

การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal
amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ
Streptococcus agalactiae ในปลานิล

Application of Loop-mediated isothermal
amplification (LAMP) technique to
detect *Streptococcus agalactiae* in Tilapia



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2566 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Application of Loop-mediated isothermal
amplification (LAMP) technique to
detect pathogenic bacteria in Tilapia



Darika Saensing
Trirat Phongnongno

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ **ACADEMIC YEAR 2023** ภาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ก่อโรคในปลานิล
Application of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique to detect *Streptococcus agalactiae* in Tilapia

ชื่อนักศึกษา

นางสาวดาริกา แสนสิงห์ รหัสนักศึกษา 63050477
นางสาวตรีรัตน์ พงษ์หนองโน รหัสนักศึกษา 63050478

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

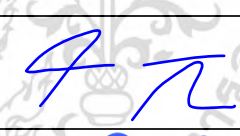
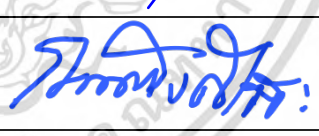
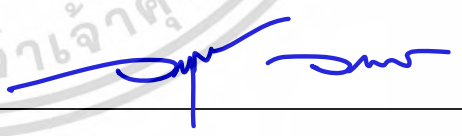
ปีการศึกษา

2566

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.กานต์ วงศาธิยะ กรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> ในปลานิล
ชื่อนักศึกษา	นางสาวดาริกา แสนสิงห์ รหัสนักศึกษา 63050477 นางสาวตรีรัตน์ พงษ์หนองโน รหัสนักศึกษา 63050478
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรภฤต วรรณนทกิจ

บทคัดย่อ

โรคสเตรปโตคอคโคซิสมีสมาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* sp.) เป็นหนึ่งในสาเหตุให้เกิดการป่วยและการตายในปลาที่มีความรุนแรง และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลานิล การวินิจฉัยที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพจึงจำเป็นในการจัดการกับโรคนี้อันเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงปลานิล จึงประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ยีน *cfb* ของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการทดสอบความไวและความจำเพาะเพื่อตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* และใช้เทคนิคแลมป์เพื่อทดสอบในตัวอย่างเหงือกปลาที่ผสมกับเชื้อ *S. agalactiae* จากการศึกษา พบว่า จากการแยกเชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิล ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 518F/800R สามารถยืนยันผลของเชื้อ *S. agalactiae* ผลของการทดสอบความไวด้วยเทคนิคแลมป์ พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอต่ำที่สุดที่ 8×10^{-5} ng/ μ l และจากผลการทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. agalactiae* โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น นอกจากนี้ การใช้เทคนิคแลมป์เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในตัวอย่างเหงือกปลานิล พบว่าสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ *S. agalactiae* ได้ที่ 1.5×10^1 ถึง 1.5×10^7 CFU/ml จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์ (LAMP) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ แม้จะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นต่ำ สามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดการและควบคุมโรคในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

คำสำคัญ : เทคนิคแลมป์ (LAMP), *Streptococcus agalactiae*, ปลานิล, การตรวจหาเชื้อ, ยีน *cfb*
เอกสารนี้เป็นเอกสารของงานวิจัยที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำเอกสารนี้ไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Application of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique to detect <i>Streptococcus agalactiae</i> in Tilapia
Student	Miss Darika Saensing Student ID 63050477 Miss Trirat Phongnongno Student ID 63050478
Degree	Bachelor of Science (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Asst. Prof. Dr. Worakrit Worananthakij

Abstract

Streptococcosis, caused by infection with *Streptococcus* sp., is a major cause of serious illness and death in tilapia, significantly affecting the tilapia farming industry. Rapid and effective diagnosis is essential for managing this disease in tilapia farming. The Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique was used to detect pathogenic bacteria in tilapia. Primers specific for the *cfb* gene of *Streptococcus agalactiae* were used to test the sensitivity and specificity for detecting *S. agalactiae*. Fish gill samples mixed with *S. agalactiae* were also used to detect *S. agalactiae* in tilapia. 16S rDNA nucleotide sequence studies with the primer pair 518F/800R were able to confirm the presence of *S. agalactiae*. LAMP test results showed that *S. agalactiae* could be detected at low DNA concentrations up to 8×10^{-5} ng/ μ l, and specificity test results indicated that the primers used were specific to *S. agalactiae* without cross-reactivity with other bacteria. Additionally, by detecting *S. agalactiae* infection in tilapia gill samples, it was found that *S. agalactiae* infection could be detected at concentrations ranging from 1.5×10^1 to 1.5×10^7 CFU/ml. The results demonstrated that the LAMP technique is a rapid and accurate method for detecting *S. agalactiae* in tilapia, even with low initial bacterial counts. It can be effectively applied to disease management and control in the aquaculture industry.

Keywords : LAMP technique, *Streptococcus agalactiae*, Nile tilapia, pathogen detection, *cfb* gene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษในหัวข้อเรื่องการประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โครงการพิเศษนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากทางคณะผู้จัดทำได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่คอยให้คำปรึกษา และให้ความรู้ในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัยให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ อีกทั้งได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เพื่อให้โครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ นอกจากนี้ทางคณะผู้จัดทำโครงการพิเศษต้องขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการสอบ ที่ให้ความกรุณาในการแนะนำ แก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่องของโครงการพิเศษเล่มนี้ให้ถูกต้อง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการศึกษาวิเคราะห์ ตลอดจนสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบคุณบิดา มารดาของครอบครัวแสนสิงห์ และครอบครัวพงษ์หนองโน เป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจ ตลอดจนรุ่นพี่ที่คอยให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ดารีกา แสนสิงห์
ตรีรัตน์ พงษ์หนองโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ปลานิล.....	3
2.2 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลานิล.....	3
2.3 โรคปลานิล	4
2.3.1 โรคจากปรสิต.....	4
2.3.2 โรคจากแบคทีเรีย.....	5
2.3.3 โรคจากเชื้อรา	5
2.3.4 โรคจากไวรัส	5
2.4 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค.....	5
2.5 การป้องกันและรักษาโรคปลา.....	6
2.5.1 ชนิดของยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคปลา	6
2.5.2 การรักษาโรคที่เกิดจากปรสิต	6
2.5.3 การรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย	6
2.5.4 การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา.....	7
2.5.5 การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัส.....	7
2.6 โรคในปลานิลที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย	7
2.6.1 กลไกการเกิดโรคจากแบคทีเรีย	7
2.6.2 โรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococosis)	8

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.3 โรคคอถัมนาริส (Columnaris disease) หรือ โรคติดเชื้อแฟลกซิแบคเตอร์ (Flexibacteriosis)	9
2.6.4 โรคแบคทีเรียลเฮโมราจิกเซปติซีเมีย (Bacterial haemorrhagic septicemia)	9
2.6.5 โรคอีพิเทลิโอซิสทิส (Epitheliocystis)	10
2.6.6 โรคซูโดโมนเนส เซปติซีเมีย (Pseudomonas septicemia)	11
2.7 ประเภทของเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus</i>	12
2.7.1 Alpha (α) hemolytic streptococci.....	12
2.7.2 Beta (β) hemolytic streptococci.....	12
2.7.3 Gamma (γ) or nonhemolytic streptococci.....	12
2.8 การจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี	13
2.8.1 การย้อมแกรมแบคทีเรีย.....	13
2.8.2 Oxidase Test.....	14
2.8.3 Catalase Test.....	14
2.8.4 OF Test (Oxidation fermentation test)	15
2.8.5 การทดสอบด้วยอาหาร TSI (Triple Sugar Iron Agar)	15
2.8.6 การทดสอบด้วยอาหาร Bile Esculin (Bile Esculin Agar Base)	17
2.9 เทคนิคแลมป์ (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP)	17
2.9.1 กลไกการทำงานของเทคนิคแลมป์.....	18
2.9.2 วิธีตรวจวัดยีนที่เพิ่มขึ้น.....	21
2.9.3 ข้อดีของเทคนิคแลมป์	22
2.9.4 ข้อด้อยของเทคนิคแลมป์.....	22
2.10 ยีน <i>cfb</i>	22
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	27
3.1 ตัวอย่างปลานิล	27
3.2 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	27
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	30
3.4 เชื้อที่ใช้ทดสอบ	30
3.5 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลานิล	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6 จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี.....	31
3.6.1 การย้อมแกรมแบคทีเรีย.....	31
3.6.2 Oxidase Test.....	31
3.6.3 Catalase Test.....	31
3.6.4 OF Test (Oxidation fermentation test)	32
3.6.5 การทดสอบด้วยอาหาร TSI (Triple Sugar Iron Agar)	32
3.6.6 การทดสอบด้วยอาหาร Bile Esculin (Bile Esculin Agar Base)	32
3.7 สกัดดีเอ็นเอ	32
3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย	32
3.7.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ.....	33
3.8 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	33
3.9 ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
3.9.1 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาแลมพ์	34
3.9.2 การทดสอบความไวและประสิทธิภาพของเทคนิคแลมพ์.....	35
3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิคแลมพ์.....	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	37
4.1 ตัวอย่าง.....	37
4.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี	37
4.3 ผลวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์	39
4.4 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเทคนิคแลมพ์	45
4.5 การศึกษาหาความไวของเทคนิคแลมพ์.....	46
4.6 การศึกษาหาความจำเพาะของเทคนิคแลมพ์	47
4.7 การประยุกต์ใช้เทคนิคแลมพ์ (การทำ spike test)	48
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	49
5.1 สรุปผลการวิจัย	49
5.2 ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก.....	54
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	55
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ	57

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย	59
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย	64



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างการเขียนรายงานผลการทดสอบด้วยอาหาร TSI	16
3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>cfb</i> ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus</i> ...	34
3.2 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาแลมป์ ปริมาณทั้งหมด 20 ไมโครลิตร	34
4.1 ขนาดของตัวอย่างปลานิล	37
4.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิล T1L1, T1L3, T1L4 และ T2L1	38
4.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิล T3(1)L1, T3(1)L2, T3(1)S1 และ T3(1)S2	38
4.4 แสดงลำดับและความยาว (Sequence Lengths)	45



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะภายนอกของปลานิล	3
2.2 กราฟข้อมูลการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	4
2.3 ปลานิลมีตาโปนขุนขาว เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus</i>	8
2.4 ลูกปลาที่ติดเชื้อ <i>Flavobacterium</i>	9
2.5 ปลานิลที่เป็นผลเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i>	10
2.6 รูปเซลล์ของปลานิลที่เป็นโรค Epitheliocystis	11
2.7 ลักษณะของปลาที่ติดเชื้อ <i>Pseudomonas fluoresce</i>	11
2.8 แผนผังแสดงการออกแบบโปรแกรมสำหรับเทคนิคแลมป์	18
2.9 หลักการของเทคนิคแลมป์ : โครงสร้างเริ่มต้นขั้นตอนการผลิต (ขั้นตอนที่ 1–8)	19
2.10 หลักการของเทคนิคแลมป์ : ขั้นตอนการขยายวงจร	20
2.11 ลักษณะความขุ่น	21
2.12 การเรืองแสงที่เกิดจากการใช้สารฟลูออเรสเซนต์	21
4.1 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยคำสั่ง Nucleotide BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (T1L1)	40
4.2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยคำสั่ง Nucleotide BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ <i>Staphylococcus</i> sp. (T1L3)	41
4.3 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยคำสั่ง Nucleotide BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ <i>Lactococcus garvieae</i> (T1L4)	43
4.4 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยคำสั่ง Nucleotide BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (T2L1)	44
4.5 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกราส 2 เปอร์เซ็นต์ ของการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60 – 65°C เป็นเวลา 60 นาที	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์ Lane M: 100 bp DNA ladder; lanes 1–6: ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายตั้งแต่ 8 ถึง 8×10^{-5} ng/ μ l	46
4.7 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์	47
4.8 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเหงือกปลาหมอกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus agalactiae</i> ความเข้มข้นจากมากไปน้อย	48
ค.1 การวัดขนาดปลานิล	59
ค.2 ลักษณะโคโลนี และการย้อมแกรมสองกล้อง	61
ค.3 ผลการทดสอบ Oxidase	62
ค.4 ผลการทดสอบ Catalase	62
ค.5 ผลการทดสอบ OF, TSI, Esculin	63
ง.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (T1L1) ไพรมเมอร์ 518F มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 971 bp	64
ง.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (T1L1) ไพรมเมอร์ 800R มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 783 bp	64
ง.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Staphylococcus</i> sp. (T1L3) ไพรมเมอร์ 518F มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 975 bp	65
ง.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Staphylococcus</i> sp. (T1L3) ไพรมเมอร์ 800R มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 779 bp	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ง.5 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Lactococcus garvieae</i> (T1L4) ไพรเมอร์ 518F มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 972 คู่เบส	66
ง.6 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Lactococcus garvieae</i> (T1L4) ไพรเมอร์ 800R มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 782 คู่เบส	66
ง.7 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (T2L1) ไพรเมอร์ 518F มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 978 คู่เบส	67
ง.8 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (T2L1) ไพรเมอร์ 800R มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 783 คู่เบส	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
pg	พิโคกรัม
μl	ไมโครลิตร
CFU/ml	หน่วยสร้างโคโลนีต่อมิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
ng	นาโนกรัม
bp	base pair
ml	มิลลิลิตร
rpm	ความเร็วรอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และเป็นแหล่งรายได้สำหรับผู้ประกอบการเกษตรอย่างมาก อย่างไรก็ตาม ปริมาณผลผลิตปลานิลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา แต่มีแนวโน้มลดลงในปี 2566 โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงปลานิลในระบบที่หนาแน่นจะเผชิญกับปัญหาหลัก คือการจัดการระบบเลี้ยง และปัญหาทางสุขภาพของปลาที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อโรคที่มาจากเชื้อแบคทีเรีย หนึ่งในปัญหาใหญ่คือการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่ทำให้เกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococcosis) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ปลามีคุณภาพต่ำหรือตาย ปัญหาเหล่านี้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมประมงทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียทำให้ราคาขายลดลงและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น เนื่องจากการรักษาโรคในปลาจากเชื้อแบคทีเรียอาจต้องใช้ยาและสารเคมี นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การปล่อยเชื้อแบคทีเรียและสารพิษเข้าสู่แหล่งน้ำ ทำให้คุณภาพของน้ำเสื่อมลงและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในแหล่งน้ำ

การตรวจหาเชื้อก่อโรคในปลาสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา เป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในปลา โดยนำตัวอย่างจากปลาที่สงสัยว่าติดเชื้อมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะของเชื้อโรค ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ง่าย สะดวก และราคาไม่แพง แต่อาจมีความไวต่ำ เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบเชื้อโรคทั้งหมดได้ การตรวจทางชีวเคมี เป็นวิธีที่ใช้สารเคมีหรือเอนไซม์เพื่อตรวจหาสารที่เกี่ยวข้องกับเชื้อโรค ซึ่งมีความไวและจำเพาะสูง แต่อาจมีความซับซ้อนและใช้เวลานาน และการตรวจทางพันธุศาสตร์ เช่น การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เพื่อตรวจหา DNA หรือ RNA ของเชื้อโรค ซึ่งที่มีความไวและจำเพาะสูงที่สุด แต่อาจมีความซับซ้อนและราคาแพง และเทคนิคแลมป์ เป็นเทคนิคที่คล้ายกับ PCR แต่ใช้สารเคมีและอุปกรณ์ที่เรียบง่ายกว่า ทำให้สะดวกและราคาไม่แพงเท่า PCR เทคนิคนี้มีความไวและจำเพาะใกล้เคียงกับ PCR

เทคนิคแลมป์ หรือ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้ง DNA และ RNA ที่อุณหภูมิในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ถึง 1000 ล้าน (10^9) เท่า ภายในเวลา 1 ชั่วโมง เทคนิคแลมป์เป็นเทคนิคตรวจหาสารพันธุกรรมของตัวเชื้อ เช่นเดียวกับเทคนิค PCR และ Realtime-PCR โดย LAMP มีความไวในการตรวจวัด (sensitivity) สูงกว่า PCR และอาจเทียบเท่า Realtime-PCR และเนื่องจากเทคนิคแลมป์มีความจำเพาะ (specificity) กับตัวเชื้อสูง (สวทช, 2564) มีขั้นตอนการตรวจไม่ยุ่งยาก ใช้งานง่าย และใช้เครื่องมือราคาไม่แพง ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคแลมป์ มาพัฒนาและ

ประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อในผู้ป่วย หรือผู้ที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียอย่างต่อเนื่อง เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำมาเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น เชื้อ HIV เชื้อวัณโรค เชื้อโควิด-19 และในด้านการเกษตร มีการนำมาใช้ตรวจหาโรคพืชและสัตว์ เช่น โรคใบเหลืองในข้าว โรคหนอนกระทู้ผัก โรคหนอนในกุ้ง เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการนำเทคนิคแลมป์มาใช้เพื่อศึกษายีนที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียก่อโรคในปลาไนล์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อก่อโรคให้มีความแม่นยำและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิคแลมป์สำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* ในปลาไนล์

1.2.2 เพื่อทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิคแลมป์ต่อการตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* ในปลาไนล์

1.2.3 เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* จากตัวอย่างเหงือกปลาที่ผสมกับเชื้อ *S. agalactiae*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาไนล์ และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

1.3.2 การทดสอบทางชีวเคมี (Oxidase Test, Catalase Test, OF Test, TSI, Bile Esculin Agar Base Test) เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1.3.3 การทดสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *cfb* ของ *S. agalactiae* โดยทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาแลมป์ การทดสอบความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของเทคนิคแลมป์ ในการตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae*

1.3.4 การใช้เทคนิคแลมป์เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* จากตัวอย่างเหงือกปลาที่ผสมกับเชื้อ *S. agalactiae*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* ในปลาไนล์ได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคมกยิ่งขึ้น

1.4.2 นำไปประยุกต์ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลานิล

ปลานิล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาลและมีลาดพาดขวาง 9-10 แถบ ครีบหลัง ครีบกันและ ครีบหางมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวาง ครีบหลังมีอันเดียวประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบกันมีก้านครีบแข็ง 3 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน บนแถบเส้นข้างลำตัวมีเกล็ด 33 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงแนวส่วนหน้าของครีบกัน 13 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่ 1 จุด (รูปที่ 2.1) ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี มีอุปนิสัยกินอาหารทั้งพืชและสัตว์ สามารถกินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ ซากอินทรีย์และอินทรีย์ที่เน่าเปื่อย รวมทั้งจุลินทรีย์และพืชน้ำต่างๆ เป็นปลาที่กินอาหารในเวลากลางวันและหยุดกินอาหารในเวลากลางคืน กินอาหารได้ที่ผิวน้ำ กลางน้ำ และก้นบ่อ (กรมประมง, 2562)

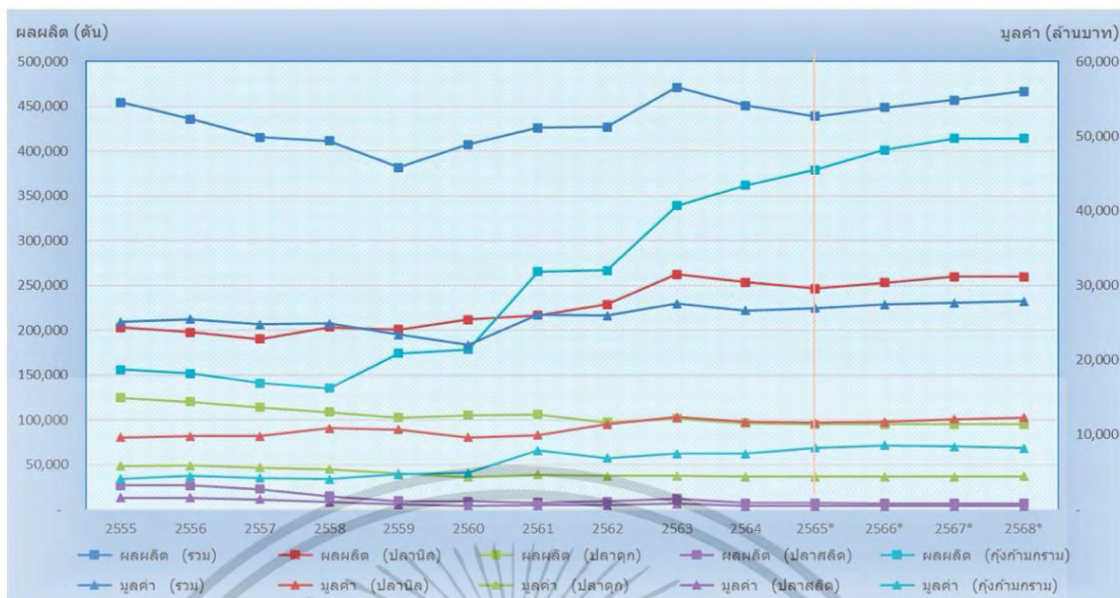


รูปที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลานิล

2.2 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลานิล

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืด ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งมีการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวางในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทย จีน ไทย และมาเลเซีย (Zhu et al., 2023) จากสถิติการประมงแห่งประเทศไทยในปี 2564 พบว่า ปริมาณผลผลิตปลานิลจากการเพาะเลี้ยงในปี 2545 - 2564 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น พิจารณาจาก 83,800 ตัน (ในปี 2545) และ 253,500 ตัน (ในปี 2564) ซึ่งคิดเป็น 3 เท่าในช่วงระยะเวลา 10 ปี (รูปที่ 2.2) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยปี 2566 มีปริมาณการผลิตรวมทั้งประเทศ 259,498 ตัน ซึ่งลดลงจากปี 2565 จำนวน 9,896 ตัน หรือร้อยละ 3.67 ผลผลิตต่อไร่ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2566)

เอกสารนี้... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 กราฟข้อมูลการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
ที่มา : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2566)

2.3 โรคปลานิล

เมื่อมีการเลี้ยงปลานิลเพิ่มมากขึ้นและเป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่นทำให้เกิดปัญหาด้านโรคขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับการจัดการการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เช่น การปล่อยปลาต่อหน่วยพื้นที่มากเกินไป การให้อาหารในปริมาณที่มากเกินไป ความต้องการของปลา คุณสมบัติของน้ำในบริเวณที่เลี้ยงปลาเกิดความเครียด อ่อนแอ เกิดโรคต่างๆได้ง่าย โรคที่พบในปลานิลแยกออกได้เป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้ (กรมประมง, 2555)

2.3.1 โรคจากปรสิต

ปรสิตเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ เนื่องจากปรสิตส่วนมากสามารถเข้าสู่ปลาได้โดยตรง หรืออาจแฝงตัวมากับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆที่ปลากินเป็นอาหารได้ ปรสิตที่พบในปลามีตั้งแต่สัตว์เซลล์เดียวขนาดเล็ก หนองพยาธิ ไปจนถึงปรสิตเปลือกแข็งที่มีขนาดใหญ่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของปลาแตกต่างกันไป ตัวอย่างของปรสิตที่ก่อโรคในปลา เช่น เห็บระฆัง การที่ปรสิตชนิดนี้เกาะยึดหรือเคลื่อนที่ไปมาบริเวณผิวหนังและเหงือกปลา ทำให้เซลล์บริเวณนั้นเกิดการระคายเคือง มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนัง ปลาขับเมือกออกมามากขึ้นและตายในที่สุด (กรมประมง, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 โรคจากแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปลานิลส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีเพียงส่วนน้อยที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก กระบวนการก่อโรคของแบคทีเรียเป็นผลจากการที่เชื้อเข้าสู่ตัวปลา แล้วอยู่ในอวัยวะเป้าหมายโดยทางกระแสโลหิตรวมถึงการที่แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในอวัยวะเป้าหมาย และการสร้างพิษของแบคทีเรียทั้งสารพิษชนิดที่ขับออกนอกเซลล์แบคทีเรีย (exotoxin) และสารพิษที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (endotoxin) รอยโรคที่เกิดขึ้นในปลาป่วยเป็นผลจากสารพิษของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์บุผิวตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายจนอวัยวะเหล่านั้นไม่สามารถทำงานได้หรือทำให้เกิดเนื้อตาย (necrosis) ตามอวัยวะต่าง ๆ อย่างไรก็ตามลักษณะอาการและรอยโรคของปลานิลที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อแบคทีเรียไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อที่ทำให้เกิดโรค นอกจากนี้การเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียในลูกปลานิลมักปรากฏเพียงอัตราการรอดตายสูงและรวดเร็วโดยไม่แสดงรอยโรค (ชุตินา และคณะ, 2561)

2.3.3 โรคจากเชื้อรา

โรคจากเชื้อราเป็นโรคที่พบได้น้อยในปลานิลขนาดใหญ่ แต่มักพบได้ในโรงเพาะฟัก จะพบลักษณะขุยขาวๆ ที่ไข่ปลาและลูกปลาวัยอ่อน โดยเฉพาะลูกปลาระยะที่ 3-4 ทำให้ปลาตายได้ 5-10% เชื้อราที่พบเป็นกลุ่ม *Achly* sp. หรือ *Saprolegnia* sp. มักเกิดเป็น secondary infection คือ มีปรสิตภายนอกหรือแบคทีเรีย เช่น *Aeromonas* เข้าทำอันตรายผิวหนังปลาก่อน เชื้อราจะเข้าทำอันตรายปลาซ้ำ ปลาอาจแสดงลักษณะอาการทางขาว ตัวเปื่อยร่วมด้วย ปลาที่รอดตายจากอาการดังกล่าว จะมีภูมิคุ้มกันโรคต่ำ โตช้า แคระแกร็น หรือหางกุดเมื่อเจริญเป็นปลาใหญ่ (กรมประมง, 2555)

2.3.4 โรคจากไวรัส

เชื้อไวรัสจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ธรรมชาติของเชื้อไวรัสจะต้องอาศัยเซลล์ของสิ่งมีชีวิตในการเพิ่มจำนวนของตัวเองให้มากขึ้น ซึ่งไวรัสแต่ละชนิดจะสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตบางชนิดที่มีความจำเพาะกับไวรัสนั้นๆ เช่น ในกรณีของโรคไวรัสในปลา เซลล์เนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ของปลาจับที่อยู่อาศัยของไวรัสได้เป็นอย่างดี ซึ่งเซลล์ที่ไวรัสเข้าไปอาศัยนั้นจะถูกทำลายและตายในที่สุดและหากเซลล์มีการตายเป็นจำนวนมากจะทำให้อวัยวะนั้นไม่สามารถทำงานต่อไปได้ จะส่งผลให้ปลาเกิดอาการป่วยและตายได้ (กรมประมง, 2555)

2.4 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

การตายของสัตว์น้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือในบ่อที่เกิดขึ้นในแต่ละปีนั้น มาจากสาเหตุเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศอย่างรวดเร็ว ได้แก่ พายุ อุณหภูมิ น้ำฝน และฟ้าผ่าไม่เว้นกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคติดเชื้อปรสิตและแบคทีเรียที่เกิดจากความเครียด การปนเปื้อนของสารพิษและสารอินทรีย์ หรือตายหลังจากถูกจับได้และถูกปล่อยไปโดยชาวประมง บางครั้งสัตว์น้ำตายไม่กี่ตัวก็ไม่ได้เป็นสิ่งบ่งบอกถึงปัญหาคุณภาพน้ำ ระดับออกซิเจนละลายน้ำต่ำเป็นสาเหตุที่พบมากที่สุดของการตายของสัตว์น้ำ การลดลงของออกซิเจนอาจเกิดจากหนึ่งหรือหลายปัจจัย ในช่วงฤดูร้อนซึ่งอุณหภูมิน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับอุณหภูมิ น้ำ โดยน้ำที่มีอุณหภูมิสูงจะมีออกซิเจนที่ละลายน้ำอยู่น้อยกว่าน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า รวมทั้งการเน่าสลายของสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำปิด การตายของพืชน้ำหรือสาหร่ายที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ หรือจากสารเคมีที่สามารถก่อให้เกิดสภาวะออกซิเจนละลายน้ำต่ำในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย สำหรับในบ่อเลี้ยงปลา การปล่อยปลามากเกินไปหรือการให้อาหารมากเกินไป ก็เป็นสาเหตุให้สัตว์น้ำขาดออกซิเจนและตายได้ (ชุตินา และคณะ, 2561)

2.5 การป้องกันและรักษาโรคปลา

การป้องกันโรคสามารถทำได้โดยการเลือกปลาสายพันธุ์ที่ดีและทนต่อโรคมะเร็ง ผู้เลี้ยงต้องมีกระบวนการที่จะส่งเสริมให้ปลามีสุขภาพแข็งแรง โดยให้อาหารที่มีคุณภาพดี การเสริมด้วยวิตามินซีหรืออี จะช่วยให้ปลาไม่เครียดและมีภูมิคุ้มกันโรคที่ดี ตลอดจนการให้วัคซีนในการป้องกันโรคที่จะเกิดขึ้นอีกด้วยหรือการใช้ยาและสารเคมีบางชนิด อย่างไรก็ตามหากมีการเกิดโรคขึ้นแล้วจำเป็นจะต้องทำการรักษาให้ปลาหายจากโรค เพื่อป้องกันการตายที่จะเกิดขึ้น

2.5.1 ชนิดของยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคปลา

- 1) กลุ่มสารเคมี เช่น ฟอร์มาลิน ต่างหัททิม สารประกอบไอโอดีน และอื่นๆ
- 2) กลุ่มยาต้านจุลชีพ เช่น เททราไซคลิน กลุ่มอนุพันธ์ไนโตรฟูรานและกลุ่มซัลฟา
- 3) กลุ่มสารเคมีที่ใช้ประกอบการรักษา เช่น กลุ่มวิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ

2.5.2 การรักษาโรคที่เกิดจากปรสิต

โดยปกติแล้วปรสิตภายนอกจะหลุดออกจากปลาป่วย หลังได้รับสารเคมี อย่างไรก็ตามระยะที่เป็นไข่และซีสต์ จะทนทานต่อสารเคมีมากกว่าระยะอื่นๆ ดังนั้นจึงควรทำการให้ยาติดต่อกัน 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อในระยะที่เป็น Spore หรือ Oncomiracidium (ปณรัตน์, 2552)

2.5.3 การรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

โรคที่เกิดจากแบคทีเรียสามารถรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะมีมากมายหลายชนิดในท้องตลาด หากนำมาใช้ไม่เหมาะสมก็อาจทำให้เกิดผลในทางลบได้ ดังนั้นการเลือกชนิดของยาจึงมีความสำคัญต่อการรักษาโรค ซึ่งควรพิจารณาเลือกจากผลการทดสอบยาต่อแบคทีเรียชนิดนั้นๆ (Sensitivity test) ในห้องปฏิบัติการ อีกกรณีหนึ่งต้องระวังเรื่องการดื้อยา หาก

ใช้ยาเวลานานหรือใช้ในความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมจะมีผลทำให้เกิดการดื้อยา ส่วนในการป้องกันโรคนั้นควรจะทำให้ปลา มีสุขภาพแข็งแรง โดยมีวิธีการจัดการที่ดี ได้รับอาหารในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การใช้วัคซีนก็เป็นวิธีหนึ่งในการป้องกันโรค (ปณรัตน์, 2552)

2.5.4 การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา

สาเหตุหลักของการเกิดโรค เกิดจากการจัดการระบบกรองไม่ดี มีการสะสมของอินทรีย์สารมาก เป็นเหตุให้ปลาอ่อนแอ อัตรารอดต่ำ การป้องกันที่ดีที่สุด คือ การฆ่าเชื้อในน้ำที่ใช้หมุนเวียนในระบบ และจัดการระบบกรองให้สะอาดอยู่เสมอ เมื่อปลาป่วยให้ปรับคุณภาพน้ำด้วยปูนขาวในอัตรา 60 กิโลกรัมต่อไร่ หรือใช้ไตรฟลูราริน (Triflurarin) จำนวน 8-10 ซีซี.ต่อน้ำ 100 ลูกบาศก์เมตร (กรมประมง, 2555)

2.5.5 การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัส

เนื่องจากเชื้อไวรัสมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ภายในเซลล์ การใช้ยาหรือสารเคมีจึงไม่ได้ผล ดังนั้นจึงควรทำการรักษาภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และปรสิต ส่วนการป้องกันสามารถทำได้โดย เลือกรูปลูกปลาจากแหล่งที่ไม่มีประวัติการเกิดโรคไวรัส, ไม่เลี้ยงปลาในอัตราที่หนาแน่นจนเกินไป เพื่อป้องกันไม่ให้ปลาเกิดความเครียด, น้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงปลาควรผ่านการบำบัดฆ่าเชื้อก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ และซากปลาที่ตายหรือป่วยไม่ควรทิ้งลงแหล่งน้ำสาธารณะ แต่ควรกำจัดอย่างถูกวิธีโดยการฝังหรือเผ่า (กรมประมง, 2555)

2.6 โรคในปลานิลที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย

2.6.1 กลไกการเกิดโรคจากแบคทีเรีย

การติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญของโรคระบาดในการเพาะเลี้ยงปลานิลของประเทศไทย แบคทีเรียที่อยู่ในน้ำส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียหากินอิสระ (free living bacteria) และไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพปลาในสภาวะปกติ แต่อาจก่อโรคในปลาที่อ่อนแอหรือที่เรียกว่าฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ต่างจากแบคทีเรียก่อโรคที่พบในตัวปลาป่วย (pathogenic bacteria) ซึ่งต้องอาศัยโฮสต์ในการเจริญเติบโตและอยู่ในน้ำหรือนอกตัวโฮสต์ได้ไม่นาน อย่างไรก็ตาม โรคติดเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มปลานิลอาจมีสาเหตุจากแบคทีเรียฉวยโอกาสหรือแบคทีเรียก่อโรค การเกิดโรคติดเชื้อในฟาร์มปลานิลมักเกิดขึ้นเมื่อสภาพการจัดการฟาร์มทำให้ปลาเครียด เช่น การคัดร่อนขนาด การเคลื่อนย้าย คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ น้ำ และการสะสมของเสียในน้ำ โดยเฉพาะเมื่อมีการเลี้ยงปลาหนาแน่น เป็นต้น ปลาที่ได้รับความเครียดมีความไวต่อการติดเชื้อโรคจากแหล่งน้ำ และการเกิดโรคภายในบ่อทำให้เชื้อโรคเพิ่มจำนวนและแพร่ไปยังบ่ออื่น ๆ การจัดการใน

เอกสารนี้
โรงเพาะฟักเริ่มต้นจากการรวบรวมไข่ปลาที่ผสมแล้ว (fertilized egg) จากปากของแม่ปลานิลแต่ละ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวแล้วลำเลียงไปเข้าโรงเพาะฟักซึ่งมีระบบการฟักไข่ภายในโรงเรือนที่มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลาเพื่อกระตุ้นพัฒนาการของไข่ปลา นอกจากนี้สภาวะการฟักไข่ในโรงเพาะฟักแตกต่างจากการฟักไข่ภายในปากของแม่ปลา แม่ปลาสร้างภูมิคุ้มกันให้ไข่ปลาโดยการผลิตสารหลังที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อโรคและป้องกัน

การติดเชื้อบนผิวไข่ปลาระหว่างที่ไข่มีการพัฒนาการภายในปากของแม่ปลา การเกิดโรคติดเชื้อในโรงเพาะฟักนอกจากทำให้อัตรการฟักเป็นตัวของไข่ต่ำและเกิดความสูญเสียในการผลิตลูกปลาระยะแรกแล้ว ลูกปลาที่ไม่แข็งแรงจากการติดเชื้อภายในโรงเพาะฟักยังเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อโรคภายในฟาร์มระยะต่อมากการสุ่มตรวจคุณภาพของไข่ เช่น การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (bacterial colony count) รวมถึงพัฒนาการของไข่ในโรงเพาะฟักเป็นวิธีการที่ใช้ประเมินสภาวะการเกิดโรคติดเชื้อในระยะนี้ (ชุตินา และคณะ, 2561)

2.6.2 โรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococosis)

โรคสเตรปโตคอคโคซิสมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* sp.) โรคดังกล่าวถูกจัดให้เป็นหนึ่งในโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรงมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงปลานิล และเป็นสาเหตุในการป่วยและการตายในปลาทั่วโลก (สุไพลหมาน และคณะ, 2562) อาการของปลาที่เป็นโรคมีตาขุนขาวและโปนไม่ค้อย้วยน้ำลอยนิ่ง บางตัวว่ายน้ำควงส่วนช่องซบถ่ายบวมแดง (รูปที่ 2.3) สำหรับอาการภายใน พบการติดเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในหลายส่วน ได้แก่ ตับ ไต สมอ ม้าม และหัวใจ โดยตับจะมีอาการบวมผิดปกติมีสีซีดและเซลล์ตับเกิดการตาย หัวใจมีการอักเสบบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ ม้ามมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีเซลล์บวมและมีสีแดงคล้ำ ภายในช่องท้องมีของเหลวสะสมอยู่ มีเลือดคั่งในระบบทางเดินอาหาร และเกิดการอักเสบบริเวณลำไส้ (ชุตินา และคณะ, 2561)



รูปที่ 2.3 ปลานิลมีตาโปนขุนขาว เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus*
ที่มา : กรมประมง (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Streptococcus sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมรีย้อมติดสีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นโซ่ยาว หรือแบบคู่ ไม่มีการสร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างรงควัตถุแต่มีการสร้างแคปซูล เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถก่อโรคได้ทั้งในปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม (ชุตินา และกฤติมา, 2560)

2.6.3 โรคคอลลัมনারิส (Columnaris disease) หรือ โรคติดเชื้อแฟลกซีแบคทีเรีย (Flexibacteriosis)

โรคคอลลัมনারิส มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* (ชื่อเดิมคือ *Flexibacter columnaris*) (สุไหลหมาน และคณะ, 2562) อาการทางคลินิก คือ ลำตัวปลา มีสีต่างชนิดเป็นแถบ ๆ มีเมือกมาก ครีบและเหงือกกร่อน (รูปที่ 2.4) อาจมีสีเหลืองเกิดขึ้นบริเวณบาดแผล การป้องกันการระบาดของโรคทำได้โดย การลดการบอบช้ำจากการจับและคัดขนาดปลา ไม่เลี้ยงปลาหนาแน่น ฝักระวังอย่าให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำ (ชุตินา และคณะ, 2561)

Flavobacterium columnare เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีเส้นใย โคโลนีมีสีเหลือง รูปร่างเป็นแท่งเรียว ยาวประมาณ 3-10 ไมครอน กว้าง 0.3-0.5 ไมครอน (นันทรัฐดี, 2564)



รูปที่ 2.4 ลูกปลานิลที่ติดเชื้อ *Flavobacterium*
ที่มา : กรมประมง (2555)

2.6.4 โรคแบคทีเรียลเฮโมราจิกเซปติซีเมีย (Bacterial haemorrhagic septicemia)

โรคแบคทีเรียลมีสาเหตุจากการติดเชื้อแอโรโมนาสไฮโดรฟิลลา (*Aeromonas hydrophila*) โรคนี้เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและมักพบบ่อยในบ่อที่เลี้ยงโดยให้อาหารสดหรือการเลี้ยงแบบผสมผสาน (ชุตินา และคณะ, 2561) อาการที่แสดงออกและลักษณะรอยโรคมีความหลากหลาย แต่อาการที่ปรากฏร่วมกันในการติดเชื้อแต่ละ Serotype คือ อาการมีเลือดออก (Hemorrhage) ที่ผิวหนัง ช่องปาก และกล้ามเนื้อซึ่งมักเกิดร่วมกับการมีแผลหลุมที่ชั้น Epidermis บางครั้งอาจพบลักษณะเป็นแผลหลุมลึก (Furunculosis) เหมือนกับรอยโรคที่เกิด

จาก *Aeromonas salmonicida* (รูปที่ 2.5) นอกจากนี้ยังมักพบอาการตาโปน (Exophthalmus) และท้องมาร (Ascites) ได้ อาการอื่นๆ ที่อาจพบได้แก่ อาการ เกล็ดตั้ง ท้องกาง ครีบเปื่อย (Fin rot) เมื่อไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเห็ดคดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่าซากจะพบมีม้ามโต ไตบวม และเมื่อทำการตรวจอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ที่ติดเชื้อทางจุลพยาธิวิทยา มักพบจุดเนื้อตาย หลายบริเวณที่มีม้าม ตับ ไต และหัวใจ ซึ่งจะพบไปพร้อม ๆ กับการปรากฏของแบคทีเรียรูปร่างแท่ง ชื่อ *Aeromonas hydrophila* สามารถติดต่อกันได้โดยทำให้เกิดอาการต่างๆ ในคนได้แก่ *Myonecrosis cellulitis* และ *Ecthyma gangrenosum* (สุโหลหมาน และคณะ, 2562)



รูปที่ 2.5 ปลานิลเป็นแผลเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas*
ที่มา : กรมประมง (2555)

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นเส้นตรง ขนาดประมาณ 1.0-4.4 ไมโครเมตร เรียงตัวเดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือสายโซ่ซึ่งอาจต่อกันเป็นสายยาวถึง 8 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ส่วนมากจะเคลื่อนที่โดยมีเส้น (flagellum) อยู่ที่บริเวณปลายของเซลล์ บางพวกไม่เคลื่อนที่ และเป็นแบคทีเรียพวก facultative anaerobic จึงเจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (อภิรักษ์ และจิราพร, 2547)

2.6.5 โรคอิพิเทลิโอซิสทิส (Epitheliocystis)

โรคอิพิเทลิโอซิสทิสมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบขนาดเล็กคล้ายริคเกตเซีย (a rickettsia-like organism หรือ *Piscirickettsia* sp.) (ชุตินา และคณะ, 2561) ปลาที่ป่วยเป็ยโรคนี้อาจทำให้ปลาตายได้ โดยเฉพาะปลาขนาดเล็ก ลูกปลาที่ต่อโรคนี้อาจโตช้ากว่าปลาปกติมาก ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำสูง คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม และสภาพการเลี้ยงปลาหนาแน่น ล้วนเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค เชื้อตัวนี้จะเข้าไปทำลายเหงือกและผิวหนังชั้นนอกโดยการแทรกเข้าไปอยู่ในเซลล์เยื่อบุของเหงือกและผิวหนัง (intracellular infection) ทำให้เซลล์ที่เชื้อเข้าไปอยู่มีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อตรวจไตกล้องจุลทรรศน์จะเห็นแต่ละเซลล์เป็นถุงสีเหลืองอมน้ำตาลอยู่บริเวณซี่เหงือกหรือผิวหนังชั้นนอกของปลา (กรมประมง, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 รูปเซลล์ของปลานิลที่เป็นโรค Epitheliocystis
ที่มา : กรมประมง (2555)

2.6.6 โรคซุโดโมแนส เซปติซีเมีย (*Pseudomonas septicemia*)

โรคซุโดโมแนส เซปติซีเมีย มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* แบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรค pseudomonas septicemia กับปลานิล โดยปกติปลาสามารถรับแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายได้ทางปาก ทางผิวหนัง และทางเหงือกที่มีบาดแผลจากนั้นแบคทีเรียจะเข้าสู่กระแสเลือด และสร้างสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่าง ๆ ของปลา ปลาที่ติดเชื้อ *P. fluorescens* จะมีอาการดังนี้ รอบ ๆ ทวารหนักจะมีสีแดง ภายในลำไส้มีของเหลวปนเลือด มีการตกเลือดที่เยื่อช่องท้องและอวัยวะภายใน (รูปที่ 2.7) โรคนี้สามารถติดต่อจากปลาที่เป็นโรคไปยังปลาอื่นได้โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคจะปะปนอยู่ในอุจจาระของปลาที่เป็นโรค

Pseudomonas fluorescens เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง มี flagellum สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20–35 °C



รูปที่ 2.7 ลักษณะของปลาที่ติดเชื้อ *Pseudomonas fluorescens*

ที่มา : กรมประมง (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ประเภทของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus*

ลักษณะทั่วไปของ *Streptococcus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรม บวก รูปร่างกลมรีอัดติดสัณฐานเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.5–1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นโซ่ยาว หรือแบบคู่ ไม่มีการสร้างสปอร์ ไม่สามารถ เคลื่อนที่ได้ไม่สร้างรงควัตถุแต่มีการสร้างแคปซูล เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มี ออกซิเจน

จากการทดสอบโดยใช้ Blood agar สามารถแบ่งประเภทของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* ได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

2.7.1 Alpha (α) hemolytic streptococci

เมื่อทดสอบโดยใช้ Blood agar พบการเปลี่ยนสีเป็นสีเขียว โดยมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกบางส่วนรอบโคโลนี โชนของการสลายมีขนาดเล็ก (กว้าง 1 หรือ 2 มม.) โดยมีระยะขอบไม่จำกัด และเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้แตก สามารถทำดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เรียกว่า viridans streptococci หรือ *Streptococcus viridians* (จาก 'viridis' หมายถึงสีเขียว) alpha streptococci เป็นเชื้อที่ปกติอยู่ในลำคอ แต่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสได้ไม่บ่อยนัก *Pneumococcus (Streptococcus pneumoniae)* ยังเป็น alpha hemolytic streptococcus

2.7.2 Beta (β) hemolytic streptococci

เมื่อทดสอบโดยใช้ Blood agar พบบริเวณของภาวะเม็ดเลือดแดงแตกที่ชัดเจน และไม่มีสีอย่างชัดเจนกว้าง 2–4 มม. ซึ่งภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงจะแตกอย่างสมบูรณ์ คำว่า “hemolytic streptococci” ใช้เฉพาะกับสายพันธุ์ Beta (β) hemolytic เท่านั้น Streptococci ที่ทำให้เกิดโรคส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มนี้

2.7.3 Gamma (γ) or nonhemolytic streptococci

เมื่อทดสอบโดยใช้ Blood agar พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Blood agar และบางครั้งเรียกว่า “indifferent Streptococci” รวมถึง *Streptococci (enterococci, Str faecalis)* และสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง เรียกว่า “enterococcus group”

เชื้อ *Streptococcus agalactiae* หรือที่รู้จักอีกชื่อว่า Group B streptococci (GBS) ซึ่งเป็น Beta (β) hemolytic streptococci เป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงและทำให้เกิดความพิการหรือเสียชีวิตในทารกแรกเกิด หญิงตั้งครรภ์ร้อยละ 10-30 ที่มีเชื้อนี้แฝงอยู่ที่ช่องคลอด และทารกหรืออาจเรียกว่าเป็นพาหะของเชื้อ GBS สามารถทำให้หญิงตั้งครรภ์เกิดการติดเชื้อในเอกสารนี้ทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อของเยื่อโพรงมดลูก ภูมุน้ำคร่ำอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด หรืออาจไม่พบเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อนี้ได้ ซึ่งการถ่ายทอดเชื้อจากมารดาสู่ทารกนั้นมักเกิดจากการติดเชื้อ

ระหว่างคลอด ในช่วงที่ทารกคลอดผ่านช่องคลอดที่มีเชื้อ GBS แฝงอยู่ได้ และเชื้อตัวนี้ยังเป็นภัยคุกคามสำคัญต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟาร์มเลี้ยงปลานิล ซึ่งความเสี่ยงของปลานิลต่อการติดเชื้อ GBS ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ซึ่งคาดว่าจะเลวร้ายลงในหลายพื้นที่เพาะเลี้ยงปลานิล เนื่องจากปัจจัยสองประการหลัก คือประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม, ภาวะโลกร้อน ส่งผลต่ออุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างของแหล่งน้ำ (Phuoc et al., 2021)

2.8 การจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

2.8.1 การย้อมแกรมแบคทีเรีย

การย้อมแกรมแบคทีเรียเป็นเทคนิคในการศึกษาจุลินทรีย์ โดยดูสีที่ย้อมติดกับตัวจุลินทรีย์ลักษณะการย้อมติดที่ตัวเซลล์เป็นแบบ differential strain ซึ่งเป็นการใช้สีย้อมมากกว่าหนึ่งชนิด สีจะติดตามไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์ แบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ ผู้ที่คิดค้นการย้อมสีวิธีนี้คือ Hans Christian Gram ในปี ค.ศ. 1884 ผลของการย้อมสีแกรมทำให้จำแนกแบคทีเรียออกได้ 2 กลุ่ม คือ (มณฑล, 2562)

1) แกรมบวก (Gram Positive) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีน้ำเงินม่วง

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการย้อมแกรม คือ หยด crystal violet เซลล์จะติดสีม่วงของ crystal violet, หยดสารละลายไอโอดีน สารละลายไอโอดีนรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง, หยดเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์สูญเสียน้ำ จึงเกิดการเหี่ยวหรือหดตัว ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดเล็ก สารประกอบของสีซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายออกมาได้ เซลล์จึงติดสีม่วง และสุดท้ายหยด Safranin เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีนี้ เซลล์ติดสีม่วงตามเดิม

2) แกรมลบ (Gram Negative) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแดง

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการย้อมแกรม คือ หยด crystal violet เซลล์จะติดสีม่วงของ crystal violet, หยดสารละลายไอโอดีน สารละลายไอโอดีนรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง, หยดเอทิลแอลกอฮอล์ 95% สารพวกลิปิดที่ผนัง เซลล์ถูกละลายออกไป ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น สารละลายของสีจึงสามารถละลายออกจากเซลล์ได้ เซลล์ไม่ติดสี และสุดท้ายหยด Safranin เซลล์ติดสีแดงของ Safranin

หลักเกณฑ์ในการย้อม มีดังนี้

1) เซลล์ปกติ (vegetative cell) เท่านั้นที่ติดสีแกรมบวกหรือแกรมลบ แต่ถ้าเซลล์เกินแตกขึ้นมาจะติดสีเฉพาะแกรมลบเท่านั้น

2) การย้อมแกรมต้องใช้ crystal violet และสารละลายไอโอดีนเสมอ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น และอยู่ภายใต้ลิขสิทธิ์ของศูนย์ฯ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3) แบคทีเรียเท่านั้นที่ให้ผลต่างกันในการย้อมแกรม แต่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จะติดสีย้อมแกรมอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เช่น เซลล์ยีสต์จะติดสีแกรมบวก
- 4) การย้อมสีแกรมสามารถเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแกรมลบได้ แต่สามารถเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมลบไปเป็นแกรมบวกได้
- 5) ไฮโดรฟลอสซิมติดสีแกรมลบเท่านั้น
- 6) แบคทีเรียแกรมบวกถูกล้างสียากกว่าแกรมลบ
- 7) สปอร์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature endospore) จะติดสีแกรมบวก ส่วนสปอร์ที่เจริญเต็มที่ (mature endospore) ไม่ติดสีแกรม

2.8.2 Oxidase Test

การทดสอบหา cytochrome C oxidase ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะไป oxidase สารเคมีทำให้เกิดสารประกอบสีม่วง (ศรวิน และศุภกิจ, 2558)

การอ่านปฏิกิริยา ผลบวก: เกิดการเปลี่ยนสีในเวลา 10 – 30 นาที
 ผลลบ: ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย

2.8.3 Catalase Test

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มี catalase enzyme ซึ่งจะสามารถเปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็น O_2 และ H_2O ดังสมการ (ศรวิน และศุภกิจ, 2558)



การอ่านปฏิกิริยา ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้น
 ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

ข้อควรระวัง การทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่ควรนำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเม็ดเลือดแดง เช่น Sheep blood agar (SBA) มาทำการทดสอบ เพราะอาจเกิดผลบวกปลอม (False positive) ได้ เนื่องจากในขณะที่ย้ายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจมีเม็ดเลือดแดงปนเปื้อนมากับเชื้อ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับน้ำยา 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเป็นฟองก๊าซขึ้นได้

นอกจากนี้ไม่ควรใช้ Inoculating loop เชี่ยวเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายลงใน 3%

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่หยดไว้ก่อน เนื่องจากโลหะบางชนิด เช่น แพลทินัม (Platinum) สามารถทำปฏิกิริยากับ 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดเป็นฟองก๊าซได้ ดังนั้นควรเชียวเชื้อแบคทีเรียที่

ต้องการทดสอบมาป้ายลงบนแผ่นสไลด์ก่อน จึงหยดน้ำยา 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อทำการทดสอบ (ปิยะรัตน์, 2567)

2.8.3 OF Test (Oxidation fermentation test)

การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่มีการใช้น้ำตาลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic condition หรือ Oxidation) หรือขาดออกซิเจน (Anaerobic หรือ Faementation) หรือไม่ใช้น้ำตาลเลย

อ่านผลการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยดูการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าแบคทีเรียมีการใช้น้ำตาลภายใต้สภาวะขาดออกซิเจน จะเกิดเป็นกรดในทั้งสองหลอด (อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) ถ้าแบคทีเรียมีการใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจน จะเกิดกรดเฉพาะหลอดที่ไม่ได้ปิดหน้าด้วยพาราฟินเหลว ส่วนแบคทีเรียที่ไม่ใช้น้ำตาลเลย จะเจริญไม่ดีหรือไม่เจริญและไม่มี การสร้างกรด (ปณรัตน์, 2552)

2.8.4 การทดสอบด้วยอาหาร TSI (Triple Sugar Iron Agar)

TSI agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะเป็น slant (ส่วนเอียง) และลักษณะเป็น butt (ส่วนก้นหลอด) ใช้ทดสอบการย่อยน้ำตาลของแบคทีเรีย ซึ่งใน TSI จะประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือน้ำตาลกลูโคส แล็กโทส และน้ำตาลซูโครส (อัตราส่วนของน้ำตาลเท่ากับ 1:10:10) ตามลำดับ และมีเพปโตนเป็นแหล่งโปรตีน

การอ่านผล เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35–37 °C ครบ 18–24 ชั่วโมงแล้ว บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI จะสามารถอ่านผลการย่อยน้ำตาล การเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และ/หรือไฮโดรเจนจากการย่อยน้ำตาล และการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) ได้ ทั้งนี้ควรอ่านผลหลังจากบ่มเชื้อครบ 18–24 ชั่วโมง ถ้าอ่านผลเร็วกว่า 18 ชั่วโมงหรือนานกว่า 24 ชั่วโมง ผลที่ได้อาจจะไม่ถูกต้อง สำหรับการอ่านผลจะอ่านที่บริเวณผิวหน้า (slant) และบริเวณก้นหลอด (butt) ถ้ามีสีเหลืองแสดงว่าเกิดกรด (acid) สีแดงแสดงว่าเป็นด่าง (alkaline) สังเกต TSI ว่ามีรอยแตกหรือมีฟองอากาศแทรกอยู่หรือมีก๊าซดัน TSI ให้หลุดจากก้นหลอด แสดงว่าเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และ/หรือก๊าซไฮโดรเจน และสังเกต TSI ว่ามีสีดำหรือไม่ ถ้ามีสีดำแสดงว่ามีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งนิยมเขียนรายงานผล ดังนี้ A คือ acid, K คือ alkaline, N คือ no change, G (gas) คือ ก๊าซ CO₂ และ/หรือ H₂ และ H₂S คือ hydrogen sulfide (ตารางที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การเขียนรายงานผลการทดสอบด้วยอาหาร TSI

สีบน Slant	สีบน Butt	TSI มีรอยแตก/ มี ฟองอากาศแทรกอยู่/ มีก๊าซดัน TSI ให้หลุด จากกันหลุด	สีด้านบน TSI	การรายงานผล	รายงานผล แบบย่อ
สีเหลือง	สีเหลือง	ไม่พบ	ไม่พบ	acid slant/acid butt	A/A
สีแดง	สีเหลือง	ไม่พบ	ไม่พบ	alkaline slant/acid butt	K/A
สีเหลือง	สีเหลือง	พบ	ไม่พบ	acid slant/acid butt with gas	A/A, gas หรือ A/A, G
สีแดง	สีเหลือง	พบ	ไม่พบ	alkaline slant/ acid butt with gas	K/A, gas หรือ K/A, G
สีเหลือง	สีเหลือง	พบ	พบ	acid slant/acid butt with gas and H ₂ S	A/A, gas, H ₂ S หรือ A/A, G, H ₂ S
สีแดง	สีเหลือง	พบ	พบ	alkaline slant/ acid butt with gas and H ₂ S	K/A, gas, H ₂ S หรือ K/A, G, H ₂ S
สีแดง	สีเหลือง	ไม่พบ	พบ	alkaline slant/ acid butt H ₂ S	K/A, H ₂ S
สีแดง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่พบ	ไม่พบ	alkaline slant/no chang butt	K/N

ที่มา : ปิยะรัตน์ (2566)

ข้อควรระวังในการอ่านผล ในกรณีที่แบคทีเรียมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ปริมาณมาก สีดำที่เกิดขึ้นใน TSI อาจจะไปบดบังการอ่านผลของส่วนกันหลุด (butt) ดังนั้นต้องคำนึงไว้ว่าก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะถูกสร้างในสภาวะที่เป็นกรดเท่านั้น จึงให้รายงานผลในส่วนกันหลุดที่ไม่สามารถอ่านผลได้ว่าให้ผลเป็นกรด (acid butt; A)

การแปลผลการย่อยสลายน้ำตาล

แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีการย่อยสลายน้ำตาลและการใช้เพปโตนที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จากการย่อยสลายน้ำตาลจะได้กรด โดยอาจจะมีก๊าซ CO₂ และ/หรือ H₂ เกิดขึ้นด้วย ซึ่งการใช้

น้ำตาลที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหน้า (slant) จะเป็นแบบการใช้ออกซิเจน ส่วนที่ก้นหลอด (butt) จะเป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน สามารถแปลผลการย่อยสลายน้ำตาลบน TSI ได้ดังนี้

1) สีแดง-สีเหลือง (alkaline slant/acid butt; K/A)

แสดงว่าสามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียว โดยบริเวณผิวหน้า (slant) จะเป็นต่างเนื่องจากการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีออกซิเจน และมีการใช้เพปโทนซึ่งจะได้แอมโมเนียเกิดขึ้น ส่วนก้นหลอด (butt) จะเป็นกรดเนื่องจากการสลายน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

2) สีเหลืองทั้งหลอด (acid slant/acid butt; A/A)

แสดงว่าสามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส แล็กโทส และ/หรือซูโครสได้ โดยบริเวณผิวหน้า (slant) และก้นหลอด (butt) จะเป็นกรด เนื่องจากแบคทีเรียใช้น้ำตาลกลูโคสหมด และเปลี่ยนมาใช้น้ำตาลแล็กโทส และ/หรือซูโครสแทน ซึ่งมีปริมาณมากจึงย่อยสลายไม่หมด

3) สีแดงทั้งหลอด (alkaline slant/alkaline butt; K/K) หรือสีแดง-ไม่เปลี่ยนแปลง (alkaline slant/no change; K/N)

แสดงว่าไม่สามารถย่อยสลายทั้ง 3 ชนิด (น้ำตาลกลูโคส แล็กโทส และซูโครส) แต่จะใช้เพปโทนแทน ถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยเพปโทนได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและ/หรือไม่มีออกซิเจนจะทำให้บริเวณผิวหน้า (slant) และก้นหลอด (butt) เป็นกรด แต่ถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยเพปโทนได้เฉพาะในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้นจะทำให้บริเวณผิวหน้า (slant) เป็นกรด ส่วนก้นหลอด (butt) จะไม่เปลี่ยนแปลง (เปลี่ยนสี) (ปิยะรัตน์, 2566)

2.8.5 การทดสอบด้วยอาหาร Bile esculin (Bile esculin Agar Base)

การทดสอบความสามารถของเชื้อที่จะ hydrolyse esculin ให้เป็น esculin และ glucose ซึ่ง esculin ก็จะทำปฏิกิริยากับ Ferric ion ในอาหารเกิดตะกอนสีดำของ phenolic iron complex นอกจากนี้การทดสอบนี้ยังเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการทนต่อ bile (10-40%) ด้วย (มณฑล, 2560)

การอ่านผล ผลบวก: เกิดสีดำขึ้นบริเวณ slant หรือทั่วทั้งหลอด

ผลลบ: ไม่มีสีดำเกิดขึ้น

2.9 เทคนิคแลมป์ (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP)

เทคนิคแลมป์เป็นเทคนิคในการเพิ่มขยายยีนจะใช้อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 °C และใช้ปฏิกิริยา strand displacement ในการแยกสายดีเอ็นเอจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวเพื่อการเข้าจับของไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยการ

ทำงานของเอนไซม์ Bst DNA polymerase Primers ของวิธีการแลมป์ที่ใช้มีจำนวน 4 เส้น จะถูกออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายทั้ง 6 ตำแหน่ง ประกอบไปด้วย outer primers (F3 และ B3) มี

ความยาวประมาณ 17 - 21 base pairs (bp) และ inner primers (FIP = forward inner primer, BIP = backward inner primer) โดยที่ FIP ประกอบด้วย F1c กับ F2 และ BIP ประกอบด้วย B1c กับ B2 และความยาวของเส้นไพรเมอร์ inner primer (FIP และ BIP) มีความยาวประมาณ 40 – 50 base pairs ทำให้ใช้ primer ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อ target sequence ถึง 4 ตัว ซึ่งจะประกอบด้วย 6 ตำแหน่งของ target sequence นั้น ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่จำเพาะอย่างยิ่ง โอกาสการเกิดผลบวกปลอม (false positive) จึงน้อยมากจนแทบไม่มีเลย เทคนิคนี้ได้ถูกนำไปใช้เพื่อพัฒนาการตรวจไวรัสทั้งในคนและสัตว์เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไว (sensitive) จำเพาะ (specific) และเร็ว (Rapid) กว่าเทคนิค PCR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ถึง 10⁹ เท่า ในเวลาเพียง 1 ชั่วโมง ปฏิกิริยาของ LAMP จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ Bst DNA polymerase (รูปที่ 2.8)



2.9.1 กลไกการทำงานของเทคนิคแลมป์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ

1) Starting structure producing step เพื่อสร้าง stem-loop ทั้งสองข้างของยีน เป้าหมายการทำงานประกอบด้วยขั้นตอนย่อยต่าง ๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส DNA สายคู่จะอยู่ในสภาวะ dynamic equilibrium คือมีการจับกันแบบสายคู่ (double stranded DNA) และคลายบางส่วนเป็นสายเดี่ยว (single stranded DNA) ตลอดเวลา ทำให้ FIP primer มีโอกาสเข้าไป anneal กับ complementary sequence ของยีนเป้าหมายได้ (รูปที่ 2.9) จากนั้น DNA polymerase with strand displacement จะเริ่มทำงานเกิด displacing และแยกสายคู่ของดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว

ขั้นตอนที่ 2 มีการสร้าง DNA สายใหม่ขึ้น (สายที่ 1) (รูปที่ 2.9)

ขั้นตอนที่ 3 ต่อมา F3-Primer (outer primer) จะเข้าไปจับ (รูปที่ 2.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาคู่เท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่แจ้งชื่อผู้แต่งหรือหน่วยงานต้นฉบับ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

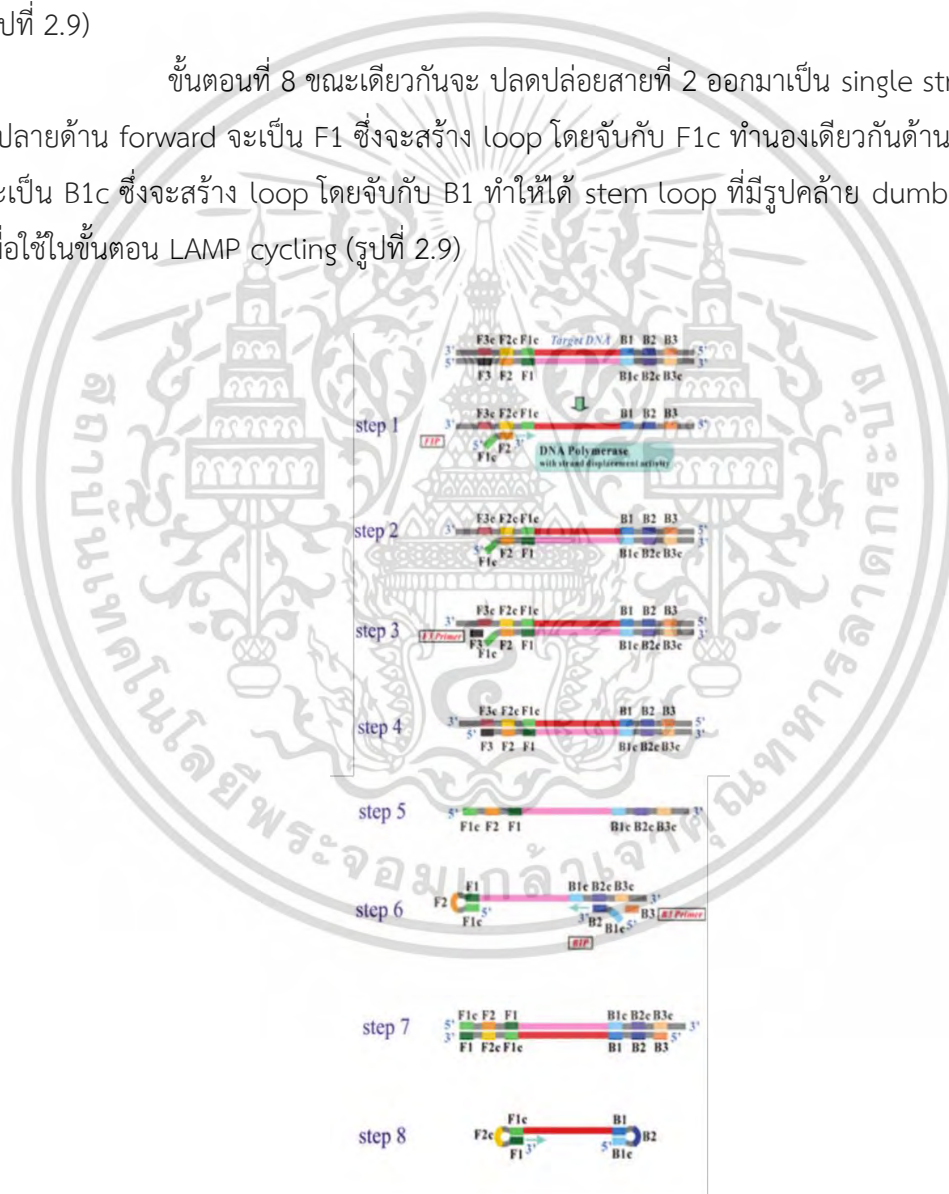
ขั้นตอนที่ 4 F3 Primer เริ่มสร้าง DNA สายใหม่โดยอาศัยคุณสมบัติของ DNA polymerase with strand displacement ได้ DNA ลักษณะเหมือน template (รูปที่ 2.9)

ขั้นตอนที่ 5 ขณะเดียวกันสายที่ 1 จะถูกปล่อยออกมาเป็น single strand (รูปที่ 2.9)

ขั้นตอนที่ 6 ทางด้าน 5' ของสายที่ 1 จะเป็นส่วนของ F1c (ปลายของ FIP) สามารถเข้าจับกับ F1 สร้าง loop ขึ้นทางด้าน Forward จากนั้น BIP primer จะเข้าจับและสร้าง DNA สายที่ 2 ขึ้นมา (รูปที่ 2.9)

ขั้นตอนที่ 7 ทำนองเดียวกัน B3 Primer จะเข้าไปจับและเริ่มสร้าง DNA สายใหม่ (รูปที่ 2.9)

ขั้นตอนที่ 8 ขณะเดียวกันจะ ปลดปล่อยสายที่ 2 ออกมาเป็น single strand ขณะนี้ที่ปลายด้าน forward จะเป็น F1 ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ F1c ทำนองเดียวกันด้าน backward จะเป็น B1c ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ B1 ทำให้ได้ stem loop ที่มีรูปร่างคล้าย dumbbell shape เพื่อใช้ในขั้นตอน LAMP cycling (รูปที่ 2.9)



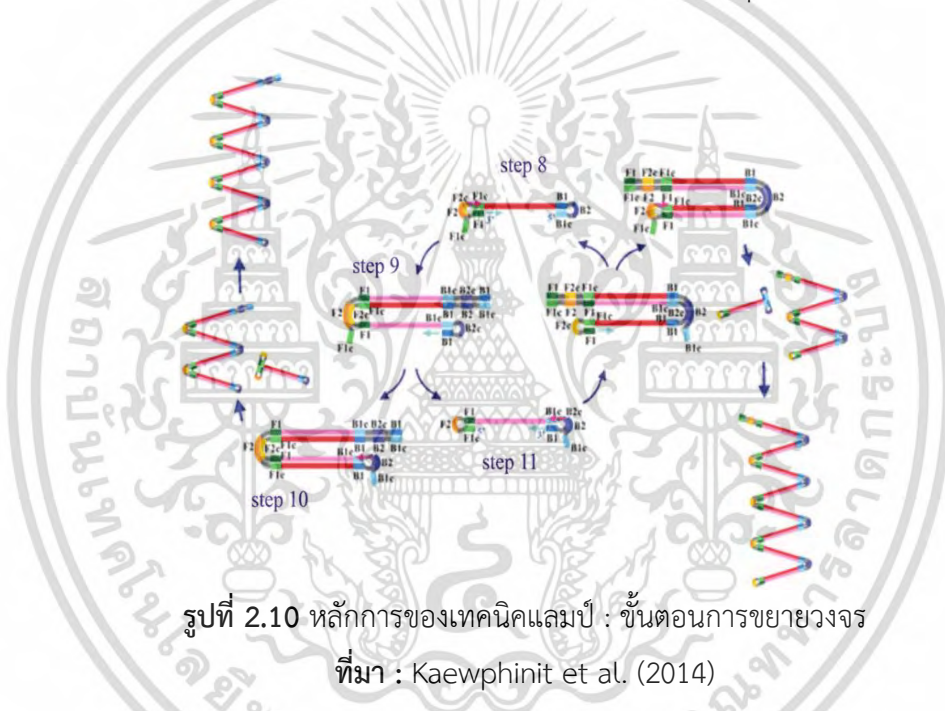
รูปที่ 2.9 หลักการของเทคนิคแลมป์ : โครงสร้างเริ่มต้นขั้นตอนการผลิต (ขั้นตอนที่ 1-8)

ที่มา : Kaewphinit et al. (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

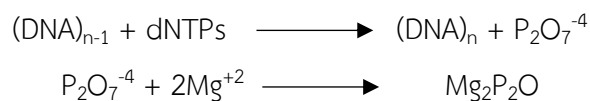
2) Cycle amplification step เป็นการเพิ่มขยายยีนจาก stem-loop โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase with strand displacement activity แสดงการทำงานดังรูปที่ 2.10

ขั้นตอนนี้สามารถเกิด cycle amplification step (8-11) ด้านปลายของ loop forward ก่อน คือสามารถมี self-primed strand displacement DNA synthesis สร้าง DNA จาก F1 ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง B1c ขณะเดียวกัน FIP primer ก็สามารถ hybridize กับ F2c ที่ loop forward (step 9) และสร้าง DNA สายใหม่ ได้เป็น 3 copies (step 10) และมี stem loop แบบ dumbbell (step 11) ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ (step 11) การทำงานจะต่อเนื่องกันตลอดเวลา วนเวียนกันอยู่ ทำให้ได้ target DNA ที่ยาวขึ้นหลายๆ copies ทำให้อัตราการสร้าง DNA ยิ่งมากขึ้น พบว่าสามารถสร้าง ได้ $10^9 - 10^{10}$ copies ภายในเวลา 15-60 นาที



รูปที่ 2.10 หลักการของเทคนิคแลมเบ้ : ขั้นตอนการขยายวงจร
ที่มา : Kaewphinit et al. (2014)

การตรวจสอบยีนที่เพิ่มขยายได้จากเทคนิคแลมเบ้สามารถทำได้หลายวิธีเช่น เจลอิเล็กโตร โพลีซิส นอกจากนี้สามารถดูความขุ่นที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากการเพิ่มขยายยีนในเทคนิคแลมเบ้ ทำให้มีสารpyrophosphate เป็น by product ที่สารดังกล่าวสามารถจับกับ magnesium กลายเป็น magnesium pyrophosphate (Hara-Kudo et Al., 2008) ซึ่งจะตกตะกอนเป็นสีขาว สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณการเพิ่มขยายยีนนั้นๆ ดังสมการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 วิธีการตรวจวัดยีนที่เพิ่มขยายขึ้น

1) การดูความขุ่น

วิธีการตรวจวัดนี้สามารถดูผลของปฏิกิริยาจากตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate โดยนำหลอดทดสอบไปปั่นให้ตกตะกอน ถ้าเกิดการเพิ่มขยายยีน จะพบตะกอนสีขาวมากดังรูปที่ 2.11

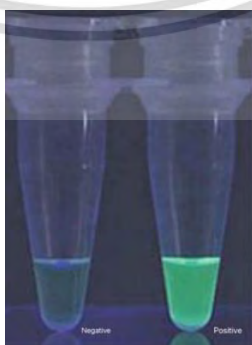


รูปที่ 2.11 ลักษณะความขุ่น

ที่มา : Yasuyoshi and Tsugunori (2009)

2) การดูสีฟลูออเรสเซนซ์

วิธีการตรวจวัดนี้ ใช้สารฟลูออเรสเซนซ์ เช่น SYBR Green I เติมหลังจากเกิดปฏิกิริยา LAMP แล้ว ถ้ามี product เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้น (สีส้ม) ให้กลายเป็นสีเขียวเมื่อดูภายใต้แสง UV (302 nm) ดังรูปที่ 2.12 หรืออาจดูภายใต้แสงธรรมชาติ วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องเปิดฝาหลอดทดสอบเพื่อเติมสารฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้ product มีโอกาสฟุ้งกระจายสูง เกิด carry over ได้ง่าย จึงได้มีผู้ดัดแปลงใช้สาร calcein แทน สารนี้สามารถเติมได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบ สาร calcein จะจับกับ magnesium ดังนั้นเมื่อมี product เกิดขึ้น จะมีสาร pyrophosphate เกิดขึ้นตาม สาร pyrophosphate จะแย่งจับกับ magnesium ทำให้สาร calcein เป็นอิสระจึงให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้รูปที่ 2.12 การเรืองแสงที่เกิดจากการใช้สารฟลูออเรสเซนซ์ที่ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ที่มา : Yasuyoshi and Tsugunori (2009) สารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การใช้เจลอิเล็กโตรโพลีซิส

วิธีการตรวจวัดนี้สามารถนำ product จากเทคนิคแลมป์ ไป run gel-electrophoresis เพื่อดูยีนที่เพิ่มขยายได้ product ที่ได้จะให้ band หลาย ๆ ขนาด ต่างจากปฏิกิริยาของ PCR product ทั่วไปที่ให้เพียง 1 band ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอน cycle amplification จะได้ขนาดของดีเอ็นเอแตกต่างกัน

2.9.3 ข้อดีของเทคนิคแลมป์

- 1) มีประสิทธิภาพในการเพิ่มขยายยีนได้สูง ภายใต้สภาวะเดียวกัน ที่อุณหภูมิประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส มีความไวสูงในการตรวจจับ DNA สามารถตรวจจับ DNA จำนวนน้อยๆ ได้ถึง 6 copies ในการตรวจหาเชื้อไวรัส เทคนิคแลมป์ มีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10-100 เท่า
- 2) LAMP มีความจำเพาะสูงเพราะต้องใช้ specific sites ถึง 6 ตำแหน่ง โดยใช้ primers ถึง 4 เส้น ดังนั้นจะช่วยลด background จากการเพิ่มขยายยีนที่ไม่จำเพาะได้
- 3) เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบ ถ้าสามารถสร้าง primer ที่เหมาะสมได้ ใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วไป เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block
- 4) การตรวจวัดผลการทดสอบง่าย ไม่ยุ่งยาก และสามารถเลือกวิธีการตรวจวัดได้ ปัจจุบันสามารถวัดแบบ real time ได้
- 5) สามารถใช้ร่วมกับปฏิกิริยา reverse transcription ก็จะสามารถเพิ่มขยายยีน RNA ได้ในประสิทธิภาพสูง

2.9.4 ข้อด้อยของเทคนิคแลมป์

- 1) การออกแบบ primer จะค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายถึง 6 ตำแหน่ง
- 2) ใช้ primer ในปริมาณที่มากกว่าปกติโดยเฉพาะ primer FIP และ BIP

2.10 ยีน *cfb*

ยีน *cfb* คือยีนที่มีอยู่ในเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* (GBS) เกือบทุกสายพันธุ์ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุลส่วนใหญ่จะกำหนดเป้าหมายไปยังบริเวณของ *cfb* เพื่อตรวจหา GBS (Thwe et al, 2022) โดยยีน *cfb* เป็นยีนที่เข้ารหัสโปรตีน CAMP factor ยีนนี้มีความสำคัญในการควบคุมการผลิต CAMP factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำลายเซลล์ของเจ้าบ้าน ในการศึกษาของ Zhang (2021) มีการระบุถึงบทบาทของยีน *cfb* และ

CAMP factor ในกระบวนการก่อโรคของ *Streptococcus* ในปลาชนิด โดย CAMP factor เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ช่วยให้แบคทีเรียสามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านและทำลายเนื้อเยื่อได้

CAMP factor (co-hemolysin) ถูกสร้างขึ้นจากยีน *cfb* เป็นโปรตีนนอกเซลล์ มีขนาด 23.5 กิโลดาลตัน (kDa) มีบทบาทสำคัญในการทำให้เชื้อ *S. agalactiae* (GBS) ก่อโรคได้มากขึ้น

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญญา และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคแลมป์ (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* สาเหตุของโรคจุดขาวในปลาน้ำจืด โดยทำการออกแบบ 4 ชุดไพรเมอร์ของแลมป์ ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วน 18S ribosomal RNA ของเชื้อ *I. multifiliis* ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที และปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อต่ำที่สุด ที่สามารถพบปฏิกิริยาได้คือ 5 pg สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของเทคนิคแลมป์ (LAMP) ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสของ 1.5 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลที่ย้อมด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เพียงเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลองก็สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *I. multifiliis* ได้ จึงสรุปได้ว่า เทคนิคแลมป์ (LAMP) สามารถตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคในภาคสนามได้

ศรุตวิงศ์ และคณะ (2556) ได้ทำการศึกษาโดยทำการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาแลมป์ เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อและแพะพื้นเมืองไทย โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุมแลมป์ กลุ่มแลมป์เสริมด้วย ethidium bromide (EB) ที่ความเข้มข้น 1 mM และกลุ่มแลมป์เสริมด้วย CuSO₄ (CS) ที่ความเข้มข้น 1 M พบว่า การตัดเพศในโคโดยการเสริม EB (100.0%) ให้ผลดีกว่าการเสริมด้วย CS (74.3%) และกลุ่มควบคุม (57.2%) ($P < 0.01$) ความแม่นยำในโคโดยการเสริม EB (42.5%) สูงที่สุด รองลงมา คือ การเสริม CS (35.0%) และกลุ่มควบคุม (22.5%) ($P > 0.05$) การตัดเพศในแพะโดยการเสริม EB (77.9%) สูงที่สุด รองลงมา คือ การเสริม CS (61.1%) และกลุ่มควบคุม (38.9%) ($P > 0.05$) ความแม่นยำในแพะโดยการเสริม CS (50.0%) สูงที่สุด รองลงมา คือ การเสริม EB (30.8%) และกลุ่มควบคุม (19.2%) ($P > 0.05$) ดังนั้น สรุปได้ว่า 1) การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาแลมป์โดยการเสริม EB ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มความแม่นยำในการตัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ 2) การเสริม CS ที่ความเข้มข้น 1 M ไม่สามารถเพิ่มความแม่นยำในการตัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อและแพะได้

จิตรลัดดา และคณะ (2554) ได้พัฒนาชุดตรวจสำหรับค้นหาเชื้อ Human papillomavirus type 58 ในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งปากมดลูก โดยใช้เทคนิคแลมป์ (LAMP) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่ที่ 63°C ใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ผลการตรวจสามารถอ่านได้ด้วยตาเปล่าจากความขุ่นที่เกิดขึ้น โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ เพียงแค่ใช้ water bath สำหรับการปรับอุณหภูมิก็เพียงพอ จากการศึกษาพบว่าเทคนิคแลมป์ (LAMP) มีความไวและความจำเพาะสูงต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเทียบเท่ากับเทคนิค nested PCR และสามารถตรวจพบดีเอ็นเอ

เป้าหมายในตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำถึง 10 copies เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกพบว่าผลตรวจสอดคล้องกันทุกราย ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้มีความรวดเร็ว แม่นยำ ราคาเหมาะสม และลดแรงงาน ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ HPV ในห้องปฏิบัติการได้

Gwak et al. (2024) ได้ทำการศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจจับ *Leuconostoc citreum* ณ จุดตรวจอย่างรวดเร็วโดยใช้เทคนิคแลมป์ (LAMP) และชุดไพรเมอร์แลมป์ที่ออกแบบมาด้วยความจำเพาะสูง โดยสามารถแยกแยะเฉพาะสายพันธุ์ที่ต้องการเท่านั้น จากการทดสอบกับ 76 สายพันธุ์ นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังมีความไวในการตรวจจับ DNA ปริมาณเพียง 2 pg และเพื่อประเมินความสามารถในการประยุกต์ใช้ของเทคนิค LAMP ได้ทำการเลือกผลิตภัณฑ์แปรรูปที่หลากหลายจำนวน 20 ชนิด ผลการวิจัยยืนยันว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจจับ *L. citreum* ได้อย่างสำเร็จและแม่นยำภายใน 35 นาที นอกจากนี้ ใช้ตัวอย่างที่มีการเติม *L. citreum* เพื่อกำหนดขีดจำกัดการตรวจจับ พบว่าสามารถตรวจจับ *L. citreum* ได้สูงถึง 10^2 หรือ 10^3 CFU/mL ดังนั้นเทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นวิธีการตรวจจับ *L. citreum* ณ จุดตรวจที่รวดเร็ว มีความจำเพาะ แม่นยำ และเหมาะสมสำหรับใช้กับผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ

Shi et al. (2024) ได้ทำการศึกษาการตรวจหา *Rahnella aquatilis* ในปลา โดยใช้เทคนิค real-time quantitative PCR (RT-qPCR) และเทคนิคแลมป์ (LAMP) นักวิจัยได้พัฒนาไพรเมอร์เฉพาะ สำหรับยีน outer membrane protein (OmpA) ของ *Rahnella aquatilis* และปรับปรุงระบบการทดสอบ โดยใช้พลาสมิด recombinant pMD18-T ที่มีลำดับยีน OmpA ผลการศึกษาพบว่า เทคนิค RT-qPCR และ LAMP สามารถตรวจจับ *Rahnella aquatilis* ได้อย่างแม่นยำ ด้วยความจำเพาะ 100% ค่าความไวต่ำสุดของเทคนิค RT-qPCR และ LAMP อยู่ที่ 2.3 copies/ μ L และ 2.3×10^1 copies/ μ L ตามลำดับ เทคนิค RT-qPCR และ LAMP ใช้เวลาในการทดสอบ 30 นาที และ 40 นาที ตามลำดับ ดังนั้นเทคนิค RT-qPCR และ LAMP สำหรับการตรวจหา *Rahnella aquatilis* ในปลา มีความรวดเร็ว แม่นยำ และสามารถใช้เป็นเครื่องมือ ในการวินิจฉัย และควบคุมโรค ที่เกิดจาก *Rahnella aquatilis* ในปลา ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Neelima et al. (2023) ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ (LAMP) สำหรับการตรวจจับ *Listeria monocytogenes* อย่างรวดเร็วในปลา โดยเทคนิคแลมป์ (LAMP) นี้มุ่งเป้าไปที่ยีนฮีโมไลซิน (hemolysin gene) และมีการเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมและเทคนิค real time PCR (qPCR) ทดลองเทคนิคแลมป์ (LAMP) และ qPCR โดยใช้ DNA ที่สกัดจากปลาที่เติมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ

เทคนิคแลมป์ (LAMP) และ qPCR กับเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ประเมินความจำเพาะของเทคนิคทั้งสาม โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใกล้เคียง นำเทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ปรับให้เหมาะสม

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปใช้กับตัวอย่างปลาจากแหล่งจริง 204 ตัว เปรียบเทียบความแม่นยำของเทคนิคแลมป์ (LAMP) กับเทคนิคอื่น ๆ ผลที่ได้ คือความไวในการตรวจจับของเทคนิคแลมป์ (LAMP) และ qPCR มีค่าใกล้เคียงกัน โดยสามารถตรวจจับ *Listeria monocytogenes* ได้ที่ความเข้มข้น 9.6×10^1 CFU ml⁻¹ จากน้ำซूप และ 8×10^2 CFU ml⁻¹ จากเนื้อปลาที่เติมเชื้อ เทคนิค PCR แบบดั้งเดิมมีความไวในการตรวจจับต่ำกว่า โดยสามารถตรวจจับ *Listeria monocytogenes* ได้ที่ความเข้มข้น 9.8×10^2 CFU ml⁻¹ จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และ 8×10^4 CFU ml⁻¹ จากเนื้อปลาที่เติมเชื้อ เทคนิคทั้งสามมีความจำเพาะ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใกล้เคียง เมื่อนำเทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ปรับให้เหมาะสมไปใช้กับตัวอย่างปลาจากแหล่งจริง 204 ตัว พบว่ามีความแม่นยำ 70.59% เมื่อเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน (gold standard) ในขณะที่เทคนิค PCR แบบดั้งเดิมมีความแม่นยำเพียง 52.94% อย่างไรก็ตาม การเพิ่มระยะเวลาการเพาะเชื้อของตัวอย่างที่ผลตรวจแลมป์เป็นลบ (negative) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มความไวในการตรวจจับได้ถึง 100% เทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ปรับให้เหมาะสมสามารถตรวจจับตัวอย่างปลาที่ผลตรวจเป็นลบ (negative) ด้วยเทคนิคเพาะเชื้อได้ทั้งหมด แสดงให้เห็นความจำเพาะในการตรวจจับ 100% เทคนิคแลมป์ (LAMP) ใช้เวลาน้อยที่สุดในการตรวจจับเมื่อเทียบกับเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมและ qPCR เทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ปรับให้เหมาะสมนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือตรวจจับ *Listeria monocytogenes* ในปลาได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และสะดวก ช่วยในการควบคุมความปลอดภัยของอาหารทะเลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Mendoza-Avilés et al. (2021) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคแลมป์ (LAMP) เพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำในเนื้อเยื่อของหอยนางรม (*Crassostrea* spp.) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงในเม็กซิโก โดยได้รวบรวมตัวอย่างหอยนางรมและกุ้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อจากฟาร์มต่างๆ บนชายฝั่งตะวันตกเฉียงเหนือของเม็กซิโก เพื่อนำมาใช้ในการปรับมาตรฐานเทคนิคแลมป์ (LAMP) และได้คัดเลือกยีนเป้าหมายที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์ชุดไพรเมอร์จำนวนมากในขั้นตอนแรก และเลือกชุดไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อตัวอย่างจากเม็กซิโกได้สำเร็จ ทำการปรับสภาวะปฏิกิริยาแลมป์สำหรับเชื้อโรคแต่ละชนิดด้วยชุดไพรเมอร์ที่เลือก โดยใช้การไล่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 61 ถึง 65 °C ความเข้มข้นของ DNA ตั้งแต่ 2.5 pg ถึง 250.0 ng และระยะเวลาปฏิกิริยาตั้งแต่ 10 ถึง 60 นาที การศึกษานี้ได้สร้างกระบวนการวินิจฉัยสำหรับตรวจหาเชื้อโรคในหอยนางรมและกุ้งจากเม็กซิโก การวินิจฉัยและรักษาเชื้อโรคในระยะเริ่มต้นสามารถลดการแพร่ระบาดของโรคในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้อย่างมาก

GAO et al. (2010) ได้ศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจหา *Vibrio anguillarum* โดยใช้เทคนิคแลมป์ (LAMP) ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยไม่ต้องใช้เครื่องปั่นความร้อน (thermal cycler) บริเวณที่คงอยู่ของยีน metalloproteinase (empA) ของ *V. anguillarum* ถูกเอกสารนี้ใช้เป็นเป้าหมายในการออกแบบไพรเมอร์ ชิ้นส่วนของยีน empA ถูกขยายที่อุณหภูมิ 65°C ในสภาวะไม่ว่ากรณีที่มีส่วนผสมของไพรเมอร์และเอนไซม์ Bst DNA polymerase ในการทดสอบแลมป์ที่ปรับให้

เหมาะสม สามารถตรวจจับ DNA ของ *V. anguillarum* ได้ 6.7 pg ใช้เชื้อแบคทีเรีย *V. anguillarum* 6 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่ *V. anguillarum* 17 สายพันธุ์ในการศึกษาประเมินความจำเพาะของสายพันธุ์ของไพรเมอร์ ผลปรากฏว่าเชื้อ *V. anguillarum* ทั้ง 6 สายพันธุ์ให้ผลบวกในการทดสอบแลมป์ นอกจากนี้ วิธีนี้ยังได้รับการยืนยันในปลาที่ติดเชื้อ *V. anguillarum* อีกด้วย วิธีการแลมป์นี้มีความไวในการตรวจหา *V. anguillarum* มากกว่า PCR และมีความจำเพาะของสายพันธุ์ที่ดี ดังนั้นวิธีการแลมป์จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหา *V. anguillarum* อย่างรวดเร็ว ทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม

Yeh et al. (2006) ได้ศึกษาการตรวจจับ *Flavobacterium columnare* ในปลาสลิดหัวมัน (*Ictalurus punctatus*) อย่างรวดเร็วและแม่นยำด้วยเทคนิคแลมป์ (LAMP) ออกแบบชุดไพรเมอร์ 4 ตัว (2 ตัวนอก 2 ตัวใน) เพื่อจำแนกยีน 16S ribosomal RNA ของเชื้อโรคนี้โดยเฉพาะ เตรียมแม่แบบ DNA ของแบคทีเรียด้วยวิธีการไลซิสความร้อนในสารละลายไลซิส ทำการขยายส่วนยีนที่ต้องการที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ยีนที่ขยายด้วยการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส และตรวจจับด้วยการย้อมเจลด้วยเอทิดิอัมโบรไมด์ นอกจากนี้ ยังมีการทดลองเทคนิค PCR ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ามีการขยายแบบต้นโดขนาด 204 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน 16S ribosomal RNA ของ *Fl. columnare* ชัดจำกัดการตรวจจับของเทคนิค LAMP เทียบเคียงกับ PCR ในการทดลองกับ DNA ที่เตรียมไว้ นอกจากนี้ เทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ปรับให้เหมาะสมนี้สามารถตรวจจับยีน 16S ribosomal RNA ของ *Fl. columnare* ในปลาสลิดหัวมันที่ติดเชื้อได้ ดังนั้นเทคนิคแลมป์ (LAMP) เป็นเทคนิคที่รวดเร็ว แม่นยำ เฉพาะเจาะจง ใช้งานง่าย และคุ้มค่าสำหรับการตรวจจับ *Fl. columnare* ในปลาสลิดหัวมัน จึงเหมาะสำหรับการวินิจฉัยโรคคอล์มনারิสอย่างรวดเร็วในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาและภาคสนาม

Savan et al. (2004) ได้ศึกษาวิธีการวินิจฉัยโรคเอ็ดเวิร์ดซีเอลโลซิสในปลาญี่ปุ่น (*Paralichthys olivaceus*) โดยใช้เทคนิคแลมป์ (LAMP) ในการตรวจจับ DNA นักวิจัยได้ออกแบบชุดไพรเมอร์ 4 ตัวที่สามารถจับกับยีนเฮโมไลซินของ *Edwardsiella tarda* ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นต่อความรุนแรงของโรค เงื่อนไขสำหรับการตรวจจับด้วยแลมป์ ได้รับการปรับให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถตรวจจับ *E. tarda* ได้ภายใน 45 นาที ที่อุณหภูมิ 65°C และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจจับแบบดั้งเดิม วิธีแลมป์ใหม่นี้มีความไวและเฉพาะเจาะจงมากกว่าอย่างมาก วิธีนี้สามารถตรวจจับ *E. tarda* ได้อย่างแม่นยำจากตัวอย่างต่างๆ ของปลาญี่ปุ่นที่ติดเชื้อ เช่น ไต ม้าม และน้ำทะเลที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ยังไม่มีการขยายพันธุ์ของยีนเฮโมไลซินเป้าหมายในแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องอื่นๆ ดังนั้นการพัฒนาวิธีแลมป์ใหม่นี้ถือเป็นความก้าวหน้าที่สำคัญ เนื่องจากช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรคเอ็ดเวิร์ดซีเอลโลซิสได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งจะช่วยควบคุมการระบาดของโรค ลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างปลานิล

ซื้อปลานิลจากร้านขายปลา ในตลาดหัวตะเข้ ทำการชั่งน้ำหนัก และวัดขนาดตัวอย่างปลานิล

3.2 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างปลานิล

- 1) เครื่องชั่ง
- 2) ไม้บรรทัด
- 3) ถังมือยาง
- 4) ถาดผ้าตัด
- 5) ถังร้อนขนาด 12x18

3.2.2 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลา

- 1) ชุดอุปกรณ์ผ้าตัดปลา
- 2) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3) ขวดแอลกอฮอล์ 95%
- 4) ไฟแช็ค
- 5) สำลี
- 6) กระจกยทึบ
- 7) ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 8) ที่วางหลอดทดลอง
- 9) จานเพาะเชื้อ
- 10) ตู้อบเชื้อ
- 11) ตู้นึ่งเชื้อ

3.2.3 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

- 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2) ไฟแช็ค
- 3) กระจกยทึบ
- 4) ห่วงเขี่ยเชื้อ

5) ที่วางหลอดทดลอง

6) จานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดยกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุที่แปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 7) ตู๊ปลอดเชื้อ
- 8) ตู๊ปม
- 9) แอลกอฮอล์ 70%

3.2.4 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

3.2.4.1 การย้อมแกรม

- 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2) ไฟแช็ค
- 3) ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 4) ที่วางหลอดทดลอง
- 5) สไลด์
- 6) กระจกเข็ดเลนส์
- 7) กล้องจุลทรรศน์
- 8) แอลกอฮอล์ 95%
- 9) Crystal violet
- 10) Gram Iodine
- 11) Gram Safranin O
- 12) Immersion oil

3.2.4.2 Oxidase Test

- 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2) ไฟแช็ค
- 3) ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 4) ที่วางหลอดทดลอง
- 5) กระจกกรอง
- 6) Oxidase reagent

3.2.4.3 Catalase Test

- 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2) ไฟแช็ค
- 3) ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 4) ที่วางหลอดทดลอง
- 5) สไลด์
- 6) Catalase reagent

3.2.4.4 OF Test (Oxidation fermentation test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อสิทธิพิเศษใด ๆ เมื่อผู้ยืมหรือเห็นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์

- 2) ไฟแช็ค
- 3) ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 4) เข็มเขี่ยเชื้อ
- 5) หลอดทดลอง
- 6) ที่วางหลอดทดลอง
- 7) ตู้ป่น
- 8) oil

3.2.4.5 ทดสอบด้วยอาหาร TSI

- 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2) ไฟแช็ค
- 3) เข็มเขี่ยเชื้อ
- 4) หลอดทดลอง
- 5) ที่วางหลอดทดลอง
- 6) ตู้ป่น

3.2.4.6 ทดสอบด้วยอาหาร Bile Esculin Agar Base

- 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2) ไฟแช็ค
- 3) เข็มเขี่ยเชื้อ
- 4) หลอดทดลอง
- 5) ที่วางหลอดทดลอง
- 6) ตู้ป่น

3.2.5 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 1) เพลทเชื้อที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ
- 2) ถังมือยาง
- 3) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 4) ไฟแช็ค
- 5) ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 6) ที่วางหลอดทดลอง
- 7) หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 ml
- 8) เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 9) ชุด GenUP™ gDNA Kit (biotechrabbit GmbH Berlin, Germany)

(ประกอบด้วย Buffer LYSIS LG, Proteinase K, Buffer BINDING BD, Mini Filters, Collection Tubes, Buffer WASH C, Buffer ELUTION, Elution Tubes)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งนี้หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างสูง

10) Auto pipet ขนาด 200 μ l และ 1,000 μ l

11) pipette tip ขนาด 200 μ l และ 1,000 μ l

12) อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.2.6 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

1) เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (BioDrop DUO UV/Vis)

2) น้ำกลั่น

3) สารที่ใช้ในการละลายตะกอนดีเอ็นเอ

4) Auto pipet ขนาด 10 μ l

5) pipette tip ขนาด 10 μ l

6) กระจกชั่งเลนส์

3.2.7 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแลมบ์

1) หลอดพีซีอาร์

2) หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 ml

3) ที่วางหลอดทดลอง

4) ที่วางหลอดทดลอง

5) ถังมือยาง

7) pipette tip ขนาด 10 μ l

8) Auto pipet ขนาด 10 μ l

9) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

10) กล้องน้ำแข็ง

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Tryptase Soy Agar (TSA)

2) OF Basal medium

3) Triple Sugar Iron Agar (TSI)

4) Bile Esculin Agar Base

3.4 เชื้อที่ใช้ทดสอบ

Streptococcus agalactiae

Staphylococcus sp.

Lactococcus garvieae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลานิล

แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลานิลจากอวัยวะภายใน บริเวณตับ ม้าม และไต โดยเช็ดทำความสะอาด ผิวหนังปลา และทำการเปิดช่องท้องของปลา โดยใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสอดเข้าไปบริเวณรู ทวารด้านล่าง และตัดตามแนวขวางของลำตัว (โดยต้องระวังไม่ให้ไปโดนอวัยวะภายใน) และใช้สำลี ชุบแอลกอฮอล์ 70% เช็ดบริเวณตำแหน่งเปิดอวัยวะเป้าหมาย จากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเปิดผ่านผิวหนังจนสามารถนำลูปเขี่ยเข้าถึงอวัยวะเป้าหมาย แล้วนำลูปที่เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วมา เขี่ยเชื้อจากตับ ม้าม และไต และใช้ลูปนั้นเขี่ย (Streak) ลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากนั้นนำ เพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นทำการ เลือกลโคไลที่น่าสนใจ และนำไป Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพลทใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็น เวลา 1-2 วัน

3.6 จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

3.6.1. การย้อมแกรม

เตรียมตัวอย่างกระจกสไลด์ โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ที่สะอาด 1 หยด เขี่ยเชื้อ แบคทีเรียจากโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการละเลงเชื้อลงในหยดน้ำให้กระจายให้ทั่วผิวสไลด์ ทิ้งให้แห้งยึดเชื้อตัวอย่างกับสไลด์ โดยลนเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปย้อมแกรม

ขั้นตอนการย้อมแกรม เริ่มจากหยด Gram crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้ง ไว้นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นหยด Gram iodine ลงบนสไลด์ให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น และล้างสีด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที แล้ว จึงตามด้วยน้ำกลั่น แล้วหยด Gram safranin O ลงบนสไลด์ให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้ว ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.6.2. Oxidase Test

ทำการหยดสารละลาย Oxidase ลงบนกระดาษทดสอบ แล้วเขี่ยเชื้อจากเพลทอาหาร และเขี่ยเชื้อลงกระดาษทดสอบนั้น

3.6.3. Catalase Test

ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีมาเขี่ยบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% Hydrogen peroxide ลงบนแบคทีเรีย

3.6.4. OF Test (Oxidation fermentation test)

เตรียม OF media ในหลอดทดลอง เชื้อเชื้อแบคทีเรีย จากโคโลนีด้วย Needle ชนิดละ 2 หลอด ด้วยการ Stab ลง OF media แล้วเติม oil ลงในหลอดทดลอง 1 หลอด เป็น Fermentative tube ส่วนอีกหลอดหนึ่งเป็น Oxidative tube นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.5. ทดสอบด้วยอาหาร TSI

เตรียมอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) ในหลอดทดลอง ทำการเชื้อเชื้อโดยใช้ Needle แล้ว streak บนผิวหน้าอาหาร จากนั้น stab ลงไปในอาหาร ประมาณครึ่งหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.6. ทดสอบด้วยอาหาร Bile Esculin Agar Base

เตรียมอาหาร Bile Esculin Agar Base ในหลอดทดลอง ทำการเชื้อเชื้อโดยใช้ Needle แล้ว streak บนผิวหน้าอาหาร จากนั้น stab ลงไปในอาหาร ประมาณครึ่งหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7 การสกัดดีเอ็นเอ

3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโดยทำตามวิธีที่แนะนำของชุด kit โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเหลวปริมาณ 1 ml ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 ml และใช้ลูปที่เผาไฟแล้วเช็ดบนเพลทอาหาร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 ml (ไม่เกิน 5×10^6 เซลล์) แล้วปั่นเหวี่ยงเซลล์เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 7,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที และเทน้ำส่วนใสออก เก็บเฉพาะตะกอนเซลล์ จากนั้นเติม Buffer LYSIS LG 200 μ l และ Proteinase K 25 μ l ลงในหลอดตะกอนเซลล์ ผสมให้เข้ากันโดย vortex 5 วินาที แล้วนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าตะกอนเซลล์จะละลายจนใส โดยทำการ vortex 3-4 ครั้งระหว่างการบ่ม จากนั้นเติม Buffer BINDING BD 200 μ l ลงในหลอดแล้วผสมให้เข้ากันโดยการ vortex หรือ ปิเปตขึ้น-ลงหลายๆ ครั้ง แล้วเทสารละลายลงในช่องกรองขนาดเล็ก (Mini Filter) ที่วางในหลอดเก็บตัวอย่าง (Collection Tube) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทน้ำส่วนใสออก และเปลี่ยนหลอดเก็บตัวอย่าง (Collection Tube) ทำการเติม Buffer WASH C 700 μ l ลงใน Mini Filter ที่อยู่ในหลอดเก็บตัวอย่างใหม่ (Collection Tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำส่วนใสออก และใช้หลอดเก็บตัวอย่างอันเดิม (Collection Tube) ทำซ้ำโดยเติม Buffer WASH C อีก 700 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 2 นาที แล้วเทน้ำส่วนใสออก และทิ้ง Collection Tube เก็บช่องกรองขนาดเล็กไว้ (Mini Filter) จากนั้นวางช่องกรองขนาดเล็กไว้ (Mini Filter) ลงในหลอดชะล้างอันใหม่ (Elution Tube) และเติม Buffer ELUTION 20-50 μ l ลงตรงกลางช่องกรอง

ขนาดเล็ก (Mini Filter) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที สุดท้ายจะได้ดีเอ็นเอ ที่อยู่ในหลอดชะล้าง (Elution Tube)

3.7.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ (Tissue)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อโดยทำตามวิธีที่แนะนำของชุด kit โดยในการทดลองนี้จะทำการสกัดเนื้อเยื่อจากเหงือกปลาผสมกับเซลล์แบคทีเรีย โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ได้เตรียมไว้ มาปรับความเข้มข้นให้มีค่าเท่ากับ 0.5 ของมาตรฐานแม็กฟาร์แลนด์ (McFarland standard) ซึ่งจะได้ค่าประมาณ 1.5×10^8 CFU/mL จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียทีละ 10 เท่า ไปจนถึง 1.5×10^1 จะได้เชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 1.5×10^8 ถึง 1.5×10^1 CFU/mL และตัดเหงือกปลา 25 mg นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งและเติมเชื้อแบคทีเรียเพียง 0.1 ml หรือ 100 μ l ต่อเหงือกปลา 25 mg ซึ่งสุดท้ายแล้วจะได้เชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ความเข้มข้น 1.5×10^7 ถึง 1.5×10^8 CFU/ml ต่อเหงือกปลา 25 mg แล้วดูดใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม Buffer LYSIS LG 400 μ l และ Proteinase K 25 μ l ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันโดย vortex 5 วินาที แล้วนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือจนกว่าสารละลายจะใส โดยทำการ vortex 3-4 ครั้ง ระหว่างการบ่ม จากนั้นเติม Buffer BINDING BD 200 μ l ลงในหลอดแล้วผสมให้เข้ากันโดยการ vortex หรือ ปิเปตขึ้น-ลงหลายๆ ครั้ง แล้วเทสารละลายลงในช่องกรองขนาดเล็ก (Mini Filter) ที่วางในหลอดเก็บตัวอย่าง (Collection Tube) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทน้ำส่วนใสออก และเปลี่ยนหลอดเก็บตัวอย่าง (Collection Tube) ทำการเติม Buffer WASH C 700 μ l ลงในช่องกรองขนาดเล็ก (Mini Filter) ที่อยู่ในหลอดเก็บตัวอย่างอันใหม่ (Collection Tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำส่วนใสออก และใช้หลอดเก็บตัวอย่างอันเดิม (Collection Tube) ทำซ้ำโดยเติม Buffer WASH C อีก 700 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 2 นาที แล้วเทน้ำส่วนใสออก และทิ้งหลอดเก็บตัวอย่าง (Collection Tube) เก็บเฉพาะช่องกรองขนาดเล็กไว้ (Mini Filter) จากนั้นวางช่องกรองขนาดเล็ก (Mini Filter) ลงในหลอดชะล้างอันใหม่ (Elution Tube) และเติม Buffer ELUTION 20-50 μ l ลงตรงกลางช่องกรองขนาดเล็ก (Mini Filter) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที สุดท้ายจะได้ดีเอ็นเอ ที่อยู่ในหลอดชะล้าง (Elution Tube) โดยเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการเก็บรักษาระยะสั้น หรือที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับการเก็บรักษาระยะยาว

3.8 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ ทำด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ BioDrop DUO UV/Vis โดยทำการตั้งค่าที่หน้าจอเป็นการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ และทำการตั้งค่าเริ่มต้น (blank) โดยหยด elution buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลุมของเครื่อง BioDrop DUO UV/Vis และกดเซต blank ที่หน้าจอ จากนั้นใช้

กระดาษเช็ดเลนส์ซับ elution buffer ออก แล้วหยดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงใน หลุม และกดตรวจสอบดีเอ็นเอที่หน้าจอแล้วทำการบันทึกผล จากนั้นใช้กระดาษเช็ดเลนส์ซับ สารละลายดีเอ็นเอให้สะอาด แล้วทำการล้างหลุมหยดสารโดยหยดน้ำกลั่น ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และใช้กระดาษเช็ดเลนส์ซับให้สะอาด

3.9 ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

ในการทดลองนี้ ใช้ไพรมเมอร์จำนวนทั้งสิ้น 4 เส้น โดยเลือกใช้ไพรมเมอร์ตามงานวิจัยก่อนหน้า (Ke et al., 2014) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cfb* ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* (Ke et al., 2014)

ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
F3	AGTAATAGCCTCATTAAACCGG
B3	CTAGTGGCTGGTGCATTG
FIP	GCTCAAAAGCTTGATCAAGATAGC-TTTT-CTGTTCCCTGAACATTATCTTTG
BIP	TTACTTGATTTACCACTTGTGGAGT-TTTT-TTCACCAGCTGTATTAGAAGT

3.9.1 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาแลมบ์

ทำการทดลองโดยใช้ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cfb* ของเชื้อ *S. agalactiae* และทำปฏิกิริยาแลมบ์ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ 60°C 61°C 62°C 63°C 64°C และ 65°C เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาแลมบ์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาแลมบ์ ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร (μ l)

ส่วนผสมของปฏิกิริยาแลมบ์	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X ThermoPol Buffer	2.00	1X
MgSO ₄ (100 mM)	2.00	10 mM
dNTP Mix (25 mM)	1.12	1.4 mM
FIP/BIP Primers (10 μ M)	3.20	1.6 μ M
F3/B3 Primers (10 μ M)	0.40	0.2 μ M
<i>Bst</i> DNA Polymerase (8000 U/ml)	0.90	360 U/ml
Nuclease-free Water	6.38	

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนและการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีก ปริมาตรรวม 20.00

ทำปฏิกิริยาแลมบ์โดยนำส่วนผสมให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม *Bst* DNA Polymerase ลงไป 0.9 μ l แล้วนำไปทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ 60°C 61°C 62°C 63°C 64°C และ 65°C เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์แลมบ์มาตรวจสอบผลที่ได้ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์

3.9.2 การทดสอบความไวและประสิทธิภาพของเทคนิคแลมบ์

3.9.2.1 การศึกษาหาความไวของเทคนิคแลมบ์

ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์สำหรับยีน *cfb* ในการตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยเทคนิคแลมบ์ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่งจะนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ BioDrop DUO UV/Vis เพื่อให้ทราบความเข้มข้นเริ่มต้น แล้วทำการเจือจางที่ละ 10 เท่า (10-fold dilution) โดยสกัดได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นเท่ากับ 40 ng/ μ l แล้วทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 40, 4.0, 0.4, 0.004, 0.0004 ng/ μ l โดยใน 1 reaction ประกอบด้วย 20 μ l ซึ่งใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 4 μ l จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในการทำปฏิกิริยาเป็น 8, 8×10^{-1} , 8×10^{-2} , 8×10^{-3} , 8×10^{-4} , 8×10^{-5} ng/ μ l และนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยาแลมบ์ นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมบ์ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์

3.9.2.2 การศึกษาหาความจำเพาะของเทคนิคแลมบ์

ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับยีน *cfb* ของเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เท่ากันของเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปลานิลที่เป็นโรค ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Citrobacter* จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของแต่ละเชื้อไปตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ BioDrop DUO UV/Vis เพื่อให้ทราบความเข้มข้นเริ่มต้น และทำการเจือจางดีเอ็นเอทุกตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากัน และนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยาแลมบ์ แล้วนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมบ์ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์

3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิคแลมป์

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ (LAMP) ในการตรวจหา *Streptococcus agalactiae* ในเหงือกปลา ได้ทำการทดสอบโดยการเติมเชื้อในปริมาณที่ทราบลงในตัวอย่าง (Spike Test) โดยใช้เหงือกปลา 25 mg ผสมกับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 1.5×10^8 ถึง 1.5×10^1 CFU/ml โดยใส่เชื้อแบคทีเรีย 0.1 ml (100 μ l) ต่อเหงือกปลา 25 mg ทำให้ได้ความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ในเหงือกปลา 25 mg อยู่ที่ 1.5×10^7 ถึง 1.5×10^{-1} CFU/ml จากนั้นทำการสกัด DNA จากเหงือกปลาแต่ละตัวอย่าง และตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ BioDrop DUO UV/Vis เพื่อให้ทราบความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น และเจือจางดีเอ็นเอทุกตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากัน และนำไปทำปฏิกิริยาแลมป์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างปลานิลจากตลาดหัวตะเข้ ซอย ตลาดกระบ้ง 17 แขวงตลาดกระบ้ง เขตตลาดกระบ้ง กรุงเทพมหานคร 10520 ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขนาดของตัวอย่างปลานิล

	น้ำหนัก (g)	SL (cm)	TL (cm)
ตัวที่ 1	315	21.5	25.5
ตัวที่ 2	385	22.8	26
ตัวที่ 3	520	25	30

หมายเหตุ: SL = ความยาวมาตรฐานปลา วัดจากปลายสุดทางด้านหัวไปจนถึงเส้นดิ่งที่ลากลงมาตัดกับฐานครีบทงหรือปลายสุดของกระดูก hypural plate

TL = ความยาวทั้งสิ้น วัดจากปลายสุดทางด้านหัวไปจนถึงเส้นดิ่งที่ลากลงมาตัดกับปลายสุดของครีบทงส่วนที่ยาวที่สุด

4.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

หลังจากทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้ว และทำการเลือกเชื้อบริสุทธิ์มา 7 isolate ดังนี้ T1L1, T1L3, T1L4, T2L1, T3(1)L1, T3(1)L2, T3(1)S1 และ T3(1)S2 โดยนำทั้ง 7 isolate มาทดสอบทางชีวเคมีด้วยวิธีการย้อมแกรม, ส่องกล้องจุลทรรศน์, Oxidase Test, Catalase Test พบว่า T1L1, T1L3, T1L4 และ T2L1 เป็นแกรมบวก และมีลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ดังตารางที่ 4.2 จึงทำการนำเชื้อทั้ง 4 isolate ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริษัทยูทูไบโอไทยแลนด์ และนำเชื้ออีก 3 isolate มาทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติม ได้แก่ OF Test, ทดสอบด้วยอาหาร TSI และ Bile Esculin Agar Base ได้ผลดังตารางที่ 4.3 จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ Bergey's manual of systematic bacteriology Second Edition Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิล T1L1, T1L3, T1L4 และ T2L1

	ลักษณะโคโลนี	แกรม/รูปร่าง	Oxidase	Catalase
T1L1	กลม เล็ก ขาว ขอบเรียบ	+/กลมต่อกันเป็นสาย	-	-
T1L3	กลม ขาว ขอบเรียบ	+/กลม	-	+
T1L4	กลม ขาว ขอบเรียบ	+/กลม	-	-
T2L1	กลม เล็ก ขาว ขอบเรียบ	+/กลมต่อกันเป็นสาย	-	-

จากการทดสอบที่ส่งเชื้อทั้ง 4 isolate ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า T1L1 คือ *Streptococcus agalactiae*, T1L3 คือ *Staphylococcus* sp., T1L4 คือ *Lactococcus garvieae* และ T2L1 คือ *Streptococcus agalactiae*

ตารางที่ 4.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างปลานิล T3(1)L1, T3(1)L2, T3(1)S1 และ T3(1)S2

	ลักษณะโคโลนี	แกรม/รูปร่าง	Oxidase	Catalase	OF	TSI	Esculin
T3(1)L1	กลม ครีมน ขอบเรียบ	-/ท่อนสั้น	+	+	F	K/A	-
T3(1)L2	กลม ขาว ขอบเรียบ	-/ท่อนสั้น	-	+	F	A/A	-
T3(1)S1	กลม ครีมน ออก เหลือง อ่อนๆ ขอบเรียบ	-/ท่อนสั้น	+	+	-	K/K, H ₂ S	-

จากผลการทดสอบทางชีวเคมี และเปรียบเทียบผลกับ Bergey's manual of systematic bacteriology Second Edition Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria พบว่า T3(1)L1 คือ *Aeromonas* sp., T3(1)L2 คือ *Edwardsiella* sp. เอกสารนี้ และ T3(1)S1 คือ *Citrobacter* sp. งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่ทำการย้อมแกรมแล้วนำไปส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วพบว่า มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* จำนวน 4 isolate จึงทำการแยกเชื้อดังกล่าวให้บริสุทธิ์อีกครั้ง แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริษัทยูทูไปโอไทยแลนด์ ซึ่งจะได้ของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของไฟล์ fasta ประกอบไปด้วย 2 read ได้แก่ ฟังไพรเมอร์ 518F และ 800R หลังจากนั้นได้ทำการตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์จากการศึกษา ลักษณะของโครมาโตแกรม เมื่อเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 518F และ 800R ได้ขนาด 1,479 bp แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn โดยเข้าถึงได้จาก <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> พบว่าในตัวอย่างที่ 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ยืนยันได้ว่าตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ เป็นตัวอย่างของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (T1L1) มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 1,479 bp

>T1L1

```
TTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCG
ACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAC
GTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGA
GTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGGCTTTAAGAGATTAGCTTGCCGTCACCGG
CTTGCGACTCGTTGTACCAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA
TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATTACCGGCAGTCTCGCTAGAG
TGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTCTGCTCCGA
AGAGAAAGCCTATCTCTAGGCCGGTCAGAAGGATGTCAAGACCTGTAAGGTTCTTCG
CGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTT
TGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGG
CACTAAGCCCCGAAAGGGCCTAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTG GACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACC
AGAGAGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCCCTCATATATCTACGCATTTACCGCTACAC
ATGGAATTCACCTCTCCCCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAAAGCGTACAATG
GTTAAGCCACTGCCTTTAACTTCAGACTTAAAGAACC GCTGCGCTCGCTTTACGCCC
AATAAATCCGGACAACGCTCGGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA
GCCGTCCCTTTCTGGTTAGTTACCGTCACTTGGTAGATTTTCCACTCCTACCAACGTT
CTTCTCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT
CGGTACAGACTTCCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTG
GGCCGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGTATCGTCCG
CCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCTAATAACAACGCAGGTCCATCTCACAGTG
AAGCAATTGCTCCTTTTAAATAACTAACATGTGTTAATCACTCTTATGCGGTATTAGC
TATCGTTTCCAATAGTTATCCCCGCTATGAGGCGAGTTACCTACGCGTTACTCACCC
```

เอกสารนี้

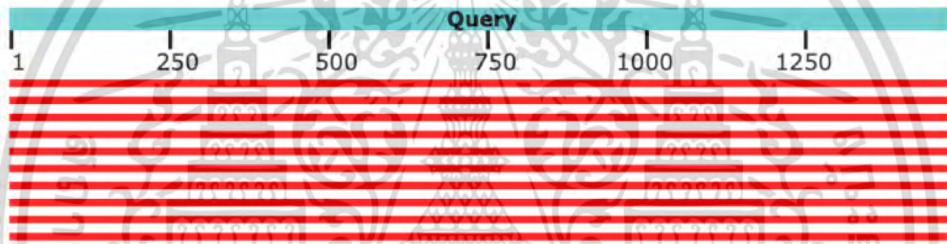
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GTTCGCAACTCATCAGTCTAGTGTAACACCAAACATCAGCGTTCTACTTGCATGTAT
TAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGC

ภายหลังจากการนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Abc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain 01173 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19120	100%	0.0	100.00%	2105299	CP053027.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain Sag153 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19081	100%	0.0	100.00%	2174504	CP036376.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain ZC0910 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19104	100%	0.0	100.00%	2064943	CP049938.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain TFJ0901 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19098	100%	0.0	100.00%	2080936	CP034315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain WC1535 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19109	100%	0.0	100.00%	2189728	CP016501.2
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain 573 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	16603	100%	0.0	100.00%	2059915	CP030845.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain B507 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19092	100%	0.0	100.00%	2082479	CP021771.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain B509 chromosome, complete genome	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19098	100%	0.0	100.00%	2060637	CP021769.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain NCTC6167 genome assembly, chromosome_1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	16382	100%	0.0	100.00%	2052456	LS483367.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain NCTC11930 genome assembly, chromosome_1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2732	19109	100%	0.0	100.00%	2063270	LS483342.1

Distribution of the top 69 Blast Hits on 10 subject sequences



รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (T1L1) โดยแสดงผล 10 ลำดับแรก ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียง ได้แก่เชื้อ *Streptococcus agalactiae* และมีค่า alignment scores ≥ 200

ตัวอย่างที่ 2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Staphylococcus sp.* ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันอยู่ที่ 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ยืนยันได้ว่าตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์เป็นตัวอย่างของเชื้อ *Staphylococcus sp.* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus sp.* (T1L3) มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 1,493 bp

>T1L3

```
CCCCCTGTAGATTCACCCCAATCATTTGTCCCACCTTCGACGGCTAGCTCCAAATG
GTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAG
CTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACCTTATGGGATTT
GCTTGACCTCGCGTTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
CAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCACCTTCCCTCCGGTTTTGTCAC
CGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGC
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่หรือใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาต

TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA
 CCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAAACTTCTATCTCTAGAAGGGTCAAAGGATGT
 CAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
 GTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA TCCCCAGGCG
 GAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCA
 CTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTT
 TCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCC
 ATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCTTTCTTCTGCACTCA
 AGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACT
 TAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCT
 ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGATTAGGTACCGT
 CAAGACGTGCACAGTTACTTACACGTTTGTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGAT
 CCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGGA
 AGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTTGG
 CCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACC
 AACTAGCTAATACGGCGCAGGTCATCTATAAGTGATAGCAAAGCCATCTTTCACCTA
 TCGAACCATGCGGTTCGAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATC
 CCAGTCTTATAGGTAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAA
 GGAGCAAGCTCCTCGTCTGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT
 TCATCCTGAGC

ภายหลังจากการนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.2

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain R306 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus ...	2741	2741	100%	0.0	99.87%	1490	MH817399.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain Firmi-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus ...	2736	2736	100%	0.0	99.80%	1501	MH683099.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus hominis strain 3BCA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus ...	2732	2732	99%	0.0	99.93%	1487	MK874940.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus hominis strain CK7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus ...	2732	2732	100%	0.0	99.73%	1511	OP143719.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus hominis strain FDAARGOS_745 chromosome	Staphylococcus ...	2730	16366	99%	0.0	100.00%	2338248	CP050982.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus hominis strain 19A chromosome, complete genome	Staphylococcus ...	2730	16327	99%	0.0	100.00%	2202898	CP031277.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus hominis strain C34847, complete genome	Staphylococcus ...	2730	16360	99%	0.0	100.00%	2273112	CP014567.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus hominis subsp. hominis strain RW8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus ...	2730	2730	98%	0.0	100.00%	1492	MH716220.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain Firmi-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus ...	2730	2730	99%	0.0	100.00%	1547	MH683107.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus hominis strain M006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus ...	2730	2730	99%	0.0	100.00%	1507	MG255965.1

Distribution of the top 25 Blast Hits on 10 subject sequences



รูปที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus* sp. (T1L3) โดยแสดงผล 10 ลำดับแรก ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียง ได้แก่เชื้อ *Streptococcus agalactiae* และมีค่า alignment scores ≥ 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดยกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ หากมีผู้ใดนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง อาจมีความผิดตามกฎหมายคุ้มครองสิทธิบัตรและเครื่องหมายการค้าได้

ตัวอย่างที่ 3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Lactococcus garvieae* ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันอยู่ที่ 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ยืนยันได้ว่าตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์เป็นตัวอย่างของเชื้อ *Lactococcus garvieae* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อ *Lactococcus garvieae* (T1L4) มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 1,482 bp

>T1L4

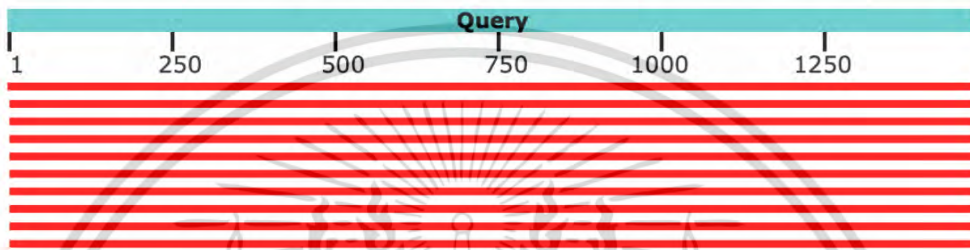
```
AGATTCACCCAGTCATCGGTCTTACCTTAGGAAGCGCCCTCCTTGCGGTTAGGCAA
CCTACTTTGGGTACTCCCAACTTCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG
GAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGCA
GGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCGCACCCCT
CGCGGGTTGGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA
AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCT
CACTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCC
CGTGTCCCGAAGGAACTCCTTATCTCTAAGGATAGCACGAGTATGTCAAGACCTGGT
AAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
CGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA TCCCCAGGCGGAGTGCTTAAT
GCGTTAGCTGCGCTACAGAGAACTTATAGCTCCCTACAGCTAGCACTCATCGTTTAC
GGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGT
GTCAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTCGCTCCGGTGTTCCTCCATATATCTACGC
ATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTCTCCCAGTT
TCCAATGCACACAATGGTTGAGCCACTGCCTTTTACATCAGACTTAAGAAACCACCT
GCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGGGACCTACGTATTACCGCG
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGCTCCCTTTCTGGTTAGATACCGTCACTTAAGTAATT
TTCCACTCTACTTAACGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTC
TTCCTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGGGTTGCCCCCATTTGCCGAAGATTCCTACT
GCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTC
TCAGGTGCGCTATGTATCATCGCCTTGGTAGTCCTTTACACTACCAACTAGCTAATA
CAACGCGGGATCATCAAGTAGTGAAGCAATTGCTTCTTTCAAATAAGAATCATGCGA
TTCTCATTTGTTATGCGGTATTAGCGTTCGTTTCCAAACGTTGTCCCCCGTACTCGG
CAGATTTCCCACGCGTTACTCACCCGTTCCGCCGCTCTTCATAAAAATAGCAAGCTAT
CTTTAATCATCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGC
```

ภายหลังจากการนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain C54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactococcus garvieae	2732	2732	100%	0.0	99.93%	1493	MW073318.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain IBB3403 chromosome, complete genome	Lactococcus garvieae	2732	13639	99%	0.0	100.00%	2179532	CP028386.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae partial 16S rRNA gene, strain M14	Lactococcus garvieae	2732	2732	99%	0.0	100.00%	1537	LK985397.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1089	Lactococcus garvieae	2732	2732	99%	0.0	100.00%	1509	AB598960.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain TUB/2013/V47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactococcus garvieae	2728	2728	99%	0.0	100.00%	1484	KT428591.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain JJJN1 chromosome, complete genome	Lactococcus garvieae	2726	13633	99%	0.0	99.93%	1965928	CP026502.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae subsp. garvieae strain PYZ22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactococcus garvieae subsp. g...	2726	2726	99%	0.0	99.93%	1535	MF582349.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain L2 chromosome, complete genome	Lactococcus garvieae	2726	13633	99%	0.0	99.93%	1940183	CP146750.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain L7 chromosome, complete genome	Lactococcus garvieae	2726	13633	99%	0.0	99.93%	1938303	CP146739.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactococcus garvieae KN22525 DNA, complete genome	Lactococcus garvieae	2726	13633	99%	0.0	99.93%	1976750	AP031391.1

Distribution of the top 30 Blast Hits on 18 subject sequences



รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ *Lactococcus garvieae* (T1L4) โดยแสดงผล 10 ลำดับแรก ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียง ได้แก่เชื้อ *Lactococcus garvieae* และมีค่า alignment scores ≥ 200

ตัวอย่างที่ 4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันอยู่ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ยืนยันได้ว่าตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์เป็นตัวอย่างของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อ *Lactococcus garvieae* (T2L1) มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 1,484 bp

>T2L1

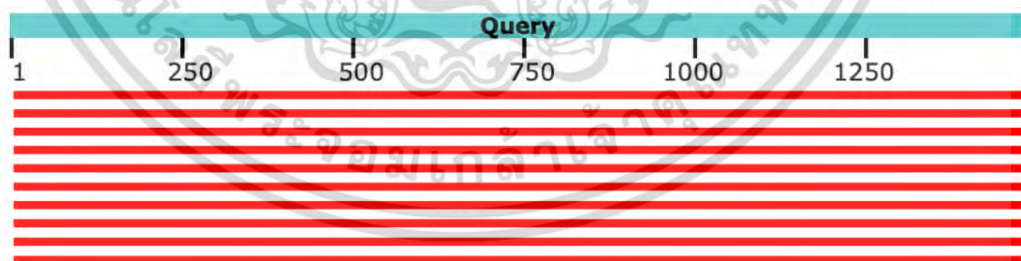
```
CTAGATTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACC
TCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGTTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCAT
GTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGGCTTTAAGAGATTAGCTTGC
CGTCACCGGCTTGCAGCTCGTTGTACCAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTC
ATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATTACCGGCAG
TCTCGCTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTG
CGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTC
ACTTCTGCTCCGAAGAGAAAGCCTATCTCTAGGCCGGTCAGAAGGATGTCAAGACCT
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGGTTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTT
AATGCGTTAGCTGCGGCACTAAGCCCCGAAAGGGCCTAACACCTAGCACTCATCGT
TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGAGCCT
```

CAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCATATATCT
 ACGCATTTACACGCTACACATGGAATTCCTCTCCCCTTCTGCACTCAAGTCCTCC
 AGTTTCCAAAGCGTACAATGGTTAAGCCACTGCCTTTAACTTCAGACTTAAAGAACC
 GCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTCGGGACCTACGTATTAC
 CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCTTTCTGGTTAGTTACCGTCACTTGGTA
 GATTTTCCACTCCTACCAACGTTCTTCTCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAAC
 CTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTCCGTCCATTGCCGAAGATTCCC
 TACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCAC
 CCTCTCAGGTCGGCTATGTATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCT
 AATAACAACGCAGGTCCATCTCACAGTGAAGCAATTGCTCCTTTTAAATAACTAACAT
 GTGTTAATCACTCTTATGCGGTATTAGCTATCGTTTCCAATAGTTATCCCCGCTAT
 GAGGCAGGTTACCTACGCGTTACTCACCCGTTTCGCAACTCATCAGTCTAGTGTAAC
 ACCAAACATCAGCGTTCTACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTTGA
 GC

ภายหลังจากการนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.4

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain 01173 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	19120	99%	0.0	100.00%	2105299	CP053027.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain Sap153 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	19081	99%	0.0	100.00%	2174504	CP036376.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain ZQ0910 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	19104	99%	0.0	100.00%	2064943	CP049938.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain TEJ0901 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	19098	99%	0.0	100.00%	2080936	CP034315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain WC1535 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	19109	99%	0.0	100.00%	2189728	CP016501.2
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain S75 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	16603	99%	0.0	100.00%	2059915	CP030845.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain B507 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	19092	99%	0.0	100.00%	2082479	CP021771.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain B509 chromosome, complete genome	Streptococcus agalactiae	2732	19098	99%	0.0	100.00%	2060637	CP021769.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain NCTC8187 genome assembly, chromosome: 1	Streptococcus agalactiae	2732	16382	99%	0.0	100.00%	2052456	LS483387.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain NCTC11930 genome assembly, chromosome: 1	Streptococcus agalactiae	2732	19109	99%	0.0	100.00%	2063270	LS483342.1

Distribution of the top 69 Blast Hits on 10 subject sequences



รูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ของตัวอย่างเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (T2L1) โดยแสดงผล 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียง 10 อันดับแรก ได้แก่เชื้อ *Lactococcus garvieae* และมีค่า alignment scores ≥ 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงลำดับและความยาว (Sequence Lengths)

ลำดับ (Sequence)	ชื่อ (Name)	ความยาว (Length) (bp)
1	T1L1 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	1,479
2	T1L3 (<i>Staphylococcus</i> sp.)	1,481
3	T1L4 (<i>Lactococcus garvieae</i>)	1,479
4	T2L1 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	1,479

4.4 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเทคนิคแลมป์

จากผลการทดลองทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cfb* ของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยใช้อุณหภูมิที่ต่างกัน ได้แก่ 60°C 61°C 62°C 63°C 64°C และ 65°C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิลเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *S. agalactiae* ได้ที่อุณหภูมิ 60°C 61°C และ 62°C โดยที่อุณหภูมิ 62°C เกิด ladder pattern ชัดเจนที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.5 จึงใช้อุณหภูมิ 62°C ในการทดสอบความไว ความจำเพาะ และการประยุกต์ใช้เทคนิคแลมป์ การทำ (spike test)

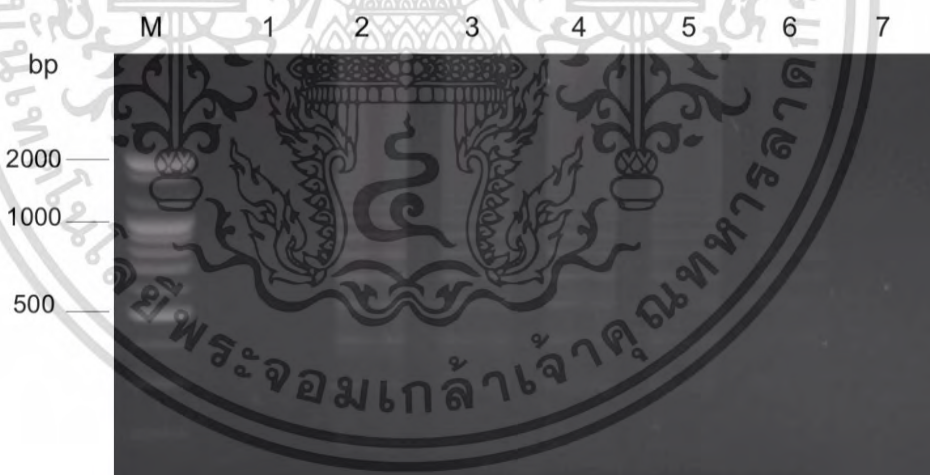


รูปที่ 4.5 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิลเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์ ของการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60 – 65°C เป็นเวลา 60 นาที; Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: 60°C; lane 2: 62°C; lane 3: 63°C; lane 4: 64°C, lane 5: 65°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การศึกษาหาความไวของเทคนิคแลมป์

เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* ที่สกัดได้มาเจือจางทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) จะได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอสุดท้าย (final concentration) ของแต่ละปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ตั้งแต่ 8 ถึง 8×10^{-5} ng/ μ l (ซึ่งเทียบเท่ากับ 8,000 ถึง 0.8 pg/ μ l) โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 62°C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 8×10^{-1} ถึง 8×10^{-5} ng/ μ l ดังแสดงในรูปที่ 4.6 อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ *S. agalactiae* ได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอสุดท้ายของปฏิกิริยาแลมป์ที่เท่ากับ 8 ng/ μ l ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากเกินไป ส่งผลต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปัญญา และคณะ (2558) ที่รายงานการพัฒนาเทคนิคแลมป์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* ที่เป็นสาเหตุของโรคจุดขาวในปลาน้ำจืด โดยทำการออกแบบ 4 ชุดไพรเมอร์ของแลมป์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วน 18S ribosomal RNA ของเชื้อ *I. multifiliis* ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาคือ อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที และปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อต่ำที่สุด ที่สามารถพบปฏิกิริยาได้คือ 5 pg/ μ l ในขณะที่งานวิจัยนี้สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของแลมป์ ได้ที่ความเข้มข้นของ DNA ต่ำสุดที่ 0.8 pg/ μ l แสดงให้เห็นถึงความไวในการทำปฏิกิริยาแลมป์ที่สูง



รูปที่ 4.6 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกลอส 2 เปอร์เซ็นต์ Lane M: 100 bp DNA ladder; lanes 1 – 6: ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายตั้งแต่ 8 ถึง 8×10^{-5} ng/ μ l; Lane 1: 8 ng/ μ l; lane 2: 8×10^{-1} ng/ μ l; lane 3: 8×10^{-2} ng/ μ l; lane 4: 8×10^{-3} ng/ μ l; lane 5: 8×10^{-4} ng/ μ l; lane 6: 8×10^{-5} ng/ μ l; lane 7: – (negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาหาความจำเพาะของเทคนิคแลมป์

เมื่อนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้จากปลานิลที่ติดเชื้ออื่นๆ เช่น *Staphylococcus* sp. (T1L3), *Lactococcus garvieae* (T1L4), *Aeromonas* (T3(1)L1), *Edwardsiella* (T3(1)L2) และ *Citrobacter* (T3(1)S1) มาทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาแลมป์ ที่ 62°C เป็นเวลา 60 นาที พบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์ แสดงว่าเทคนิคแลมป์ที่ใช้ในตรวจสอบการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มีความจำเพาะ เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและก่อโรคในปลานิล เมื่อนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจลอะโกราส 2 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 โดยเชื้อ *S. agalactiae* ที่นำมาทดสอบคือ *S. agalactiae* สายพันธุ์ 00173 ซึ่งสอดคล้องกับกับงานวิจัยของ Ke et al. (2014) ที่ได้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ *S. agalactiae* จากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อในสมองได้ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. agalactiae* สายพันธุ์ CVCC1887, BSL2n, GDZL, ZY1N, DWLT1N, LG-N และสายพันธุ์ ATCC55191 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะและสามารถตรวจพบยีน *cfb* ของ *S. agalactiae* โดยไม่พบในแบคทีเรียชนิดอื่นและปลานิลที่ไม่ติดเชื้อ *S. agalactiae*



รูปที่ 4.7 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกราส 2 เปอร์เซ็นต์ Lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1: *Streptococcus agalactiae* (T1L1); lane 2: *Staphylococcus* sp. (T1L3); lane 3: *Lactococcus garvieae* (T1L4); lane 4: *Aeromonas* (T3(1)L1); lane 5: *Edwardsiella* (T3(1)L2); lane 6: *Citrobacter* (T3(1)S1); lane 7: – (negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การประยุกต์ใช้เทคนิคแลมป์ (การทำ spike test)

จากการทดสอบโดยการเติมเชื้อในปริมาณที่ทราบลงในตัวอย่าง (spike test) เพื่อเป็นการตรวจสอบในสภาพจริง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ (LAMP) ในการตรวจหา *Streptococcus agalactiae* ในเหงือกปลา ได้ทำการทดสอบ Spike Test โดยใช้เหงือกปลา 25 mg ผสมกับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5 ถึง 1.5×10^7 CFU/ml นำมาทำปฏิกิริยาแลมป์ เพื่อตรวจหา *cfb* ในดีเอ็นเอของ *S. agalactiae* ที่อุณหภูมิ 62°C เป็นเวลา 60 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะโกราส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถตรวจหาการติดเชื้อ *S. agalactiae* ได้ที่ความเข้มข้น 1.5×10^1 ถึง 1.5×10^7 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2012) ที่รายงานว่า จากการนำโคลนของ *S. agalactiae* มาสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาแลมป์ เพื่อตรวจหา *in vitro* *fbsB* ในดีเอ็นเอของ *S. agalactiae* ในช่วง 10^3 - 10^8 CFU พบว่าเทคนิคแลมป์สามารถตรวจพบ *S. agalactiae* ได้ถึง 2.8×10^3 CFU/ml ซึ่งมีความไวเทียบเท่ากับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ในขณะที่เทคนิคพีซีอาร์ตรวจพบ *S. agalactiae* ได้ถึง 2.8×10^4 CFU/ml เท่านั้น

จากผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์สามารถตรวจหา *S. agalactiae* จากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อโดยการสกัดดีเอ็นเอ หรือจากปลาที่ติดเชื้อโดยการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.8 การตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาแลมป์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลอะโกราส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเหงือกปลาผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* Lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1-8: ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย (ความเข้มข้นจากมากไปน้อย) ตั้งแต่ 1.5×10^7 ถึง 1.5 CFU/ml ; lane 1: 1.5×10^7 CFU/ml; lane 2: 1.5×10^6 CFU/ml; lane 3: 1.5×10^5 CFU/ml; lane 4: 1.5×10^4 CFU/ml; lane 5: 1.5×10^3 CFU/ml; lane 6: 1.5×10^2 CFU/ml; lane 7: 1.5×10^1 CFU/ml; lane 8: 1.5 CFU/ml; lane 9: - (negative control); lane 10: + (positive control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้ที่อุณหภูมิ 60°C 61°C และ 62°C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 62°C เนื่องจากเกิด ladder pattern ชัดเจนที่สุด

จากผลการศึกษาความไวของเทคนิคแลมพ์ (LAMP) โดยการทำปฏิกิริยาแลมพ์ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *S. agalactiae* ได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 8×10^{-1} ถึง 8×10^{-5} ng/ μ l

จากผลการศึกษาความจำเพาะจากการใช้เทคนิคแลมพ์ (LAMP) พบว่าเทคนิคนี้มีความสามารถในการตรวจจำเพาะเชื้อ *S. agalactiae* เนื่องจากไม่มีการสร้างผลิตภัณฑ์แลมพ์จากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่สามารถก่อให้เกิดโรคในปลาในปลาที่ได้นำมาทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas* sp., *Edwardsiella* sp. และ *Citrobacter* sp.

ในการทดสอบการประยุกต์ใช้เทคนิคแลมพ์ ด้วยการทำ spike test เพื่อจำลองการตรวจสอบในสภาพจริงของปลาที่มีการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในระดับต่าง ๆ ช่วยให้เข้าใจถึงความสามารถในการตรวจสอบการติดเชื้อในตัวอย่างปลา โดยที่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ในระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 1.5×10^1 ถึง 1.5×10^7 CFU/ml จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมพ์ สามารถตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว แม้จะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ต่ำ สามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและยั่งยืนในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การทดสอบเทคนิคแลมพ์โดยการทดลองใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่หลากหลายมากขึ้น เช่น *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., *Yersinia ruckeri*, *Pseudomonas* spp. และ *Mycobacterium* spp. เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

5.2.2 การทดสอบเทคนิคแลมพ์โดยทดลองใช้เวลาน้อยลง เช่น 30, 40 หรือ 50 นาที ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มความเร็วในการตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2555. โรคปลานิล. [Online]. สืบค้นวันที่ 17 ตุลาคม 2566 จาก https://www4.fisheries.go.th/dof/list_main/3.
- กรมประมง. 2562. ประวัติ/ความเป็นมาของปลานิล. [Online]. สืบค้นวันที่ 17 ตุลาคม 2566 จาก https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_blog2/1220/64289/23 15.
- กรมเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2565). รายงานภาวะเศรษฐกิจการเกษตร ประจำเดือนพฤศจิกายน 2566. กรุงเทพฯ: กรมเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2566. กระทรวงเกษตรฯ เห็นชอบผลพยากรณ์ปริมาณการผลิตสินค้าเกษตร ปีเพาะปลูก 2566/67 และ ปี 2566 ณ มิถุนายน 2566. [Online]. สืบค้นวันที่ 4 ตุลาคม 2566 จาก <https://www.moac.go.th/news-preview-451491791563>.
- จาตุรนต์ ป็องน้ำไฟ และชนกันต์ จิตมนัส. 2560. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ระบาดในฟาร์มปลานิล โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี. วารสารเกษตร. 33(3): 427-435.
- จิตรศักดิ์ แซ่เตียว และคณะ 2554. การพัฒนาชุดตรวจกรองหาเชื้อ Human papillomavirus type 58 ในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค. วิจัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 11(3): 33-40.
- ชุตินา ถนอมสิทธิ์ และกฤติมา เสาวกุล. 2560. โรคสเตรปโตคอคโคซิส: กรณีศึกษาในปลาเศรษฐกิจ Koch Cha Sarn Journal of Science. 39(2).
- ชุตินา ถนอมสิทธิ์, อัครพล แสนกล้า และจักรพันธ์ นาน่วม. 2561. โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียและการจัดการสุขภาพของปลานิลสำหรับการเพาะเลี้ยง. Koch Cha Sarn Journal of Science. 40(1).
- นพปฎล เสียงเพราะ. 2564. คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลา. ปรินูญานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยนเรศวร
- นันต์ธวัช พลภักดี. 2564. การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Flavobacterium columnare* สาเหตุของโรค คอลัมน์าริส ปรินูญานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
- มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. 2560. คู่มือปฏิบัติกรแบคทีเรียวิทยาและกิมวิทยาทางการแพทย์ (MTH-231). [Online]. สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2667 จาก <https://apis.wu.ac.th/rds/MediaFile/1331215689.pdf>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มณฑล สุกใส. 2562. **บทความ Gram staining การย้อมแกรม.** [Online]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 มีนาคม 2567 จาก <https://www.tonanasia.com/gram-staining/>.

ไบโอเทค สวทช. 2563. **พัฒนาชุดตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค LAMP.** สืบค้นเมื่อวันที่ 3 กันยายน 2666 จาก <https://www.nstda.or.th/home/performance-post/sars-cov-2-lamp/>.

ปณรัตน์ ผาดี. 2552. **โรคและการวินิจฉัยโรคปลา.** พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: โอ.เอส. พรีนติ้ง เฮ้าส์.

ปิยะรัตน์ จิตรภิมมย์. 2566. **Catalase test.** [Online]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 เมษายน 2567 จาก <https://medium.com/@piyarat.ch/catalase-test-4f198b77612b>.

ปิยะรัตน์ จิตรภิมมย์. 2567. **Triple sugar iron (TSI) agar.** [Online]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 เมษายน 2567 จาก <https://medium.com/@piyarat.ch/triple-sugar-iron-tsi-agar-ce1805e52b04>.

ปัญญา โปติบุตร, ทองกร มีแย้ม, ศรุดา ติวะนันท์กร และสุรัชย์ พิกุลแก้ว. 2558. **การพัฒนาวิธี Loop-mediated isothermal amplification ในการตรวจหาเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* อย่างรวดเร็ว.** การประชุมระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2558.

ศรวิน ด่านสันเทียะ และศุภกิจ มานูจำ. 2558. **การแยกและการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella spp.* และ *Escherichia coli* ในน้ำนมดิบจากศูนย์รับน้ำนมในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา.** รายงานวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

ศรุตวิวงศ์ บุญคง, ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์, ทศพล มูลมณี, จิรัฐติ ธรรมศิริ, วิไลวรรณ ชันธุแสง และอารีย์ ไกรสุรีย์. 2556. **การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อ และแพะพื้นเมืองไทย.** เชียงใหม่สัตว์แพทยสาร. 11(1): 9-19.

สุไพลหมาน หมายโตหยด, สุณิษา คงทอง และอุมาพร ชิมมากทอง. 2562. **ความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคแบคทีเรียในปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง และการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ื้อยาด้านจุลชีพในปลานิลที่เลี้ยงบริเวณแม่น้ำตาปี จังหวัดนครศรีธรรมราช.** รายงานการวิจัย. คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สวทช. 2564. **ชุดตรวจโควิด-19 ด้วยเทคนิคแลมป์เปลี่ยนสี.** [Online]. สืบค้นเมื่อวันที่ 3 กันยายน 2566 จาก https://www.nstda.or.th/home/performance_post/covid-19-test-kit-with-the-color-changing-lamp-technique/.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2564. **30 ปี สวทช. กับการขับเคลื่อนประเทศด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : ความมั่นคงของประเทศ การรับมือโรคระบาด และภัยพิบัติ.** เล่ม 5 เทคโนโลยีความมั่นคงและการควบคุมโรค. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารของงานวิจัยหรือการศึกษานี้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อภิรักษ์ สุวรรณรักษ์ และจิราพร โจรณ์ทินกร. 2547. การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรรักษา
บางชนิดต่อเชื้อแบคทีเรีย *ไฮโดรฟิลล่า* รายงานผลวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์. 2554. บทความพิเศษ เทคนิค Loop-mediated isothermal
amplification (LAMP). วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 21(3): 201-206.
- Gwak, Y., Kim, H. and Kim M. 2024. Rapid on-site detection of *Leuconostoc citreum*
in commercially processed products using loop-mediated isothermal
amplification (LAMP) technique. Food Control. 158: 110230.
- Gao, H., Li, F., Zhang, X., Wang, B. and Xiang, J. 2010. Rapid, sensitive detection of
Vibrio anguillarum using loop-mediated isothermal amplification. Chinese
Journal of Oceanology and Limnology. 28(1): 62-66.
- Huang, T., Li, L., Liu, X., Chen, Q., Fang, F., Kong, J., Draz, M.S. and Cao, H. 2020. Loop-
mediated isothermal amplification technique: principle, development and
wide application in food safety. Analytical Methods. 46(2020).
- Kaewphinit, T., Santiwatanakul, S. and Chansiri, K. 2014. The detection of tuberculosis
by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) Combined with a
Lateral Flow Dipstick. ResearchGate. 10: 4018.
- Ke, X., Huo, H., Lu, M., Liu, Z., Zhu, H. & Gao, F. 2014. Development of loop-mediated
isothermal amplification (LAMP) for the rapid detection of *Streptococcus*
agalactiae in tilapia, *Oreochromis niloticus*. The world aquaculture society.
45(5): 586-594.
- Mendoza-Avilés, I., Muñoz-Rojas, C.A., Rojas M. and Estrada N. 2021. Loop-mediated
isothermal amplification for diagnosing marine pathogens in tissues of
Crassostrea spp. and white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, farmed in
Mexico. Ciencias Marinas. 47(4): 227-239.
- Ngoc Phuoc, N., Hue Linh, N. T., Crestani, C., and Zadoks, R. N. 2021. Effect of strain
and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus*
agalactiae (Group B Streptococcus; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.).
Aquaculture. 534: 736256.
- Neelima, V.S., Kaur, S., Singh, R. and Gill, J.P.S. 2023. Evaluation of loop mediated
isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Listeria*
monocytogenes from fish. Indian J. Fish. 70(4): 127-134.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shi, M., Cao, Y., Hu, X., Luo, F. and Lv, A. 2024. **Development of RT-qPCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid detection of *Rahnella aquatilis* in fish.** Aquaculture. 578: 740117.
- Savan, R., Igarashi, A., Matsuoka, S. and Sakai, M. 2004. **Sensitive and rapid detection of *Edwardsiellosis* in fish by a loop-mediated isothermal amplification method.** Applied and environmental microbiology. 70(1): 621-624.
- Thwe, P. M., Faron, M. L., Pride, D. T., Cruz, A., Gerstbrein, D., Nahmod, K. A., Bigham, L., Du, X., Lu, X., Moya, S., and Ren, P. 2022. **Multicenter Evaluation of the Cepheid Xpert GBS LB XC Test.** Journal of Clinical Microbiology. 60(12).
- Wang, B., Cai, S. H., Lu, Y. S., Zhang, X. L., Huang, Y. C., Jian, J. C., and Wu, Z. H. 2012. **A loop-mediated isothermal amplification method targeting the *fbsB* gene for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*, the causative agent of Streptococcosis in farmed fish.** The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah. 60:64, 677, 7 pages.
- Yasuyoshi, M. and Tsugunori, N. 2009. **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases.** J Infect Chemother. 15: 62-69.
- Yeh, H.-Y., Shoemaker, C.A. and Klesius, P.H. 2006. **Sensitive and rapid detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus* by a loop-mediated isothermal amplification method.** Journal of Applied Microbiology. 100: 919–925.
- Zhang, Z. 2021. **Research advances on tilapia Streptococcosis.** Pathogens. 10: 558.
- Zhu, J., Zou, Z., Li, D., Xiao, W., Yu, J., Chen, B. and Yang, H. 2023. **Comparative transcriptomes reveal different tolerance mechanisms to *Streptococcus agalactiae* in hybrid tilapia, Nile tilapia, and blue tilapia.** Fish and Shellfish Immunology. 142: 109121.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Tryptone Soya Agar (TSA)

Tryptone Soya Broth	30	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมอาหาร

ให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วให้ความร้อนจนกว่าส่วนผสมทั้งหมดจะเดือดเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย OF Basal Medium

OF Basal Medium	9.4	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมอาหาร

ให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วให้ความร้อนจนกว่าส่วนผสมทั้งหมดจะเดือดเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5-8 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที pH สุดท้าย 6.8 ± 0.2

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Triple Sugar Iron Agar (TSI)

TSI	65	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมอาหาร

ให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วให้ความร้อนจนกว่าส่วนผสมทั้งหมดจะเดือดเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5-8 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเอียงทำเป็น slant agar pH สุดท้าย 7.4 ± 0.2

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Bile Esculin Agar Base

Bile Esculin Agar Base	31.75	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ความรู้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีเตรียมอาหาร

ให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วให้ความร้อนจนกว่าส่วนผสมทั้งหมดจะเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5-8 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเอียงทำเป็น slant agar pH สุดท้าย 6.6 ± 0.2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

การเตรียม Oxidase reagent

Tetra-methy-p-phenylenediamine dihydrochloride	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมให้เข้ากัน และเก็บในขวดสีชา

การเตรียม Catalase reagent

H ₂ O ₂	3	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมให้เข้ากัน และเก็บในขวดสีชา

สูตรการเตรียม 5X TBE buffer (stock 1000 ml)

Tris base	54	กรัม
Boric aci	27.5	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.	20	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

เทสารใส่ปิกรเกอร์จากนั้นใส่แท่งแม่เหล็กกวนสารแล้วนำไปวางบนเครื่องกวนสาร เพื่อผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เมื่อสารทั้งหมดละลายจนใสแล้ว ให้ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องหรือแช่ตู้เย็น

เจือจาง 5X TBE นี้ให้เป็น 1X TBE โดยเติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ลงใน 5X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ 1 X TBE ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องหรือแช่ตู้เย็น

การเตรียมแผ่นเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 2 เปอร์เซ็นต์

Agarose	0.8	กรัม
1X TBE buffer	40	มิลลิลิตร
SYBR Safe	2	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม

ชั่งวุ้น 0.8 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ TBE 1X 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าไมโครเวฟ เวฟจนผงวุ้นกับบัฟเฟอร์ TBE 1X ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีเม็ดวุ้น แล้วเตรียมแม่พิมพ์สำหรับเทเจล เมื่อเจลเริ่มเย็นลงจนอยู่ในอุณหภูมิที่มือสามารถจับได้ให้ใส่สีย้อมเจล SYBR Safe 2 ไมโครลิตร แล้วผสมให้สีย้อมเจลเป็นเนื้อเดียวกับเจลโดยการแกว่งขวดรูปชมพู่ แล้วรีบนำมาเทลงในแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้และนำไปเก็บในที่มืดรอจนเจลแข็งตัว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

1. การวัดขนาดตัวอย่างปลาชนิด

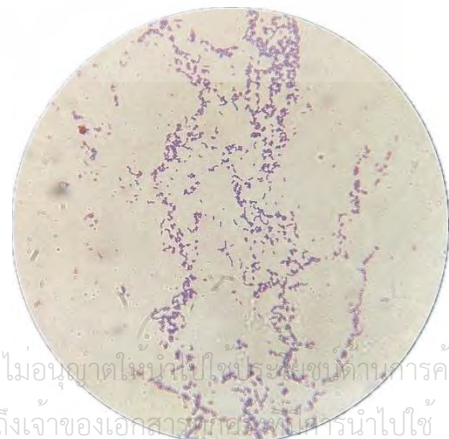
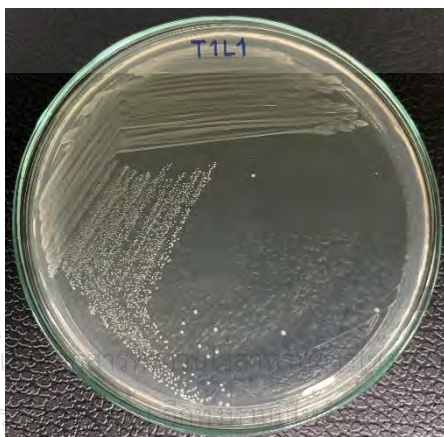


รูปภาคผนวก ค.1 การวัดขนาดตัวอย่างปลาชนิด

2. การทดสอบทางชีวเคมี

2.1 การย้อมแกรมและส่องกล้องจุลทรรศน์

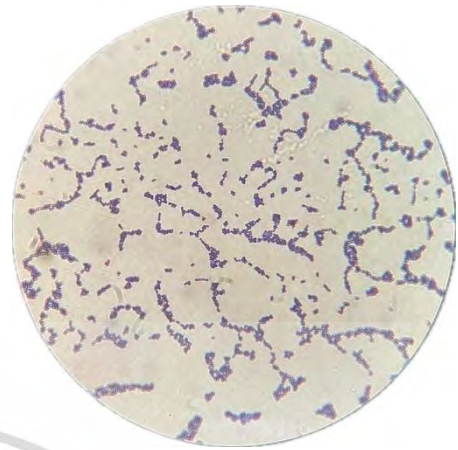
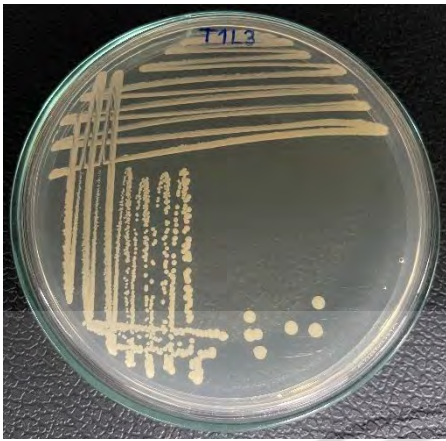
T1L1



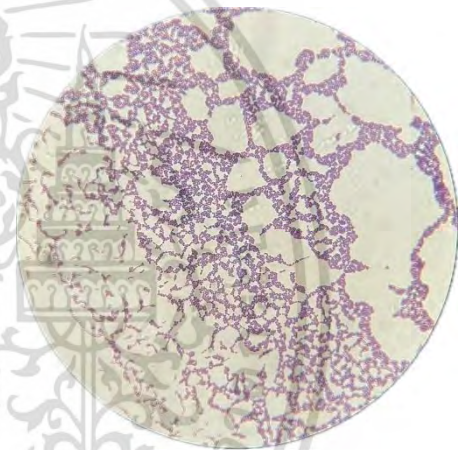
เอกสารนี้
ไม่ว่ากร

เพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการคำ
ขอและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ขอสงวนสิทธิ์นำไปใช้

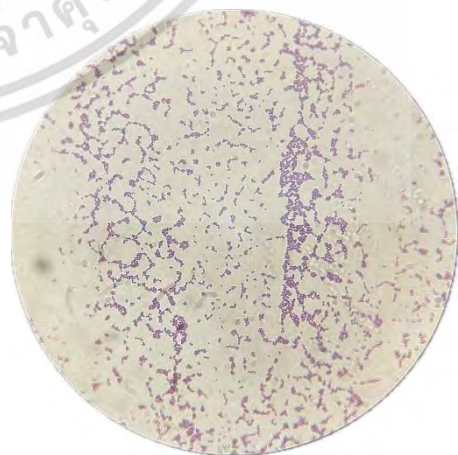
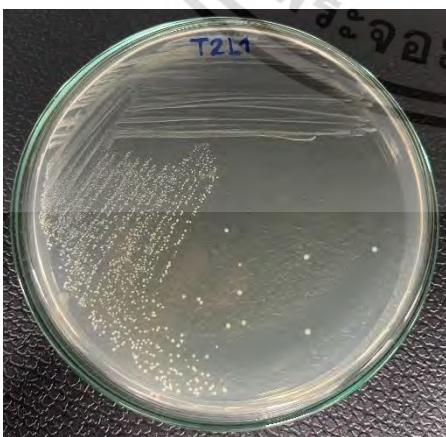
T1L3



T1L4

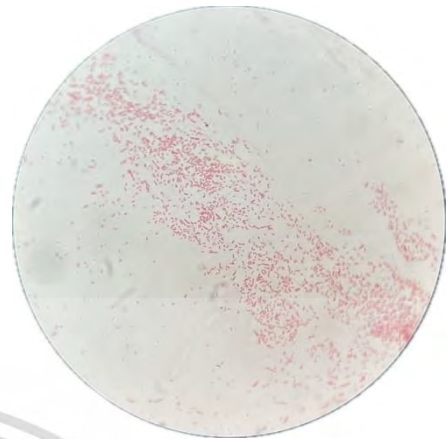


T2L1

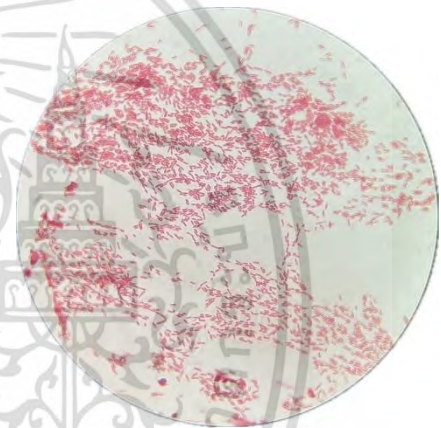


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

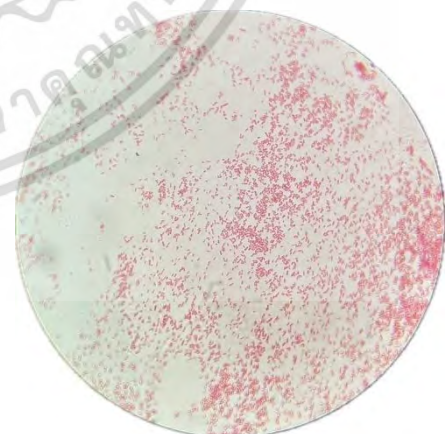
T3(1)L1



T3(1)L2



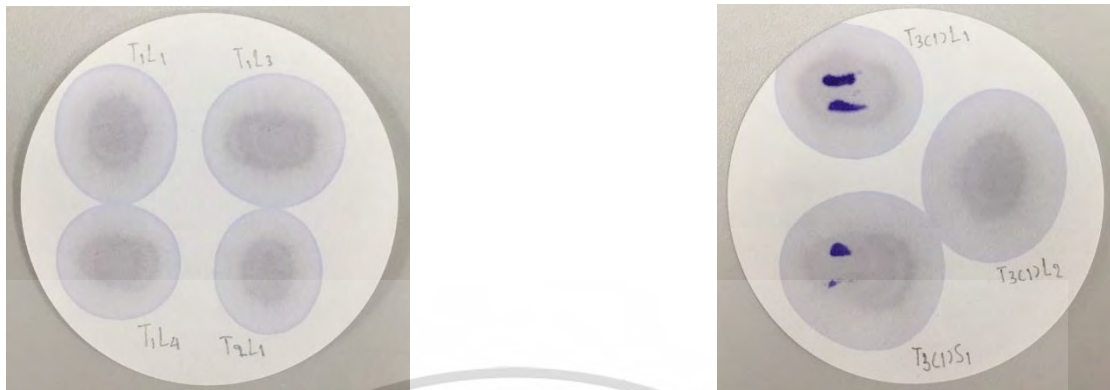
T3(1)S1



รูปภาพผนวก ค.2 ลักษณะโคโลนี และการย้อมแกรมส่องกล้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Oxidase Test



รูปภาพผนวก ค.3 ผลการทดสอบ Oxidase

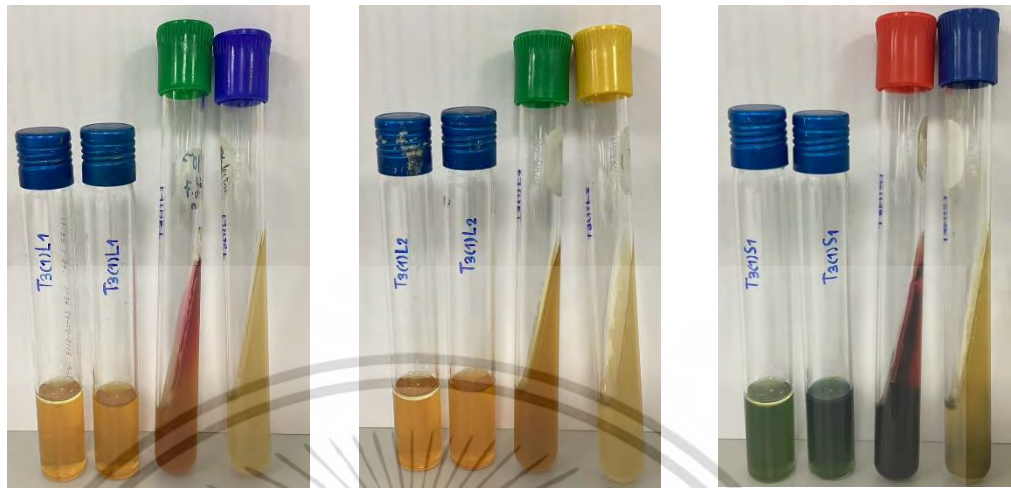
2.3 Catalase Test



รูปภาพผนวก ค.4 ผลการทดสอบ Catalase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

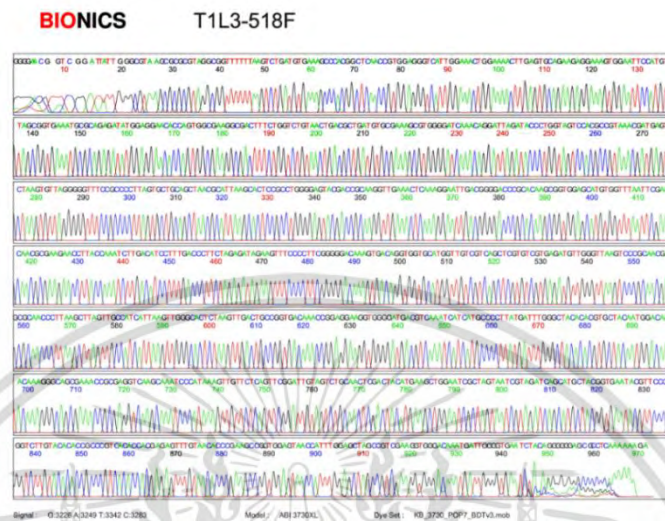
2.4 ทดสอบ OF, TSI, Esculin



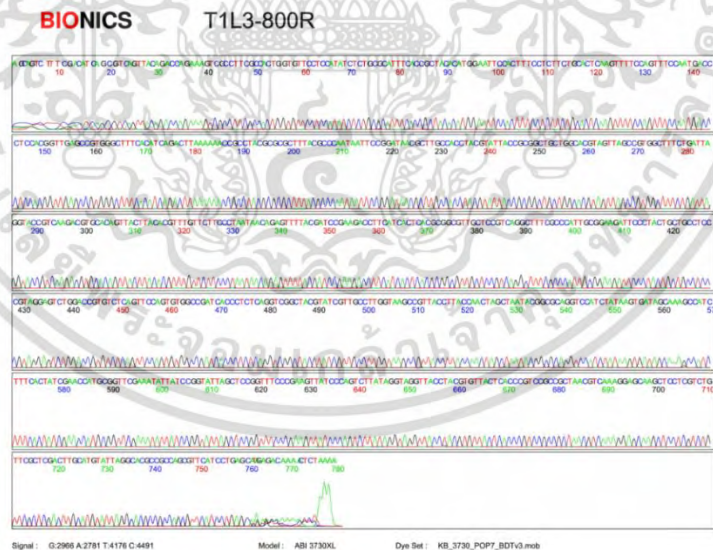
รูปภาพผนวก ค.5 ผลการทดสอบ OF, TSI, Esculin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย (T1L3) ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Staphylococcus* sp



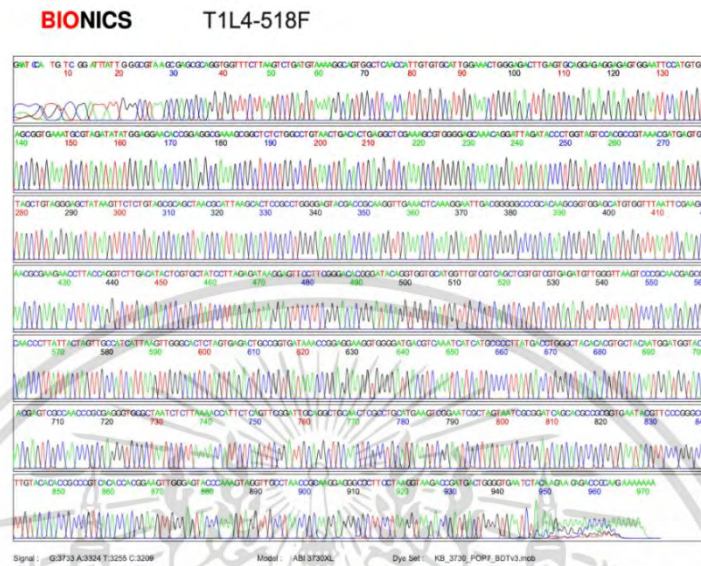
รูปภาคผนวก ง.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus* sp. (T1L3) ไพรเมอร์ 518F มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 975 bp



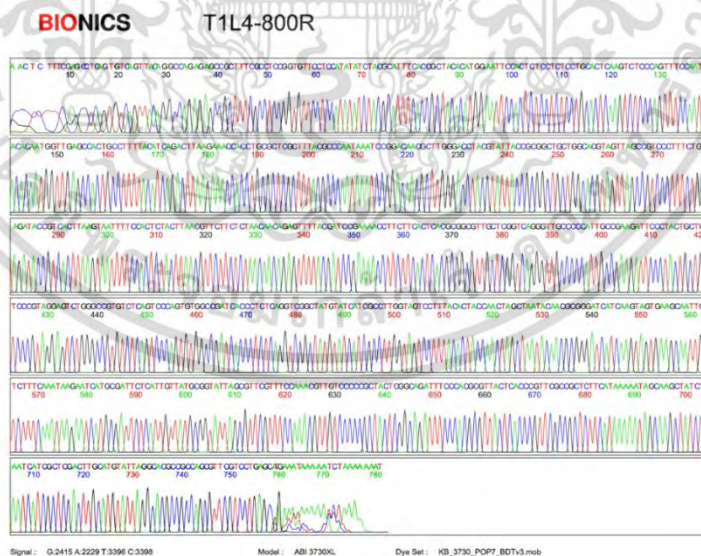
รูปภาคผนวก ง.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus* sp. (T1L3) ไพรเมอร์ 800R มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 779 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย (T1L3) ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Staphylococcus* sp



รูปภาพผนวก ๖.5 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ *Lactococcus garvieae* (T1L4) ไพรเมอร์ 518F มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 972 คู่เบส



รูปภาพผนวก ๖.6 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างเชื้อ *Lactococcus garvieae* (T1L4) ไพรเมอร์ 800R มีขนาดของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 782 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 26 เดือนมิถุนายน พ.ศ.2567

ข้าพเจ้า นางสาวดาริกา แสนสิงห์ รหัสประจำตัว 63050477

นางสาวตรีรัตน์ พงษ์หนองโน รหัสประจำตัว 63050478

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่า
โครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อ
ตรวจหาเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล

ชื่อภาษาอังกฤษ Application of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique
to detect *Streptococcus agalactiae* in Tilapia

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่น และได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว โดยใช้โปรแกรมอักขรวิสุทธิ์ ทั้งนี้ได้ตรวจสอบความเหมือนของเนื้อหา 2.16% และได้แนบเอกสาร
การตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

ลงชื่อ...**ดาริกา แสนสิงห์**.....

(นางสาวดาริกา แสนสิงห์)

นักศึกษา

ลงชื่อ...**ตรีรัตน์ พงษ์หนองโน**.....

(นางสาวตรีรัตน์ พงษ์หนองโน)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วรกฤต วรรณทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของ
นักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็น
หลักฐาน

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.วรกฤต วรรณทกิจ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้