

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1. การยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียตามลักษณะฐานวิทยา

เชื้อ *S. agalactiae* ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง TSA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. พบว่าโคโลนีลักษณะ กลมมน ขอบเรียบ มีสีขาวนวล ขนาดโคโลนีประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เซลล์มีรูปร่างกลมต่อกันเป็นสายและเมื่อนำเอาไปย้อมสีแกรม พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมต่อกันเป็นคู่หรือสายสั้น ๆ จำนวน 2-10 เซลล์ คิตส์คริสตอลไวโอเลต (crystal violet) ยืนยันได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก

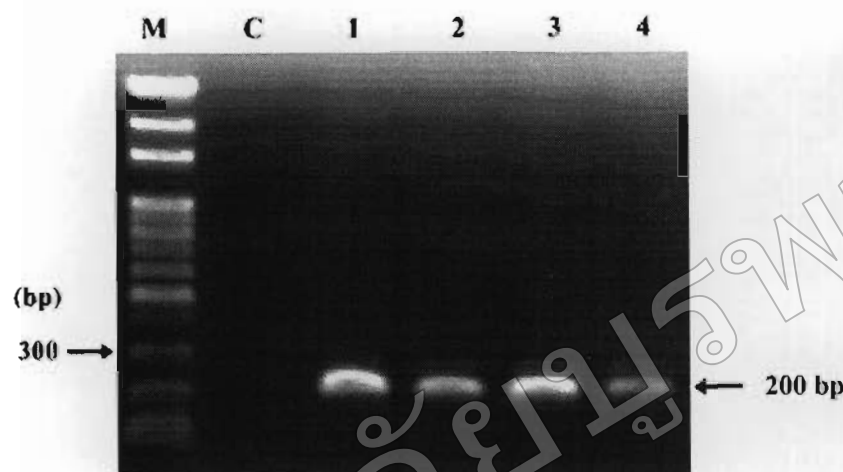


ภาพที่ 4-1 ลักษณะฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

- (A) ลักษณะของเชื้อ *S. agalactiae* ย้อมคิตส์คริสตอลไวโอเลตเป็นสีน้ำเงินเซลล์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นคู่หรือสายสั้น ๆ
- (B) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

4.2. การตรวจสอบทางชีวโมเลกุล ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์

เมื่อนำจีโนมิคดีเอ็นเอของ *S. agalactiae* มาวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 73.8 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรแล้วใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ในส่วนขงยีน *16S rRNA* โดยใช้ไพรเมอร์ F1 (5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3') และ IMOD (5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3') โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 นาโนกรัมตามลำดับที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* ผลิตรหัสที่ได้นำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส ความเข้มข้น 0.8% ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบแถบผลิตรหัสที่มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4-2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณยีน *16S rRNA* ของเชื้อ *S. agalactiae* ตรวจสอบโดย อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส ความเข้มข้น 0.8% ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็น เวลา 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ C คือ ปฏิกริยาชุดควบคุม ที่ไม่มีดีเอ็นเอ

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอ *S. agalactiae* 0.5 นาโนกรัม

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอ *S. agalactiae* 0.4 นาโนกรัม

ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอ *S. agalactiae* 0.3 นาโนกรัม

ช่องที่ 4 คือ ดีเอ็นเอ *S. agalactiae* 0.2 นาโนกรัม

4.3. การโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้ในส่วนของยีน *16S rRNA* มาเชื่อมต่อกับ pGEM-Teasy vector และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียคัดเลือกทรานฟอร์มแมนต์จากโคโลนีสีขาว แล้วสกัดพลาสมิดลูกผสม เมื่อตรวจสอบขนาดโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสเจอพบว่า แอปพลาสมิดสายผสม มีขนาด มากกว่า 3,000 คู่เบส (ภาพที่ 4.3A) แล้วทดสอบซ้ำโดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R ทำให้ได้ผลผลิตขนาด 420 คู่เบส (ภาพที่ 4.3B) ซึ่งเป็น

ขนาดเท่ากับที่คาดการณ์คือ ขนาดประมาณ 220 คู่เบส ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์รวมกับประมาณ 200 คู่เบสของขนาดที่เพิ่มขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์



ภาพที่ 4-3 พลาสมิดสายผสมของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก pGEM-T easy Vector

(A) พลาสมิดสายผสมของ pGEM-T easy Vector และชิ้นดีเอ็นเอของ *E. coli*

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 1 คือ พลาสมิดสายผสมจากโคโลนีที่ 1

ช่องที่ 2 คือ พลาสมิดสายผสมจาก โคโลนีที่ 9

(B) พลาสมิดสายผสมที่ได้จากการทรานสฟอร์มปฏิกิริยาเชื่อมของ pGEM-T easy และชิ้นดีเอ็นเอของ *E. coli* จำนวน 12 โคโลนี

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 1 คือ พลาสมิดสายผสมจากโคโลนีที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ

4.4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนดีเอ็นเอ

นำพลาสมิดสายผสมที่ได้รับการยืนยันว่ามีจีนดีเอ็นเอแทรก ไปหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าจีนส่วนดีเอ็นเอมีความเหมือนสูงสุดกับ ยีนของ 16S rRNA ของเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ A909 (Accession no. CP000114.1) ร้อยละ 98 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 1 ลำดับ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 10 (ภาพที่ 4-4) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 2 ลำดับ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 10 และ 192 (ภาพที่ 4-5)

```
>gb|CP000114.1| Streptococcus agalactiae A909, complete genome
Length=2127839
```

```
Features in this part of subject sequence:
rRNA-16S ribosomal RNA
```

```
Score = 346 bits (187), Expect = 3e-92
Identities = 189/190 (99%), Gaps = 0/190 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 1 AGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGAACGC
Sbjct 358665 AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGAACGC

Query 61 TGATGTTTGGTGTGTACACTAGACTGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAA
Sbjct 358725 TGATGTTTGGTGTGTACACTAGACTGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAA

Query 121 CCTGCCTCATAGCGGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAAGAGTAATT
Sbjct 358785 CCTGCCTCATAGCGGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAAGAGTAATT

Query 181 AACACATGTT 190
Sbjct 358845 AACACATGTT 358854
```

ภาพที่ 4-4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก

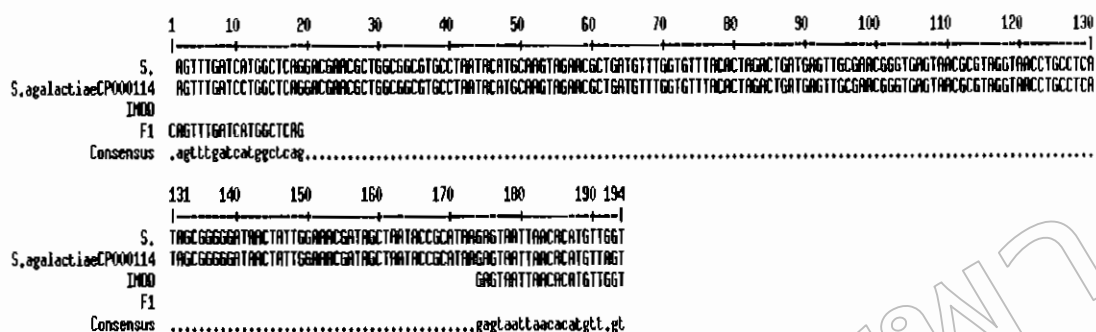
ฐานข้อมูลของ Genbank

ตารางที่ 4-1 อัตราการตายของปลานิลต่อปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* 5 ระดับ และชุดควบคุมที่
ระยะเวลา 14 วัน

ความเข้มข้นของเชื้อ (CFU/ml)	จำนวนปลาที่ตาย (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)	เวลา (วัน)
0	0	0	14
1×10^4	4	40	14
1×10^5	2	20	14
1×10^6	3	30	14
1×10^7	6	60	14
1×10^8	10	100	14

4.6. ลักษณะอาการของปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae*

ปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณสูงตั้งแต่ 1×10^7 ถึง 1×10^8 CFU/ml จะแสดงอาการของโรภายใน 3 ถึง 5 วัน โดยมีลักษณะอาการภายนอก คือ ตาขาวโปน ลำตัวมีสีเข้ม ว่ายน้ำควง ส่วนในปลาที่ใกล้ตาย พบว่าลำตัวมีสีเข้ม ครีบหุบอีกเสบวม เกิดการตกเลือดทั่วร่างกาย เมื่อผ่าเปิดช่องท้องมักพบอาการผิดปกติเช่น ตับบวมโตและมีสีซีด บางครั้งพบมีสีเข้มแบบขี้เลือด และมีของเหลวคั่งในช่องท้องจำนวนมาก (ภาพที่ 4-6)

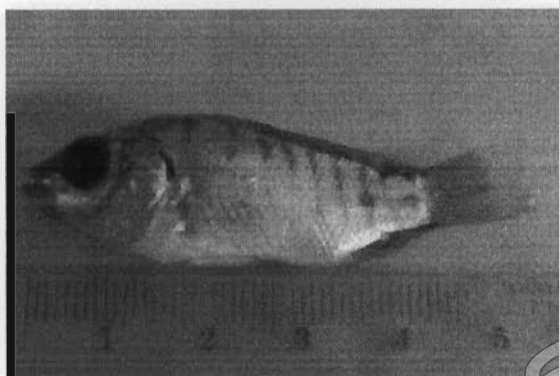


ภาพที่ 4-5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (*S. agalactiae*_Ins) กับ *16S rRNA* ของเชื้อ

S. agalactiae สายพันธุ์ A909 (Accession no. CP000114.1)

4.5. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *S. agalactiae* ต่อปลานิล

เมื่อทดสอบกับปลานิลมีน้ำหนักเฉลี่ย 7.77 ± 1.87 กรัม มีจำนวน 10 ตัว ค่อ ชุดทดลอง ที่มีเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณ 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 CFU/ml และฉีดน้ำเกลือเข้าที่บริเวณช่องท้องของปลานิล และบันทึกอัตราการตายของปลานิลทุกวันและเวลาที่ปลาตายหมด 100 % ผลการศึกษาพบว่าปลานิลมีอัตราการตายจากเชื้อ *S. agalactiae* โดยปลานิลมีการตาย 100 % ในวันที่ 14 ดังตารางที่ 4-1 ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลานิลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ที่ระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.51×10^6 CFU/ml



ภาพที่ 4-6 ลักษณะพยาธิสภาพภายนอกของปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae*

ปริมาณ 1×10^8 CFU/ml

4.7. การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ 28S *rRNA* ต่อเลือดปลา นิล

นำตัวอย่างเลือดของปลานิลที่ปลอดเชื้อ *S. agalactiae* มาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R นำไปวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสเจลความเข้มข้น 1% พบว่าคู่ไพรเมอร์บริเวณ OceL99R และ Oce215R มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน DNA ของปลานิล ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอประมาณ 150 คู่เบส (ภาพที่ 4-8)



ภาพที่ 4-7 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R ของดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดปลานิล เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสเจล ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

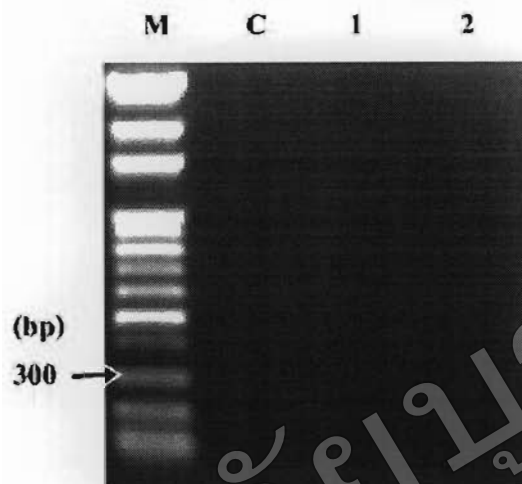
ช่องที่ C คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดปลานิล

ช่องที่ I คือ ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดปลานิล

4.8. การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ 28S rRNA

ต่อเชื้อ *S. agalactiae*

นำตัวอย่าง *S. agalactiae* มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF-1 Bacterial DNA Extraction kit (Vivantis) จากนั้นทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 28S rRNA OceL99 และ Oce215R นำไปวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสเจลความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลานาน 30 นาทีพบว่าไพรเมอร์ 28S rRNA OceL99 และ Oce215R ไม่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อเชื้อ *S. agalactiae* (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4-8 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ L99 และ Oce215R ของ ดีเอ็นเอแบคทีเรียที่สกัด *S. agalactiae* เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรฟอเรซิส ความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ C คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดปลา

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดจาก *S. agalactiae* ตัวอย่างที่ 1

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดจาก *S. agalactiae* ตัวอย่างที่ 2

4.9. การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการทดสอบเชื้อ จาก *S. agalactiae*

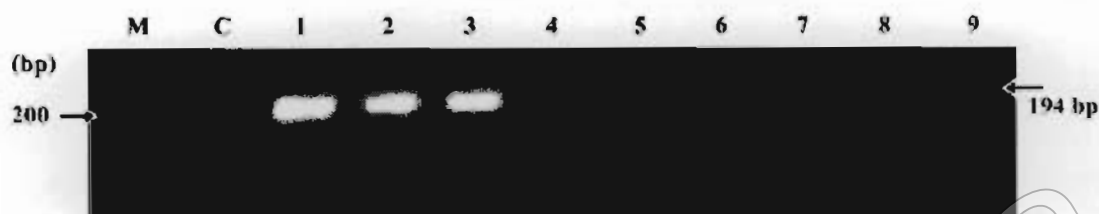
นำพลาสติกสายผสมที่สกัดได้ปรับความเข้มข้นเป็น 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001,

0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัม มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำปฏิกิริยา

ลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส

ทุกความเข้มข้น และพบว่าที่ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 0.000000001 นาโนกรัม (ช่องที่ 9)

เป็นพลาสติกความเข้มข้นปริมาณที่น้อยที่สุดที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 4-7



ภาพที่ 4-9 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ F1 และ IMOD ของพลาสมิด

สายผสมเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรฟอเรซิส เจล ความเข้มข้น 1%

ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ C คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 นาโนกรัม

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.1 นาโนกรัม

ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.01 นาโนกรัม

ช่องที่ 4 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.001 นาโนกรัม

ช่องที่ 5 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.0001 นาโนกรัม

ช่องที่ 6 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.00001 นาโนกรัม

ช่องที่ 7 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.000001 นาโนกรัม

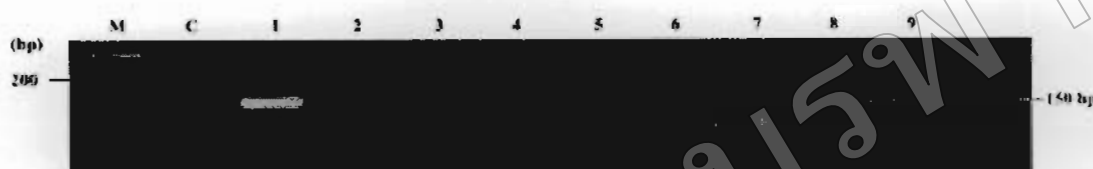
ช่องที่ 8 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.0000001 นาโนกรัม

ช่องที่ 9 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.00000001 นาโนกรัม

4.10. การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการทดสอบดีเอ็นเอจากเลือดปาลานิล

นำพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้ปรับความเข้มข้นเป็น 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัม มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ

150 คู่เบสทุกความเข้มข้น และพบว่าที่ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 0.1 นาโนกรัม (ช่องที่ 2) เป็นดีเอ็นเอความเข้มข้นปริมาณที่น้อยที่สุดที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 4-10



ภาพที่ 4-10 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R ของดีเอ็นเอจากเลือดปลานิลเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรลิซิสเจล ความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ C คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 นาโนกรัม

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.1 นาโนกรัม

ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.01 นาโนกรัม

ช่องที่ 4 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.001 นาโนกรัม

ช่องที่ 5 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.0001 นาโนกรัม

ช่องที่ 6 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.00001 นาโนกรัม

ช่องที่ 7 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.0000001 นาโนกรัม

ช่องที่ 8 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.00000001 นาโนกรัม

ช่องที่ 9 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.000000001 นาโนกรัม

4.11. การทดสอบความไวของปฏิกิริยาลูกโซ่พหุคูณ

นำตัวอย่างเลือดของปลานิลที่ปลอดเชื้อ และสกัด โดยชุดสกัด GF-1 Blood DNA Extraction kit จากนั้นวัดปริมาณของดีเอ็นเอ ได้ปริมาณ 24.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และพลาสมิดจากผลิตภัณฑ์พหุคูณในส่วนที่ยีน *16S rRNA* ของเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณ 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำมาทำปฏิกิริยาพหุคูณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่แรกบริเวณ *16S rRNA* คือ F1 และ IMOD และ คู่ไพรเมอร์บริเวณ *28S rRNA* คือ OceL99 และ Oce215R เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ปฏิกิริยาลูกโซ่พหุคูณสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจนคือ 0.000001 นาโนกรัม



ภาพที่ 4-11 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ 28S *rRNA* (OceL99 และ Oce215R) และคู่ไพรเมอร์ 16S *rRNA* (F1 และ Oce215R) ของพลาสมิดสายผสม เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ C คือ ชุดควบคุมไม่มีดีเอ็นเอ

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 นาโนกรัม

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.1 นาโนกรัม

ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.01 นาโนกรัม

ช่องที่ 4 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.001 นาโนกรัม

ช่องที่ 5 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.0001 นาโนกรัม

ช่องที่ 6 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.00001 นาโนกรัม

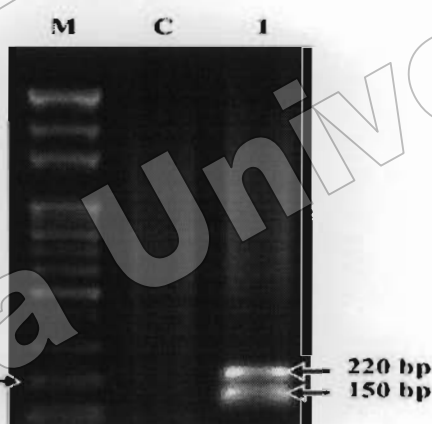
ช่องที่ 7 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.0000001 นาโนกรัม

ช่องที่ 8 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.00000001 นาโนกรัม

ช่องที่ 9 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.000000001 นาโนกรัม

4.12. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ จากเลือดของปลานิลและเชื้อ *S. agalactiae*

นำตัวอย่างเลือดของปลานิลที่มีเชื้อ *S. agalactiae* การสกัดโดยวิธีการต้ม นำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่แรกบริเวณ *16S rRNA* คือ F1 และ IMOD และ คู่ไพรเมอร์บริเวณ *28S rRNA* คือ OceL99 และ Oce215R จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวิธี อะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสเจล ความเข้มข้น 1% พบว่าคู่ไพรเมอร์ทั้งสองมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยที่ คู่ไพรเมอร์ F1 และ IMOD มีความสามารถในการเพิ่มดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *S. agalactiae* และคู่ไพรเมอร์ OceL99 และ Oce215R มีความสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเลือดปลานิลได้โดยพบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 150 คู่เบสและ 220 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 4-12)



ภาพที่ 4-12 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ *28S rRNA*

(OceL99 และ Oce215R) และ *16S rRNA* (F1 และ IMOD) ของดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดปลานิลมีเชื้อ *S. agalactiae* วิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรลิซิสเจล ความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ C คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดปลานิล

ช่องที่ I คือ ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดปลานิลมีเชื้อ *S. agalactiae*

4.13. การตรวจสอบเชื้อ *S. agalactiae* ในเลือดปลานิลทดลอง

4.13.1. ลักษณะอาการของปลานิล

ภายหลังจากการทดลองฉีดเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 1×10^1 ถึง 1×10^5 และฉีดน้ำเกลือในกลุ่มควบคุม พบว่าปลานิลมีการแสดงออกของโรคสังเกตได้ดังนี้ วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ภายหลังจากการฉีด ปลานิลไม่มีการแสดงออกของอาการโรคในทุกกลุ่มการทดลอง ในวันที่ 4 ปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 1×10^5 บางตัวมีลักษณะลำตัวสีเข้มขึ้น และเชื่องซึม ในขณะที่ปลานิลในกลุ่มอื่น ๆ ยังไม่มีการแสดงลักษณะอาการภายนอก ในวันที่ 5 ปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 1×10^4 และ 1×10^5 เริ่มมีอาการว่ายน้ำผิดปกติ ในวันที่ 6 ปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 1×10^3 ถึง 1×10^5 บางตัวมีอาการท้องบวม และบางตัวตายโดยไม่มีลักษณะอาการภายนอก จากการตรวจพบว่ามีอาการตับมีสีซีด มีน้ำขังในช่องท้อง ในวันที่ 7 ปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 1×10^4 และ 1×10^5 มีการตายเกิดขึ้น

4.13.2. การตรวจสอบโดยวิธีการเพาะเลี้ยง *S. agalactiae* ในอาหารเพาะเชื้อ TSA

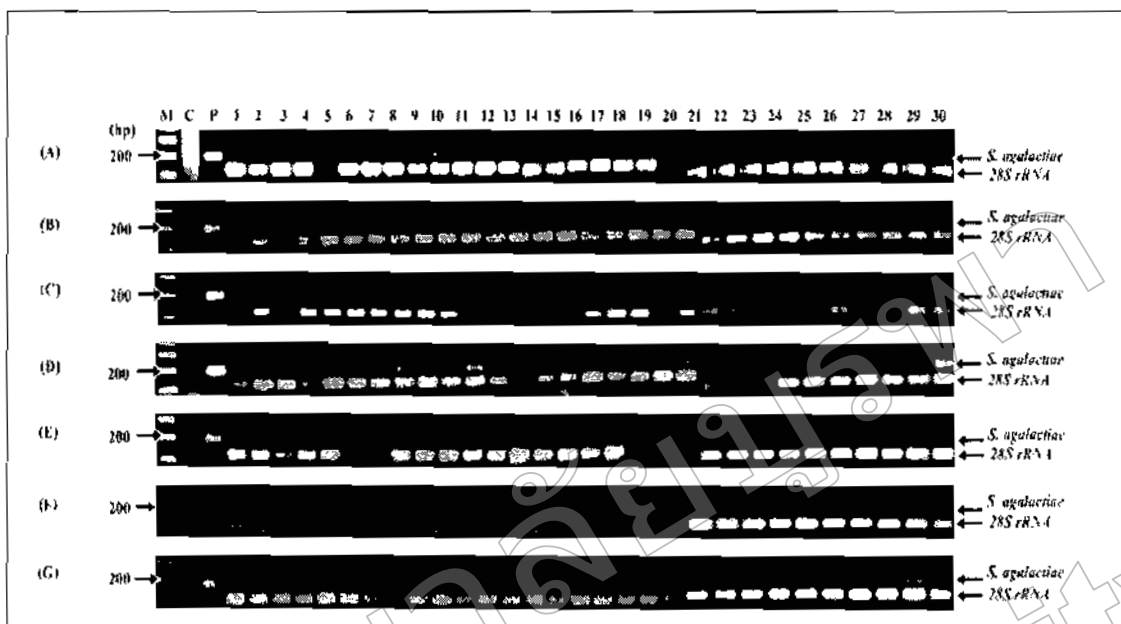
ผลการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* 5 ระดับ และชุดควบคุม (ฉีดน้ำเกลือ) ในปลานิลทดลอง และตรวจสอบติดตามเชื้อในเลือดปลานิลโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบโคโลนีขอบเรียบกลมมน ขนาดเล็กสีขาวขุ่น ของเชื้อ *S. agalactiae* จำนวน 1 ตัวอย่างของกลุ่มที่ฉีดด้วยเชื้อความเข้มข้น 1×10^4 CFU/ml ในวันที่ 6 ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย และพบโคโลนีของเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่างในกลุ่มที่ฉีดด้วยเชื้อความเข้มข้น 1×10^4 CFU/ml และ 2 ตัวอย่างของเชื้อความเข้มข้น 1×10^3 CFU/ml ในวันที่ 7 ผลการตรวจจำนวนโคโลนีที่พบเชื้อแบคทีเรียภายใน 7 วันจากเลือดปลานิลทดลอง แสดงดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 จำนวนของโคโลนี *S. agalactiae* บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (TSA) จากเลือด
ของปลานิลที่ได้รับการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ที่ช่องท้อง 5 ระดับ และชุดควบคุม
ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7 หลังการฉีด

ความเข้มข้น (CFU/ml)	ตัวที่	วันที่						
		1	2	3	4	5	6	7
0	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
1×10^1	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
1×10^2	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
1×10^3	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
1×10^4	1	0	0	0	0	0	138	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	8
	5	0	0	0	0	0	0	0
1×10^5	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	3
	3	0	0	0	0	0	0	7
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0

4.13.3. การตรวจสอบโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

จากผลการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลานิลทดลอง ที่ปริมาณ $0, 1 \times 10^1, 1 \times 10^2, 1 \times 10^3, 1 \times 10^4$ และ 1×10^5 CFU/ml และตรวจสอบติดตามเชื้อในเลือดปลานิลโดยปฏิกิริยา มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ F1 และ IMOD เพื่อตรวจความจำเพาะใน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* และคู่ไพรเมอร์ *28 S rRNA* คือ OceL99 และ Occ215R ที่มี ความจำเพาะต่อเลือดปลานิล เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธี อะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสเจล ความ เข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที จะปรากฏแถบดี เอ็นเอ 2 ขนาด คือ 150 คู่เบส และ 220 คู่เบส ถ้าเลือดปลานิลมีแบคทีเรีย *S. agalactiae* ผล การตรวจ *S. agalactiae* โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดปลานิลจำนวน 5 ตัว ด้วยปริมาณ เชื้อ 5 ระดับและชุดควบคุม ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 (A-G) ตามลำดับ โดยวันที่ 1 พบ 3 ตัวอย่างจาก ปลานิลทดลอง 1×10^1 CFU/ml และ 1×10^2 ถึง 1×10^5 CFU/ml พบ 4 ตัวอย่าง และ ในวันที่ 2-6 พบ เชื้อเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 และ ในวันที่ 7 ของการทดลองร้อยละของการตรวจพบสูงที่สุด จากภาพที่ 4-13 และ ภาพที่ 4-14



ภาพที่ 4-13 แสดงผลอิเล็กโพลีซิสเจลในการตรวจเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดปลานิลในวันที่ 1 ถึง วันที่ 7 (A-G) ตามลำดับ

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ C คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ

ช่องที่ 1 ถึง 5 คือตัวอย่างเลือดปลานิลชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae*

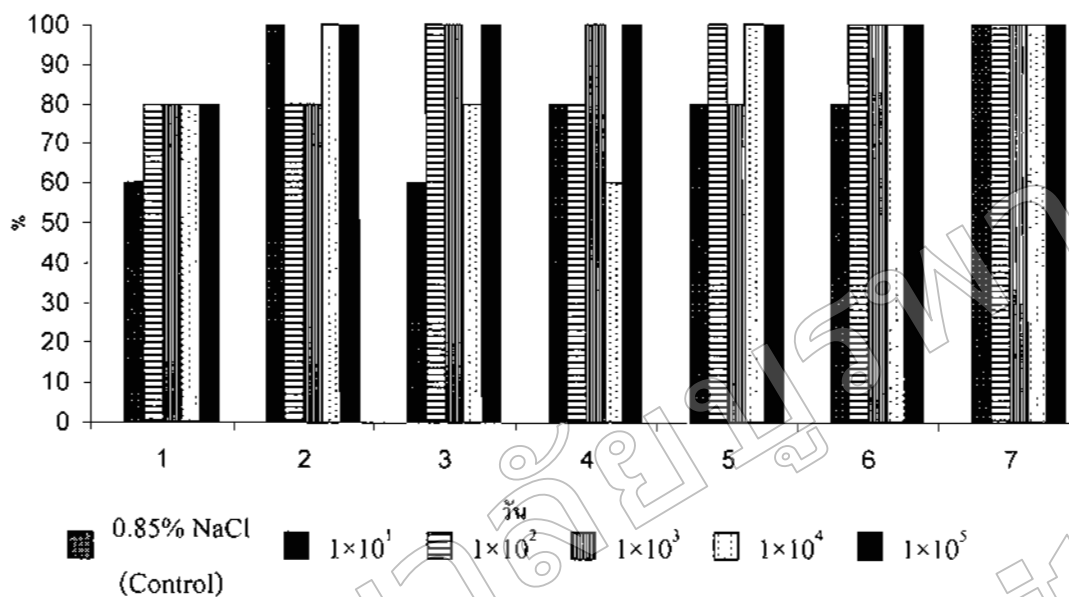
ช่องที่ 6 ถึง 10 คือตัวอย่างเลือดปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* 1×10^1 CFU/ml

ช่องที่ 11 ถึง 15 คือตัวอย่างเลือดปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* 1×10^2 CFU/ml

ช่องที่ 16 ถึง 20 คือตัวอย่างเลือดปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* 1×10^3 CFU/ml

ช่องที่ 21 ถึง 25 คือตัวอย่างเลือดปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* 1×10^4 CFU/ml

ช่องที่ 26 ถึง 30 คือตัวอย่างเลือดปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* 1×10^5 CFU/ml



ภาพที่ 4-14 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของการตรวจพบเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ จากตัวอย่างเลือดปลาวันวันที่ 1 ถึง วันที่ 7 (n=5)

4.12. การทดสอบทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โคห์น-สแควร์ พบว่า ปริมาณของเชื้อ 5 ระดับคือ 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 และ 1×10^5 ในปลาชนิดนี้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ภาพที่ 4-15 (A) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อระยะเวลาภาพที่ 4-15 (B) และความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการตรวจโดยวิธีการตรวจเชื้อในอาหารเพาะเชื้อแบบแข็ง TSA ภาพที่ 4-16 (A) และ 4-16 (B) ตามลำดับ

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	49.648 ^a	15	.000
Likelihood Ratio	43.680	15	.000
Linear-by-Linear Association	19.565	1	.000
N of Valid Cases	42		

a. 24 cells (100.0%) have expected count less than 5.
The minimum expected count is .17.

(A)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	15.436 ^a	18	.632
Likelihood Ratio	17.387	18	.497
Linear-by-Linear Association	.665	1	.415
N of Valid Cases	42		

a. 28 cells (100.0%) have expected count less than 5.
The minimum expected count is .14.

(B)

ภาพที่ 4-15 ภาพแสดงการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีการไคสแควร์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

(A) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง การปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ

S. agalactiae กับร้อยละของการตรวจพบเชื้อ โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

(B) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง การปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ

S. agalactiae กับร้อยละของการตรวจพบเชื้อ โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	15.538 ^a	10	.114
Likelihood Ratio	11.316	10	.333
Linear-by-Linear Association	3.812	1	.051
N of Valid Cases	42		

a. 12 cells (66.7%) have expected count less than 5.
The minimum expected count is .17.

(A)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	11.667 ^a	12	.473
Likelihood Ratio	9.616	12	.650
Linear-by-Linear Association	5.255	1	.022
N of Valid Cases	42		

a. 14 cells (66.7%) have expected count less than 5.
The minimum expected count is .14.

(B)

ภาพที่ 4-16 ภาพแสดงการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีการไคสแควร์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

(A) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง การปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ

S. agalactiae กับร้อยละของการตรวจพบเชื้อ โดยวิธีตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

(B) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง การปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ

S. agalactiae กับร้อยละของการตรวจพบเชื้อ โดยวิธีตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA