เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 63-78. DOI: 10.14456/cmvj.2016.6

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความปริทัศน์

โรคคอลัมนาริสในปลา

จาตุรนต์ ป้องน้ำไผ่ และ ชนกันต์ จิตมนัส *

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ *Flavobacterium columnare* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แท่งยาว มีการรวมตัวกันเป็นลักษณะคล้ายกองฟางก่อให้เกิดโรคคอลัมนาริส สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจทั้งปลาในแหล่งเลี้ยงเชิงพาณิชย์และปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จะมีแผลที่ผิวหนัง ครีบกร่อนและเหงือกเน่า มีอัตราการตายสูง การตรวจโรคจากอาการที่พบและลักษณะของแบคทีเรียจากบาดแผลโดยการทำสไลด์สด มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อเพื่อที่จะใช้ในการวิจัยและพัฒนาวัคซีน อย่างไรก็ตามการเกิดโรคคอลัมนาริส ไม่ใช่เกิดจาก *F. columnare* อย่างเดียว แต่สัมพันธ์กับความแข็งแรงของตัวสัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อมรอบตัว ปัจจุบันวิธีการป้องกันและรักษายังไม่มีประสิทธิภาพ การบริหารจัดการลูกพันธุ์ การลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินและน้ำ การจัดการระหว่างการเลี้ยงมีส่วนสำคัญในการป้องกันโรค

คำสำคัญ โรคปลา โรคคอลัมนาริส โรคเหงือกเน่า *Flavobacterium columnare*

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** ชนกันต์ จิตมนัส คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

อีเมล์: chanagun1@hotmail.com

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 11 มีนาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 11 เมษายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 1 พฤษภาคม พ.ศ.2560*

Review article

Columnaris disease in fish

Jaturon Pongnumpai and Chanagun Chitmanat *

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290

Abstract *Flavobacterium columnare* is a long rod Gram negative bacterium with the haystack-like aggregation on wet mount specimen. It is the causative agent of columnaris disease. This bacterium brings about economic losses in both cultured and wild freshwater fish. Fish with *F. columnare* infection possibly result in skin lesions, fin erosion and gill necrosis, with a severe mortality. Diagnosis typically is based on clinical presentation and wet mount investigation. A culture medium has been modified to improve growth of *F. columnare* for research and vaccine development. However, a columnaris disease is not only caused by *F. columnare*, but the complex interactions between the environment and its host must take into account. At present, curative and preventive measures to combat this disease are not truly effective. Fingerling management, bacteria reduction in bottom ponds and water, good practices during rearing are important factors for this disease prevention.

Keywords; fish diseases, columnaris disease, gill rot disease, *Flavobacterium columnare*

* **Corresponding author:** Chanagun Chitmanat, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Sansai, Chiang Mai

E-mail: chanagun1@hotmail.com

Article history; received manuscript: 11 March 2017, accepted manuscript: 11 April 2017, published online: 1 May 2017

บทนำ

Flavobacterium columnare เป็นเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับสัตว์น้ำหลายชนิด บทความนี้เป็นการรวบรวมเรียบเรียงข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นมาของโรค ลักษณะของเชื้อและอาการของโรคคอลัมนาริส รวมทั้งการป้องกันรักษาโรค

ความเป็นมาของโรค

Davis (1922) ตรวจบาดแผลปลาที่เป็นโรคจากแม่น้ำมิสซิสซิปปีด้วยสไลด์สด (wet mount) แล้วพบแบคทีเรียแท่งยาว เคลื่อนที่ได้และมีการรวมกลุ่มเหมือนกองฟาง จึงตั้งชื่อแบคทีเรียว่า *Bacillus columnaris* โดยตั้งชื่อโรคว่า โรคคอลัมนาริส แต่ไม่สามารถเพาะเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ ต่อมา Ordal and Rucker (1944) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคคอลัมนาริสจากปลาแซลมอน *(Onchorhynchus nerka)* สำเร็จ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีสารอาหารปริมาณน้อย ๆ แบคทีเรียนี้จัดอยู่ในลำดับ (Order) Myxobacteria ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แท่งยาว เคลื่อนที่แบบคืบคลานบนอาหารวุ้น และมีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Chondrococcus columnaris* ปีต่อมา Garnjobst (1945) จัดแบคทีเรียนี้ให้อยู่ในวงศ์ (Family) Cytophagaceae แล้วเปลี่ยนชื่อเป็น *Cytophaga Columnaris* หลังจากที่แยกปลาที่เป็นโรคแบคทีเรียที่รูปร่างคล้าย *Chondrococcus columnaris* แต่ไม่สร้างไมโครซีส (microcyst) Bernardet and Grimont (1989) ได้จัดกลุ่มแบคทีเรียใหม่แล้วให้อยู่สกุล (Genus) *Flexibacter* พร้อมทั้งเปลี่ยนชื่อเป็น *Flexibacter columnaris* ตั้งแต่ปี 1996 จนถึงปัจจุบันมีการเปลี่ยนชื่อแบคทีเรียนี้เป็น *Flavobacterium columnare* โดยใช้ข้อมูลทาง DNA-rRNA hybridization และองค์ประกอบของโปรตีนและกรดไขมัน (Bernardet *et al*.,1996)

ลักษณะสัณฐานและคุณสมบัติทางเคมี

โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารจำเพาะ Cytophaga Agar มีลักษณะแบนและแผ่กระจายเป็นร่างแห ลักษณะสัณฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (ตารางที่ 1)

การระบาด

พบเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดทั่วโลก โรคนี้ระบาดหนักในปลาที่อาศัยในเขตร้อน (Decostere *et al*., 1998; Morley and Lewis, 2010) โดยพบการติดเชื้อทั้งในปลาธรรมชาติและปลาที่เพาะเลี้ยง เช่น ปลา black mollies (*Poecilia sphenops*) (Decostere *et al*., 1998) ปลากดหลวง (Olivares-Fuster *et al*., 2011; Bullard *et al*.,2011; Darwish *et al*., 2012b; Thomas-Jinu and Goodwin, 2004) ปลาไหล (Kuo *et al*., 1981) ปลา golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) (Sink *et al*., 2007) ปลาคาร์พ (Tripathi *et al*., 2005) ปลาเทราท์ (Kunttu *et al*., 2011; Suomalainen *et al*., 2006; Suomalaien *et al* ,. 2005c; Kunttu *et al*., 2009), ปลานิล (Kuo *et al*., 1981) ปลาม้าลาย (Olivares-Fuster *et al*., 2011; Bullard *et al*., 2011) ปลากระโห้อินเดีย (*Catla catla) (*Sarker *et al*., 2017) ปลาซันฟิช (*sunfish*, *Lepomis* spp.) (Loch and Faisal, 2015) ปลากะพงเหลือง (*Yellow perch*, *Perca flavescens*) (Loch and Faisal, 2015)

Table 1 Morphological and biochemical characteristics of *F. columnare*

Characteristic test	Results	Characteristic test	Results
Colony pigment on Shieh medium	yellow	Acid production from:	
Colony shape on Cytophaga agar	Flat,	Glucose (GLU)	–
	spreading	Mannitol (MAN)	–
	Rhizoidal	Inositol (INO)	–
	edges	Lactose (LAC)	–
Grams' stain	–	Sorbitol (SOR)	–
Morphology	Thin, long rods	Rhamnose (RHA)	–
Gliding Motility	+	Sucrose (SAC)	–
Oxidation-Fermentation (O/F)	– / –	Melibiose (MEL)	–
Sensitivity to O/129	+	Mannose	–
Production of:		Arabinose (ARA)	–
Cytochrome c oxidase	+	Amygdalin (AMY)	–
Catalase	+	Degradation of:	
Flexirubin-type pigment	+	Casein	+
Nitrate reduction	+	Gelatine (GEL)	+
Congo red adsorption	+	Starch	–
Beta-galactosidase (ONPG)	–	Growth on:	
Arginine dihydrolase (ADH)	–	Shieh agar (Tobramycin)	+
Lysine decarboxylase (LDC)	–	Shieh agar (Polymyxin and neomycin)	+
Ornithine decarboxylase (ODC)	–	Trypticase soy agar	–
Urease production (URE)	–	Shotts_Waltman medium	–
Tryptophane deaminase (TDA)	–	0% NaCl	+
Indole (IND)	–	0.5% NaCl	+
Voges Proskauer reaction (VP)	–	1% NaCl	–
H_2S production	+	2% NaCl	–

(+): positive reaction; (-): negative reaction

(adapted from Bernardet and Bowman, 2006; Declercq *et al*., 2013a; Srisapoome and Nakharuthai, 2015; Sarker *et al*., 2017)

รวมทั้งมีการติดเชื้อในกบ เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สร้างความเสียหายให้กับการเลี้ยงปลากดหลวง (*Ictalurus punctatus*) ในประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นอันดับสองรองจากการติดเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* (Hawke and Thune, 1992; Wagner *et al*., 2002) โดยสร้างความเสียหายปีละ 30 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Shoemaker *et al*., 2011) สำหรับในประเทศไทยโรคเหงือกเน่า พบได้ตลอดปี แต่จะพบได้มากในช่วงมีอากาศแปรปรวน ในปี 2557 พบระบาดในปลานิลทั้งที่เลี้ยงในบ่อดินและในกระชัง ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม ปภาศิริ (2538) กล่าวว่า มักพบปัญหาโรคเหงือกเน่าช่วงที่มีการขนย้ายปลาในช่วงที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ปลาที่รอดตายจากการระบาดของโรคจะเป็นพาหะนำโรค (Suomalainen *et al*., 2005b) อย่างไรก็ตามเกษตรกรบางราย แจ้งว่า ลูกพันธุ์ปลานิลที่รอดตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ระหว่างการอนุบาลเมื่อนำมาเลี้ยงจะมีอัตรารอดที่สูง Fujihara and Nakatani

(1971) รายงานว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่รอดตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถปล่อยเชื้อออกสู่แหล่งน้ำได้ถึง $5x10^3$ colony forming units/mL/h โดยเหงือกปลาที่เป็นโรคนี้เป็นแหล่งปล่อยเชื้อมากที่สุด ในขณะที่ปลาที่ตายจากโรคนี้สามารถแพร่เชื้อโรคได้มากกว่าปลาที่เป็นโรคและยังมีชีวิต (Kunttu *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการแยกเอาปลาที่เป็นโรคและปลาตายออกจากแหล่งเลี้ยงโดยเร็วที่สุด

เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถอยู่รอดในน้ำเป็นเวลานานมากน้อยขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางเคมีของน้ำ Fijan (1969) กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถอยู่รอดได้นาน 16 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในน้ำที่สารอินทรีย์เยอะและเป็นด่างสูง (Hard water) ในขณะที่น้ำอ่อน (Soft water) ซึ่งมี $CaCO_3$ ปริมาณ 10 mg/L และมีสารอินทรีย์ต่ำ ไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียนี้ Straus *et al.* (2015) กล่าวว่า เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จะมีความสามารถในการยึดเกาะเหงือกได้น้อยลงในน้ำอ่อน Chowdhury and Wakabayashi (1990) กล่าวว่า แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และโซเดียมไอออน มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในน้ำ แบคทีเรียสามารถอยู่รอดในน้ำจากทะเลสาบในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาอย่างน้อย 5 เดือน (Kunttu *et al.*, 2012) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถอยู่รอดในโคลนที่ฆ่าเชื้อแล้วได้ (Bullock *et al.*,1986) เพราะโคลนที่ฆ่าเชื้อแล้วยังคงมีสารอาหารเพียงพอต่อเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งสามารถอยู่รอดได้นานกว่าในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การรอดตายในโคลนที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 5 องศาเซลเซียส (Declercq *et al.*, 2013a) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถปรับเปลี่ยนความรุนแรงให้มีความรุนแรงน้อยลงได้ เพื่อประหยัดพลังงานเมื่ออยู่นอกโฮสต์หรือตัวสัตว์น้ำ (Kunttu *et al.*, 2012) สายพันธุ์และความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและคุณภาพน้ำของฟาร์มเลี้ยงปลา (Kunttu *et al.*, 2012; Pulkkinen *et al.*,2010)

อาการ รอยโรค และการเกิดโรค

อาการ รอยโรค

เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง มักจะส่งผลเสียต่อเหงือก ผิวหนังและครีบสัตว์น้ำ อาการของโรคคอลัมนาริส ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย Rucker *et al.* (1954) กล่าวว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำ (low virulence) จะติดเชื้อได้ช้าและจะสร้างความเสียหายต่อเนื้อเยื่อก่อนจะทำให้ปลาตาย ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูง (high virulence) ทำให้เกิดการติดเชื้ออย่างรวดเร็ว และสร้างความเสียหายในปลาแซลมอน (*Salmo salar*) ภายใน 12 – 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยปลาจะไม่แสดงอาการ แต่เนื้อเยื่อจะถูกทำลาย นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับอายุของปลา โดยปลาวัยอ่อนมักจะเกิดโรคแบบเฉียบพลันทำให้ปลาตายอย่างรวดเร็ว ส่วนปลาโตเต็มวัย อาจทำให้ปลาเป็นโรคทั้งแบบเฉียบพลัน (acute) และเรื้อรัง (subacute or chronic) ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายโดยเฉพาะบริเวณเหงือกที่ถูกทำลาย (Bernardet and Bowman, 2006; Decostere, 2001)

อาการแบบเรื้อรัง จะใช้ระยะเวลานานก่อนที่เหงือกปลาจะเน่าและเป็นแผลตามลำตัว (Bernardet and Bowman, 2006; Decostere, 2001) อาการเริ่มจากเป็นแผล สีลำตัวซีดจางลง ตกเลือดอย่างเห็นได้ชัด ครีบหลังกร่อน โดยเริ่มกร่อนจากโคนครีบไปยังปลายครีบ แผลเริ่มลามจากครีบหลัง เรียกว่า “saddle-back” โรคนี้จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “saddle-back disease” (Bernardet and Bowman, 2006) ปลาบางตัวมีอาการครีบเน่า (Finrot) (Decostere and Haesebrouck,

1999) บางตัวเกิดอาการอักเสบในเยื่อบุช่องปาก ทำให้ปากเปื่อย จึงเรียกว่า “cotton wool disease” หรือ “mouth fungus” (Bernardet and Bowman, 2006) โดยแผลที่ปากทำให้ปลาตายมากกว่าเป็นแผลที่ผิวหนัง เพราะปลาไม่อยากกินอาหาร และตายจากการขาดอาหาร การติดเชื้อนี้สามารถเกิดร่วมกับปรสิต เชื้อรา หรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Ferguson *et al.*, 2006) แต่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันว่า ปลาที่เป็นโรคเกิดจากการติดเชื้อเห็บระฆัง (*Trichodina* spp.) ทำให้เหงือกกร่อนแล้วเชื้อ *Flavobacterium columnare* เข้าแทรก หรือปลาติดเชื้อแบคทีเรียนี้ก่อนแล้วอ่อนแอ ทำให้เห็บระฆังเข้าเกาะ

Declercq *et al.* (2013b) กล่าวว่า ผิวหนังและเหงือกจะต้องเกิดการถลอกหรือเป็นแผลก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย ในวันแรกหลังจากที่ปลาเกิดการติดเชื้อ เกิดการขยายตัวของเซลล์เหงือกที่ผิดปกติและมีเมือกเพิ่มขึ้น (Foscarini, 1989) การขยายตัวของซี่เหงือกไปติดกับซี่เหงือกที่อยู่ติดกัน เกิดการอุดตันทั่วซี่เหงือก เนื่องจากการสะสมของเลือด ทำให้ระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลว เหงือกบวมและเกิดการอักเสบอย่างเห็นได้ชัด (Ferguson *et al.*, 2006; Decostere *et al.*, 1997) โรคคอลัมนาริสทำให้ปลาเกิดแผลเปื่อยลึกลงไปในชั้นผิวหนังและกล้ามเนื้อ การรวมตัวของเชื้อแบคทีเรียบนผิวหนังและเหงือกบริเวณบาดแผลมีลักษณะคล้ายกองฟาง (hay-stack-like) อัตราการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 10 – 100%

การเกิดโรค

จากการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge) ในปลาคาร์พ พบว่า ปลาที่ติดเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงของเลือด โดยปริมาตรเซลล์อัดแน่น (packed cell volume, PCV) ความเข้มข้นของฮีโมโกบิน ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงและปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลง เกิดภาวะโซเดียมในเลือดต่ำ (Hyponatremia) ภาวะมีคลอไรด์ในเลือดต่ำ (Hypochloremia) และภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) ระดับแคลเซียมและแมกนีเซียมลดลงเพียงเล็กน้อย ค่า Alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) และ creatine kinase (CK) หลั่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Tripathi *et al.*, 2005) การศึกษาทางโลหิตวิทยา ของ Rehulka and Minarik (2007) ในปลาเทราท์ (brook trout) ที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แบบเฉียบพลัน ซึ่งระบาดในธรรมชาติ พบว่า ปลามีอาการโรคโลหิตจาง (anemia) ระดับโปรตีนในเลือดลดลง ความเข้มข้นของ ALP ลดลง และภาวะน้ำตาลสูง

การวินิจฉัยโรค

สังเกตอาการ รอยโรค

การสุ่มตรวจโรคปลาเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคซึ่งจะนำไปสู่ความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลา โดยเราสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จากแผลภายนอกของปลาป่วย เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารอาหารปริมาณน้อย ๆ แต่ไม่เจริญบนอาหาร trypticase soy agar (TSA), brain heart infusion (BHI), nutrient agar หรือ Marine 2216 agar (Bernardet and Bowman, 2006) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ถูกเพาะบนอาหาร Cytophaga agar สำเร็จเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1944 ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารน้อย ตั้งแต่นั้นมาได้มีการปรับสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดรวมทั้ง Shieh (Shieh, 1980) และ TYES (Holt, 1987) ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แต่เชื้อแบคทีเรียนี้จะไม่เจริญบนสูตรอาหารที่มี NaCl มากกว่า 5% และมี pH ต่ำกว่า 6 (Bernardet and Bowman, 2006) และเจริญที่อุณหภูมิ 15 – 37 องศาเซลเซียส (Triyanto, 1999; Decostere *et al.*, 1998) โดยเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส (Decostere *et al.*,

1998) กลูโคสไม่ได้ช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แบคทีเรียเจริญได้ดีเมื่อเขย่าด้วยเครื่อง shaker (Olivares-Fuster *et al.*, 2011; Bullard *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2012) ต่อมามีการพัฒนาอาหารจำเพาะ (selective media) โดยอาศัยความแตกต่างของการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เช่น polymyxin และ neomycin มาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียนี้ ออกจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (Bullock *et al.*, 1986; Bernardet and Grimont, 1989) แต่ขัดแย้งกับ Gao *et al.* (2006) ที่กล่าวว่าแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีส่วนผสมของ neomycin ต่อมา Decostere *et al.* (1998) ได้เติม tobramycin 1 µg/mL ในอาหาร modified Shieh medium ทำให้เป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ยิ่งขึ้น

การตรวจทางจุลชีววิทยา

ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *F. columnare* เจริญบนอาหารวุ้น (solid media) 2 แบบ คือโคโลนีเรียบ (smooth colony) และเจริญเป็นร่างแห (rhizoid colony) (Bader, 2005) อย่างไรก็ตาม Kunttu *et al.* (2011) พบการสร้างโคโลนีแบบขรุขระ (rough colony) สายพันธุ์ที่เจริญเป็นร่างแหมีความรุนแรงและสามารถยึดเกาะปานกลาง ส่วนที่สร้างโคโลนีขรุขระไม่มีความรุนแรงแต่มีสามารถยึดเกาะสูง สำหรับแบคทีเรียโคโลนีเรียบไม่มีความรุนแรงและการยึดเกาะไม่ดี (Kunttu *et al.*, 2011) โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* บางครั้งสามารถยึดเกาะแน่นบนอาหารวุ้น ในอาหารเหลว (broth) มีสีเหลือง เซลล์เป็นก้อนเส้นใยของเซลล์แบคทีเรีย สามารถสร้างแหวนหนาที่พื้นผิวขอบแก้ว (Decostere *et al.*, 1998; Bernardet, 1989) ความสามารถในการยึดเกาะจะหายไป เมื่อต่อเชื้อ (subculture) หลายครั้ง ส่วนโคโลนีมีสีเหลือง เกิดจาก flexirubin pigments (Bernardet and Bowman, 2006)

การตรวจทางอณูชีววิทยา

สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ได้โดยการวิเคราะห์โปรตีน (Bernardet *et al.*, 1996) การใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ *Hae* III ตัดแล้วแบ่งเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ได้เป็น 3 จีโนโมวา (genomovar) ตามความรุนแรงของเชื้อ (Triyanto, 1999) เทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP) มีความละเอียดกว่า RFLP หากต้องการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (Olivares-Fuster *et al.*, 2007) ส่วน Polymerase chain reaction (PCR) ได้รับความสนใจ เพื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ขึ้นอยู่กับการเลือกเพิ่มจำนวนยีน 16S ribosomal RNA โดยใช้ species-specific primers (Darwish *et al.*, 2004; Welker *et al.*, 2005) เทคนิคนี้จะช่วยให้จำแนกสิ่งมีชีวิตได้ในไม่กี่ชั่วโมง และลดความยุ่งยากในการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี ซึ่งบางครั้งอาจจะไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจน (Darwish *et al.*, 2004)

การตรวจทางซีรั่มวิทยา

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อนี้ สามารถใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (Shoemaker et al., 2003b) และวิธี fluorescent antibody test (Panangala *et al.*, 2006; Speare *et al.*, 1995) ทั้งสองได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพและรวดเร็วสำหรับการวินิจฉัยโรคคอลัมนาริส เทคนิค A loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) สำหรับการตรวจสอบอย่างรวดเร็วของ *F. columnare* จากการติดเชื้อของอวัยวะ (เหงือก ผิวหนัง หัว และไต) ในปลากดหลวง มีรายงานว่า PCR ช่วยตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (Darwish *et al.*, 2004; Welker *et al.*, 2005) ต่อมา Panangala *et al.* (2006) ได้พัฒนาเทคนิค TaqMan-based real-time PCR เป้าหมาย 113 bp nucleotide ตำแหน่ง chondroitin

AC lyase ของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* เทคนิค PCR นี้ มีความเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ ยิ่งไปกว่านั้น เทคนิค Real-time PCR-based มีข้อได้เปรียบอย่างเห็นได้ชัดมากกว่าเทคนิค PCR แบบเดิม เพราะไม่จำเป็นต้องทำ gel electrophoresis ดังนั้นจึงลดค่าใช้จ่าย เวลาและแรงงาน เทคนิค Length heterogeneity PCR (LH-PCR) เป็นการเปรียบเทียบความยาวที่แตกต่างกันของยีน 16S rDNA PCR products ระหว่างกลุ่มของแบคทีเรีย (Suzuki *et al.*, 1998) โดย LH-PCR ได้พิสูจน์แล้วว่ายังมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในเนื้อเยื่อของปลา (Suomalainen *et al.*, 2005a) อันที่จริงโรคนี้สามารถสังเกตได้จากอาการของสัตว์น้ำที่เป็นโรคและการตรวจลักษณะของแบคทีเรียจากตัวอย่างสดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็เพียงพอ แต่สาเหตุเหนี่ยวนำอะไรที่ทำให้เชื้อนี้สร้างความเสียหายให้กับสัตว์น้ำเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาแนวทางในการป้องกันโรค

ผลของสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อ

ผลกระทบของภาวะโลกร้อน ทำให้ปรสิตและเชื้อแบคทีเรียในปลาแต่ละชนิดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น (Karvonen *et al.*, 2010) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* อาจจะได้ประโยชน์จากภาวะโลกร้อนนี้ จึงทำให้โรคคอลัมนาริสระบาดมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Pulkkinen *et al.*, 2010; Suomalainen *et al.*, 2005c) ในปี 1975 Holt และคณะทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในปลาเทราท์ (steelhead trout, *Salmo gairdneri*) และปลาแซลมอน (*O. kisutch*) ที่อุณหภูมิน้ำ 12 – 20 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ โดยการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* กับเหงือกของสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงจะมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (Decostere *et al.*,1999b) และ การทำงานของ chondroitin AC lyase activity ในเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ (Suomalainen *et al.*, 2006) Suomalaien *et al.* (2005c) กล่าวว่า การเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราท์ ที่อุณหภูมิสูง (23 องศาเซลเซียส) ทำให้ปลาเป็นโรคคอลัมนาริสและตาย ในขณะที่การเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ (18 องศาเซลเซียส) ไม่ทำให้ปลาตาย แต่ยังคงทำให้ปลาเป็นโรคคอลัมนาริส

คุณภาพน้ำเป็นปัจจัยการเกิดโรคคอลัมนาริส โดยโรคคอลัมนาริสมักจะเกิดหลังที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและคุณสมบัติของน้ำอย่างเฉียบพลันหลังฝนตก Decostere *et al.* (1999a) พบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สูงขึ้นบริเวณเหงือก เมื่อมีปริมาณสารอินทรีย์และสารไนไตรต์ในน้ำสูง เนื่องจากสารอินทรีย์มีสารอาหารสำหรับแบคทีเรียและเอนไซม์สำหรับย่อยเนื้อเยื่อโฮสต์ Bandilla *et al.* (2006) กล่าวว่า การติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* พร้อมกับเห็บปลา (*Argulus coregoni*) ซึ่งเป็นปรสิตภายนอกกับเชื้อในปลาเรนโบว์เทราท์ จะแสดงอาการของโรคเร็วกว่าและอัตราการตายสูงกว่า เมื่อเทียบกับการติดเชื้อชนิดเดียว Decostere *et al.* (1999a) รายงานว่า ปลาที่เลี้ยงในแหล่งน้ำนิ่งจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียตัวนี้มากกว่าปลาในแหล่งน้ำไหล โดยเขาตั้งสมมุติฐานว่าแบคทีเรียจะเข้ายึดเกาะเหงือกและผิวตัวปลาได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ ความเครียดของปลาที่เกิดจากความหนาแน่นและปริมาณแอมโมเนียในน้ำสูงจะเป็นสาเหตุเหนี่ยวนำของการเกิดโรค (Decostere *et al.*, 1998)

การป้องกันและรักษาโรค

การป้องกันโรคให้ผลดีกว่าการรักษา เกษตรกรจึงควรเลือกลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพ ระมัดระวังในการลากอวน คัดและขนส่งลูกพันธุ์ไปยังบ่อเลี้ยง Cunningham *et al.* (2012) กล่าวว่า วิธีการผลิต (ความลึกของบ่อ อัตราการปล่อย การให้อาหารและปริมาณแอมโมเนีย) มีความสัมพันธ์กับการระบาดของโรคคอลัมนาริส

Conrad *et al.*(1975) กล่าวว่า การบำบัดน้ำด้วยโอโซน สามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* หรือการแช่อุปกรณ์ในน้ำที่เป็นกรดและที่มีความเค็ม สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ปนเปื้อนได้ (Suomalainen *et al.*, 2005b) Suomalainen *et al.* (2005c) รายงานว่า การลดความหนาแน่นของปลาที่เลี้ยง สามารถป้องกันโรคคอลัมนาริสได้ โดยความหนาแน่นในการเลี้ยงที่ลดลง สามารถลดการติดเชื้อปรสิตภายนอกซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาอ่อนแอและติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ปริมาณไนไตรท์และสารอินทรีย์ที่สูงสามารถกระตุ้นการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (Decostere *et al.*, 1999a) จึงจำเป็นต้องควบคุมคุณสมบัติของน้ำภายในบ่อและมีการบำบัดน้ำก่อนปล่อยลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ

การป้องกัน

ในการทดลองความต้านทานโรคของปลากดหลวงและปลาทองด้วยการแช่ (immersion challenge) กับเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* พบว่า อัตราการตายของปลาลดลง เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น และไม่มีการตายเกิดขึ้น เมื่อมีความเค็มระหว่าง 3 – 9% (Altinok and Grizzle, 2001) Decostere *et al.* (1998) รายงานว่า เชื้อ *F. columnare* ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็ม 1% ซึ่งนำไปปรับเพื่อป้องกันโรคคอลัมนาริส โดย Davis (1922) กล่าวว่า การนำปลาไปแช่ในคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 37 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที หรือเติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในบ่อเลี้ยง การแช่ปลา 1 ครั้ง ในคอปเปอร์ซัลเฟต 1:2000 เป็นเวลา 1 – 2 นาที สามารถป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริสได้ Darwish *et al.* (2009) รายงานว่า การใช้ด่างทับทิมปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถป้องกันโรคได้ การรักษาป้องกันโรคในปลากดหลวง โดยใช้ chloramine-T ช่วยลดการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จากร้อยละ 84 – 100 เหลือร้อยละ 6 – 14 (Riley, 2000) Thomas-Jinu and Goodwin (2004) ได้ใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ป้องกันโรค และลดการตายของปลากดหลวง แต่จากการศึกษาของ Declercq et al. (2013a) ชี้ว่า แบคทีเรีย *F. columnare* ร้อยละ 11 ดื้อยา oxytetracycline และร้อยละ 10 ดื้อยา enrofloxacin

การให้วัคซีนเป็นวิธีการป้องกันโรคคอลัมนาริส ซึ่งมีการใช้ในสัตว์น้ำเศรษฐกิจบางชนิด แต่ยังติดปัญหาเรื่องต้นทุนและผลที่ได้ยังไม่แน่นอน โดยการพัฒนาวัคซีนระยะแรกจะเตรียมมาจากเชื้อแบคทีเรียเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน (formalin killed) หรือที่ได้ทำให้อ่อนกำลังลง และมักเรียกชื่อว่า แบคทีริน (bacterin) การสร้างภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดวัคซีนเชื้อตายผสมกับแอนจูแวนท์ (formalin-killed sonicated cells in Freund's complete adjuvant) เข้าช่องท้อง สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ใน 2 สัปดาห์ โดยแอนติบอดีเพิ่มเป็น 3 เท่า ใน 10 สัปดาห์ สำหรับการฉีดครั้งที่ 2 (Grabowski *et al.*, 2004) Bader *et al.* (1997) กล่าวว่า ฟอร์มาลินจะทำลายแอนติเจนที่มีความสำคัญทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลง ต่อมามีการใช้ยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) เพื่อทำให้เชื้ออ่อนกำลังแล้วนำมาพัฒนาเป็นวัคซีน (Zhang *et al.*, 2006) มีการขึ้นทะเบียนวัคซีนเชื้ออ่อนแรงแต่ยังมีชีวิตอยู่แบบแช่ (attenuated immersion vaccine) เพื่อใช้ป้องกันโรคปลากดหลวงที่สหรัฐอเมริกา (Shoemaker *et al.*, 2011) ส่วนการใช้วัคซีนป้องกันโรคในปลานิลของไทย มีการใช้น้อยมาก เนื่องจากยังไม่เห็นผลที่แตกต่างชัดเจนระหว่างปลานิลที่ให้วัคซีนกับที่ไม่ได้ให้วัคซีน ความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียทำให้ยากในการพัฒนาวัคซีนเพื่อนำไปใช้ครอบคลุมทุกพื้นที่การเลี้ยง Shoemaker *et al.* (2007) ทดลองให้วัคซีนป้องกันโรคคอลัมนาริสพร้อมกับโรคเอ็ดเวิร์ด (Edwardsiellosis) ในระยะตั้งแต่ไข่ใกล้ฟักเป็นตัว (eyed-egg stage) โดยการแช่ ช่วยป้องกันโรคได้ มีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำวัยอ่อนและน่าจะเป็นวิธีการที่จะนำไปใช้ได้จริงในทางปฏิบัติ ไม่ต้องจับปลา

ฉีดแต่ละตัว โปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์(outer membrane protein, OMP) จากเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ช่วยป้องกันโรคในปลากดอเมริกันและปลา Bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นวัคซีน (Luo *et al.*, 2016)

เหงือก เกล็ดและผิวหนังปลาจะเป็นปราการด่านแรกในการป้องกันโรค การให้อาหารเสริมภูมิคุ้มกันเป็นอีกทางหนึ่งของการป้องกันโรค มีการใช้พรีไบโอติกและโปรไบโอติกในการป้องกันโรคสัตว์น้ำหลายชนิด แต่งานวิจัยด้านการป้องกันโรคคอลัมนาริสมีน้อย Boutin *et al.*(2012) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียไม่ก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ จากผิวหนังปลาเทราท์ (*Salvelinus fontinalis*) พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ ส่วน Zhao *et al.* (2015) ทดลองใช้อาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์และผลผลิตที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อราร้อยละ 5-10 ให้ปลากดหลวง นาน 9 สัปดาห์ พบว่า ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้น มีการใช้บีตา-กลูแคน (β-glucan) และบีตา-ไฮดรอกซิล-บีตา-เมททิลบูไทเลท (β-hydroxy-β-methylbutyrate) ผสมอาหารให้ปลาเทร้าต์ พบว่าช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม ไลโซไซม์ คอมพลีเมนต์) แต่ไม่ได้เพิ่มอัตรารอดหลังทดลองการต้านทานเชื้อ *F. columnare* (Challenge) (Kunttu *et al.*, 2009)

การรักษา

การรักษาโรคคอลัมนาริสด้วยสารเคมีและยาปฏิชีวนะให้ผลที่แตกต่างกัน การรักษาภายนอกใช้ได้ผลในระยะเริ่มเป็นโรคและมีติดเชื้อภายนอกตัวปลา (Bullock *et al.*, 1986) ยาที่มีประสิทธิภาพในการแช่ คือ oxolinic acid (Soltani *et al.*, 1995) ส่วนยาปฏิชีวนะผสมอาหาร ที่ใช้ คือ oxytetracycline ผสมอาหารให้ปลากินเป็นเวลา 10 วัน ในช่วงแรกของการเป็นโรค (Bullock *et al.*, 1986) แต่มีรายงานว่า การใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ผสมอาหารไม่ประสบผลสำเร็จ (Koski *et al.*, 1993) อาจเนื่องจากปลาที่ติดเชื้อมีอาการรุนแรงจนไม่กินอาหาร ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamides เช่น sulfamerazine และ sulfamethazine สามารถนำมาใช้ด้วยการให้กิน แต่จะมีประสิทธิภาพน้อยกว่ายาชนิดอื่น (Bullock *et al.*, 1986) Gaunt *et al.*(2010) แนะนำให้ใช้ florfenicol ผสมอาหารให้ปลากดหลวงกิน 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม นาน 10 วัน เมื่อปลาเป็นโรคคอลัมนาริส Darwish *et al.*(2012a) ใช้ florfenicol ใช้ป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ *F. columnare* ในปลา Sunshine bass (hybrid striped bass, *Morone chrysops* female × *Morone saxatilis* male) การใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณมากเกินไป จะทำให้เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ดื้อยาปฏิชีวนะ (Shoemaker *et al.*, 2011) รวมทั้งอาจจะทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้ในหลังรับประทานปลา (Serrano, 2005) เกิดความเสี่ยงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมลักษณะดื้อยาไปสู่แบคทีเรียในมนุษย์และสิ่งแวดล้อม Thomas-Jinu and Goodwin (2004) ใช้สารกำจัดวัชพืชไดควอท (Diquat) ลดการตายของปลากดหลวง มีการใช้คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate) (Davis,1922) และด่างทับทิม (potassium permanganate) (Rogers, 1971) ในการรักษาและป้องกันโรคคอลัมนาริสของปลาที่เลี้ยงในบ่อ Xu *et al.* (2015) รายงานว่า การใช้ฟอร์มาลินฆ่าเชื้อเห็บระฆังช่วยลดปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* อย่างไรก็ตามสารอินทรีย์ในน้ำมีผลต่อประสิทธิภาพของฟอร์มาลินและด่างทับทิม มีการใช้แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) ในควบคุมเชื้อแบคทีเรียเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการป้องกันโรคระบาดในสัตว์น้ำ Laanto *et al.* (2011) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. phage lysates สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Prasad *et al.* (2011) ได้ใช้ *F. columnare* phage FCP1 รักษาโรคคอลัมนาริสในปลาดุกด้าน (*Claries batrachus*) ทำให้รอยโรคหายไป ซึ่งวิธีการนี้อาจจะเป็นวิธีการในการ

ลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตามควรจะคัดกรองเฟจที่ใช้ว่า ไม่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะหรือยีนสร้างสารพิษ

สรุป

โรคคอลัมนาริสเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อม บนผิวและเนื้อเยื่อเหงือกปลา แต่ปัจจัยแวดล้อมและความแตกต่างของพันธุกรรมสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* มีผลต่อความรุนแรงของการเกิดโรค ความยุ่งยากในการเตรียมเชื้อและความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในแต่ละงานวิจัยทำให้ยากที่จะนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรค การเตรียมบ่อ การจัดหาลูกพันธุ์ที่ดี ปรับความหนาแน่นของปลาและควบคุมคุณภาพน้ำเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการควบคุมโรคคอลัมนาริส นอกจากนั้น วัคซีน ยา สารเคมี พรีไบโอติกและโปรไบโอติกมีส่วนช่วยในการป้องกันและควบคุมโรค

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

Altinok, I., Grizzle, J., 2001. Effects of low salinities on *Flavobacterium columnare* infection of euryhaline and freshwater stenohaline fish. J Fish Dis. 24, 361-367.

Arias, C.R., Cai, W., Peatman, E., Bullard, S.A., 2012. Catfish hybrid *Ictalurus punctatus*× *I. furcatus* exhibits higher resistance to columnaris disease than the parental species. Dis. Aquat. Org. 100, 77-81.

Bader, J., Klesius, P.H., Vinitnantharat, S., 1997. Comparison of whole-cell antigens of pressure- and formalin-killed *Flexibacter columnaris* from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Am J Veter Res. 58, 985 - 958.

Bader, J., Shoemaker, C., Klesius, P., 2005. Production, characterization and evaluation of virulence of an adhesion defective mutant of *Flavobacterium columnare* produced by β-lactam selection. Lett. Appl. Microbiol. 40, 123-127.

Bandilla, M., Valtonen, E., Suomalainen, L.-R., Aphalo, P., Hakalahti, T., 2006. A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. Int. J. Parasitol. 36, 987-991.

Bernardet, J.F., Bowman, J.P., 2006. The genus Flavobacterium, In:The prokaryotes. Springer, 481-531.

Bernardet, J.F., Grimont, P.A., 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 39, 346-354.

Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., 1996. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus Flavobacterium, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of Flavobacterium hydatis nom. nov.(basonym, Cytophaga aquatilis Strohl and Tait 1978). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 46, 128-148.

Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., Derôme, N., 2012. Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. Vet. Microbiol. 155, 355-361.

Bullard, S.A., McElwain, A., Arias, C.R., 2011. Scanning electron microscopy of "saddleback" lesions associated with experimental infections of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Siluriformes: Ictaluridae), and zebrafish, *Danio rerio* (Cypriniformes: Cyprinidae). J World Aquac Soc. 42, 906-913.

Bullock, G., Hsu, T.C., Shotts Jr, E., 1986. Columnaris disease of fishes. US Fish & Wildlife Publications, Lincoln.

Chowdhury, M., Wakabayashi, H., 1990. Survival of four major bacterial fish pathogens in different types of experimental water [in Japan]. Banglad J Microbiol. (Bangladesh).

Conrad, J., Holt, R., Kreps, T., 1975. Ozone disinfection of flowing water. The Progressive Fish-Culturist 37, 134-136.

Cunningham, F.L., Jack, S.W., Hardin, D., Wills, R.W., 2012. Pond-Level risk factors associated with columnaris disease on Mississippi commercial catfish farms. J. Aquat. Anim. Health. 24, 178-184.

Darwish, A., Bebak, J., Schrader, K., 2012a., Assessment of Aquaflor®, copper sulphate and potassium permanganate for control of *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* infection in sunshine bass, *Morone chrysops* female× *Morone saxatilis* male. J Fish Dis. 35, 637-647.

Darwish, A.M., Mitchell, A., Straus, D.L., 2012b. Evaluation of a 4-h static copper sulphate treatment against experimental infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquac. Res. 43, 688-695.

Darwish, A., Mitchell, A., Straus, D., 2009. Evaluation of potassium permanganate against an experimental subacute infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J Fish Dis. 32, 193-199.

Darwish, A.M., Ismaiel, A.A., Newton, J.C., Tang, J., 2004. Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. Mol. Cell. Probes. 18, 421-427.

Davis, H.S., 1922. A new bacterial disease of fresh-water fishes. By H.S. Davis., United States Bureau of fisheries.Doc. 924. Government Printing Office., Washington.

Declercq, A., Boyen, F., den Broeck, W., Bossier, P., Karsi, A., Haesebrouck, F., Decostere, A., 2013a. Antimicrobial susceptibility pattern of *Flavobacterium columnare* isolates collected worldwide from 17 fish species. J Fish Dis. 36, 45-55.

Declercq, A., Haesebrouck, F., Van den Broeck, W., Bossier, P., Decostere, A., 2013b. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. Vet. Res. 44, 27 - 43.

Decostere, A., 2001. *Flavobacterium columnare* infections in fish: the agent and its adhesion to the gill tissue. Verhandelingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België 64, 421-430.

Decostere, A., Haesebrouck, F., 1999. Outbreak of columnaris disease in tronical aquarium fish. Vet. Rec. 144, 23-24.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Charlier, G., Ducatelle, R., 1999a. The association of *Flavobacterium columnare* strains of high and low virulence with gill tissue of black mollies (*Poecilia sphenops*). Vet. Microbiol. 67, 287-298.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Van Driessche, E., Charlier, G., Ducatelle, R., 1999b. Characterization of the adhesion of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter*

columnaris) to gill tissue. J Fish Dis. 22, 465-474.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L., 1997. Development of a medium for the selective isolation of *Flavobacterium columnare* from diseased fish. J Clin Microbiol 35, 322-324.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L., 1998. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. Vet. Microbiol. 62, 35-45.

Ferguson, H., Bjerkas, E., Evensen, O., 2006. Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissue Responses in Teleosts, and Their Responses in Disease, 2nd ed. Scotian Press, London.191-214.

Fijan, N.N., 1969. Antibiotic additives for the isolation of *Chondrococcus columnaris* from fish. Appl. Microbiol. 17, 333.

Foscarini, R., 1989. Induction and development of bacterial gill disease in the eel (*Anguilla japonica*) experimentally infected with *Flexibacter columnaris*: pathological changes in the gill vascular structure and in cardiac performance. Aquac. 78, 1-20.

Fujihara, M., Nakatani, R., 1971. Antibody production and immune responses of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*. Journal of the Fisheries Board of Canada. 28,1253-1258.

Gao, D.X., Gaunt, P.S., 2016. Development of new G media for culture of *Flavobacterium columnare* and comparison with other media. Aquac. 463, 113 – 122

Garnjobst, L., 1945. *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: a myxobacterium pathogenic to fish. J. Bacteriol. 49, 113.

Gaunt, P.S., Gao, D., Sun, F., Endris, R., 2010. Efficacy of florfenicol for control of mortality caused by *Flavobacterium columnare* infection in channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 22, 115-122.

Grabowski, L., LaPatra, S., Cain, K., 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. J Fish Dis. 27, 573-581.

Hawke, J.P., Thune, R.L., 1992. Systemic isolation and antimicrobial susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 4, 109-113.

Holt, R., Sanders, J., Zinn, J., Fryer, J., Pilcher, K., 1975. Relation of water temperature to *Flexibacter columnaris* infection in steelhead trout (*Salmo gairdneri*), coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*O. tshawytscha*) salmon. Journal of the Fisheries Board of Canada 32, 1553-1559.

Holt, R.A., 1987. Cytophaga psychrophila, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. Dissertation Abstracts International, B (Sciences and Engineering). 49, 605.

Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J., Valtonen, E.T., 2010. Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: climate change increases the risk of some, but not all, diseases. Int. J. Parasitol. 40, 1483-1488.

Koski P, Hirvelä-Koski V, Bernardet JF. 1993. Flexibacter columnaris infection in arctic char (*Salvelinus alpinus* (L.)). First isolation in Finland. Bull Eur Ass Fish Pathol. 31, 66–69.

Kou, S., Chung, H., Kou, G., 1981. Studies of artificial infection of the gliding bacteria in cultured fish. Fish Pathol. 15, 309-314.

Kunttu, H., Jokinen, E., Valtonen, E., Sundberg, L.R., 2011. Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. J. Appl. Microbiol. 111, 1319-1326.

Kunttu, H.M., Sundberg, L.R., Pulkkinen, K., Valtonen, E.T., 2012. Environment may be the source of

Flavobacterium columnare outbreaks at fish farms. Environ Microbiol Rep. 4, 398-402.

Kunttu, H.M., Valtonen, E.T., Jokinen, E.I., Suomalainen, L.R., 2009. Saprophytism of a fish pathogen as a transmission strategy. Epidemics 1, 96-100.

Laanto, E., Sundberg, L.-R., Bamford, J.K.H., 2011. Phage specificity of the freshwater fish pathogen *Flavobacterium columnare*. Appl. Environ. Microbiol. 77, 7868–7872.

Loch, T.P., Faisal, M., 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. J Adv Res. 6, 283 - 300.

Luo, Z., Fu, J., Li, N., Liu, Z., Qin, T., Zhang, X., Nie, P., 2016. Immunogenic proteins and their vaccine development potential evaluation in outer membrane proteins (OMPs) of *Flavobacterium columnare*. Aquaculture and Fisheries 1, 1 - 8.

Morley, N., Lewis, J., 2010. Consequences of an outbreak of columnaris disease (*Flavobacterium columnare*) to the helminth fauna of perch (*Perca fluviatilis*) in the Queen Mary reservoir, south-east England. J. Helminthol. 84, 186-192.

Olivares-Fuster, O., Baker, J.L., Terhune, J.S., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Arias, C.R., 2007. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. Syst. Appl. Microbiol. 30, 624-633.

Olivares-Fuster, O., Bullard, S.A., McElwain, A., Llosa, M.J., Arias, C.R., 2011. Adhesion dynamics of *Flavobacterium columnare* to channel catfish *Ictalurus punctatus* and zebrafish *Danio rerio* after immersion challenge. Dis. Aquat. Org. 96, 221-227.

Ordal, E.J., Rucker, R.R., 1944. Pathogenic myxobacteria. Experimental Biology and Medicine 56, 15-18.

Panangala, V.S., Shelby, R.A., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Mitra, A., Morrison, E.E., 2006. Immunofluorescent test for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. Dis. Aquat. Org. 68, 197-207.

Prasad, Y., Arpana, null, Kumar, D., Sharma, A.K., 2011. Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, Clarias batrachus (Linn.) from columnaris disease. J Environ Biol 32, 161–168.

Pulkkinen, K., Suomalainen, L.-R., Read, A., Ebert, D., Rintamäki, P., Valtonen, E., 2010. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. Proc R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 277, 593-600.

Rehulka, J., Minarík, B., 2007. Blood parameters in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1815), affected by columnaris disease. Aquac. Res. 38, 1182-1197.

Riley, T.A., 2000. Treatment of *Flavobacterium columnare* and toxicity of chloramine-T in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Thesis (M.S.)--Auburn University, Auburn, Alabama.

Rogers, W.A., 1971. Principal diseases of catfish: how to identify and fight them. Fish Farming Ind,

Rucker, R.R., Earp, B.J., Ordal, E.J., 1954. Infectious diseases of Pacific salmon. Trans. Am. Fish. Soc. 83, 297-312.

Sarker, S., Abraham, T.J., Banerjee, S., Adikesavalu, H., Patra, A. 2017. Characterization, virulence and pathology of *Flavobacterium* sp. KG3 associated with gill rot in carp, *Catla catla* (Ham.). Aquac. 468, 579 - 584.

Serrano, P.H., Nations, F. and A.O. of the U., 2005. Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. Food & Agriculture Org, Rome.

Shieh, H., 1980. Studies on the nutrition of a fish pathogen, Flexibacter columnaris. Microbios Letters 13, 129-133.

Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Drennan, J.D., Evans, J.J., 2011. Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. Fish Shellfish Immunol. 30, 304-308.

Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Evans, J.J., 2007. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent

Flavobacterium columnare vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. Vaccine 25, 1126-1131.

Shoemaker, C.A., Shelby, R.A., Klesius, P.H., 2003b. Development of an indirect ELISA to detect humoral response to *Flavobacterium columnare* infection of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J App Aquac. 14, 43-52.

Sink, T.D., Lochmann, R.T., Goodwin, A.E., Marecaux, E., 2007. Mortality rates in golden shiners fed high-fat diets with or without a dairy-yeast prebiotic before challenge with *Flavobacterium columnare*. N Am J Aquac. 69, 305-308.

Soltani, M., Shanker, S., Munday, B., 1995. Chemotherapy of Cytophaga/Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials. J Fish Dis. 18, 555-565.

Speare, D.J., Markham, R., Despres, B., Whitman, K., MacNair, N., 1995. Examination of gills from salmonids with bacterial gill disease using monoclonal antibody probes for *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris*. J. Vet. Diagn. Invest. 7, 500-505.

Srisapoome, P., Nakharuthai C., 2015. Isolation and identification of causative bacteria of columnaris disease in cultured Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand. Fish Sci J. 1-2, 78 - 100.

Straus, D.L., Farmer, B.D., Beck, B.H., Bosworth, B.G., Torrans, E.L., Tucker, C.S., 2015. Water hardness influences *Flavobacterium columnare* pathogenesis in channel catfish. Aquaculture 435, 252 - 256.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2005a. Effect of *Pseudomonas* sp. MT5 baths on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout and on microbial diversity on fish skin and gills. Dis. Aquat. Org. 63, 61-68.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2005b. Treatment of columnaris disease of rainbow trout: low pH and salt as possible tools? Dis. Aquat. Org. 65, 115-120.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2005c. Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis. 28, 271-277.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2006. Chondroitin AC lyase activity is related to virulence of fish pathogenic *Flavobacterium columnare*. J Fish Dis. 29, 757-763.

Suzuki, M., Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4522-4529.

Thomas-Jinu, S., Goodwin, A., 2004. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. J Fish Dis. 27, 23-28.

Tripathi, N.K., Latimer, K.S., Gregory, C.R., Ritchie, B.W., Wooley, R.E., Walker, R.L., 2005. Development and evaluation of an experimental model of cutaneous columnaris disease in koi *Cyprinus carpio*. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 45-54.

Triyanto, W.H., 1999. Genotypic Diversity of Strains of *Flavobacterium columnare* from Diseased Fishes. Fish Pathol. 34, 65-71.

Wagner, B.A., Wise, D.J., Khoo, L.H., Terhune, J.S., 2002. The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 14, 263-272.

Welker, T.L., Shoemaker, C.A., Arias, C.R., Klesius, P.H., 2005. Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. Dis. Aquat. Org. 63, 129-138.

Xu, D.-H., Shoemaker, C.A., Zhang, D., 2015. Treatment of *Trichodina* sp reduced load of *Flavobacterium*

columnare and improved survival of hybrid tilapia. Aquaculture Reports. 2, 126-131.

Zhao, H., Li, C., Beck, B.H., Zhang, R., Thongda, W., Davis, D.A., Peatman, E., 2015. Impact of feed additives on surface mucosal health and columnaris susceptibility in channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. Fish & shellfish immunology. 46, 624-637.

Zhang, Y., Arias, C.R., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2006. Comparison of lipopolysaccharide and protein profiles between *Flavobacterium columnare* strains from different genomovars. J Fish Dis 29, 657 - 663.