

**Research article**

Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* recovered from farmed tilapia in Chiang Mai

Dilok Wongsathein^{1,*}, Nantachat Kaewngernsong², Sayamon Raksri², Rutch Khattiya¹,
Teerapong Potha³ and Sukolrat Boonyayatra¹

¹Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

²Graduate Program in Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

³Central Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

Abstract

Streptococcus agalactiae is a bacterial pathogen affecting farmed tilapia losses. In this study, five bacterial samples were recovered from farmed tilapia in Chiang Mai. They were identified and characterized by standard conventional methods, Lancefield serogrouping, biochemical assay with API 20 STREP, confirmed *S. agalactiae* and capsular typing by PCR. Bacterial growth and antibiotic susceptibility were also investigated. The results showed that all isolates were Gram-positive cocci, mostly in long chains, white colonies measuring 1-2 mm and grow from 28 to 37 °C at 24-48 h. They appeared β-hemolysis, non-motile, catalase and oxidase negative, CAMP test positive but no grow at higher than 2% NaCl and serogroup B. The biochemical profiles showed some differences in reactions while all the PCR samples were confirmed as *S. agalactiae* serotype III. The bacterial growth were similar including lag phase at 0-3 h, log phase at 3-12 h, stationary phase at 12-54 h and death phase after 54 h. In addition, the isolates were susceptible to oxytetracycline, sulphamethoxazole/trimethoprim, enrofloxacin, amoxycillin, penicillin and chloramphenicol.

Keywords: Characterization, Chiang Mai, Identification, *Streptococcus agalactiae*, Tilapia

***Corresponding author:** Dilok Wongsathein, Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand. E-mail: dilok.w@cmu.ac.th

Article history: received manuscript: 4 June 2018, revised manuscript: 1 August 2018, accepted manuscript: 8 August 2018, published online: 3 October 2018

Academic editor: Korakot Nganvongpanit



Open Access Copyright: ©2018 Author (s). This is an open access article distributed under the term of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author (s) and the source.

บทนำ

Streptococcus agalactiae (synonym *S. difficile*) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สำคัญในสัตว์น้ำ ซึ่งก่อให้เกิดโรค Streptococcosis ในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะปลานิล ทำให้เกิดความเสียหายในระดับฟาร์มและอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลทั่วโลก เช่น โคลัมเบีย จีน บราซิล มาเลเซีย และไทย (Iregui et al., 2016; Li et al., 2014; Mian et al., 2009; Alsaied et al., 2013; Suanyuk et al., 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อมีความแตกต่างกัน อาจขึ้นกับสายพันธุ์ (strain) ของเชื้อ ชนิดของปลา สภาพแวดล้อม คุณภาพน้ำ และภูมิประเทศที่แตกต่างกัน (Evans et al., 2002; Bowater et al., 2012; Rodkhum et al., 2011) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจมีความสัมพันธ์และส่งผลกับการก่อโรคหรือความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น อาการและรอยโรคที่มักพบในปลาป่วย คือ วายน้ำ ผิดปกติ สูญเสียการทรงตัว ลำตัวสีคล้ำ ตาขุ่นและโปน ตกเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือก ครีบและลำตัว มักมีมีของเหลวในช่องท้อง หรือดับซีด (Austin and Austin, 2007)

เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีลักษณะและคุณสมบัติบางประการที่คล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ (Family) เดียวกัน เช่น *S. iniae*, *Lactococcus* sp. และ *Enterococcus* sp. (Austin and Austin, 2007) ดังนั้นการจำแนกชนิด ลักษณะและทราบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยโรค การรักษา การป้องกันและควบคุมโรค Streptococcosis ในปลานิลได้อย่างถูกต้อง เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันการจำแนกชนิด ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวให้ถูกต้องและแม่นยำต้องอาศัยหลักการวินิจฉัยขั้นพื้นฐานไปจนถึงทางด้านอนุชีววิทยา (Meiri-Bendek et al., 2002; Buller, 2004; Austin and Austin, 2007; Azad et al., 2012)

S. agalactiae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) เรียงตัวเป็นคู่หรือสายโซ่สั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์หรือแคปซูล ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy agar (TSA) และ blood agar (BA) ที่อุณหภูมิ 28-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ฐานเล็กน้อย ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-1 มิลลิเมตร สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ได้ทั้งแบบแอลฟา (α), เบต้า (β) และแกมมา (γ) ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วย (Christie-Atkins-Munch-Petersen; CAMP) test (Buller, 2004; Austin and Austin, 2007) คุณสมบัติทางซีรัมวิทยาของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ของเชื้อ (lancefield's group antigen) จัดอยู่ใน group B (group B Streptococcus; GBS) จากทั้งหมด 20 กลุ่ม ได้แก่ group A-V ยกเว้น I และ J (Evans et al., 2002; El-Huneidi et al., 2007; Austin and Austin, 2007) ส่วนคุณสมบัติทางชีวเคมี ความทนทานต่ออุณหภูมิและความเค็ม รวมทั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial growth) และความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะมีความแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ (Evans et al., 2002) ซึ่งสายพันธุ์ของเชื้อ *S. agalactiae* สามารถจำแนกออกได้เป็น 10 สายพันธุ์ โดยอาศัยคุณสมบัติของแอนติเจนที่ผิวแคปซูล (capsular typing) ได้แก่ Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII และ IX (Slotved et al., 2007)

การศึกษานี้ขึ้นเพื่อทำการจำแนกชนิด ลักษณะและคุณสมบัติ รวมทั้งยืนยันตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลป่วยในฟาร์มจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อจะนำไปสู่การพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรค การรักษา การป้องกันและควบคุมโรคในปลานิลได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การจำแนกชนิดและลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากไตส่วนหน้า ม้าม หรือสมองของปลานิลป่วยจากฟาร์มในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 ฟาร์ม (Table 1) ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

TSA และ BA ที่ผสมเลือดและความเข้มข้นร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของโคโลนี ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BA ลักษณะของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรม การเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส และการทดสอบ CAMP test (Buchanan and Gibbons, 1974; Sneath et al., 1986; Freichs and Millar, 1993) จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาของเอนติเจนที่ผนังเซลล์ด้วยชุดทดสอบ lancefield serogrouping (Oxoid, England) ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) ด้วยชุดทดสอบ API 20 STREP (BioMerieux® SA, France) ทดสอบคุณสมบัติความทนทาน (tolerance test) ของเชื้อแบคทีเรียต่ออุณหภูมิที่ 4, 15, 28, 37 และ 45 องศาเซลเซียส และความเค็มที่ 1, 2, 3, 5 และ 6.5% NaCl จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 5 ตัวอย่างไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth (BHI) ที่ผสม glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อบริโภคใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

Table 1 Number of bacterial samples from infected farmed tilapia in Chiang Mai

Sample	Farm	Date	Farm type	Fish spp.	Sex	Age (month)	Sampled organ
1	1	9 June 2014	Cage	Red tilapia	Male	6	Anterior kidney
2	2	21 August 2014	Cage	Red tilapia	Male	4	Anterior kidney
3	3	9 June 2015	Pond	Nile tilapia	Male	5	Brain
4	3	9 June 2015	Pond	Nile tilapia	Male	5	Anterior kidney
5	3	9 June 2015	Pond	Nile tilapia	Male	5	Spleen

การยืนยันชนิดและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคพอลิเมอร์เชนรีแอชัน

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่าง ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วย GF-1 Bacterial DNA extraction kit (NucleoSpin® Tissue, Germany) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำก้อนเซลล์ที่ได้ไปเจือจางกับสาร buffer R1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาทำให้เซลล์แตกโดยเติม lysozyme (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เซลล์ที่ผ่านการย่อยแล้วจะถูกนำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 10,000 xg เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำก้อนเซลล์ที่ได้มาละลายใน buffer R2 แล้วเติม proteinase K ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติม buffer BG แล้วเขย่าจนได้สารละลายใส แยกดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยการเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย จากนั้นย้ายสารละลายไปเติมลงใน DNA binding column ทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบแล้วล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ซึ่งดีเอ็นเอจะเกาะติดที่คอลัมน์ จากนั้นแยกดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์โดยเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบริโภคในการทำพีซีอาร์ต่อไป

การยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคพอลิเมอร์เชนรีแอชัน

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่าง มายืนยันชนิด (species) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ V1: 5'-TTTGGTGTTCACACTAGACTG-3' และ V2: 5'-TGTGTTAATTACTCT-TATGCG-3' ดังที่เคยมีรายงานไว้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ (Meiri-Bendek et al., 2002) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์จะประกอบไปด้วย 2x Taq Master Mix (Vivantis Technologies, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) ไพรเมอร์ V1 และ V2 และดีเอ็นเอของตัวอย่างที่สกัดไว้ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler; Bio-Rad, USA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เพื่อเริ่มแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว (initial denaturation) จากนั้นจึงเริ่มปฏิกิริยาฟิซาร์จำนวน 5 รอบ โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ และแยกออกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) จากนั้นลดอุณหภูมิลงเหลือ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอแม่แบบจับกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ (annealing) แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากปลายของไพรเมอร์ให้ยาวขึ้น (extension) จากนั้นทำปฏิกิริยาฟิซาร์อีกครั้ง จำนวน 20 รอบ โดยใช้อุณหภูมิในการแยกสายของดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงเป็น 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ยาวขึ้น ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาฟิซาร์ จะคงไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่อย่างสมบูรณ์ (final extension) จากนั้นผลผลิตของปฏิกิริยาฟิซาร์ที่ได้จะถูกนำมาแยกหาดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยดูผลจากการย้อมสีด้วย ethidium bromide ซึ่งผลผลิตปฏิกิริยาฟิซาร์ที่ได้จะต้องมีขนาด 120 คู่เบส จึงจะยืนยันชนิดของเชื้อได้ว่าเป็น *S. agalactiae*

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค multiplex PCR

นำผลผลิตของปฏิกิริยาฟิซาร์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่าง มาจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนติเจนที่ผิวแคปซูล (capsular typing) ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (Table 2) ที่เคยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ (Poyart et al., 2007)

Table 2 Specific primers for multiplex PCR

Primer name	Sequence (5'→3')	Gene target	Amplicon size (bp)
Ia-F	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	cps1a	521 and 1826
Ia-R	GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC		
Ib-F	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	cps1b	770
Ib-R	GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG		
II-F	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	cps2	397
II-R	TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG		
III-F	TCCGTACTACAACAGACTCATCC	cps1a/2/3	1826
III-R	AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC		
IV-F	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAAGTGT	cps4	578
IV-R	CCTCCCAATTTCTGCCATAATGGT		
V-F	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	cps5	701
V-R	AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT		
VI-F	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA	cps6	487
VI-R	CTGTCCGACTATCCTGATGAATCTC		
VII-F	CCTGGAGAGAACAATGTCCAGAT	cps7	371
VII-R	GCTGGTCGTGATTTCTACACA		
VIII-F	AGGTCAACCACTATATAGCGA	cps8	282
VIII-R	TCTTCAAATTCGCTGACTT		

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 5 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth (TSB) ที่มีปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ (transfer) ใส่ลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตรครั้งละ 1.5 ml ณ ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 48, 54, 72 และ 96 ตามลำดับ ตัวอย่างที่ได้นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่นแสง 610 นาโนเมตร และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี drop plating technique หรือวิธี Miles & Misra method (Miles et al., 1938)

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ

ทำการทดสอบความไวของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disc diffusion method (MacFaddin, 1980) โดยนำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 5 ตัวอย่าง ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ขูดลงใน 0.9% sterile NSS (Normal saline solution) แล้วทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายเชื้อให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ฆ่าเชื้อจุ่มสารละลายเชื้อแล้วป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mueller hinton agar (MHA) ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร หลังจากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) ฆ่าเชื้อคีบแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน ได้แก่ อ็อกซิเตตราไซ-คลิน (30 มิลลิกรัม) ซัลฟาเมโทซาโซล/ไตรเมโทพริม (25 มิลลิกรัม) เอ็นโรฟล็อกซาซิน (5 มิลลิกรัม) อะม็อกซิซิลลิน (10 มิลลิกรัม) เพนิซิลลิน (10 ยูนิต) และคลอแรมฟินิคอล (30 มิลลิกรัม) วางลงบนผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการแปลผลตามตารางมาตรฐานของการแปลผลความไวของยาปฏิชีวนะ

ผลการศึกษา

การจำแนกชนิดและลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากไตส่วนหน้า ม้าม หรือสมองของปลานิลป่วยทั้ง 5 ตัวอย่าง จากจำนวน 3 ฟาร์ม พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ BA เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นสายสั้น โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ขนาดเล็กประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เจริญได้ดีภายใน 24-48 ชั่วโมง ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -hemolysis ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส ให้ผลบวกต่อ CAMP test เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเค็มมากกว่า 2% และคุณสมบัติทางซีรัมวิทยาของแอนติเจนที่ผนังเซลล์จัดอยู่ในกลุ่ม serogroup B (Table 3)

Table 3 Phenotypic characteristic of bacterial sample from infected farmed tilapia in Chiang Mai

Test	Bacterial sample				
	1	2	3	4	5
Growth on TSA	+	+	+	+	+
Growth on BA	+	+	+	+	+
Haemolysis	β	β	β	β	β
Gram staining	+	+	+	+	+
Cell morphology	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Motility	-	-	-	-	-
Catalase production	-	-	-	-	-
Oxidase production	-	-	-	-	-
Lancefield's group	B	B	B	B	B
Growth on TSB at :					
4°C	-	-	-	-	-
15°C	-	-	-	-	-
28°C	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-
Growth on TSB in :					
1% NaCl	+	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	+	+	+
3% NaCl	-	-	-	-	-
5% NaCl	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	-	-	-	-
CAMP test	+	+	+	+	+

Identification: + = positive, - = negative

ส่วนผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยพบว่าให้ผลบวก (positive) ต่อ voges proskauer, hydrolysis, alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase, arginine dihydrolase, ribose (ยกเว้น ตัวอย่างที่ 4 และ 5) และ trehalose และให้ผลลบ (negative) ต่อ β -glucosidase hydrolysis, pyrolydonyl arylamidase, α -Galactosidase, β -Glucuronidase, β -Galactosidase, arabinose, manitol, sorbitol, lactose, inulin, raffinose, amidon และ glycogen ตามลำดับ (Table 4)

Table 4 Biochemical characteristic of bacterial sample from infected farmed tilapia in Chiang Mai

Biochemical reactions/enzymes	Bacterial sample				
	1	2	3	4	5
Voges proskauer	+	+	+	+	+
Hydrolysis	+	+	+	+	+
β -glucosidase hydrolysis	-	-	-	-	-
Pyrolidonyl arylamidase	-	-	-	-	-
α -Galactosidase	-	-	-	-	-
β -Glucuronidase	-	-	-	-	-
β -Galactosidase	-	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+
Leucine aminopeptidase	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-

Identification: + = positive, - = negative

การยืนยันชนิดและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคพอลิเมอร์เชนรีแอชัน

จากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่าง พบว่าสามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* และจัดอยู่ในกลุ่ม III (serotype III) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* และ capsular typing serotype III ซึ่งมีผลผลิต พีซีอาร์ ขนาด 120 คู่เบส (Figure 1) และขนาด 1826 คู่เบส (Figure 2) ตามลำดับ

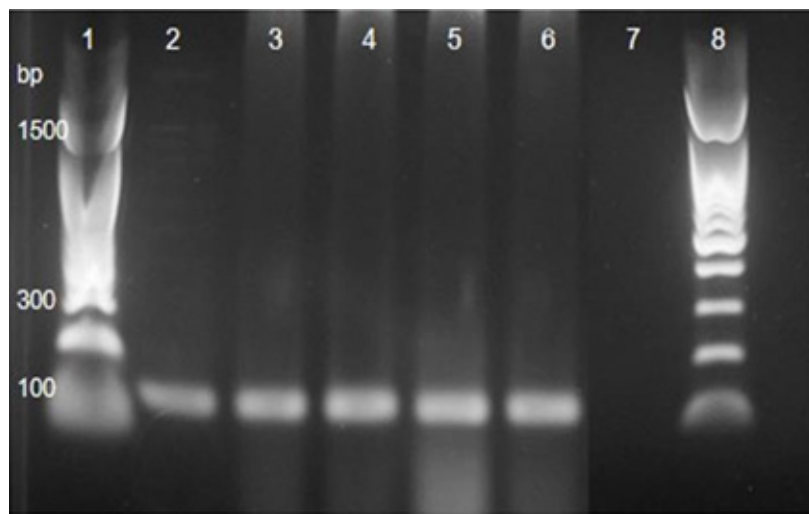


Figure 1 1.5% Agarose gel showing the amplification products of *Streptococcus agalactiae* using the V1 and V2 primers from 16S rRNA gene to yielded 120 bp. Lanes 1 & 8, DNA ladder; Lanes 2-6, Bacterial samples number 1-5 respectively; Lane 7, negative control

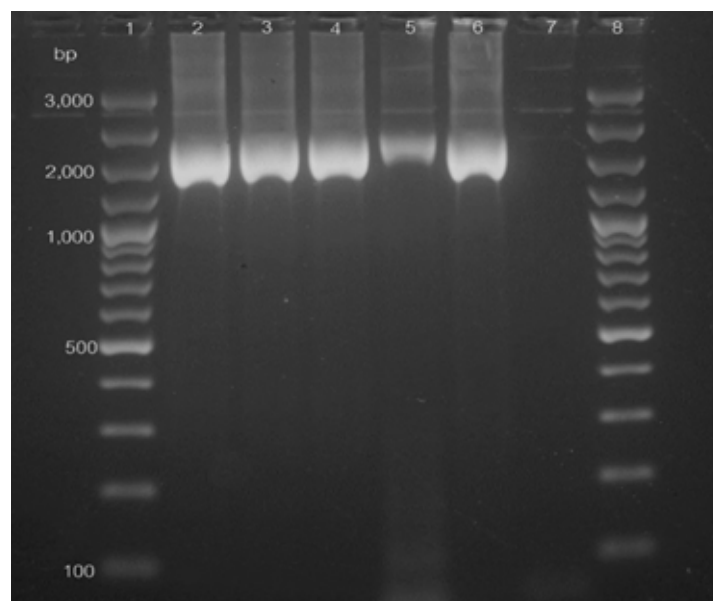


Figure 2 1.5% Agarose gel showing the amplification products of *Streptococcus agalactiae* using the III-F and III-R primers from cps gene to yielded 1826 bp. Lanes 1 & 8, DNA ladder; Lanes 2-6, Bacterial samples number 1-5 respectively; Lane 7, negative control

การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการวัดค่าดูดกลืนแสง พบว่าตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่าง มีค่าค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วง 0-3 จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 แล้วไม่พบการเปลี่ยนแปลงหลังจากช่วง 12 (Figure 3) ส่วนผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1 เรียกว่า lag phase (ช่วง 0-3) ระยะที่ 2 เรียกว่า log phase (ช่วง 3-12) ระยะที่ 3 เรียกว่า stationary phase (ช่วง 12-54) และระยะที่ 4 เรียกว่า death phase (ช่วง 54 เป็นต้นไป) ตามลำดับ (Figure 4)

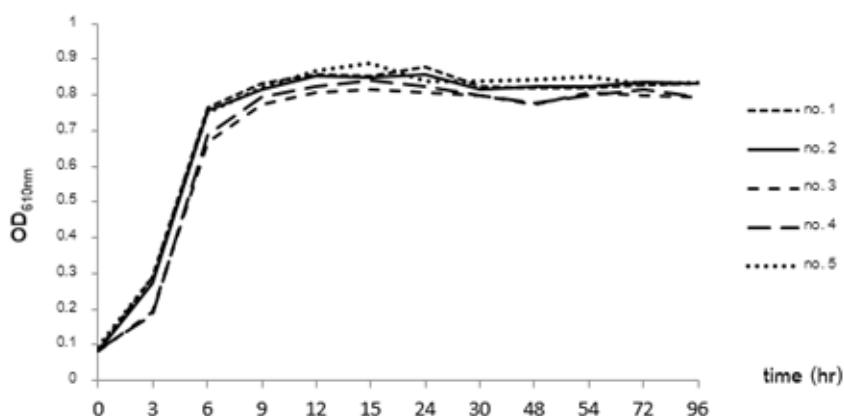


Figure 3 Growth curve of the bacterial samples at 28 °C, showing of the OD_{610 nm} versus time

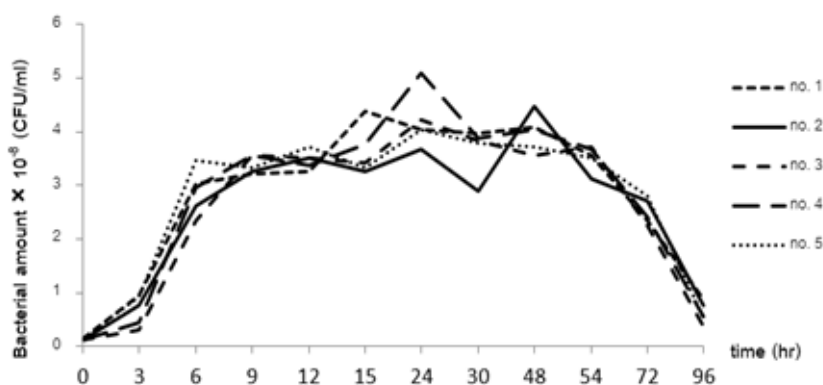


Figure 4 Growth curve of the bacterial samples at 28 °C, showing the typical phase of growth of the number viable cells versus time

ความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดสอบ คือ อ็อกซีเตตราไซคลิน ซัลฟาเมโทซาโซล/ไตรเมโทพริม เอ็นโรฟล็อกซาซิน อะม็อกซิซิลลิน เพนิซิลลิน และคลอแรมฟินิคอล (Table 5)

Table 5 Antibiotic susceptibility of bacterial samples from infected farmed tilapia in Chiang Mai

Antibiotics	The number of sample				
	1	2	3	4	5
Oxytetracycline (OT); 30 mg	S	S	S	S	S
Sulphamethoxazole/Trimethoprim (SXT); 25 mg	S	S	S	S	S
Enrofloxacin (ENR); 5 mg	S	S	S	S	S
Amoxycillin (AML); 10 mg	S	S	S	S	S
Penicillin (P); 10 unit	S	S	S	S	S
Chloramphenicol (C); 30 mg	S	S	S	S	S

Identification: s=bacterial susceptible

วิจารณ์

การศึกษานี้สามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่างแบคทีเรียทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม group B Streptococcus (GBS) หรือเชื้อ *Streptococcus agalactiae* จากลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางซีรัมวิทยาของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งมีเพียงเชื้อ *S. agalactiae* ชนิดเดียวเท่านั้นที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ (Evans et al., 2002) โดยมีความแตกต่างกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในวงศ์ (Family) เดียวกันที่มีลักษณะและคุณสมบัติใกล้เคียงกัน เช่น *S. iniae* ที่ไม่ถูกจัดอยู่ใน Lancefield's group ใด เนื่องจากไม่มีคุณสมบัติทางซีรัมวิทยาของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ ตั้งแต่ group A ถึง V (Elder et al., 1995) หรือเชื้อ *Lactococcus* sp. และ *Enterococcus* sp. ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Group N และ D ตามลำดับ (Buller, 2004)

การทดสอบคุณสมบัติความทนทาน (tolerance test) ของเชื้อแบคทีเรียต่ออุณหภูมิ ความเค็ม และค่าความเป็นกรดต่าง สามารถช่วยแยกความแตกต่างของเชื้อที่มีลักษณะและคุณสมบัติใกล้เคียงกันกับเชื้อ *S. agalactiae* ขึ้นพื้นฐานได้ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดหรือสายพันธุ์จะมีความสามารถทนทานที่แตกต่างกัน การศึกษานี้พบว่าเชื้อ *S. agalactiae* ทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเค็มมากกว่า 2% NaCl ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kayansamruaj et al. (2014) ที่พบการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่อุณหภูมิ 28 และ 35 องศาเซลเซียส แต่แตกต่างจากเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลแดงในจังหวัดสงขลาที่สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 4-40 องศาเซลเซียส ความเค็มร้อยละ 6.5-10 และค่าความเป็นกรดต่าง 9.6 (Suanyuk et al., 2008) นอกจากนี้เชื้อในกลุ่ม *Lactococcus* sp. และ *Enterococcus* sp. สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส และความเค็มร้อยละ 6.5 (Elder et al., 1999; Evans et al. 2009)

ดังนั้นการใช้เทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะจะทำให้สามารถระบุและยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ จากตัวอย่างทั้งหมดมีขนาด 120 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Meiri-Bendek et al. (2002) ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ อาจมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย หรือชนิดของปลา ยกตัวอย่างเช่น มีการศึกษาพบว่าผลผลิตพีซีอาร์ ของเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาจะละเมียดขาว (*Pampus argenteus*) มีขนาด 194 คู่เบส (Azad et al., 2012) และปลานิลแดง (*Oreochromis* spp.) มีขนาด 1457 คู่เบส (Abdullah et al., 2013) นอกเหนือจากนี้เทคนิคพีซีอาร์ ยังช่วยจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ทั้งหมด จัดอยู่ใน serotype III ซึ่งเหมือนกันกับปลานิลที่ป่วยในจังหวัดสงขลาและสมุทรปราการ แต่แตกต่างกันกับปลานิลที่ป่วยในจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี อโยธยาและนครปฐม ซึ่งจัดอยู่ใน serotype Ia (Suanyuk et al., 2008)

การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (lag phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียปรับตัวเข้าสู่ภาวะแวดล้อมใหม่ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียน้อยมาก ระยะที่ 2 (log phase หรือ exponential phase) เป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ทำให้มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ระยะที่ 3 (stationary phase) เป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียมีอัตราการเจริญและอัตราการตายใกล้เคียงกัน ประกอบกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่เริ่มลดลง จากการใช้ในการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และระยะที่ 4 (dead phase หรือ phase of decline) เป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียมีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเจริญ เนื่องจากการสะสมของเสียจากกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ถูกปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นประกอบกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อลดน้อยลง จึงทำให้จำนวนของแบคทีเรียที่มีชีวิตลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งหากทราบลักษณะการเจริญเติบโตที่แท้จริงของเชื้อจะช่วยให้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาอื่นต่อไปได้อย่างถูกต้อง จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่างมีการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกันได้ โดยเฉพาะช่วงระยะเวลาของแต่ละระยะ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเชื้อที่ใช้ ขั้นตอนหรือวิธีการ (Gross et al., 1995; Tortora et al., 2007)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเลือกใช้ในรักษาโรคที่ถูกต้องเหมาะสม (Abuseliana et al., 2010) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด/สายพันธุ์จะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *S. agalactiae* serotype III ที่แยกได้จากปลานิลป่วยในจังหวัดเชียงใหม่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะอีกสี่เตตราไซคลิน ซึ่งเหมือนกันกับเชื้อ *S. agalactiae* serotype Ia ที่แยกได้จากปลานิลในจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี อโยธยา และนครปฐม ในขณะที่มีความแตกต่างจากเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลในจังหวัดสงขลาและสมุทรปราการ ที่จัดอยู่ใน serotype III เหมือนกัน ซึ่งเชื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Suanyuk et al., 2008) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการรักษาโรคอาจจะต้องรวมกับการใช้ปริมาณยา ระยะเวลาที่ใช้ วิธีการให้ที่ถูกต้อง และการจัดการที่ดี

สรุป

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่างที่แยกได้จากไตส่วนหน้า ม้าม หรือสมองของปลานิลดำหรือแดงที่ป่วยในกระชังหรือบ่อดินในฟาร์มจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 ฟาร์ม พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม β -haemolytic group B Streptococcus (GBS) หรือเชื้อ *Streptococcus agalactiae* serotype III ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส ภายใน 24-48 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่

ความเค็มมากกว่าร้อยละ 2 และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะอีกซีเตตราไซคลิน ซัลฟาเมโทซาโซล/ไตรเมโทพริม เอ็นโรฟล็อกซาซิน อะม็อกซิซิลลิน เพนิซิลลิน และคลอแรมฟินิคอล จากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัย การรักษา การควบคุมและป้องกันโรคปลานิลในฟาร์มจังหวัดเชียงใหม่ได้อย่างถูกต้อง เหมาะสม และมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนทุนในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการกลางทางแบคทีเรีย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในงานวิจัย รวมถึงนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่คอยอำนวยความสะดวกและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยทั้งหมด

REFERENCES

- Abdullah, S., Omar, N.1, Yusoff, S.M., Obukwho, E.B., Nwunuji, T.P., Hanan, L. and Samad, J. 2013. Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis* spp.). SpringerPlus, 2, 286.
- Abuseliana, A., Daud, H., Abdul-Aziz, S., Khairani-Bejo, S. and Alsaid, M. 2010. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). J. Anim. Vet. Adv., 9, 2640-2646.
- Alsaid, M., Daud, H.M., Mustapha, N.M., Bejo, S.K., Abdelhadi, Y.M., Abuseliana, A.F. and Hamdan, R.H. 2013. Pathological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences (CAMS-2013) Dec. 29-30, 2013 Kuala Lumpur (Malaysia).
- Austin, B. and Austin, D.A. 2007. Bacterial fish pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish. 4th ed. Springer/Prazis Publishing, Chichester. pp. 552.
- Azad, I.S., Al-Marzouk, A., James, C.M., Almatar, S., Al-Gharabally, H. and Qasem, J.A. 2012. Outbreak of natural Streptococcosis in hatchery produced silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) larvae in Kuwait. Aquaculture, 330-333, 15-20.
- Bowater, R.O., Forbes-Faulkner, J., Anderson, I.G., Condon, K., Robinson, B., Kong, F., Gilbert, G.L., Reynolds, A., Hyland, S., McPherson, G., Brien, J.O. and Blyde D. 2012. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. J Fish Dis, 35, 173-186.
- Bergey, D.H., Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.), 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Bergey, D.H., Krieg, N.R., Holt, J.G., Sneath, P.H.A. (Eds.), 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.

- Buller, N.B. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: A Practical Identification Manual. CABI Publishing, Wallingford. pp. 361.
- Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A. and Bercovier, H. 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.*, 43, 33-40.
- Eldar, A., Gloria, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H. 1999. Biodiversity of *Lactococcus garviae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microb.*, 65, 1005-1008.
- El-Huneidi, W., Mui, R., Zhang, T.H. and Plamer, M. 2007. *Streptococcus agalactiae* CAMP factor/protein B does not bind to human IgG. *Med. Microbiol. Immun.*, 196, 73-77.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Gilbert, P.M., Shoemaker, C.A., Al Sarawi, M.A., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A. and 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.
- Evans, J.J., Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A. 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garviae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *J. Fish Dis.*, 32, 943-951.
- Frerichs, G.N., Millar, S.D., 1993. Manual for the Isolation and Identification of fish bacterial pathogens. Pisces Press, Stirling, Stirling.
- Gross, T., Faull, J., Ketteridge, S. and Springham, D. 1995. Introductory microbiology. Chapman & Hall, London.
- Iregui, C.A., Comas, J., Vasquez, G.M. and Verjan, N. 2016. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp.. *J. Fish Dis.*, 39, 205-215.
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Hirono, I. and Rodkhum, C. 2014. Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the up-regulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet. Microbiol.*, 172, 265-271.
- Li, W., Su, Y.L., Mai, Y.Z., Li, Y.W., Mo, Z.Q. and Li, A.X. 2014. Comparative proteome analysis of two *Streptococcus agalactiae* strains from cultured tilapia with different virulence. *Vet. Microbiol.*, 170, 135-143.
- MacFaddin, J.F., 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedmann, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S. and Kashi, Y. 2002. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *J. Dairy Sci.*, 85, 1717-1723.
- Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M. and Figueiredo, H.C.P. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.*, 136, 180-183.
- Miles, A.A., Misra, S.S. and Irwin, J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*, 38, 732-749.

- Poyart, C., Tazi, A., Réglier-Poupet, H., Billoët, A., Tavares, N., Raymond, J. and Trieu-Cuot, P. 2007. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1985–1988.
- Rodkhum, C., Kayansamruaj, P. and Pirarat, N. 2011. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype Ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Thai J. Vet. Med.*, 41, 309-314.
- Slotved, H.C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S. and Gilbert, G.L. 2007. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2929–2936
- Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G.L. and Supamattaya, K. 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—relationship to human isolates?. *Aqua culture*, 284, 35–40.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 2007. *Microbiology: An introduction*. 9th edition. Pearson Benjamin Cummings, London.

How to cite this article;

Dilok Wongsathein, Nantachat Kaewngernsong, Sayamon Raksri, Rutch Khattiya, Teerapong Potha and Sukolrat Boonyayatra. Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* recovered from farmed tilapia in Chiang Mai. *Veterinary Integrative Sciences*. 2018; 16(3): 271-284.
