกำจัดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Edwardsiella ictaluri* ที่เป็นสาเหตุของโรค Enteric septicemia of catfish (ESC) พบว่า ความสามารถของแมคโครฟาจจากสายพันธุ์ทนโรค จะสูงกว่าในสายพันธุ์อ่อนแอ และค่าดังกล่าวจากทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน เช่น cytokine, chemokine, interferon, toll-like receptor และกลุ่มแอนติบอดี ในปลาหลายชนิดหลังการติดเชื้อทั้งจากไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต โดยพบว่าการแสดงออกของยีนในสายพันธุ์ที่ทนโรค และอ่อนแอมีลักษณะแตกต่างกัน (Baoprasertkul *et al.*, 2004; Peatman *et al.*, 2006; Baoprasertkul *et al.*, 2006; Matejusova *et al.*, 2006; Lockhart *et al.*, 2007) ซึ่งผลจากการศึกษาดังกล่าวบ่งบอกถึงรูปแบบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immune response) และความต้านทานโรคในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การรวบรวมและแยกเชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิลป่วย

แยกเชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิลป่วยที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ โดยจะทำการแยกเชื้อและตรวจสอบเชื้อที่ได้จากปลานิลด้วยวิธีดัดแปลงจาก Russo *et al.* (2006) และ Evans *et al.* (2002) โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ตรวจวินิจฉัยลักษณะภายนอกของปลานิลป่วย
2. ตรวจวินิจฉัยอวัยวะภายในของปลานิลป่วย
3. ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยการเขี่ยเชื้อจากอวัยวะในต่างๆ เช่น ตับ ม้าม ไต ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำเชื้อที่ได้มา streak บน Tryptone Soya Agar (TSA) plate แล้วไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4. ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ โดยคุณลักษณะโคโลนีของเชื้อที่ปรากฏบน TSA plate ย้อมสีแบคทีเรียแบบ Gram's stain และทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย
5. ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น ทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test) และใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 strep และแปรผลที่ได้โดยโปรแกรม Analytical Profile Index (API) Web
6. ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (sensitivity test) นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มา spread บน Muller Hinton agar plate ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีแล้วนำแผ่น disc สำเร็จรูปที่มียาต้านจุลชีพแต่ละชนิดวางบน agar plate นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบขนาด clear zone ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับขนาดมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา 3 ชนิดคือ oxytetracyclin, enrofloxacin และ sulfatrimetroprim

การหาค่า LD_{50}

1. นำเชื้อที่แยกได้จากปลานิลป่วยและผ่านการตรวจสอบแล้วว่าเป็นเชื้อ *S. agalactiae* มาเปรียบเทียบการทำลายเม็ดเลือด (hemolytic activity) บน blood agar เลือกเชื้อที่ให้ผลการทำลายเม็ดเลือดที่ดีโดยดูจากขนาด clear zone ที่ปรากฏบน blood agar เชื้อที่เลือกถูกนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป
2. นำปลานิลขนาด 40 กรัม ที่ผ่านการตรวจจากห้องปฏิบัติการแล้วว่าปลอดเชื้อ *S. agalactiae* มาเลี้ยงในตู้ทดลองขนาด 18 x 36 นิ้ว บรรจุน้ำ 100 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 16 ตู้ เลี้ยงปลานิลให้คุ้นเคยกับตู้เป็นเวลา 1 สัปดาห์
3. ทดลองหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลานิลตายที่ 0 % และ 100 % โดยเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น OD (optical density) เท่ากับ 0.6 , 0.5 , 0.4 , 0.3 , 0.2 , 0.1 และ 0.7 (วัด OD ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ 0.85 % นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ฉีดเข้าปลานิลบริเวณช่องท้องประมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ความเข้มข้นละ 10 ตัว ส่วนปลานิลในชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85 % บันทึกผลการตายสะสมของปลานิล 0% และ 100 % ที่ 96 ชั่วโมง หลังการฉีดเชื้อ
4. ทดลองหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลานิลตาย 50 % ที่เวลา 72 , 48 , 24 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ โดยนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นที่ทำให้ปลานิลตาย 0 % และที่มีความเข้มข้นที่ทำให้ปลานิลตายที่ 100 % ที่ 96 ชั่วโมง จากการทดลองในข้อ 2 มาจัดแบ่งช่วงความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเป็นระดับความเข้มข้น 6 ระดับ ตามวิธีของ Reed and Muench (1938) โดยใช้สูตร

$$\log OD \text{ 6 ระดับ} = \frac{\log OD \text{ ตาย} - \%100 \log OD \text{ ตาย} 0 \%}{n-1}$$

n-1

โดย n คือ จำนวนระดับความเข้มข้น

5. เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ ตามที่คำนวณได้โดยเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 % นำสารละลายเชื้อที่เจือจางมา spread plate ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียที่ได้ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ฉีดเข้าปลาในบริเวณช่องท้อง ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ความเข้มข้นละ 10 ตัวโดยฉีดปลาในชุดควบคุมด้วยน้ำเกลือ 0.85 % แล้วบันทึกผลการตายของปลาในถังที่ 72 ,48 ,24 และ 96 ชั่วโมง
6. นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

ทดสอบความรุนแรงและการติดเชื้อ (challenge) ในปลา

1. รวบรวมปลา 3 สายพันธุ์เพื่อผลิตลูกปลาปลอดเชื้อ *S. agalactiae* ได้แก่ สายพันธุ์จิตรลดา 1 สายพันธุ์จิตรลดา 3 และ นิลแดง สายพันธุ์ละ 1,500 ตัว อนุบาลและเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 6 ตัน สายพันธุ์ละ 2 ถัง ที่ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำอุดรดิตถ์ ควบคุมระบบและบริเวณที่อนุบาลลูกปลาเพื่อไม่ให้เกิดการแพร่ของเชื้อ *S. agalactiae* เช่น ให้เจ้าหน้าที่สวมรองเท้าบูท ผ่านที่ฆ่าเท้าที่ใส่น้ำยาฆ่าเชื้อคลอรีนความเข้มข้น 30 ppm น้ำที่ใช้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน และอุปกรณ์ที่ใช้จะแยกจากงานอื่นๆ เป็นต้น เปลี่ยนถ่ายน้ำวันเว้นวัน ตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติ น้ำ เช่น วัฏออกซิเจน ความเป็นกรด-ด่าง alkalinity และ ค่าความกระด้างของน้ำ ในระหว่างการเลี้ยงจะสุ่มตัวอย่างลูกปลาจากแต่ละสายพันธุ์มาห้องปฏิบัติการที่สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืดเพื่อตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* เดือนละ 1 ครั้ง
2. หลังจากปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 80 กรัม ทำการสุ่มปลาเพื่อนำมาตรวจสอบว่าปลาทั้งสามสายพันธุ์ปลอดเชื้อ *S. agalactiae*
3. นำลูกปลาปลอดเชื้อมา challenge ในตู้ทดลองขนาด 18 x 36 นิ้ว บรรจุน้ำ 100 ลิตร ใส่ปลา สายพันธุ์ละ 5 ตัว/ตู้ โดยก่อนปล่อยลงเลี้ยงในตู้เดียวกันจะตัดครีบทูของปลาจิตรลดา 1 เพื่อเป็นการทำเครื่องหมายให้แตกต่างจากปลาจิตรลดา 3 หลังจากเลี้ยงในตู้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ทดสอบความรุนแรงตามวิธีการข้างต้น โดยแบ่งออกเป็นชุดควบคุม (control) และชุดทดลอง (treatment) โดยชุดทดลองจะฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* และชุดควบคุมถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ ซึ่งความเข้มข้นของแบคทีเรีย (CFU/ml) ที่ใช้ในการทดลองมาจากค่าเฉลี่ยของค่า LD_{50} ที่ได้ข้างต้น
4. เก็บตัวอย่างอวัยวะได้แก่ไต (kidney) ไตส่วนหน้า (head kidney) ตับ (liver) และ ม้าม (spleen) จากปลา 3 สายพันธุ์ละ 5 ตัวของทั้ง 2 ชุดทดลองในแต่ละช่วงเวลา ได้แก่ระยะเวลาก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) และหลังฉีดที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 3 วัน และ 7 วัน นำตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบการแสดงออกของยีนต่อไป เมื่อครบ 7 วันสังเกตอาการปลา ตรวจนับจำนวนปลาตาย และเก็บตัวอย่างปลาที่ตายเพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคในปลา เมื่อครบ 7 วันตรวจสอบอัตราการรอดของปลาในถังแต่ละสายพันธุ์

5. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่ให้อัตราอคติที่สุด

One step RT-PCR

ตัวอย่างจากขั้นตอน challenge จะนำมาสกัด RNA เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี one step RT-PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างจากขั้นตอน challenge มาบดในโถรงบดยาด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งผงตัวอย่างที่บดได้ประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด 1.5 ml เพื่อนำมาสกัด RNA ด้วย High Pure RNA Tissue Kit (Roche Applied Science) ตามวิธีมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต นำ RNA ที่สกัดได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าพร้อมใช้งาน

2. นำ RNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน 3 ชนิด ได้แก่ interleukin-1 beta (IL-1β), hepcidin และ NCCRP-1 ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ชุด SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนทั้งสามชนิดในการตรวจสอบ และใช้ beta-actin (β-actin) เป็น internal control ในปฏิกิริยา RT-PCR รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1 สำหรับรายละเอียดการเตรียมสารในปฏิกิริยา RT-PCR กล่าวโดยย่อได้ดังนี้ เตรียมของสารละลายในการทำ RT-PCR มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร/1

ตัวอย่าง โดยใช้ reaction mix จำนวน 12.5 ไมโครลิตร, SuperScript III RT/Platinum Taq 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม (forward และ reverse) 1 ไมโครลิตร และ RNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ RNase-free จำนวน 8.5 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ในเครื่อง PCR แล้วเพิ่มจำนวนด้วยโปรแกรมดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

3. ตรวจผล RT-PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

ตารางที่1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

ยีน	ลำดับเบส 5' to 3'	อุณหภูมิ annealing/ T_A ($^{\circ}\text{C}$)	ขนาด PCR (bp)
IL-1 β	F: CATGCTGGAGAGCATTGTG R: GACAGATAGAGGTTTGTGCC	55	277
hepcidin	F: CGTTCAGTGTTGCAGTTGCAG R: GCAGCAAACCTCCACAGATACC	59	248
NCCRP-1	F: ATGTCTGCTGCCGAGTGG R: ACTGCGCTGCCAGTGAAC	60	671
β -actin	F: CAGGCATCAGGGTGTGATG R: ACGATACCAGTGGTACGACC	ขึ้นอยู่กับยีนที่ศึกษา	342

ตารางที่2 โปรแกรมในปฏิกิริยา RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	จำนวนรอบ	ระยะเวลา (นาที –วินาที)
Reverse transcription	45	1	15 - 0
Pre-denaturation	94	1	2 - 0
DNA amplification		35	
- Denaturation	94		0 - 15
- Annealing	T_A^*		0 - 30
- Extension	68		1 - 0
Final extension	68	1	5 - 0

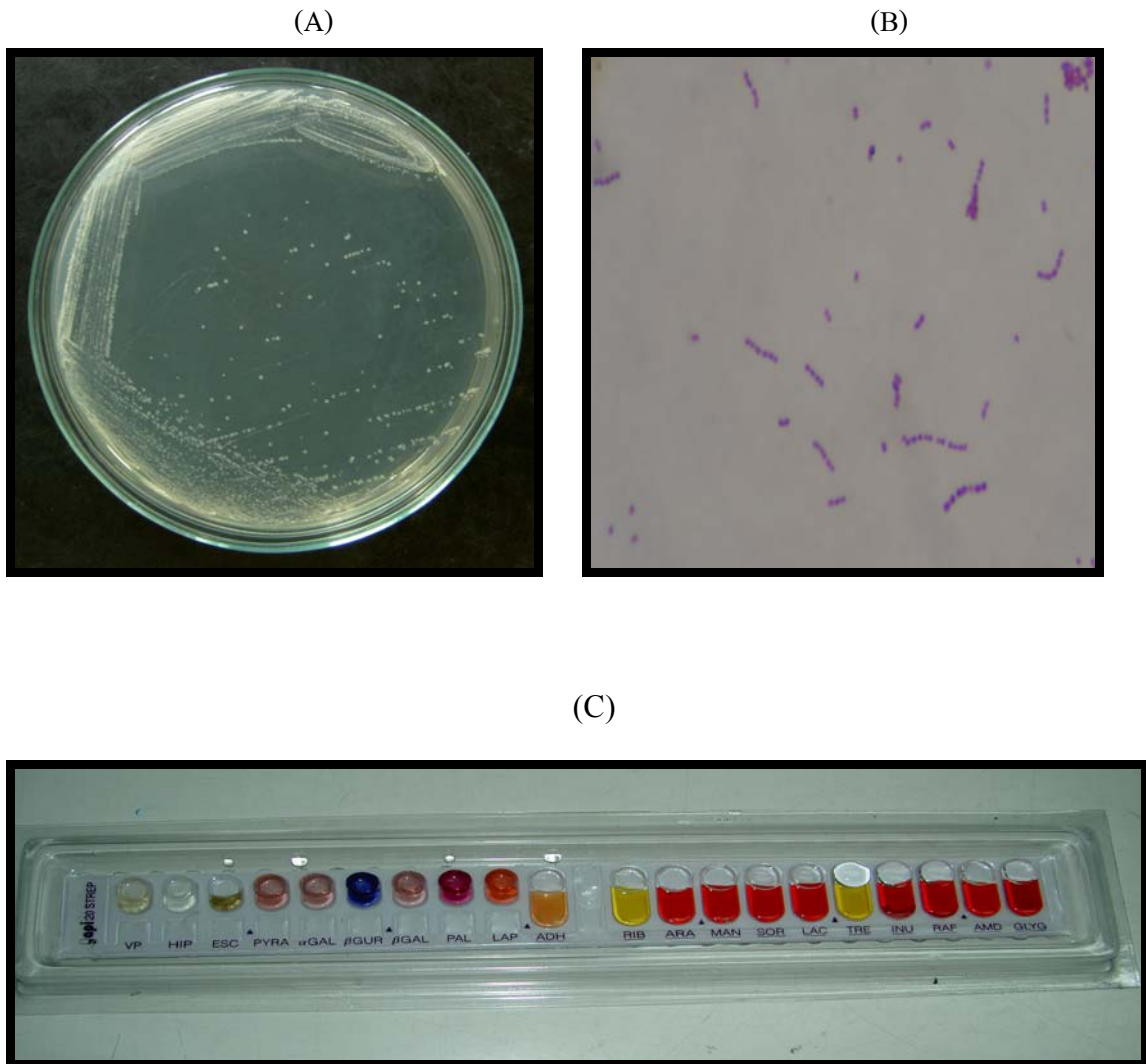
หมายเหตุ: T_A^* = อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ตามรายละเอียดที่แสดงในตารางที่1

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

การรวบรวมและแยกเชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิลป่วย

ผลการสำรวจลักษณะภายนอกของปลานิลตรวจพบ เหงือกซีด แผลเปื่อยเป็นหลุมตาม ลำตัว ตกเลือดตามครีบก้น ปากและลำตัว ครีบก้นรอบ ตาขุ่น โปนและบอดในบางตัว พบฝี/ตุ่มหนองที่ บริเวณปากและใต้คาง และท้องมีอาการบวม เมื่อผ่าดูอวัยวะภายในพบว่า มีของเหลวสีเหลือง/น้ำ เลือดในช่องท้อง ตับซีด ตกเลือดและบวม ไตบวม ถุงน้ำดีโต ม้ามซีดและโต

หลังบ่มเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจสอบ ลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีพบว่าเชื้อที่ได้มีลักษณะของโคโลนีทรงกลม ขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร ขอบเรียบ มีสีขาวขุ่น ให้ผลการดัดสีม่วงเข้มจากการย้อม Gram's stain ไม่พบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียชนิดนี้จากการทดสอบ motility test ไม่มีการสร้าง เอนไซม์ออกซิเดส และเอนไซม์อะตอเรส ผลการจำแนกชนิดเชื้อด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 strep และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป API Web พบว่าเชืวดังกล่าวคือ *S. agalactiae* โดยให้ค่า จำแนกที่ 98.5 - 99.9 เปอร์เซนต์ เชื้อ *S. agalactiae* (ภาพที่1)

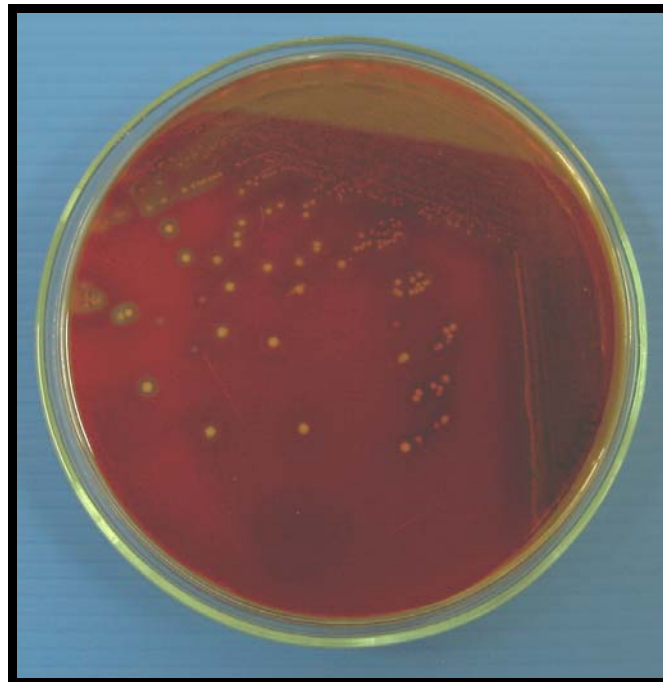


ภาพที่ 1 ผลการแยกเชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิลป่วย (A) แสดงลักษณะโคโลนีของ *Streptococcus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (B) แสดงผลการย้อมสี Gram's stain และ (C) ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 strep

ดังนั้นผลการตรวจสอบลักษณะภายนอกและภายในของปลานิล คุณสมบัติทางกายภาพ และชีวเคมีของเชื้อ สรุปได้ว่าเชื้อที่ก่อโรคในปลานิลจากการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อ *S. agalactiae* ผล sensitivity test ของเชื้อพบค่าความไวสูงสุดและต่ำสุดต่อยาจุลชีพของเชื้อชนิดนี้ในยา oxytetracyclin และ enrofloxacin ตามลำดับ เชื้อที่รวบรวมได้ตั้งแต่เริ่มโครงการจนถึงปัจจุบันมีทั้งสิ้น 16 isolates ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ค่า LD_{50} ของปลานิล

จากการทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดบน blood agar ของเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลทั้ง 10 isolates พบว่า clear zone ที่ได้บน blood agar (ภาพที่ 2) หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1.2 – 1.8 มิลลิเมตร ซึ่งเชื้อตัวแรกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เท่ากับ 1.8 มิลลิเมตร และให้ผลข้อมูลลักษณะภายนอกและอวัยวะภายในที่แสดงอาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อย่างชัดเจน จึงเลือกมาใช้ในการทดสอบหาค่า LD_{50} ของปลานิลทั้งสามสายพันธุ์เพื่อใช้จัดเชื้อในการ challenge พบว่าค่าเฉลี่ยของค่า LD_{50} ในการฉีดอยู่ที่ 1.4×10^8 CFU/ml



ภาพที่ 2 ตัวอย่างผลการทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *S. agalactiae* บน blood agar

ตารางที่ 3 เชื้อ *S. agalactiae* จำนวน 16 isolates ที่รวบรวมได้จากปลานิลป่วย

Isolate	API identification (%)	ที่มาของปลานิล	Clear zone บน blood agar		Antibiotic sensitivity
			24 ชม.	48 ชม.	
1	99.9	สระบุรี	1.1	1.8	Oxytetracyclin
2	99.9	สระบุรี	0.9	1.4	Oxytetracyclin และ Sulfatrimetroprim
3	99.9	นครปฐม	1	1.7	Oxytetracyclin
4	99.9	นครปฐม	1	1.6	Oxytetracyclin และ Sulfatrimetroprim
5	98.5	อยุธยา	0.9	1.2	Oxytetracyclin
6	99.9	ปทุมธานี	1	1.6	Oxytetracyclin
7	99.9	สุพรรณบุรี	1	1.8	Oxytetracyclin
8	99.9	สุพรรณบุรี	1.1	1.8	Oxytetracyclin, Sulfatrimetroprim และ Enrofloxacin
9	99.9	กาญจนบุรี	1.1	1.8	Sulfatrimetroprim และ Enrofloxacin
10	99.9	กทม.	1	1.6	Oxytetracyclin
11	99.9	ปทุมธานี	0.9	1.8	Resistance
12	99.3	ปทุมธานี	0.8	1.7	Oxytetracyclin, Sulfatrimetroprim
13	99.9	นครพนม	1.1	1.9	Oxytetracyclin
14	99.9	สมุทรปราการ	0.9	2	Oxytetracyclin
15	99.9	สมุทรปราการ	1	1.6	Oxytetracyclin
16	99.4	ปราจีนบุรี	0.9	1.5	Oxytetracyclin, Sulfatrimetroprim

สายพันธุ์ปลานิลที่มีอัตราการรอดสูงจากการติดเชื้อ *S. agalactiae*

ลูกปลานิลทั้ง 3 สายพันธุ์ที่อนุบาลในถังไฟเบอร์มีค่าเฉลี่ยของคุณสมบัติน้ำตลอดเวลาการเลี้ยงครั้งนี้ อุณหภูมิ 21.07 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.52 ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) เท่ากับ 80.87 มิลลิกรัม/ลิตร และความกระด้าง (hardness) เท่ากับ 61.9 มิลลิกรัม/ลิตร จากการสุ่มตัวอย่างลูกปลานิลทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จิตรลดา1 สายพันธุ์จิตรลดา3 และนิลแดง สายพันธุ์ละ 10 ตัว เพื่อตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* เดือนละ 1 ครั้ง พบว่าปลานิลทั้ง 3 สายพันธุ์ปลอดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทดสอบการติดเชื้อต่อไป

หลังการ challenge ปลานิล 3 สายพันธุ์เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา3 มีอัตราการตายสูงสุด (85%) รองลงมาได้แก่ปลานิลแดง (80%) และปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา1 มีอัตราการตายต่ำสุด (55%) (ตารางที่4) ผลของอัตราการตายที่ได้จากการ challenge ครั้งนี้บ่งชี้ว่าปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา3 มีแนวโน้มของความทนทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* สูงสุด และจากการตรวจหาเชื้อในปลานิลที่ตายระหว่างการ challenge พบว่าเชื้อดังกล่าวคือ *S. agalactiae* จึงเป็นการยืนยันว่าการ challenge ครั้งนี้ประสบความสำเร็จ

ตารางที่4 เปอร์เซนต์อัตราการรอดของปลานิลสามสายพันธุ์

สายพันธุ์	เปอร์เซนต์อัตราการรอด
นิลแดง	80
จิตรลดา1	55
จิตรลดา3	85

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งเป็นการทดลองในสภาพควบคุม อาจไม่สอดคล้องกับสถานการณ์การตายของปลานิลในการเพาะเลี้ยงของเกษตรกร ที่พบอัตราการตายจากการเลี้ยงปลาจิตรลดา3 สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา3 และรองลงมาได้แก่นิลแดงในการเพาะเลี้ยง สำหรับจิตรลดา1 จะมีการเลี้ยงน้อยมากเพราะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าจิตรลดา3 นอกจากนี้พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่เลี้ยงปลาด้วยระบบ intensive ที่ความหนาแน่นของปลาสูง และนิยมเลี้ยงปลาในกระชังซึ่งยากต่อการควบคุมจัดการคุณภาพน้ำและสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ว่าโอกาสพบการตายจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลจิตรลดา3 และนิลแดงในระบบการเพาะเลี้ยงทั่วไปจะสูงกว่าปลานิลจิตรลดา1 ดังนั้นควรมีการขยายผลจากการศึกษาครั้งนี้โดยนำรูปแบบการทดสอบความรุนแรงของการติดเชื้อที่ได้ไปทดสอบกับระบบการเพาะเลี้ยงทั่วไปซึ่งเป็นสภาพของการเพาะเลี้ยงที่แท้จริงเพื่อเป็นการยืนยันผล อันจะเป็น

ประโยชน์ต่อเกษตรกร และสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกผลิตปลานิลสายพันธุ์ด้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในอนาคตได้

การแสดงออกของยีน

เนื่องจากในช่วงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างปลานิลจากการ challenge ที่ระยะเวลาต่าง ๆ นั้น ผู้วิจัยยังไม่ทราบผลอัตราการรอดสูงสุดและต่ำสุดของปลานิลแต่ละสายพันธุ์ จึงจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างปลานิลจากทั้งสามสายพันธุ์ ซึ่งในการเก็บตัวอย่างปลานิลเพื่อการศึกษาการแสดงออกจะต้องทำอย่างรวดเร็วและถูกต้อง มิฉะนั้น RNA ที่ได้จะมีคุณภาพไม่ดีพอในการศึกษาการแสดงออกของยีน ดังนั้นจำเป็นต้องต้องมีบุคลากรมากพอสำหรับเก็บตัวอย่างปลาในทุกช่วงระยะเวลา จากข้อเสนอโครงการที่วางแผนการเก็บตัวอย่างปลาสามสายพันธุ์สายพันธุ์ละ 5 ตัว ตัวละ 7 อวัยวะ จากปลาทั้งสองกลุ่ม (control และ treatment) รวมตัวอย่างที่จะต้องเก็บทั้งสิ้น 210 ตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลา

จากข้อจำกัดของเวลาและบุคลากร ผู้วิจัยมีความจำเป็นต้องลดชนิดของอวัยวะที่วางแผนไว้ในครั้งแรกลงเหลือ 4 อวัยวะได้แก่ ไต ไตส่วนหน้า ตับ และม้าม แม้ว่าชนิดของอวัยวะที่ทดลองน้อยลง แต่อวัยวะทั้งหมดที่กล่าวมามีหน้าที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งสามารถตอบโจทย์ในการวิจัยครั้งนี้ได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนการแสดงออกของยีน จากข้อเสนอโครงการที่วางแผนศึกษาการแสดงออกของยีนในสองสายพันธุ์ได้แก่สายพันธุ์ที่มีอัตราการรอดสูงสุดและต่ำสุด ผู้วิจัยได้เพิ่มการทดลองโดยทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในปลาทั้งสามสายพันธุ์เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและสมบูรณ์มากขึ้น

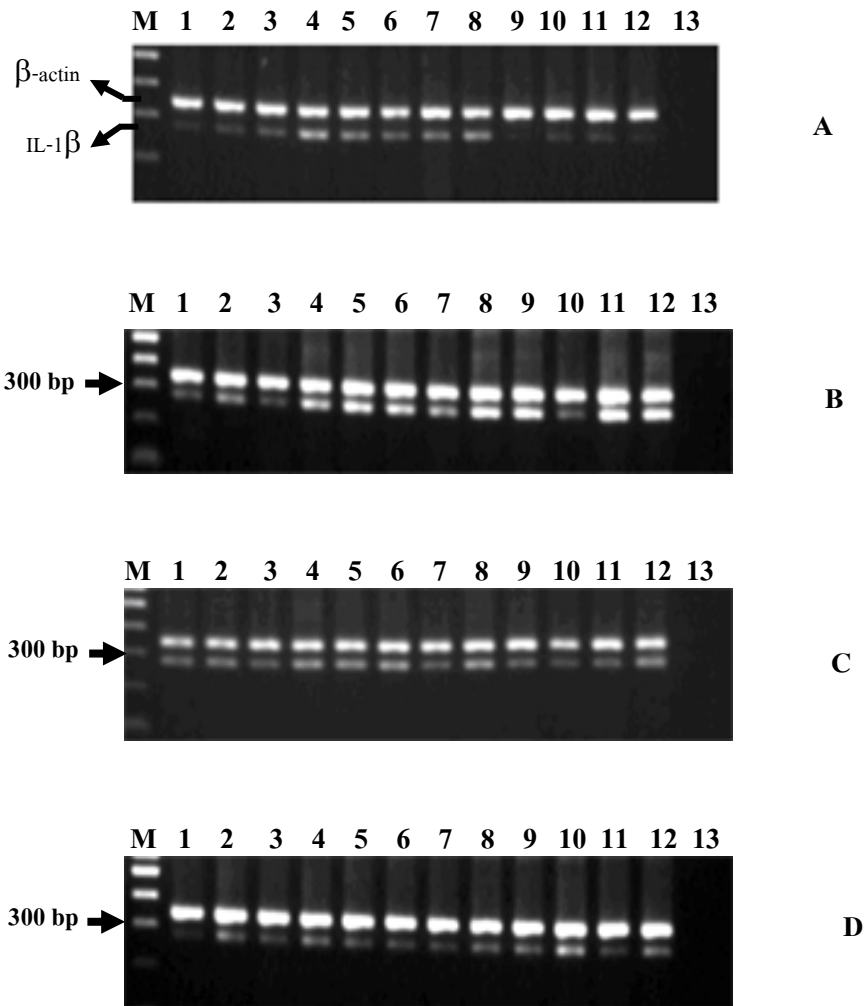
สำหรับผลการศึกษาการแสดงออกของยีนจำนวน 3 ชนิดได้แก่ IL-1 β , Hecpudin และ NCCRP-1 มีดังนี้

Interleukin1- β (IL-1 β)

พบการแสดงออกของยีน IL-1 β ในทั้งสี่อวัยวะของปลานิลปกติ (ที่ 0 ชั่วโมง) และในปลาทั้งสามสายพันธุ์ แต่ระดับการแสดงออกของยีนที่พบจะแตกต่างกันตามชนิดสายพันธุ์และอวัยวะ โดยการแสดงออกของยีน IL-1 β ที่พบในปลานิลจิตรลดา3 อยู่ในระดับสูงกว่าที่พบในปลานิลแดงและจิตรลดา1 นอกจากนี้พบว่าไตของปลาทั้งสองสายพันธุ์หลังมีระดับการแสดงออกของยีนน้อยสุด (ภาพที่3)

หลังได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β เพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่างของปลาทั้งสามสายพันธุ์โดยเฉพาะในม้าม และพบว่าระดับของยีนนี้เพิ่มสูง

อย่างชัดเจนในปลาจิตรลดา3 ระดับยีน IL-1 β ยังคงอยู่ในทุกตัวอย่างทดลองที่ระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นยีน IL-1 β เริ่มลดระดับลงที่ระยะเวลา 7 วันหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่3)



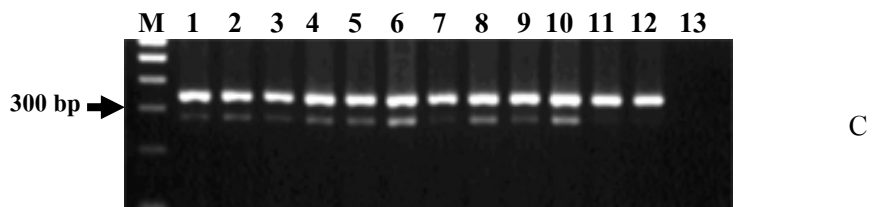
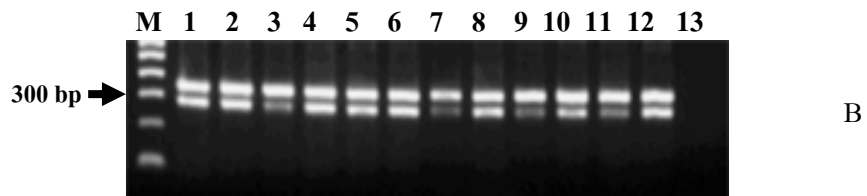
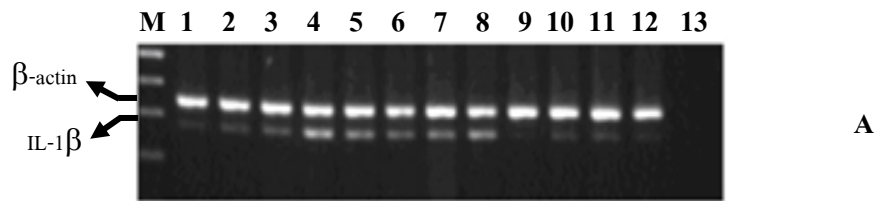
ภาพที่3 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีน IL-1 β ในอวัยวะต่างๆ (1, 5, 9 = ไต; 2, 6, 10 = ไตส่วนหน้า; 3, 7, 11 = ตับ; 4, 8, 12 = ม้าม) ของปลานิลสามสายพันธุ์ (1 - 4 = นิลแดง; 5 - 8 = จิตรลดา 3; 9-12 = จิตรลดา1) ที่ฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ในระยะเวลาต่างๆ (A= 0 ชั่วโมง; B = 4 ชั่วโมง; C = 3 วัน; D = 7 วัน) โดยเปรียบเทียบกับ β -actin; 13 = negative control และ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

จากผลการวิจัยที่พบการแสดงออกของยีนในอวัยวะทั้งหมด ได้แก่ ไต ไตส่วนหน้า ตับ และ ม้าม ของปลานิลปกติทั้งสามสายพันธุ์ บ่งชี้ว่ายีน IL-1β ของปลานิลมีการสร้างอยู่ตลอดเวลา (constitutive expression) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาอื่น IL-1β ในปลาคูเกออเมริกัน ซึ่งนอกจากจะพบการแสดงออกของ IL-1β ในอวัยวะทั้ง 4 ชนิดที่พบในปลานิลแล้ว ยังพบยีนนี้ในอวัยวะอื่นๆ อีกด้วย เช่น กล้ามเนื้อ สมอง และ ลำไส้ (Wang et al., 2006)

Interleukin-1 (IL-1) จัดอยู่ในกลุ่ม proinflammatory cytokine ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) และแบบจำเพาะ (specific immunity) โดยเฉพาะการตอบสนองต่อการติดเชื้อในขั้นตอนที่เกี่ยวกับการอักเสบ (inflammation) ซึ่งพบว่ายีน IL-1 จะถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มปริมาณระดับการแสดงออกสูงขึ้น (Dinarello, 1998; Bird et al., 2002; Huising et al., 2004) ยีน IL-1 มีหลายชนิด เช่น IL-1α (IL-1F1), IL-1β (IL-1F2) และ IL-1 receptor antagonist (IL-1ra, IL-1F3) เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานว่า ยีน IL-1β มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้มากกว่า IL-1α (Nakae et al., 2001)

มีรายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับยีน IL-1β ในปลาหลายชนิดเช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ปลาคูเกออเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) และปลาเรนโบว์เทรา (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) พบว่า หากมีสิ่งแปลกปลอมเช่น แบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและลบเข้าสู่ร่างกาย ยีน IL-1β ในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (ไตส่วนหน้า เม็ดเลือดขาวของไตส่วนหน้า และม้าม) จะถูกกระตุ้นและมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนอย่างชัดเจนภายในระยะเวลา 2-24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (Engelsma et al., 2001; Hilton et al., 2002; Kim and Austin, 2006; Wang et al., 2006) ซึ่งผลของการตอบสนองต่อแบคทีเรียแกรมบวกในปลานิลในครั้งนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยพบว่าระดับยีน IL-1β เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงหลังฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* โดยเฉพาะในปลานิลจิตรลดา 13 ที่พบการเพิ่มของยีนอย่างชัดเจน

สำหรับปลานิลในชุดควบคุม แม้ว่าระดับการแสดงออกของยีนนี้จะเพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่าง และทุกสายพันธุ์ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงหลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ แต่การแสดงออกของยีนได้ลดระดับลงในทุกตัวอย่างที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงจนถึง 7 วันเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนติดเชื้อ (ที่ 0 ชั่วโมง) ซึ่งการเพิ่มของยีนที่พบในช่วง 4 ชั่วโมงหลังได้รับน้ำเกลือ อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย แต่หลังจากที่พบว่าสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวไม่มีอันตรายต่อร่างกาย ระดับการแสดงออกของ IL-1β จึงลดลงสู่ระดับปกติ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีน IL-1 β ของปลากลุ่มควบคุมในอวัยวะต่างๆ (1, 5, 9 = ไต; 2, 6, 10 = ไตส่วนหน้า; 3, 7, 11 = ตับ; 4, 8, 12 = ม้าม) ของปลานิลสามสายพันธุ์ (1 - 4 = นิลแดง; 5 - 8 = จิตรลดา3; 9-12 = จิตรลดา1) ที่ฉีดน้ำเกลือในระยะเวลาต่างๆ (A = 0 ชั่วโมง; B = 4 ชั่วโมง; C = 7 วัน) โดยเปรียบเทียบกับ β -actin; 13 = negative control และ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

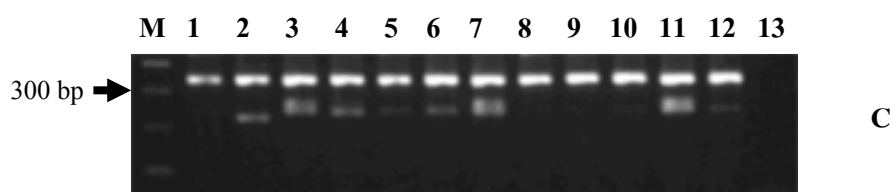
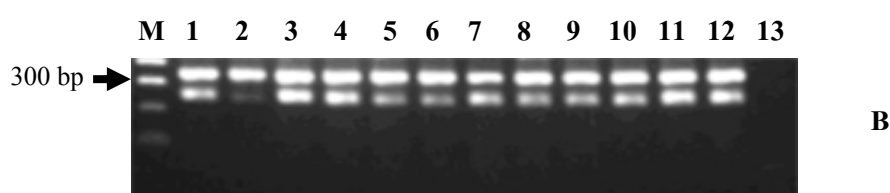
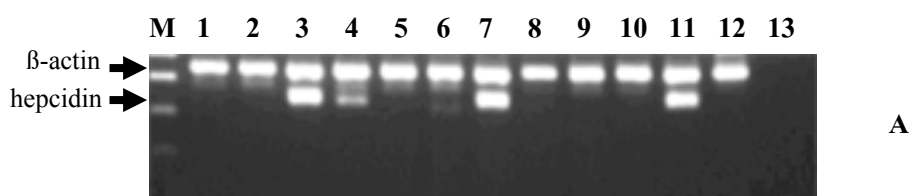
Hepcidin

ผลการศึกษาพบว่าปลานิลทั้งสามสายพันธุ์ในสภาวะปกติมีการแสดงออกของยีนชนิดนี้ อย่างชัดเจนในระดับ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนนี้ในม้ามของปลานิลแดง และไตส่วนหน้าของปลานิลจิตรลดา3อีกด้วย ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อแบคทีเรียพบระดับการแสดงออกของยีนนี้เพิ่มสูงขึ้นในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษากของปลาทั้งสามสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับเวลาที่ 0 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อ *S. agalactiae* เป็นเวลา 3 วันยังคงพบยีนนี้ในทุกอวัยวะและสายพันธุ์ของปลาที่ทำการทดลอง แต่พบในระดับที่น้อยลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง ในระยะเวลาที่ 7 วันหลังการติดเชื้อยังคงพบการแสดงออกของ hepcidin ในเกือบทุกอวัยวะที่ทำการศึกษากของปลานิลแดงและจิตรลดา3 และเป็นที่น่าสนใจว่าในดับของปลาทุกสายพันธุ์ มีการแสดงออกของยีนนี้สูงกว่าอวัยวะอื่นๆ สำหรับไตและไตส่วนหน้าของปลานิลจิตรลดา1 พบระดับการแสดงออกของยีนนี้ลดลงมากจนเกือบไม่พบการแสดงออกของยีน (ภาพที่5)

hepcidin จัดอยู่ในกลุ่ม antimicrobial peptide (AMP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่สำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อต่างๆที่เข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด หรือแบบไม่จำเพาะ (innate/non-specific immunity) โดยพบได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา (Bulet et al., 2004; Shi and Camus, 2006) นอกจากนี้ hepcidin ยังมีหน้าที่สำคัญต่อระบบ iron regulating/metabolism และขบวนการอักเสบที่เกิดจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ Krause et al. (2000) รายงานว่า mRNA ของ hepcidin ในคนจะพบได้ที่ตับ ดังนั้น hepcidin จึงจัดเป็นยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะบางอวัยวะเท่านั้น (tissue specific expression) มีรายงานเกี่ยวกับ hepcidin ในปลาหลายชนิดเช่น ปลา Bass ลูกผสม (hybrid striped bass) ปลาคูโกอเมริกัน ปลา sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) และปลา largemouth bass (*Micropterus salmoides*) พบการสร้างโปรตีนชนิดนี้ในหลายอวัยวะ แต่ปริมาณของยีน hepcidin ที่พบจะแตกต่างกัน โดยในดับจะพบ hepcidin ในปริมาณที่สูงแตกต่างจากอวัยวะอื่นๆอย่างชัดเจน ยีนดังกล่าวนี้จะเพิ่มระดับการแสดงออกในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่นตับ ไตส่วนหน้าและม้าม ได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อด้วยแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ (Shike et al., 2002; Bao et al., 2005; Rodrigues et al., 2006; Huang et al., 2007; Robertson et al., 2009)

ผลการศึกษาในปลาหลายชนิดที่กล่าวข้างต้นมีผลใกล้เคียงกับการวิจัยครั้งนี้ โดยพบการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในปริมาณสูงที่ดับของปลานิลทั้งสามสายพันธุ์ ระดับยีนจะเพิ่มอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังฉีดปลานิลด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ในทุกตัวอย่าง จนกระทั่งเวลาที่

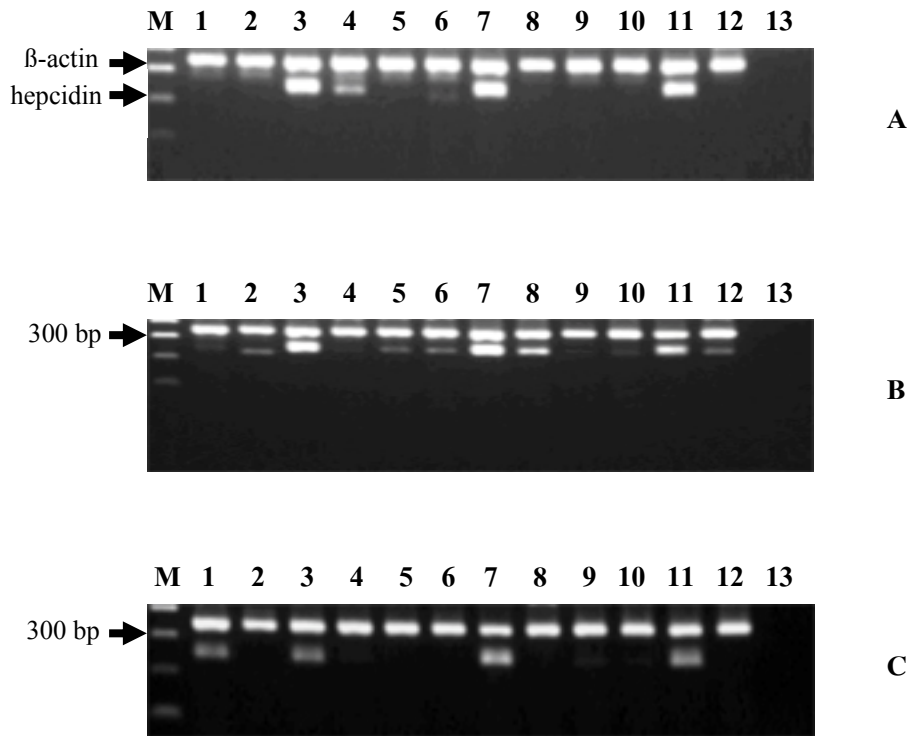
7 วัน พบว่าระดับของ hepcidin ในปลานิลจิตรลดา3 และนิลแดงยังคงมีการแสดงออกอยู่ ในขณะที่ระดับของยีนนี้ลดลงมากจนเกือบไม่พบในปลานิลจิตรลดา1



ภาพที่ 5 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีน hepcidin ใน
อวัยวะต่างๆ (1, 5, 9 = ไต; 2, 6, 10 = ไตส่วนหน้า; 3, 7, 11 = ตับ;
4, 8, 12 = ม้าม) ของปลานิลสามสายพันธุ์ (1 - 4 = นิลแดง; 5 - 8
= จิตรลดา3; 9-12 = จิตรลดา1) ที่ฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ใน
ระยะเวลาต่างๆ (A= 0 ชั่วโมง; B = 24 ชั่วโมง; C = 7 วัน) โดย
เปรียบเทียบกับ β -actin; 13 = negative control และ M = ดีเอ็นเอ
มาตรฐาน 100 bp

สำหรับการแสดงออกของ hepcidin ในปลากลุ่มควบคุมจะมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกับยีน IL-1 β ในกลุ่มควบคุม คือที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงหลังฉีดน้ำเกลือ ยีนชนิดนี้จะถูกเหนี่ยวนำให้มีระดับการแสดงออกเพิ่มในหลายอวัยวะเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมงก่อนฉีดน้ำเกลือ โดยเฉพาะในปลานิลจิตรลดา 3 ที่พบยีนนี้ในทุกอวัยวะศึกษาและมีระดับของยีนสูงกว่าปลาอีกสองสายพันธุ์ ในขณะที่ปลาจิตรลดา1 พบ hepcidin ในตับและม้ามเท่านั้น อย่างไรก็ตามก็ระดับยีนได้ลดลงและให้รูปแบบการแสดงออกเหมือนกับปลาปกติ (0 ชั่วโมงก่อนฉีดน้ำเกลือ) อย่าง

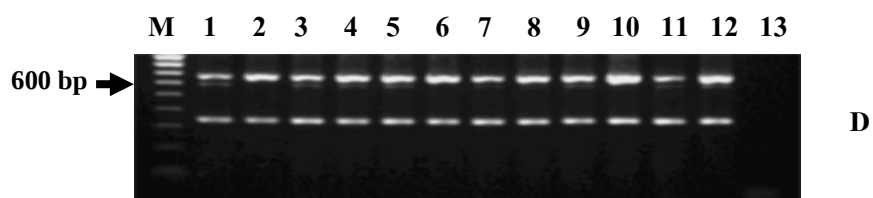
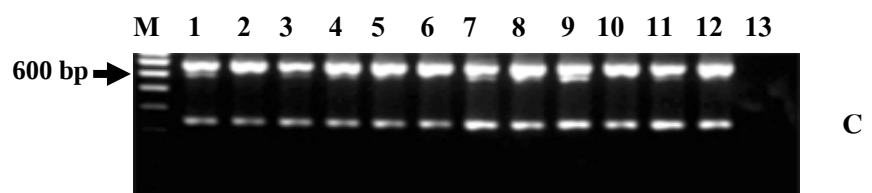
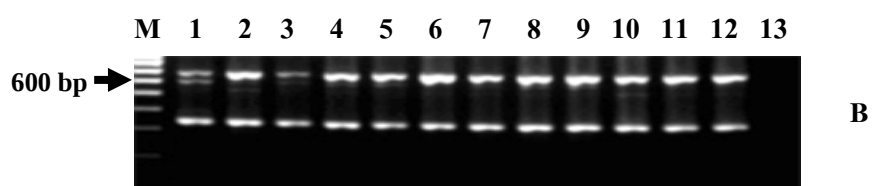
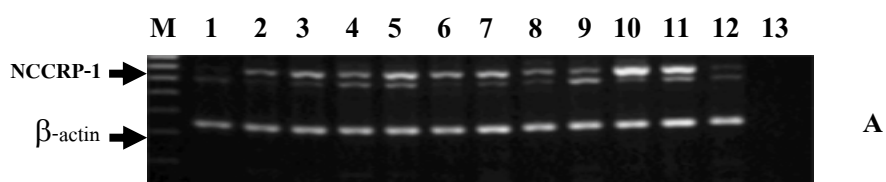
รวดเร็วภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังฉีดน้ำเกลือ (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่พบในระยะเวลาสั้นๆแล้วคืนกลับสู่สภาวะปกติหลังจากร่างกายของเซลล์เจ้าบ้านพบว่าสิ่งที่เข้าสู่ร่างกายไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบภูมิคุ้มกัน



ภาพที่ 6 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีน hepcidin ของปลากลุ่มควบคุมในอวัยวะต่างๆ (1, 5, 9 = ไต; 2, 6, 10 = ไตส่วนหน้า; 3, 7, 11 = ตับ; 4, 8, 12 = ม้าม) ของปลานิลสามสายพันธุ์ (1 - 4 = นิลแดง; 5 - 8 = จิตรลดา3; 9-12 = จิตรลดา1) ที่ระยะเวลาต่างๆ (A = 0 ชั่วโมง; B = 4 ชั่วโมง; C = 24 ชั่วโมง) โดยเปรียบเทียบกับ β -actin; 13 = negative control และ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

Non-specific cytotoxic cell receptor protein-1 (NCCRP-1)

ผล RT-PCR พบว่าปลานิลในสภาวะปกติมีการแสดงออกของยีนNCCRP-1 ในทุกสายพันธุ์และทุกชนิดของอวัยวะที่ใช้ทดลองในครั้งนี้ โดยพบระดับการแสดงออกของยีนNCCRP-1สูงในอวัยวะสองชนิดคือ ไตส่วนหน้าและตับ ในขณะที่ไตและม้ามมีระดับการแสดงออกของยีนนี้ต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลานิลปกติสามสายพันธุ์พบว่า ปลานิลจิตรลดา3 มีการแสดงออกของยีนนี้ชัดเจนในทุกอวัยวะทดลอง แต่หลังจากปลาได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง พบการเพิ่มระดับของการแสดงออกที่สูงขึ้นอย่างชัดเจนในทุกตัวอย่างทดลอง โดยเฉพาะในไตส่วนหน้าของปลานิลจิตรลดา3 การเพิ่มของยีนNCCRP-1 ในปลานิลจะคงอยู่จนถึงระยะเวลา 3 วันหลังการติดเชื้อ หลังจากนั้นที่ระยะเวลา 7 วันพบการแสดงออกที่ลดระดับลงจนเกือบใกล้เคียงกับที่พบในระยะเวลา 4 ชั่วโมงของทุกตัวอย่างทดลอง (ภาพที่7)



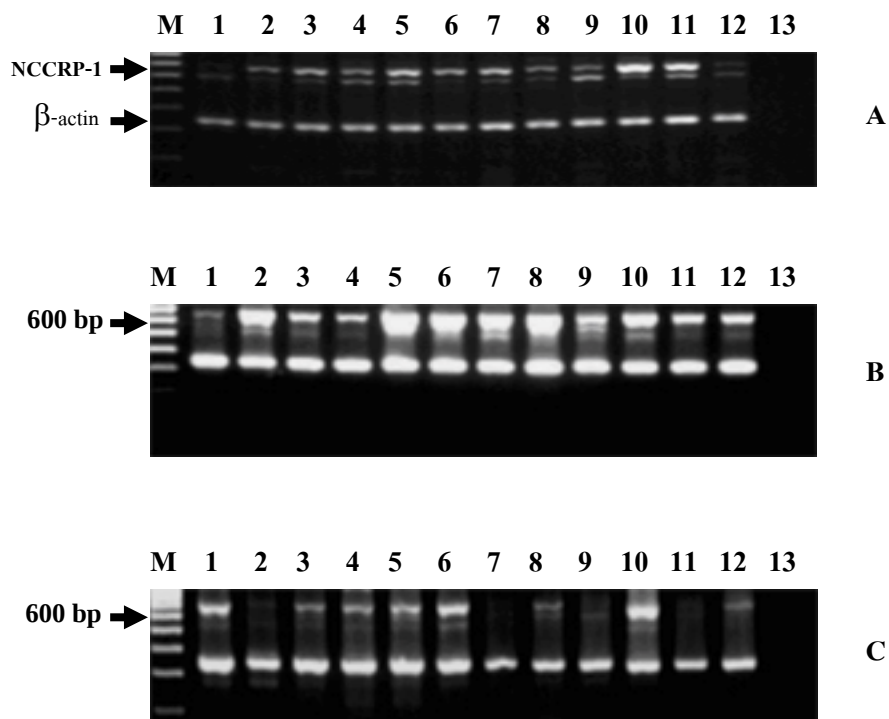
ภาพที่7 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีนNCCRP-1 ในอวัยวะต่างๆ (1, 5, 9 = ไต; 2, 6, 10 = ไตส่วนหน้า; 3, 7, 11 = ตับ; 4, 8, 12 = ม้าม) ของปลานิลสามสายพันธุ์ (1 - 4 = นิลแดง; 5 - 8 = จิตรลดา3; 9-12 = จิตรลดา1) ที่ระยะเวลาต่างๆ (A = 0 ชั่วโมง; B = 4 ชั่วโมง; C = 24 ชั่วโมง; D = 7 วัน) โดยเปรียบเทียบกับ β -actin; 13 = negative control และ M = คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

ผลการแสดงออกของยีนNCCRP-1 ในปลานิลปกติที่ได้ในครั้งนี้อยู่สอดคล้องกับรายงานในปลานิล ปลาไน และ ปลาAtlantic cod (Ishimoto et al., 2004; Sakata et al., 2005; Seppola et al., 2007) ซึ่งพบว่ายีน non specific cytotoxic cell receptor protein-1 ของปลามีการแสดงออกในหลายอวัยวะทั้งในกลุ่ม lymphoid เช่น ไตส่วนหน้า ตับ ม้าม และกลุ่ม non-lymphoid เช่น ผิวหนัง เหงือก หัวใจ เป็นต้น โดยอวัยวะในกลุ่มแรกจะมีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าอีกกลุ่มอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโปรตีนNCCRP-1ในปลาทั่วไปจัดเป็นโปรตีนที่มีการสร้างอยู่ตลอดเวลาเช่นเดียวกับ IL-1β

จากการศึกษาเอกสารงานวิจัยพบว่า non-specific cytotoxic cell (NCC) ในปลาเป็นเซลล์ที่เทียบเท่ากับ natural killer cell (NK cell) ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Evans et al., 1984) นักวิจัยพบว่าเซลล์ชนิดนี้มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะชนิดที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) เซลล์ non-specific cytotoxic จะจดจำสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้โดยอาศัย receptor protein ซึ่งปัจจุบันพบเพียงชนิดเดียวเท่านั้นคือ non-specific cytotoxic cell receptor protein-1 (NCCRP-1) เซลล์ชนิดนี้สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้หลายชนิด เช่นแบคทีเรีย ซึ่งจะถูกกำจัดโดยการปล่อยสาร cytokine ของระบบที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อันเป็นขบวนการตอบสนองต่อการติดเชื้อที่เข้าสู่ร่างกาย (Graves et al., 1985)

มีการวิจัยเพื่อศึกษาการตอบสนองและการเปลี่ยนแปลงของยีน NCCRP-1 ในปลาหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในไตส่วนหน้าของปลาไน หลังจากติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ขณะที่ในไตส่วนหน้าของปลา Atlantic cod ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนนี้หลังการกระตุ้นด้วย polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C), lipopolysaccharide (LPS) และ formalin killed *Vibrio anguillarum* (Sakata et al., 2005; Seppola et al., 2007) สำหรับในปลานิลแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนนี้ในปลาทั้งสามสายพันธุ์จะเห็นความแตกต่างไม่มากนัก แต่พบว่ายีน NCCRP-1 ได้ถูกกระตุ้นให้มีการเพิ่มของระดับการแสดงออกอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 4 หลังการฉีดด้วยแบคทีเรียแกรมบวก *S. agalactiae* โดยเฉพาะในไตส่วนหน้าและม้ามของปลาสายพันธุ์จิตรลดา3

ส่วนรูปแบบการแสดงออกของยีนNCCRP-1 ในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือจะเป็นไปในทิศทางเดียวกับยีนสองชนิดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คือมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นและลดลงขึ้นอยู่กับสภาวะปกติภายในระยะเวลาที่ 4 และ 24 ชั่วโมงหลังฉีดด้วยน้ำเกลือตามลำดับ (ภาพที่8)



ภาพที่8 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีน NCCRP-1 ของปลาในกลุ่มควบคุมในอวัยวะต่างๆ (1, 5, 9 = ไต; 2, 6, 10 = ไตส่วนหน้า; 3, 7, 11 = ตับ; 4, 8, 12 = ม้าม) ของปลานิลสามสายพันธุ์ (1 - 4 = นิลแดง; 5 - 8 = จิตรลดา3; 9-12 = จิตรลดา1) ที่ระยะเวลาต่างๆ (A = 0 ชั่วโมง; B = 4 ชั่วโมง; C = 24 ชั่วโมง) โดยเปรียบเทียบกับ β -actin; 13 = negative control และ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *S. agalactiae* ที่รวบรวมได้ในการศึกษานี้มีทั้งหมด 16 isolates จาก 10 จังหวัดในประเทศไทย ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้อ *S. agalactiae* ส่วนใหญ่ยังคงมีความไวต่อยา oxytetracycline และ sulfatrimetoprim ดังนั้นหากเกษตรกรมีความจำเป็นเร่งด่วนต้องใช้ยาในการรักษาโรค Streptococcosis ควรเลือกใช้ยาสองชนิดนี้ตามลำดับ

การทดสอบความรุนแรงการติดเชื้อ (challenge) ในปลานิลสามสายพันธุ์ภายใต้สภาพควบคุมในโรงทดลองให้ผลสรุปว่า ปลานิลจิตรลดา3 และปลานิลจิตรลดา1 มีแนวโน้มการทนต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* สูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ

การแสดงออกของยีน IL-1β ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม pro-inflammatory cytokine ที่มีความสำคัญต่อทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ สำหรับในปลานิลทั่วไปพบว่า IL-1β มีการแสดงออกแบบ constitutive expression คือเป็นยีนที่มีการสร้างอยู่ตลอดเวลาและพบในอวัยวะหลายชนิด ยีนนี้จะเพิ่มระดับการแสดงออกอย่างรวดเร็วภายในเวลา 4 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยเฉพาะในไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลจิตรลดา3

hepcidin ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในกลุ่ม antimicrobial peptide ที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน ยีนชนิดนี้ในปลานิลทั่วไปมีการแสดงออกแบบ tissue specific expression คือพบระดับการแสดงออกสูงในตับของปลานิลปกติทั้งสามสายพันธุ์ แต่ภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. agalactiae* จะพบยีนดังกล่าวนี้ในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษาของปลาทั้งสามสายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าปลานิลจิตรลดา3 ยังคงมีการแสดงออกของ hepcidin ในเกือบทุกอวัยวะทดลองที่ระยะเวลา 7 วัน

สำหรับ NCCRP-1 จัดเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ มีหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายในขบวนการ inflammation พบว่า NCCRP-1 ในปลานิลปกติมีการแสดงออกแบบ constitutive expression เช่นเดียวกับ IL-1β และระดับของยีน NCCRP-1 จะถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 4 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ *S. agalactiae* ในทุกอวัยวะและสายพันธุ์ของปลานิล โดยเฉพาะในไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลจิตรลดา3

รูปแบบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการได้แก่ สายพันธุ์ ชนิดของยีน ชนิดของอวัยวะ และระยะเวลาต่างๆทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อเป็นต้น จาก

การศึกษานี้พบว่าระดับของการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียในยีนทั้งสามชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (เพิ่มภายในเวลา 4 - 24 ชั่วโมง) และส่วนใหญ่จะพบในอวัยวะกลุ่ม lymphoid เช่น ไตส่วนหน้า ตับ และม้าม แต่ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อความแตกต่างของการแสดงออกของยีนอย่างชัดเจนในการศึกษานี้ก็คือสายพันธุ์ของปลา โดยสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มความทนโรคสูง (จิตรลดา3) หลังการติดเชื้อจะถูกเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนอย่างรวดเร็ว และการแสดงออกจะคงอยู่ได้นานกว่าสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มการทนโรคต่ำ (จิตรลดา1) จะเห็นว่าความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามชนิดต่อการติดเชื้อ *S. agalactiae* แปรผันตรงกับระดับความต้านทานโรคของปลานิล

เนื่องจากยีนทั้งสามชนิดนี้มีหน้าที่และความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน แต่พบว่าระดับของยีนทั้งหมดถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังปลานิลได้รับเชื้อ *S. agalactiae* และการแสดงออกของยีนทั้งหมดจะลดระดับลงภายใน 3-7 วันหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าปลานิลตอบสนองต่อเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้กลไกของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่ร่างกาย ผลที่ได้ในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาการรักษาโรค streptococcosis โดยหลีกเลี่ยงการใช้ยาต้านจุลชีพ และนำไปใช้ในการผลิตสายพันธุ์ปลานิลต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อการทดลองครั้งนี้ในส่วนการทดสอบความรุนแรงของการติดเชื้อในสภาพของการเพาะเลี้ยงทั่วไป เพื่อให้ทราบผลของเชื้อต่อการตายของปลานิลในสภาพที่แท้จริงของการเลี้ยงปลา ซึ่งผลที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลานิล
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการทำงานของยีนทั้งสามชนิดอย่างละเอียด เพื่อให้เข้าใจขั้นตอนการตอบสนองต่อเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำมาพัฒนาวิธีการรักษาโรค Streptococcosis ในปลานิลโดยไม่ใช้ยาต้านจุลชีพ

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ได้ข้อมูลสถานะของความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล
2. ได้ข้อมูลสายพันธุ์ปลานิลที่มีอัตราการตายดีที่สุดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae*
3. ได้ข้อมูลรูปแบบการตอบสนองของยีนสามชนิดได้แก่ IL-1β, Hepcidin และ NCCRP-1 ในปลานิลสามสายพันธุ์ต่อการติดเชื้อ *S. agalactiae*

4. ได้ข้อมูลเบื้องต้นของแนวทางการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลต่อเชื้อ *S. agalactiae*

References

- นิลบล ยูอาสา .2544. โรคปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.เอกสารประกอบการสอนวิชา 118 341 โรคปลาและปรสิตตัวน้ำ .ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 100 หน้า.
- นิลบล ยูอาสา หุติมา หาญจวนิช และนงนุช สุวรรณเพ็ง. 2545. การพัฒนาวิธีการในการป้องกันรักษาโรคที่เกิดกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ .เอกสารประกอบการงานวิจัยทุนอุดหนุนประจำปี 2545. มหาวิทยาลัยขอนแก่น .27 หน้า.
- นเรศ ช้วนยุค หิรัญ กังแฮ เรวัตร คงประดิษฐ์ และกิจการ สุขมาตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ว.สงขลานครินทร์ วทท . 27:307-319.
- ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และพันธ์ศักดิ์ ไชยบุตร.2543 .การเลี้ยงปลานิล .เอกสารคำแนะนำ .กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 10 .หน้า.
- Bao B, Peatman E, Li P, He C, Liu Z. 2005. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection Dev Comp Immunol. 29: 939–950.
- Baoprasertkul P, Peatman E, Chen L, He C, Kucuktas H, Li P, Simmons M, Liu Z. 2004. Sequence analysis and expression of a CXC chemokine in resistant and susceptible catfish after infection of *Edwardsiella ictaluri*. Dev Comp Immunol. 28: 769-780.
- Baoprasertkul P, Peatman E, Somridhivej B, Liu Z. 2006. Toll-like receptor 3 and TICAM genes in catfish (*Ictalurus* sp): species-specific expression profiles following infection with *Edwardsiella ictaluri*. Immunogenetics. 58: 817-830.
- Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ. 2002. Evolution of interleukin-1 beta. Cytokine Growth Factor Rev. 13: 483–502.
- Bulet P, Stocklin R, Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol Rev. 198: 169–184.
- Dinarello CA 1998. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int Rev Immunol. 16: 457-499.
- Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Current Microbiol. 28: 139-143.

- Engelsma MY, Stet RJ, Schipper H, Verburg-van Kemenade BM. 2001. Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. Dev Comp Immunol. 25(3): 195-203.
- Evans DL, Graves SS, Cobb D, Dawe DL. 1984. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*) II. Parameters of target cell lysis and specificity. Dev. Comp. Immunol. 8: 303–312.
- Evans JJ, Klesius PH, Gilbert PM, Shoemaker CA, Al Sarawi MA, Landsberg J, Duremdaz R, Al Marzouk A, Al Zenki S. 2002. Characterization of β -haemolytic Group B Streptococcus agalactiae in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. J. Fish Dis. 25: 505-513.
- Graves SS, Evans DL, Dawe DL. 1985. Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J Immunol. 134: 78-88.
- Grayson TH, Cooper LF, Wrathmell AB, Roper J, Evenden AJ, Gilpin ML. 2002. Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. Immunology. 106(2): 273-283.
- Hawke JP. 2000. Bacterial disease agents. In encyclopedia of aquaculture (ed. R. R., Stickney). New York, U.S.A.: John Wiley & Sons. 69-97p.
- Huang PH, Chen JY, Kuo CM. 2007. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. Mol Immunol. 44(8): 1922-1934.
- Huising MO, Stet RJ, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade BM. 2004. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines: IL-18 in teleost fish. Dev. Comp. Immunol. 28: 395–413.
- Kim DH, Austin B. 2006. Vet Immunol Immunopathol. 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. 114(3-4): 297-304.
- Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett. 480: 147–150.
- Lockhart K, McBeath AJ, Collet B, Snow M, Ellis AE. 2007. Expression of Mx mRNA following infection with IPNV is greater in IPN-susceptible Atlantic salmon post-smolts than in IPN-resistant Atlantic salmon parr. Fish Shellfish Immunol. 22: 151-156.

- Matejusova I, Felix B, Sorsa-Leslie T, Gilbey J, Noble LR, Jones CS, Cunningham CO. 2006. Gene expression profiles of some immune relevant genes from skin of susceptible and responding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) infected with *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) revealed by suppressive subtractive hybridisation. *Int J Parasitol.* 36: 1175-1183.
- Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. 2001. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology.* 104: 402–409.
- Peatman E, Bao B, Xu P, Baoprasertkul P, Brady Y, Liu Z. 2006. Catfish CC chemokines: genomic clustering, duplications, and expression after bacterial infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Mol Genet Genomics.* 275: 297-309.
- Perera RP, Johnson SK, Collins MD, Lewis DH. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* Hybrids. *J. Aquat. Anim. Health.* 6: 335-340.
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hug.* 27 ; 493-497.
- Robertson LS, Iwanowicz LR, Marranca JM. 2009. Identification of centrarchid hepcidins and evidence that 17b-estradiol disrupts constitutive expression of hepcidin-1 and inducible expression of hepcidin-2 in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish & Shellfish Immunology* 26: 898–907.
- Rodriguesa Pedro NS, Va'zquez-Dorado S, Nevesa JV, Wilson JM. 2006. Dual function of fish hepcidin: Response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev Comp Immunol.* 30: 1156–1167.
- Russo R, Mitchell H, Yanong Roy PE. 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. *Aquaculture.* 256: 105-110.
- Sakata H, Savan R, Sogabe R, Kono T, Taniguchi K, Gunimaladevi I, Tassakka AC, Sakai M. 2005. Cloning and analysis of non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1)-1 from common carp *Cyprinus carpio* L. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 140(3-4): 287-294.
- Seppola M, Robertsen B, Jensen I. 2007. The gene structure and expression of the non-specific cytotoxic cell receptor protein (NCCRP-1-1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 147(2): 199-208.

- Shi J, Camus AC. 2006. Hecpidins in amphibians and fishes: antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? *Dev Comp Immunol.* 30: 746–755.
- Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Shimizu C, Bulet P, Burns JC. 2002. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur. J. Biochem.* 269: 2232–2237.
- Shoemaker CA, Klesius PH, Plumb JA. 1997. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Vet Immunol Immunopathol.* 58: 181-190.
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Wang Y, Wang Q, Baoprasertkul P, Peatman E, Liu Z. 2006 . Genomic organization, gene duplication, and expression analysis of interleukin-1beta in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mol Immunol.* 43(10): 1653-1664.