The Application technique Multiplex PCR Method for Diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in Tilapia *(Oreochromis niloticus)*

Yhardpeth Ocharoen[1], Chuta Boonphakdee[2], Sukanda Tubmeka[1], Kun Kledmanee[1], Krairurk Tunthaworn[2], Praparsiri Barnett[1*]

[1]Department of Aquatic science, Faculty of Science, Burapha University, Saen Sook, Mueang, Chonburi 20131
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Saen Sook, Mueang, Chonburi 20131
[*]Corresponding author, Email address: praparsiri@buu.ac.th

Abstract

This study focused on sensitivity and detection of Streptococcus agalactiae from tilapia *(Oreochromis niloticus)* by using polymerase chain reaction (PCR) and culture methods. Genomic DNA, extracted by GF-1 bacterial extraction kit, was used as a template for PCR reaction with *16S rRNA* primers from *S. agalactiae* isolated from moribund tilapia. The results showed a significant rapid detection of *S. agalactiae* when using 0.1 ng of DNA template in a 14 μl PCR reaction. Multiplex PCR was also developed using a pair of primers from *16S rRNA* of *S. agalactiae* (F1/IMOD) in combination with specific primers (L99/Oce215R) in the region of *28S rRNA S. agalactiae* detection in tilapia's (IP injection) blood samples were divided into 5 concentration levels: 0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 and 10^5 CFU/ml (n=5). Within 7 days, application of multiplex-PCR assay for rapid detection of *S. agalactiae* in the experimental infected tilapia gave positive reaction on the 1st day post-infection in tilapia at the concentration of 10^1 CFU/ml to 10^5 CFU/ml (60%). In contrast, bacterial culture gave positive result on the 6th day at the concentration of 10^4 CFU/ml to 10^5 CFU/ml (20%). The PCR result show that the PCR technique is an effective tool for rapid detection of *S. agalactiae* than the traditional technique. Therefore, it could be a useful alternative to the culture base method for a routines diagnosis of streptococcal infection in fish.

Keywords: PCR, *Streptococcus agalactiae*, tilapia

การประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล *(Oreochromis niloticus)*

หยาดเพชร โอเจริญ[1], ชูตา บุญภักดี[2], สุกานดา ทับเมฆา[1], กัญช์ เกล็ดมณี[1], วิชชุดา ประสาทแก้ว[1], ไกรฤกษ์ ตันถาวร[2] และปภาศิริ กาญจโนภาศ-บาร์เนท[1*]

[1]ภาควิชา วาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
[2]ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: praparsiri@buu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความไวของปฏิกิริยา PCR และติดตามการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล *(Oreochromis niloticus)* โดยทำการสกัดดีเอ็นเอในส่วนของยีน *16S rRNA* จากเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลป่วย พบว่าเทคนิค PCRมีความไวต่อเชื้อ *S. agalactiae* สูงสุดเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.1 ng ในปฏิกิริยา 14 µl จากนั้นได้พัฒนาวิธี Multiplex PCRโดยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในส่วนของยีน *16S rRNA* (ให้แถบดีเอนเอขนาด 194 bp) ร่วมกับ *28S rRNA* (ให้แถบดีเอนเอขนาด 150 bp) ที่มีความจำเพาะกับเลือดปลานิลเป็นตัวควบคุมภายในเพื่อป้องกันผลตรวจโรคปลอมและเมื่อทดลองตรวจสอบติดตามเชื้อ *S. agalactiae* ในตัวอย่างเลือดของปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง 5 ระดับคือ 0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 CFU/ml (n=5) ในระยะเวลา 7 วัน พบว่าวิธี Multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้ภายใน 24 ชั่วโมง ในทุกระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^5 CFU/ml (60%) ในขณะที่วิธีการเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นแข็ง (TSA) พบเชื้อได้ในวันที่ 6 ที่ระดับความเข้มข้น 10^4 ถึง 10^5 CFU/ml (20%) ซึ่งวิธีการ Multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *S. agalactiae* ได้รวดเร็วกว่าวิธีการดั้งเดิมจึงเป็นวิธีการตรวจอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดเวลาในการวิเคราะห์โรคและควบคุมโรคในปลานิลได้ต่อไป

คำสำคัญ : ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส *Streptococcus agalactiae* ปลานิล

บทนำ

ปลานิลเป็นปลาที่นิยมบริโภคและเลี้ยงกันแพร่หลายกันทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อใช้ทดแทนปลาเนื้อขาวชนิดอื่นๆ เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว ใช้ต้นทุนการเลี้ยงต่ำ และเนื้อมีรสชาติ ดีจึงเป็นที่นิยมของตลาด (พลชาติ ผิวเณร และคณะ 2547) ทวีปเอเชียเป็นแหล่งผลิตใหญ่ที่สุดของปลานิลคิดเป็นปริมาณ 80% ของผลผลิตทั้งหมด โดยมีตลาดในสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และทวีปยุโรปขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (สืบพงษ์ ฉัตรมาลัย และคณะ 2549)

แม้ว่าปลานิลจะเป็นปลาที่ทนทานและปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดีแต่จากการเลี้ยงที่หนาแน่น เช่น การเลี้ยงในบ่อและกระชัง เป็นต้น ย่อมส่งผลให้คุณภาพน้ำแย่ลงอย่างรวดเร็วและเป็นสาเหตุให้ปลาเกิดความเครียด อ่อนแอและรับเชื้อได้ง่าย (นพดล ศุกระกาญจน์ และคณะ 2550) ประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อ *Streptococcus* spp. ครั้งแรกในปลาบู่ทรายที่เลี้ยงในกระชังที่จังหวัดนครสวรรค์ อยุธยา ชัยนาท โดยถูกจำแนกว่าเป็นเชื้อชนิด alpha haemolytic streptococcus (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ 2529) นอกจากนี้ยังพบการรายงานการระบาดของโรค สเตรปโตคอคโคซิส (streptococcosis) อย่างต่อเนื่องในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดปัตตานี สงขลาและสตูล (เฉลิม หวันหมาน และคณะ 2547)

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์วิธีทางด้านอณูพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ช่วยให้วินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว และมีความไวสูงจึงสามารถตรวจได้แม้ในขณะที่แบคทีเรียมีจำนวนน้อยและยังไม่เกิดการแสดงออกของโรค เทคนิคดังกล่าวนับว่ามีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดและแยกแบคทีเรียโดยการเลี้ยงในอาหารวุ้นซึ่งให้ผลการวินิจฉัยล่าช้ากว่า ทำให้ขาดประสิทธิภาพในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้ทันท่วงที การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex PCRในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากเลือดปลานิลทดลอง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคMultiplex PCR ในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากเลือดของปลานิลทดลองในระยะเวลาต่างๆ

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากปลานิลป่วยที่ได้รับความอนุเคราะห์และการยืนยันชนิด จากสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง นำมาเลี้ยงในอาหารวุ้นแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมงและนำย้อมสีแกรมเพื่อทดสอบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบและศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเพื่อจำแนกเชื้อ *Streptococcus* spp. ในเบื้องต้น ก่อนจะนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 500 ml โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง และปั่นเก็บเชื้อที่ความเร็วรอบ 4000 rpm และล้างด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% sterile NaCl) 3 ครั้งและเก็บรักษาเชื้อน้ำเกลือปลอดเชื้อปริมาณ 10 ml ที่อุณหภูมิ 4 ºC จนกว่าจะนำไปใช้

2. การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF1- Bacterial DNA extraction kit (Vivantis) วัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

3. การวัดค่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (นิลุบล กิจอันเจริญ และคณะ 2548) โดยเครื่องสเปรคโตโฟโตมิเตอร์ (รุ่น Quant-IT) ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 µl เจือจาง 200 เท่าในน้ำกลั่น และนำไปอ่านค่า Optical Density (OD) โดยค่า OD สามารถคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ (ng/µl) = ค่า OD ที่วัดได้ x 50 x 200 และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 ºC จนกว่าจะใช้

4. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ เป็นส่วนของยีน *16S rRNA* ของ *S. agalactiae* F1 (5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3') และ IMOD (5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3') อ้างอิงจาก Martinez et al (2001) และไพรเมอร์จากส่วนของยีน *28s rRNA* (ชูตา บุญภักดี และคณะ 2550) ของปลาการ์ตูน OceL99 (5'-CGA AGC CAG AGG AAA ATC TG -3') และ Oce215R (5'- GAA ACTTCG GAG GGA ACC A -3') เพื่อใช้เป็น internal control ในการทำปฏิกิริยา Multiplex PCR (multiplex PCR)

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCR reaction 14 µl ประกอบด้วย Taq polymerase 0.08 µl (0.4 unit) 10X Taq buffer 1.4 µl, dNTPs mix (0.25 mM ในแต่ละตัว) 0.28 µl, primer (100 /l) 0.6 µl, MgCl2 (50 mM) 0.42 µl, DNA template 1 µl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 14 µl นำใส่เครื่อง Thermal cycler รุ่น T-Gradient thermoblock (Biometra) โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ºC เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ºC เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 ºC เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำตั้งแต่ denaturation ถึง extension อีก 31 รอบ ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ เป็นรอบสุดท้าย ตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8% ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 µl ในสารละลาย Tris Borate EDTA Buffer (TBE) ความเข้มข้น 0.5x ลงใน เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส ให้ท่วมแผ่นเจล จากนั้นนำ loading dye ความ

เข้มข้น 2x ปริมาตร 2 µl ผสมกับ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาณ 4 µl แล้วใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปโดยสังเกตจากตำแหน่งของสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer นำ PCR product ที่ได้ทำโคลนนิ่ง (cloning) ต่อไป

6. การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR

นำ PCR product ของดีเอ็นต้นแบบมาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T easy vector (Promega) นำพลาสมิดสายผสมทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* จากนั้น เขี่ยเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Media (LB media) ที่มี x-gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside) และสุ่มเลือกโคโลนีที่มีสีขาว นำมาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิดสายผสม โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R ตามคู่มือแนะนำของ pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System (Promega) เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini Kit (IBI) นำดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

7. การทดสอบปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD ต่อพลาสมิด

นำพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ไม่มีดีเอ็นเอ เพื่อทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ *S. agalactiae* เท่ากับ 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ10^{-8} ng ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCR reaction 14 µl ประกอบด้วย Taq polymerase (5 unit/µl) 0.08 µl, 10X Taq buffer 1.4 µl, dNTPs mix (0.25 mM แต่ละตัว) 0.28 µl, primer (100 /l) 0.5 µl, $MgCl_2$ (50 mM) 0.42 µl, genomic DNA 1 µl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 14 µl ในเครื่อง thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีข้อที่ 5 จากนั้นนำผลดีเอ็นเอไปวิเคราะห์เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Vivantis) และเก็บบันทึกข้อมูลภาพถ่ายดีเอ็นเอ

8. การทดสอบปฏิกิริยา PCRของคู่ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R ต่อพลาสมิด *28S rRNA*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ *28S rRNA* (จากกุ้งขาวแปซิฟิก *Litopenaeus vannamei* (ได้รับความอนุเคราะห์จากสุรัช แย้มสวาท) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ไม่มีดีเอ็นเอ (DNase-free water) เพื่อทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ *S. agalactiae* เท่ากับ 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} ng ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCR reaction 14 µl ประกอบด้วย Taq polymerase (5 unit/µl) 0.08 µl, 10X Taq buffer 1.4 µl, dNTPs mix (0.25 mM แต่ละตัว) 0.28 µl, primer (100 /l) 0.5 µl, MgCl (50 mM) 0.42 µl, DNA template 1 µl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 14 µl แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCRในเครื่อง thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีข้อที่ 5 จากนั้นนำผลดีเอ็นเอไปส่องวิเคราะห์เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Vivantis) และเก็บบันทึกข้อมูลภาพถ่ายดีเอ็นเอ

9. การปรากฏของเชื้อ *S. agalactiae* ในเลือดของปลานิลทดลองโดยเทคนิค Multiplex PCRและการเพาะเชื้อใน TSA

9.1 การฉีดเชื้อในปลานิล

ปลานิลน้ำหนัก 50-100 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงนำเข้ามาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับการเลี้ยงในถังทดลอง ปริมาตรน้ำ จำนวนปลานิล 10 ตัวต่อถัง เป็นเวลา 3 วันก่อนเริ่มการทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 2 ครั้ง ทำการสุ่มทดสอบการปลอดเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด ด้วยการตรวจสอบเบื้องต้นทางจุลชีววิทยา การทดลองแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ใช้ปลานิลชุดทดลองละ 10 ตัว แบ่งเป็น ชุดการทดลองที่ 1-5 ฉีดสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ที่ช่องท้องของปลาแต่ละตัวในกลุ่มการทดลอง ปริมาณ 10, 10^2, 10^3, 10^4 และ 10^5 CFU/ml (ชุดการทดลองที่ 1-5 ตามลำดับ) โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ตัวละ 0.1 ml และชุดควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้าช่องท้องของปลาแทนการใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรีย

9.2 การเก็บตัวอย่างเลือดปลานิล

ดูดเก็บตัวอย่างเลือดจากปลานิลทดลองทุกๆวัน ระยะเวลา 7 วัน โดยแต่ละกลุ่มเก็บตัวอย่างเลือดกลุ่มละ 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 µl ใช้เข็มขนาด 1 ml และใช้ EDTA เป็นสารในการป้องกันเลือดแข็งตัว ผสมในตัวอย่างเลือดที่ เก็บจากปลานิล

9.3 การตรวจเชื้อโดยวิธี multiplex PCR

นำเลือดตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง 10 µl สกัดโดยวิธี NaOH-Tris extraction (Wang et al. 1993) ใน 0.1 mM NaOH ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 45 นาที และเติม 0.1 mM Tris pH 7.0µนำดีเอ็นเอที่สกัดเก็บไว้ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และ 10 µl การตรวจเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อในอาหาร TSA

9.4 การตรวจเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อในอาหาร TSA

นำเลือดตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง 10 µl เขี่ยลงในจานอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง และสังเกตการปรากฏของโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* และบันทึกผลการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างแต่ละกลุ่มทุกวัน

ผลการทดลอง

1. การศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

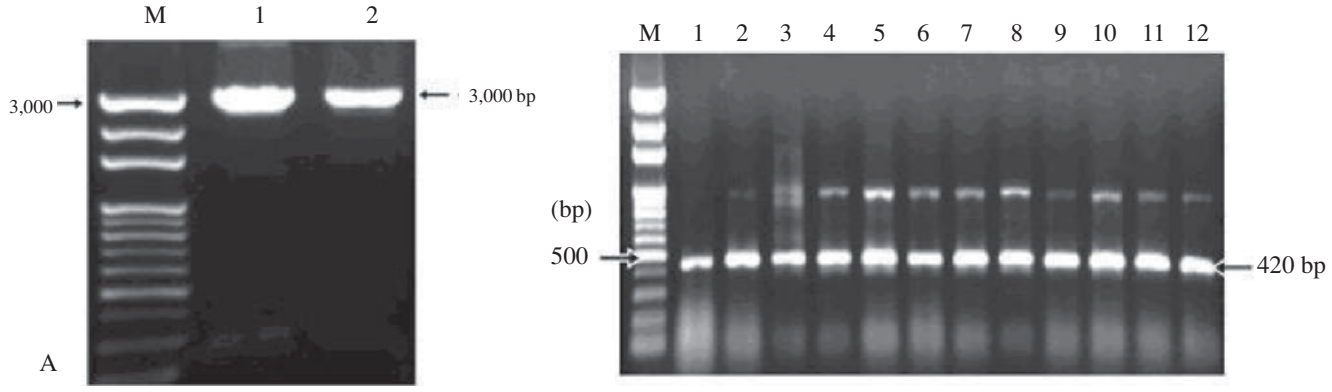
เชื้อ *S. agalactiae* ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง TSA พบว่าโคโลนีขนาดโคโลนีประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร ลักษณะ กลมนูน ขอบเรียบ มีสีขาวขุ่น เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB และเมื่อทำการย้อมสีแกรมพบว่าเซลล์มีรูปร่างกลมต่อกันเป็นคู่หรือสายสั้น ๆ จำนวน 2-10 เซลล์ ติดสีน้ำเงินของสีคริสตอลไวโอเลต จึงยืนยันได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียโดยการใช้ชุดสกัด GF1-Bacterial extraction DNA kit (Vivantis) และตรวจวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Quant-IT) พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 120 ng/µl

3. การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *16S rRNA* มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy vector และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียคัดเลือกทรานฟอร์มแมนต์จากโคโลนีสีขาว แล้วสกัดพลาสมิดลูกผสม เมื่อตรวจสอบขนาดโดยอะกาโลสอิเล็กโทรโฟลิซิสเจลพบว่าแถบพลาสมิดสายผสมมีขนาดมากกว่า 3,000 bp (รูปที่ 3A) แล้วทดสอบซ้ำโดยทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M13F และ M13R ทำให้ได้ผลผลิตขนาด 420 bp (รูปที่ 1B) ซึ่งเป็นขนาดเท่ากับที่คาดการณ์คือ ขนาดประมาณ 220 bp ของ PCR product รวมกับประมาณ 200 bp ของขนาดที่เพิ่มขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R ในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 1 พลาสมิดสายผสมของผลิตภัณฑ์ PCRจาก pGEM-T easy Vector

(A) พลาสมิดสายผสมของ pGEM-T easy Vector และชิ้นดีเอ็นเอของ *E. coli* ช่องที่ M คือ100 bp DNA ladder, ช่องที่ 1 และ 2 คือ พลาสมิดสายผสมจากโคโลนีที่ต่างกันขนาดดีเอ็นเอ > 3,000 bp)

(B) พลาสมิดสายผสมที่ได้จากการทรานสฟอร์ม ปฏิกิริยาเชื่อมของ pGEM-T easy และ ชิ้นดีเอ็นเอของ *E. coli* จำนวน 12 โคโลนี (ช่อง 1 ถึง 12 ตามลำดับ) ช่องที่ M คือ 100 bp DNA ladder ขนาดดีเอ็นเอ ประมาณ 420 bp

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ

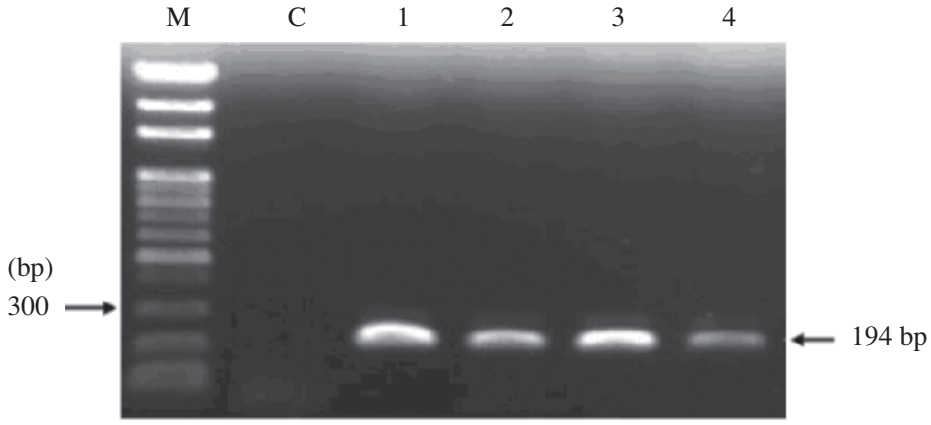
ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีความเหมือนสูงสุดกับยีนของ *16S rRNA* ของเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธ์ A909 (Accession no. CP000114.1) ถึงร้อยละ 98

5. การทดสอบปฏิกิริยา PCRของคู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD ต่อเชื้อ *S. agalactiae*

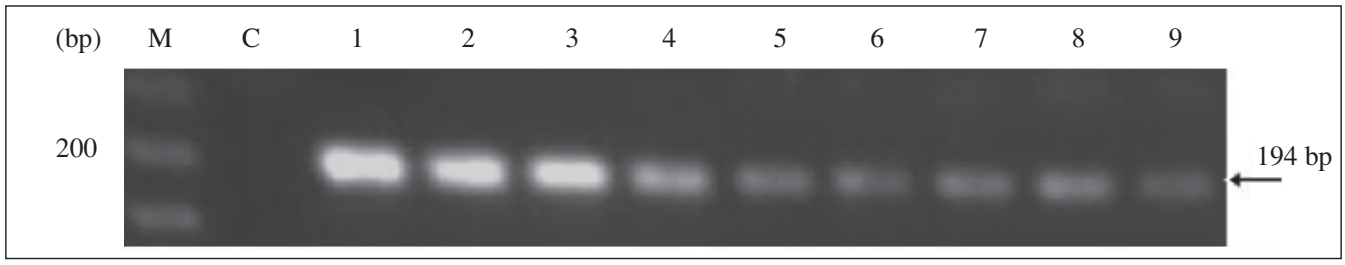
เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยเทคนิค PCR ดีเอ็นเอปริมาณ 0.2 ng ถึง 0.5 ng ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และนำดีเอ็นเอผลผลิต 4 ?ไมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส-เจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าสามารถตรวจสอบได้ถึงปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอต่ำสุด 0.2 ng ซึ่งแถบขนาดดีเอ็นเอ PCR product มีขนาด 194 bp แสดงดังรูปที่ 2

6. การทดสอบปฏิกิริยา PCRของคู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD ต่อเชื้อพลาสมิด 16S rRNA

เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยเทคนิค PCR ดีเอ็นเอปริมาณ 1 ng ถึง 10-8 ng ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และนำ PCR product ปริมาณ 4 ?ไมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าสามารถตรวจสอบได้ถึงปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอ 10-8 ng ซึ่งแถบดีเอ็นเอ PCR product มีขนาด 194 bp (ช่องที่ 9) แสดงดังรูปที่ 3



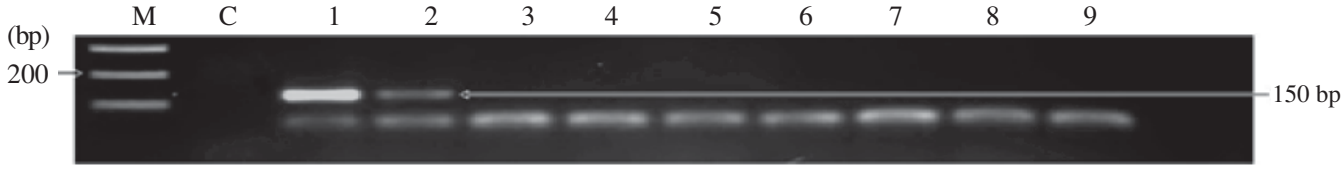
รูปที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCRบริเวณยีน *16S rRNA* ของเชื้อ *S. agalactiae* ตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder, ช่อง C คือ ไม่มีดีเอ็นเอ, ช่อง 1 ถึง 4 คือ ดีเอ็นเอ 0.5, 0.4, 0.3 และ 0.2 ng ตามลำดับ



รูปที่ 3 การทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ F1 และ IMOD ของช่อง M คือ 100 bp DNA ladder, ช่อง C คือ ไม่มีดีเอ็นเอ, ช่อง 1 ถึง 9 คือ ดีเอ็นเอ 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} ng ตามลำดับ

7. การทดสอบปฏิกิริยา PCRของคู่ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R ต่อเลือดปลานิล

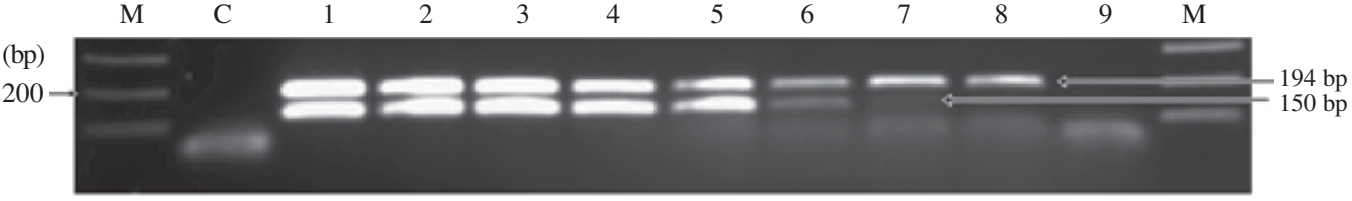
เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจดีเอ็นเอของเลือดปลานิลด้วยเทคนิค PCR ดีเอ็นเอปริมาณ 10 ng ถึง 10-7 ng ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และนำ PCR product 4 µl มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า สามารถตรวจสอบได้ถึงปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอ 1 ng (ช่องที่ 2) ซึ่ง PCR product มีแถบดีเอ็นเอมีขนาด 150 bp แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาPCRด้วยไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R ของ เลือดปลานิลโดย ช่องM คือ 100 bp DNA ladder, ช่อง C คือ ไม่มีดีเอ็นเอ, ช่อง1 ถึง 9 คือ ดีเอ็นเอ 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} ng ตามลำดับ

8. การทดสอบความไวของปฏิกิริยา MultiplexPCR

เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอ *28s rRNA* ของกุ้งขาวแปซิฟิกด้วยเทคนิค PCR ดีเอ็นเอ จำนวน 9 ความเข้มข้น จากปริมาณ 1 ถึง 10^{-8} ng ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และนำ PCR product 4 µl มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า สามารถตรวจสอบความไวต่ำสุดปริมาณดีเอ็นเอ 10^{-5} ng (ช่องที่ 7) แสดงดังรูปที่ 5



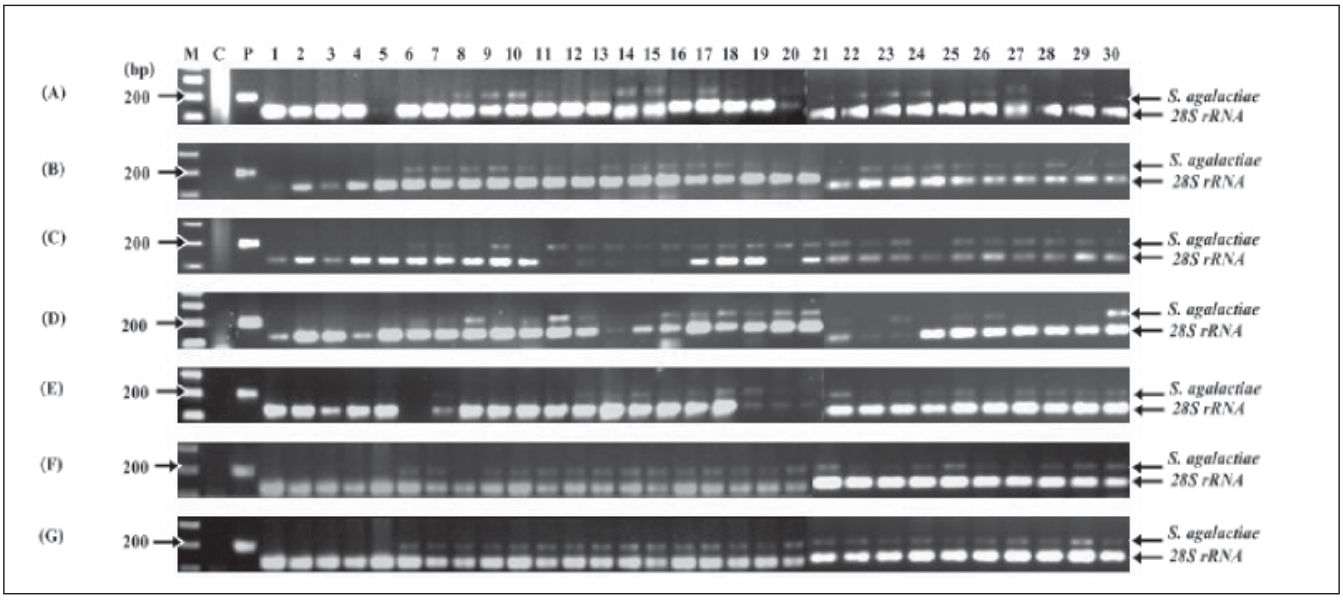
รูปที่ 5 การทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ F1 และ IMOD และ OceL99 และ Oce215R ของพลาสมิดสายผสมเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสเจล ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder, ช่อง C คือ ไม่มีดีเอ็นเอ, ช่อง1 ถึง 9 คือ ดีเอ็นเอ 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} ng ตามลำดับ

9. การตรวจติดตามเชื้อโดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นแข็ง TSA และการทำปฏิกิริยา Multiplex PCR

ผลการเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อโดยวิธี PCRและการเพาะเชื้อในอาหารวุ้นแข็ง TSA แสดงดังตารางที่ 1 พบว่า เทคนิค Multiplex PCRสามารถตรวจให้ผลบวกได้ตั้งแต่วันแรกเป็นต้นไปจากกลุ่มปลานิลหลังการรับเชื้อความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 10^5 cfu/ml (รูปที่ 6) ในขณะที่การเพาะเชื้อในอาหารวุ้นแข็งสามารถพบโคโลนีจากกลุ่มปลานิลรับเชื้อความเข้มข้น 10^4 ถึง 10^5 cfu/ml ได้ตั้งแต่วันที่ 6 เป็นต้นไป

ตารางที่ 1 ผลของการตรวจสอบเชื้อ *S. agalactiae* ในเลือดปลานิล โดยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อในอาหารวุ้นแข็ง TSA

ปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* 5 ระดับความเข้มข้น										
ระยะเวลา	1×10^1 cfu/ml		1×10^2 cfu/ml		1×10^3 cfu/ml		1×10^4 cfu/ml		1×10^5 cfu/ml	
หลังการฉีด	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR
1 วันหลังการฉีด	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
2 วันหลังการฉีด	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
3 วันหลังการฉีด	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
4 วันหลังการฉีด	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
5 วันหลังการฉีด	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
6 วันหลังการฉีด	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
7 วันหลังการฉีด	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+



รูปที่ 6 MultiplexPCRจากตัวอย่างเลือดปลานิลรับเชื้อ *S. agalactiae* ในวันที่ 1 ถึง วันที่ 7 (A-G) ตามลำดับ ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder, ช่องที่ C คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ ช่องที่ 1-5 คือตัวอย่างเลือดปลานิลชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ช่องที่ 6 ถึง 10 คือ ตัวอย่างเลือดปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* 10 CFU/ml, ช่องที่ 11 ถึง 15 คือ 10^2 CFU/ml, ช่องที่ 16 ถึง 20 คือ 10^3 CFU/ml, ช่องที่ 21 ถึง 25 คือ 10^4 CFU/ml, ช่องที่ 26 ถึง 30 คือ 10^5 CFU/ml

สรุปและวิจารณ์ผล

การพัฒนาเทคนิคPCRในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* จากเลือดปลานิลทดลองในครั้งนี้ สามารถตรวจพบเชื้อภายใน 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ตั้งแต่ปลานิลทดลองในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ในทุกกลุ่มปลานิลทดลอง ในขณะที่การตรวจเชื้อโดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นแข็ง TSA ตรวจพบโคโลนีในอาหารวุ้นแข็ง TSA ได้ในกลุ่ม $1x10^4$ และ $1x10^5$ CFU/ml ในวันที่ 6 เป็น ต้นไป ซึ่งการตรวจสอบเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีเลี้ยงในอาหาร TSA นี้ ตรวจสอบเชื้อได้ช้าเนื่องจากเชื้อ *S. agalactiae* มีการเจริญที่ช้าและใช้เวลาประมาณ 2 วัน จึงจะเห็นโคโลนีได้ชัดเจน (นิลุบล กิจอันเจริญ และคณะ 2548) จึงทำให้การตรวจวินิจฉัยเชื้อเป็นไปได้อย่างล่าช้า เนื่องจากอาการของปลานิลที่ติดโรคส่วนใหญ่จะมีการแสดงออกและการตายภายใน 7 วัน (เฉลิม หวันหมาน และคณะ 2547) ทำให้ล่าช้าต่อการรักษาและควบคุมโรคที่เกิดขึ้นในขณะที่วิธี PCR เป็นวิธีการที่รวดเร็วและไม่สูญเสียในขณะการตรวจเนื่องจากใช้ตัวอย่างเลือดในปริมาณเพียงเล็กน้อย ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโดยวิธีPCRพบว่าปฏิกิริยา PCR สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจาก เชื้อ *S. agalactiae* ได้ถึงปริมาณ 0.2 ng และความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอพลาสมิดของเชื้อ *S. agalactiae* ในปริมาณต่ำสุดที่ $1x10^{-8}$ ng ซึ่งมีความไวสูงเหมาะสำหรับเป็น positive control สำหรับปฏิกิริยา MultiplexPCR เพื่อป้องกันผลบวกปลอม

ในการพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อการตรวจเชื้อแบคทีเรียโดยการตรวจสอบตัวอย่างเลือด นอกจากการวินิจฉัยโรคในปลานิลจากเชื้อ *S. agalactiae* ของการศึกษาในครั้งนี้ ยังมีการศึกษากัน การตรวจเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. iniae* ในปลานิลที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย จากการสำรวจตัวอย่างปลานิลจากประเทศไทยโดยวิธี PCR พบว่า เชื้อ *S. agalactiae* พบสูงสุดในจำนวนปลานิลที่ตรวจ คิดเป็น 88% และ เชื้อ *S. iniae* ตรวจพบเพียง 12% เท่านั้น (Maisak 2008) ในปลานิลและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น การติดตามการตรวจเชื้อ *Edwardsiella tarda* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบในปลานิลและปลาดุก *(Clarias gariepinus)* โดยการฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อ (Intramuscular) และการฉีดเข้าช่องท้องและติดตามเชื้อจากการสกัดดีเอ็นเอจากตับและไตและตรวจโดย PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *E. tarda* จากปลาดุก และปลานิลได้ในวันที่ 4 และ 7 ตามลำดับ (El-Yazeed and Ibrahem 2009) ซึ่งวิธีการทางเทคนิค PCR เริ่มมีแนวโน้มที่ใช้ในการตรวจโรคเพิ่มขึ้นจากเลือดปลาในอนาคต โดยเฉพาะมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจพ่อแม่พันธุ์ปลาและการเฝ้าระวังในปลาเลี้ยงเพื่อป้องกันการระบาดของโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Sreptococcus agalactiae* ดร.อรุณี อหันทริก และ ดร.คเชนทร เฉลิมวัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบ แก้ไข และปรับปรุงวิธีการวิจัยให้มีคุณภาพ เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา และทุนวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ ในโครงการการสำรวจทางชีวภาพในสัตว์น้ำเศรษฐกิจตามแนวชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี และการจัดการความเสี่ยงเบื้องต้นต่อสาร PAHs ในหอยแมลงภู่ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์ สิทธิ บุณยรัตผลิน และจิราพร เกษรจันทร์ (2529). *Streptococcus* sp. แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในปลาบู่ทราย. วารสารสงขลานครินทร์. 8(3): 329-332.

เฉลิม หวันหมาน ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง และกิจการ ศุภมาตย์ (2547). โรคสเตรฟโตคอลโคซีสในปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)*. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 27 (ฉบับพิเศษ 1): 291-305.

ชูตา บุญภักดี ยุทธนา เทพทอง สุรัช แย้มสวาท โอภาส ชามะสนธิ์ ปิยวรรณ หัสดี และสมศักดิ์ ปัญหา (2550). การพัฒนาวิธีตรวจสอบเนื้อปลาปักเป้าปลอมปนในวัตถุดิบอาหารด้วยเทคนิค

multiplex PCR และ PCR-SSCP. ใน การประชุมวิชาการ 35 ปี บรูณาการความรู้ สู่งานวิจัย มุ่งแก้ไขวิกฤตสิ่งแวดล้อม วันที่ 30-31 ตุลาคม 2551 ณ อาคารสิ่งแวดล้อมพัฒนดล คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์. นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล

นพดล ศุกระกาญจน์, สุภฎา คีรีรัฐนิคม, กิจการ ศุภมาตย์ และจรีพร เรืองศรี (2550). รายงานการวิจัยการศึกษาปัจจัยการเกิดโรค *Streptococcosis* และพยาธิสภาพของการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ *(Oreochromis niloticus)*. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 10(1): 47-64.

El-Yazeed, H. A., and Ibrahem M. D. (2009). Studies on *Edwardsiella tarda* infection in catfish and *Tilapia nilotica*. BS. Vet.Met J, 19(1). 44-50.

Maisak H., Patamalai B., Amonsin A., and Wongtavatchai A. (2008). P29 *Streptococcosis* in Thai

Cultured Tilapia *Oreochromis nilotica* in Proceedings 7 Chula. Univ. Vet. Sci. Ann. Con., 1 May, 2008. 85-86.

Martinez, G., Harel, J., and Gottschalk, M. (2001). Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. Can. J. Vet, 65. 68-72.

Wang, H., Qi, M. Q., and Cutler A. J.(1993). A simple method of preparing plant-samples for PCR. Nucleic Acids Res., 21. 4153-4154.