



การพัฒนาเทคนิค cross-priming amplification ร่วมกับสี hydroxynaphthol blue (HNB) และ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับการตรวจสอบอย่างจำเพาะต่อ Scale Drop Disease Virus (SDDV) ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

DEVELOPMENT OF CROSS-PRIMING AMPLIFICATION COUPLED
WITH HYDROXYNAPHTHOL BLUE (HNB) AND LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD) FOR

ธีระวุฒิ ประสิทธิ์พร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การพัฒนาเทคนิค cross-priming amplification ร่วมกับสี hydroxynaphthol blue (HNB) และ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับการตรวจสอบอย่างจำเพาะต่อ Scale Drop Disease Virus (SDDV) ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF CROSS-PRIMING AMPLIFICATION COUPLED
WITH HYDROXYNAPHTHOL BLUE (HNB) AND LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD) FOR
SPECIFIC DETECTION OF SCALE DROP DISEASE VIRUS (SDDV) IN ASIAN SEABASS
(*LATES CALCARIFER*)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิค cross-priming amplification ร่วมกับสี hydroxynaphthol blue (HNB) และ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับการตรวจสอบอย่างจำเพาะต่อ Scale Drop Disease Virus (SDDV) ในปลากะพงขาว

(*Lates calcarifer*)

ของ

ธีระวุฒิ ประสิทธิ์พร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

..... ประธาน

(ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งศิริจิ)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเทคนิค cross-priming amplification ร่วมกับสี hydroxynaphthol blue (HNB) และ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับการตรวจสอบอย่างจำเพาะต่อ Scale Drop Disease Virus (SDDV) ในปลากะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>)
ผู้วิจัย	ธีระวุฒิ ประสิทธิ์พร
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์

เชื้อ scale drop disease virus (SDDV) เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของโรค scale drop disease (SDD) ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) การระบาดของโรคนี้เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดความสูญเสียอย่างมากในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในเอเชีย การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิค cross-priming amplification (CPA) ร่วมกับการประยุกต์ใช้ uracil-DNA glycosylase (UDG) และตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยใช้สี hydroxynaphthol blue (HNB) และ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับการตรวจสอบเชื้อ SDDV ชุดของไพรเมอร์และไพรบที่ใช้ในการทดลองถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน major capsid protein (MCP) ของเชื้อ SDDV จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา CPA ร่วมกับการใช้ UDG (UCPA) อยู่ที่ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และจากการศึกษาความจำเพาะไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสอื่นที่นำมาทดสอบ เช่น red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) และ *Lates calcarifer* herpes virus (LCHV) และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่พบได้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การตรวจสอบความไว พบว่าเทคนิค UCPA-HNB และ UCPA-LFD มีความไวในการตรวจสอบต่ำสุดเท่ากับ 100 สำเนาต่อไมโครลิตร และเท่ากับ 10 พิโคกรัม ของสารสกัดดีเอ็นเอรวม (total DNA) ซึ่งมีความไวดีกว่าเทคนิค PCR 10 เท่า นอกจากนี้เทคนิค UCPA-HNB และ UCPA-LFD ยังให้ผลสอดคล้องกับเทคนิค real-time PCR ในการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาที่ได้จากธรรมชาติ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค UCPA ร่วมกับ HNB และ LFD เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ง่าย และมีประสิทธิภาพ และเป็นหนึ่งในเทคนิคที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ SDDV ได้อย่างจำเพาะ

คำสำคัญ : ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*), ปฏิกิริยาคอสม ไพรมิ่ง แอมพลิฟิเคชัน (ซีพีเอ), ไฮโดรอกซีแนฟทอลบลู (HNB), ชุดตรวจแบบแถบสี (lateral flow dipstick), ไวรัสโรคเกล็ดหลุด (scale drop disease virus)

Title	DEVELOPMENT OF CROSS-PRIMING AMPLIFICATION COUPLED WITH HYDROXYNAPHTHOL BLUE (HNB) AND LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD) FOR SPECIFIC DETECTION OF SCALE DROP DISEASE VIRUS (SDDV) IN ASIAN SEABASS (<i>LATES CALCARIFER</i>)
Author	TERAWUT PRASITPORN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Associate Professor Parin Chaivisuthangkura
Co Advisor	Associate Professor Siwaporn Longyant , Ph.D.

Scale drop disease virus (SDDV) is one of the most important pathogens that cause scale drop disease (SDD) in Asian sea bass (*Lates calcarifer*). The outbreaks of this disease are one of the factors causing substantial losses in Asian sea bass aquaculture. In this study, the uracil-DNA glycosylase (UDG) supplemented cross-priming amplification (UCPA) combined with a colorimetric detection method using hydroxynaphthol blue (HNB) and lateral flow dipstick (LFD) for detection of SDDV was developed. The UCPA primers and probe were designed to target the major capsid protein (MCP) gene of the SDDV. The optimized UCPA coupled with UDG conditions was performed at a temperature of 61°C for 60 min. The UCPA assays demonstrated specificity to SDDV without cross-reaction to other tested viruses including red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), infectious spleen, and kidney necrosis virus (ISKNV) and *Lates calcarifer* herpes virus (LCHV), and other bacterial species commonly found in aquatic animals. The sensitivity of the UCPA-HNB, and UCPA-LFD was 100 viral copies/μL and 10 pg of extracted total DNA, which was 10-fold more sensitive than that of conventional PCR. Furthermore, the detection of SDDV infection in natural fish samples by UCPA-HNB and UCPA-LFD methods was consistent with the real-time PCR method. Therefore, the UCPA coupled with HNB and LFD was rapid, simple, and effective and might be applied for the diagnosis of SDDV infection.

Keyword : Asian sea bass (*Lates calcarifer*), Cross-priming amplification (CPA), Hydroxynaphthol blue (HNB), Scale drop disease virus (SDDV), Lateral flow dipstick (LFD)

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือและได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น ประธานกรรมการภาคนอกมหาวิทยาลัยและรองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิจุล กรรมการในการสอบป้องกันปริญญานิพนธ์ที่กรุณาใช้เวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการในการสอบปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ ตลอดจนได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้า รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาและศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ พืช และผลิต (COE Biotech) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) (Science Achievement Scholarship of Thailand; SAST) ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอรพรรณ มานะจิตต์ คุณประติษฐ์ หวังมาน นักวิจัยประจำศูนย์และอาจารย์ อรรคพล วณิกสัมพันธ์ ที่ได้ให้ความรู้และความบันเทิงซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี รวมถึงพี่ ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุลทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ดูแล ช่วยเหลือ และให้กำลังใจเสมอมา ข้าพเจ้าขออุทิศผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่บิดามารดา ครูบาอาจารย์ เพื่อน พี่ น้อง ให้ประสบแต่ความสุขสวัสดิ์พิพัฒน์มงคล สมบูรณ์พูนผลในสิ่งที่ตั้งใจด้วยเทอญ

ธีระวุฒิ ประสิทธิ์พร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	6
สมมติฐานในงานวิจัย.....	6
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
1. ปลากะพงขาว (Asian seabass)	7
1.1 อนุกรมวิธาน.....	7
1.2 ลักษณะทั่วไปของปลากะพงขาว	7
1.3 การแพร่กระจาย.....	8
1.4 วงจรชีวิตของปลากะพงขาว	9
1.5 ขั้นตอนการพัฒนาของตัวอ่อน	11
2. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว.....	13
3. การเกิดโรคในปลากะพงขาว.....	15
4. โรค scale drop syndrome หรือ scale drop disease	18

5. พยาธิสภาพของปลาที่ติดเชื้อ SDDV	22
6. การศึกษาลักษณะทั่วไปของอนุภาคไวรัสและจีโนมของเชื้อ SDDV	27
7. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ SDDV	30
8. การตรวจการติดเชื้อ SDDV	39
8.1 การตรวจเชื้อโดยการสังเกตอาการและการศึกษาทางพยาธิสภาพ	39
8.2 การใช้ transmission electron microscopy	40
8.3 การเพาะเลี้ยงไวรัส	41
8.4 การใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล	42
9. Cross-priming amplification (CPA)	44
10. กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ CPA	45
11. Uracil-DNA glycosylase (UDG)	47
12. วิธีการวิเคราะห์ผลของปฏิกิริยา CPA	49
12.1 การวิเคราะห์ผลโดยใช้ agarose gel electrophoresis	49
12.2 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ให้สี	50
13. Hydroxynaphthol blue (HNB)	51
14. Lateral flow dipstick (LFD)	52
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	56
1. อุปกรณ์และสารเคมี	56
1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	56
1.2 เคมีภัณฑ์	56
2. แบบที่เรีย พลาสมิดและไวรัสที่ใช้ในการทดลอง	56
3. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง	58
4. วิธีดำเนินการทดลอง	58

4.1 การตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในปลากะพงด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)	58
4.2 การเตรียมรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV	60
4.3 การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียโดยใช้ชุด NucleoSpin® plasmid EasyPure kit (Macherey-nagel, Germany)	61
4.4 การออกแบบไพรเมอร์ (primers) และโพรบ (probe) สำหรับปฏิกิริยา CPA-LFD	61
4.5 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA	63
4.6 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI	65
4.7 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วย lateral flow dipstick (LFD)	65
4.8 การทดสอบหาความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ SDDV	65
4.9 การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR โดยใช้ recombinant plasmid ของ SDDV-MCP ..	66
4.10 การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างของปลาที่ติดเชื้อ ด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR	66
4.11 การตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลา ที่ทราบสถานะการติดเชื้อด้วยเทคนิค UCPA-HNB และ UCPA-LFD ที่พัฒนาขึ้น	67
4.12 การตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD	67
บทที่ 4 ผลการทดลอง	71
1. การตรวจการติดเชื้อ SDDV ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)	71
2. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA	74
2.1 การทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง dUTP และ dTTP ในการทำปฏิกิริยา CPA โดยใช้ uracil DNA glycosylase (UDG) (UCPA)	74
2.2 การทดสอบหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA	75

2.3 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> I 78	
2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา UCPA.. 79	
2.5 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี hydroxynaphthol blue (HNB) ที่ใช้ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA..... 80	
2.6 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วย lateral flow dipstick (LFD) 82	
3. การตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค UCPA และ PCR..... 83	
4. การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR โดยใช้ recombinant plasmid ที่มียืนแคปซิดโปรตีนของ SDDV 85	
5. การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างของปลาติดเชื้อระหว่างเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR..... 87	
6. การตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาที่ทราบสถานะการติดเชื้อด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD ที่พัฒนาขึ้น..... 89	
7. การตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค semi-nested PCR 92	
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 93	
บรรณานุกรม 100	
ภาคผนวก..... 109	
ภาคผนวก ก 110	
ภาคผนวก ข 111	
ประวัติผู้เขียน..... 114	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 การเจริญของเอ็มบริโอของไข่ปลากระพง.....	11
ตาราง 2 ตำแหน่งของยีนอนุรักษที่อยู่บนจีโนมของไวรัสในวงศ์ Iridoviridae	32
ตาราง 3 แสดงรายชื่อแบคทีเรียและไวรัสที่ก่อโรคในปลาที่ใช้ในการทดลอง	57
ตาราง 4 ส่วนผสมของการทำ polymerase chain reaction (PCR).....	59
ตาราง 5 ขั้นตอน อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV ด้วยวิธี PCR.....	60
ตาราง 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทำ CPA-LFD	62
ตาราง 7 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา UCPA.....	64
ตาราง 8 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา semi-nested PCR ในขั้นตอนแรก	68
ตาราง 9 ขั้นตอน อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV ด้วยวิธี semi-nested PCR.....	69
ตาราง 10 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา semi-nested PCR ในขั้นตอนสุดท้าย	69
ตาราง 11 ขั้นตอน อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV ด้วยวิธี semi-nested PCR ในขั้นตอนสุดท้าย	70
ตาราง 12 การเปรียบเทียบผลการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA และ qPCR	89

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ปลากะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>)	8
ภาพประกอบ 2 การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของปลากะพงขาว (<i>L. calcarifer</i>).....	9
ภาพประกอบ 3 แบบจำลองแนวความคิดเกี่ยวกับวงจรชีวิตของปลากะพงขาว (<i>L. calcarifer</i>)	10
ภาพประกอบ 4 การพัฒนาเป็นตัวอ่อนของไข่ปลากะพงขาว (<i>L. calcarifer</i>)	12
ภาพประกอบ 5 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างปลา (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogens) กับการก่อโรคในปลา.....	16
ภาพประกอบ 6 ปลากะพงขาวที่เป็นโรค scale drop syndrome.....	20
ภาพประกอบ 7 ผิวหนังของปลากะพงขาว ที่มีอาการของโรค scale drop syndrome	23
ภาพประกอบ 8 เนื้อเยื่อของปลากะพงขาว (<i>L. calcarifer</i>) ที่ติดเชื้อ SDDV ตามธรรมชาติโดยผ่านการย้อมสี hematoxylin และ eosin.....	24
ภาพประกอบ 9 ผลการตรวจสอบยีน ATPase ของเชื้อไวรัส SDDV ในอวัยวะต่าง ๆ ของตัวแทนปลาติดเชื้อ ด้วยเทคนิค semi-nested PCRซึ่งมีขนาดยีน 412 และ 738 bp	25
ภาพประกอบ 10 ภาพแสดงพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ (S) และปลาที่สุขภาพดี (H) โดยผ่านการย้อมสี hematoxylin และ eosin	26
ภาพประกอบ 11 ภาพถ่ายอนุภาคของไวรัส SDDV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	27
ภาพประกอบ 12 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไวรัส SDDV โดยการย้อมด้วย negative staining	28
ภาพประกอบ 13 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของเนื้อเยื่อไตจากปลาติดเชื้อ SDDV ร่วมกับการย้อมสีด้วยเทคนิค negative staining	29
ภาพประกอบ 14 การสร้าง phylogenetic tree เพื่อการจัดกลุ่มของ SDDV โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid sequence) ของยีนอนุภาคทั้ง 26 ยีนที่ได้จากการทำ genome sequence กับยีนอนุภาคจากไวรัสอื่นในวงศ์ Iridoviridae.....	31

ภาพประกอบ 15 การสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid sequence) ที่คาดว่าแปลรหัสเป็น MCP ของเชื้อ SDDV กับยีน MCP ของไวรัสอื่นในวงศ์ Iridoviridae	35
ภาพประกอบ 16 การสร้าง phylogenetic tree ด้วย maximum-likelihood แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MCP ในไวรัสวงศ์ Iridoviridae ที่มีการระบาดในพื้นที่แตกต่างกัน	37
ภาพประกอบ 17 การสร้าง phylogenetic tree ด้วย maximum-likelihood โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกัน (concatenated) ของยีน <i>ATPase-like protein</i> , <i>major capsid protein</i> และ <i>myristoylated membrane</i> ของไวรัสในสกุล <i>Megalocytivirus</i>	38
ภาพประกอบ 18 เนื้อเยื่อหัวใจของปลาที่ติดเชื้อ SDDV ที่แสดงลักษณะทางพยาธิของโรค.....	40
ภาพประกอบ 19 ภาพถ่ายเซลล์มีมของปลาติดเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	41
ภาพประกอบ 20 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยปฏิกิริยา cross-priming amplification (CPA).....	46
ภาพประกอบ 21 กลไกการทำงานของเอนไซม์ uracil-DNA glycosylase (UDG) ในปฏิกิริยา LAMP	48
ภาพประกอบ 22 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา CPA โดยใช้ agarose gel electrophoresis ...	49
ภาพประกอบ 23 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา CPA โดยใช้ malachite green (MG) สำหรับเชื้อ <i>Klebsiella pneumonia</i>	50
ภาพประกอบ 24 ภาพแสดงประจุลบที่เกิดจากหมู่ซัลโฟนิคของ hydroxynaphthol blue (HNB).....	51
ภาพประกอบ 25 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ร่วมกับการใช้ HNB สำหรับตรวจสอบ lampda (λ) DNA โดยสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงจากสีม่วงไปเป็นสีน้ำเงินหรือสีฟ้า.....	52
ภาพประกอบ 26 ภาพแสดงส่วนประกอบของ lateral flow dipstick (LFD)	53
ภาพประกอบ 27 ภาพแสดงโครงสร้างการเกิดไฮบริดระหว่างผลผลิตของปฏิกิริยาที่ถูกติดฉลากด้วย biotin และโพรบที่ติดฉลากด้วย FITC ถูกจับด้วย avidin หรือ DIG ที่ถูกจับด้วย แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ DIG ที่ถูกตรึงอยู่บนบริเวณแถบทดสอบ (test line)	54

ภาพประกอบ 28 ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาด้วย lateral flow dipstick (LFD)...	55
ภาพประกอบ 29 ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายยีนแคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV	62
ภาพประกอบ 30 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลากะพงขาวและพลาสมิด ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยยีน MCP ของเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค PCR	72
ภาพประกอบ 31 ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SDDV เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST	73
ภาพประกอบ 32 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SDDV เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม blastx.....	74
ภาพประกอบ 33 การตรวจสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง dUTP และ dTTP สำหรับการทำปฏิกิริยา CPA.....	75
ภาพประกอบ 34 ผลการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA โดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน	76
ภาพประกอบ 35 ผลการตรวจสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน	77
ภาพประกอบ 36 ผลการตรวจสอบความถูกต้องในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ SDDV ด้วยปฏิกิริยา UCPA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI	78
ภาพประกอบ 37 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา UCPA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis.....	79
ภาพประกอบ 38 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี hydroxynaphthol blue (HNB) เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA	80
ภาพประกอบ 39 ผลการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB ในสารละลายปฏิกิริยา UCPA.....	81
ภาพประกอบ 40 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์โพรบ เพื่อตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย LFD	82
ภาพประกอบ 41 การตรวจสอบความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค UCPA และเทคนิค PCR	84

ภาพประกอบ 42 ผลการตรวจสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยใช้พลาสมิดที่มียีน MCP ของเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA และ PCR	86
ภาพประกอบ 43 ผลการตรวจสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก เนื้อเยื่อปลาติดเชื้อระหว่างเทคนิค UCPA และ PCR	88
ภาพประกอบ 44 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (validation) และแม่นยำในการตรวจสอบเชื้อ SDDV	91
ภาพประกอบ 45 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลากะพงขาว.....	92



บทที่ 1

บทนำ

ภาคการประมงมีบทบาทที่สำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นทั้งแหล่งอาหารเพื่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออกในรูปของอาหารทะเลแปรรูป จากข้อมูลขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of United Nation : FAO) ในช่วงปี พ.ศ. 2550 – 2559 ประเทศไทยถูกจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่มีผลผลิตสัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง (ไม่รวมพรรณไม้น้ำ) ติด 1 ใน 10 อันดับแรกของโลก (FAO, 2018) และในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์มวลรวมในประเทศ (gross domestic product: GDP) ด้านการผลิต ณ ราคาปัจจุบัน มีมูลค่า 15,703,021 ล้านบาท โดยเป็น GDP จากภาคเกษตรกรรม 1,357,503 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 8.64 ของ GDP ทั้งหมด (สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2561) เมื่อพิจารณาเฉพาะความสามารถในการผลิตสินค้าประมงเพื่อการส่งออกของประเทศไทย พบว่าในปี พ.ศ. 2563 มีปริมาณสินค้าส่งออกอยู่ที่ 1,646,585.07 ตัน โดยสินค้าหลัก ได้แก่ อาหารทะเลกระป๋อง กุ้งสด กุ้งแช่เย็น แช่แข็ง คิดเป็นมูลค่า 196,785.61 ล้านบาท (กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง, 2562) จากข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของภาคการประมงต่อเศรษฐกิจของประเทศและศักยภาพในการแข่งขันบนเวทีโลก

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นหนึ่งในสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากเพาะเลี้ยงง่าย ทนต่อสภาวะความผันผวนของสิ่งแวดล้อม โตเร็ว เนื้อมีรสชาติอร่อย จึงเป็นที่ต้องการของตลาดมาก ปลากะพงขาวมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในอินเดีย ออสเตรเลีย และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในส่วนของประเทศไทยพบว่าเริ่มมีการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวมาตั้งแต่ประมาณปี พ.ศ. 2513 โดยระยะแรกมักเป็นการจับพันธุ์ปลาจากแหล่งธรรมชาติมาเพาะเลี้ยง ซึ่งมักเป็นการเลี้ยงเพื่อยังชีพหรือเพื่อการบริโภคภายในครัวเรือน จนกระทั่งปี พ.ศ. 2516 กรมประมงสามารถเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวสำเร็จจึงทำให้การเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทยแพร่หลายมากขึ้น เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดที่เพิ่มสูงขึ้น และทดแทนการจับจากแหล่งธรรมชาติซึ่งมีความไม่แน่นอนของปริมาณและคุณภาพของผลผลิต จึงได้มีการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ โดยแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ การเลี้ยงในบ่อดินและการเลี้ยงในกระชัง จากข้อมูลประมาณการพบว่าในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยสามารถผลิตปลากะพงขาวได้ประมาณ 17,266 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,348 ล้านบาท โดยแหล่งเลี้ยง

ปลากะพงขาวที่สำคัญอยู่ในบริเวณพื้นที่จังหวัดปัตตานี ฉะเชิงเทรา สงขลา สุราษฎร์ธานี และสมุทรปราการ ซึ่งคิดเป็นประมาณ 80% ของผลผลิตทั้งประเทศ (นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์, 2562) เพื่อตอบสนองต่อความต้องการบริโภคปลากะพงขาวที่มีอัตราเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี การเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มปริมาณผลผลิตซึ่งอาจทำให้เกิดการเพาะเลี้ยงที่หนาแน่นเกินไป หรือขาดการดูแลจัดการที่เหมาะสมก่อให้เกิดการสะสมของเสียจำพวกสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ต่าง ๆ สภาพการเลี้ยงเช่นนี้มักก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาของโรคติดเชื้อชนิดต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว และปรสิต ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. โปรโตซัวในกลุ่ม *Chilodonella* spp., *Trichodina* spp. และหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญก็คือโรคติดเชื้อในปลาที่มีสาเหตุจากไวรัส เช่น *Lates calcarifer encephalitis virus* (LcEV), nervous necrosis virus (NNV), lymphocystis virus และ infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) เป็นต้น

ในปี พ.ศ. 2535 ได้มีการรายงานถึงโรค scale drop syndrome (SDS) ในฟาร์มปลากะพงขาวจากรัฐปีนัง ประเทศมาเลเซีย ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายกับปลากะพงขาวที่ติดเชื้อในประเทศสิงคโปร์ในปี พ.ศ. 2545, 2549 และ 2552 โดยปลาที่ติดเชื้อจะมีอาการว่ายน้ำผิดปกติ เกล็ดหลุด พบอาการหลอดเลือดอักเสบที่ผิวหนังและอวัยวะภายในที่สำคัญ ภายหลังพบว่าเกิดจากการติดเชื้อ scale drop disease virus (SDDV) ซึ่งถูกจัดอยู่ในสกุล *Megalocytivirus* วงศ์ Iridoviridae (de Groof et al., 2015) กระทบต่อฟาร์มปลาในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อย่างมาก ปลาที่ติดเชื้อในธรรมชาติมีอัตราการตายสะสมที่ 40-50% และยังมีรายงานการตรวจพบการติดเชื้อชนิดนี้ในจังหวัดทางภาคตะวันออกของประเทศไทยอีกด้วย (Senapin et al., 2019) เนื่องจากเป็นโรคที่มีสาเหตุจากไวรัสจึงไม่สามารถรักษาด้วยการให้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีได้ ดังนั้นการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส SDDV จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อช่วยในการควบคุมและลดการระบาดนั้นมีประสิทธิภาพสูงสุด ในการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ SDDV ได้มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ขึ้นหลายรูปแบบเพื่อใช้ในการตรวจสอบ เช่น การเพิ่มปริมาณอนุภาคไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM) (de Groof et al., 2015) การใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction: PCR) ที่จำเพาะต่อยีน major capsid protein (MCP) (Senapin et al., 2019) semi-nested PCR (Charoenwai, Meemetta, Sonthi, Dong, & Senapin, 2019) และ quantitative polymerase chain reaction

(qPCR) ที่จำเพาะต่อยีน *ATPase* (de Groof et al., 2015; Sriisan et al., 2020) อย่างไรก็ตาม เทคนิคข้างต้นจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการตรวจสอบ ใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูง ราคาแพง อีกทั้งยังไม่เหมาะสำหรับการตรวจสอบในภาคสนาม จากข้อจำกัดข้างต้น จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิเดียว เพื่อช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR โดยเทคนิคเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ สามารถใช้เครื่องมือที่มีราคาไม่แพง เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat box ในการควบคุมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบภาคสนามได้

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 นักวิจัยได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้ อุณหภูมิเดียวขึ้นหลากหลายวิธี เช่น วิธี nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) ที่อาศัยกระบวนการ transcription และ reverse transcription ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องการเครื่อง thermal cycler แต่มีความจำเพาะต่ำเนื่องจากใช้ อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม วิธี strand displacement amplification (SDA) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยอาศัยไพรเมอร์ 4 สายและใช้อุณหภูมิเดียวในการทำปฏิกิริยา แต่มีข้อเสียคืออาจมี background สูง เนื่องจากมีการตัดสายดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องที่อาจมีอยู่ในตัวอย่างและจำเป็นต้องใช้นิวคลีโอไทด์ที่มีการดัดแปลงซึ่งมีราคาสูงเป็นสารตั้งต้น (ปริญทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, 2561) ในปี พ.ศ. 2543 Notomi และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification ซึ่งถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการด้านชีววิทยาโมเลกุล ทั้งด้านงานวิจัยทางชีวโมเลกุล ด้านการแพทย์ การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การพิสูจน์หลักฐานทางนิติศาสตร์และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Notomi et al., 2000) และในปี พ.ศ. 2562 ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับ xylenol orange ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในปลา กะพงขาว (Dangtip et al., 2019)

สำหรับเทคนิค cross-priming amplification (CPA) ได้ถูกพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2552 โดย Fang และคณะ จากบริษัท Ustar Biotechnologies Co., Ltd. เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองที่อุณหภูมิเดียว โดยใช้ cross primer เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตที่มีโครงสร้างเป็น semi-loop single-strand ด้วยคุณสมบัติ strand displacement ของเอนไซม์ DNA polymerase ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อแยกสายดีเอ็นเอ เทคนิคนี้ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงในการทำปฏิกิริยาและมีความจำเพาะสูง (Fang et al., 2009) มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าเทคนิค CPA สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียและไวรัสก่อโรคในตัวอย่างทางคลินิก เช่น การตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* จากเสมหะของผู้ป่วย

(Xu et al., 2012) การตรวจหาเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (Meng, Wang, Wang, Liu, & Ye, 2015) การตรวจเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ในตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วย (Wang et al., 2019) การตรวจหาเชื้อไวรัส African swine fever (ASF) ในตัวอย่างเลือดและซีรัมของหมูและหมูป่า (Frączyk, Woźniakowski, Kowalczyk, Niemczuk, & Pejsak, 2016) การตรวจหาเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (Yang, Huang, Yang, Liu, & Zhang, 2014) หรือการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified organisms; GMOs) (Huang, Zhai, You, & Chen, 2014) เป็นต้น จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค CPA เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีความซับซ้อน มีความไว (sensitivity) สูง สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ภายในระยะเวลาอันสั้น จึงเหมาะสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือสำหรับปฏิบัติการในภาคสนามได้ดี

อย่างไรก็ตามเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองที่อุณหภูมิเดียวยังมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากการฟุ้งกระจายของผลผลิตของปฏิกิริยา (carryover contamination) และการเกิด non-specific amplification จากการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์ (primer-primer interaction) ทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ซึ่งทำให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านและแปลผล ดังนั้นนักวิจัยจึงพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ เพื่อลดข้อจำกัดนี้ ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาโดยลดการเปิดหลอดทดลอง เช่น การสังเกตการตกตะกอนของ magnesium pyrophosphate การใช้ตัวบ่งชี้โลหะ (metal ion indicator) การใช้ SYBR Green I หรือการใช้แว็กซ์ (wax) ในการปิดปากหลอด แม้ว่าวิธีการดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการแพร่กระจายของละอองผลผลิตปฏิกิริยา (aerosol) อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการเกิด carryover contamination ได้ (Ma et al., 2017) ต่อมาจึงมีการประยุกต์ใช้ uracil-DNA-glycosylase (UDG) ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งจำเป็นต้องใส่ deoxyuridine triphosphate (dUTP) เข้าไปทดแทน deoxythymidine triphosphate (dTTP) ในสารละลายปฏิกิริยาด้วย โดยในระหว่างการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Bst DNA polymerase จะทำการเติมเบส U ลงไปในผลผลิตของปฏิกิริยา ทำให้ผลผลิตภายหลังมีเบส U ผสมอยู่ ซึ่งหากภายหลังมีการทำการทดลองอีกครั้งและเกิดการปนเปื้อนของผลผลิตของปฏิกิริยาที่มีเบส U ผสมอยู่ ผลผลิตเหล่านั้นจะถูกเอนไซม์ UDG ย่อยสลายและเหลือเพียงต้นแบบสารพันธุกรรมที่เติมเข้าไปในหลอดทดลองเท่านั้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้มีการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียวหลายประเภท เช่น การตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ด้วยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (Wang,

Wang, Li, Xu, & Ye, 2018) การตรวจสอบเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ด้วยเทคนิค cross-priming amplification (Wang et al., 2019) เป็นต้น

การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค CPA สามารถทำได้หลากหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น การตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยผลผลิตของ CPA ที่ได้มีขนาดที่แตกต่างกันเห็นเป็นลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder-like pattern) ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ช่วยในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยการใช้อินดิเคเตอร์ให้สี เช่น hydroxynaphthol blue (HNB) ซึ่งสามารถเติมลงไปในห้องสารละลายปฏิกิริยาก่อนทำการทดลองได้โดยตรง ช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปิดหลอดทดลองภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา และการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยวิธี lateral flow dipstick (LFD) โดยใช้หลักการ hybridization ระหว่าง DNA เป้าหมายกับโพรบ (probe) ที่มีการติดฉลาก ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ง่าย และใช้เวลาน้อยในการทราบผลการตรวจสอบ (Wang et al., 2018)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในปลากะพงขาว โดยใช้เทคนิค cross-priming amplification (CPA) และการใช้เอนไซม์ uracil-DNA-glycosylase (UDG) (UCPA) ในการป้องกันการเกิด carryover contamination ร่วมกับการใช้อินดิเคเตอร์ให้สีที่ชื่อ hydroxynaphthol blue (UCPA-HNB) หรือร่วมกับเทคนิค lateral flow dipstick (UCPA-LFD) เพื่อตรวจสอบผลของปฏิกิริยา โดยการออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีนแคปซิดโปรตีนซึ่งสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้อย่างจำเพาะและรวดเร็ว

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิค cross-priming amplification (CPA) ร่วมกับการใช้ uracil-DNA-glycosylase (UCPA) และตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยการใช้สี hydroxynaphthol blue (UCPA-HNB) และ lateral flow dipstick (UCPA-LFD) สำหรับการตรวจสอบอย่างจำเพาะต่อ scale drop disease virus (SDDV) ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

ขอบเขตของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยใช้เทคนิค UCPA-HNB และ UCPA-LFD
2. ศึกษาความจำเพาะของเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD เปรียบเทียบกับ PCR ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV
3. ศึกษาความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลากะพงขาวติดเชื้อโดยใช้เทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD เปรียบเทียบกับ PCR

สมมติฐานในงานวิจัย

การใช้เทคนิค UCPA ร่วมกับ HNB และ LFD มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV น่าจะเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว มีความจำเพาะและมีความไวสูงกว่าการตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ SDDV

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

สามารถพัฒนาเทคนิค UCPA ร่วมกับการใช้สี HNB และ LFD ที่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในปลากะพงขาว ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะและมีความไวสูงกว่าเทคนิค PCR

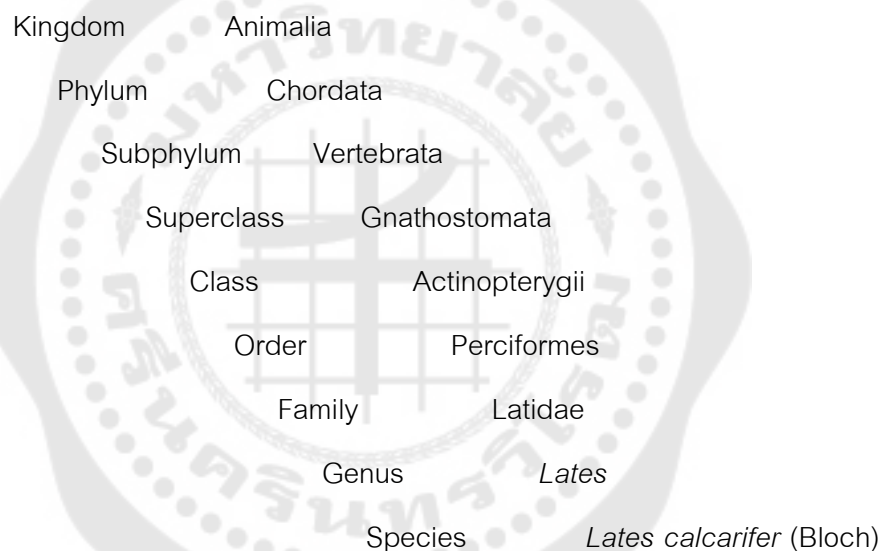
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ปลากะพงขาว (Asian seabass)

ปลากะพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* และชื่อสามัญคือ Giant sea perch, Seabass หรือ Barramundi ได้รับการจัดจำแนกอนุกรมวิธานโดย Marcus Elieser Bloch ในปี 1790 (Bloch, 1786) ไว้ดังนี้

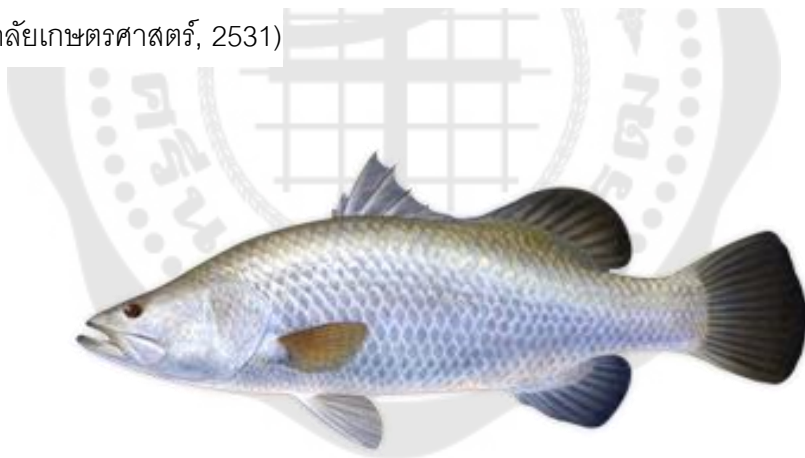
1.1 อนุกรมวิธาน



1.2 ลักษณะทั่วไปของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวมีลักษณะโดยทั่วไปคือ ลำตัวค่อนข้างยาว หนาและมีด้านข้างแบน บริเวณไหล่โค้งมน ส่วนตัวลาดชันและเว้า หัวโต นัยน์ตาโต ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้ม ปากกว้าง จะงอยปากค่อนข้างยาวและแหลม โดยมีส่วนของขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย มุมปากอยู่เลยไปทางด้านหลังนัยน์ตา ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่ แยกเป็นแนวตอนต้นและตอนท้ายอย่างชัดเจน บริเวณส่วนปากจะยึดหดได้เล็กน้อย มีฟันขนาดเล็กละเอียดที่บริเวณขากรรไกรบนและล่างรวมทั้งบริเวณเพดานปาก ช่องปากเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย แผ่นปิดเหงือกมีขนาดใหญ่ที่บริเวณขอบหลังมีลักษณะเป็นหนามแหลม 4 ซี่ เรียงต่อกันด้วยหนามซี่เล็ก ๆ ตามแนวหลัง ด้านบนส่วนหัวและบนแผ่นเหงือก พื้นลำตัวสีขาวเงินปนน้ำตาล แนวสันท้องสีขาวเงิน มี

เกล็ดขนาดต่าง ๆ กัน เกล็ดบริเวณลำตัวมีขนาดค่อนข้างใหญ่ มีขอบหยักเป็นหนามเมื่อลูบจะสากมือ มีครีบหลัง 2 ตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบเป็นหนามแข็ง ปลายแหลมคมขนาดใหญ่ 7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันด้วยเยื่อบาง ๆ ครีบหลังตอนที่ 2 แยกจากตอนแรกอย่างเห็นได้ชัด อยู่บริเวณกึ่งกลางลำตัว มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอก่อนมีปลายแตกแขนงประมาณ 10-11 ก้านมีขนาดใกล้เคียงกัน ครีบหูและครีบอกยาว ไม่ถึงรูกัน ครีบกันมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีบหลังตอนที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอก่อน 7-8 ก้าน ขั้วหางสั้น ครีบก้นค่อนข้างกลมเส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างตัว 52-61 เกล็ด นอกจากนี้สีของปลากะพงขาวขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม แต่โดยทั่วไปบริเวณด้านหลังของตัวปลาจะมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบหลัง ครีบกัน ครีบก้น มีสีเทาปนดำบาง ๆ (ภาพประกอบ 1) โดยธรรมชาติปลากะพงขาวเป็นปลาที่ปราดเปรียว ว่องไว ว่ายน้ำรวดเร็ว สามารถกระโดดพ้นน้ำได้สูงขณะตกใจหรือไล่เหยื่อ มีนิสัยซุกซ่อนอยู่ตามกองหินใต้น้ำ และออกหากินในบริเวณที่มีกระแสน้ำอ่อน ปลาขนาดใหญ่มักไม่รวมฝูง นอกจากฤดูผสมพันธุ์จะรวมเป็นกลุ่มเล็ก ๆ (Mathew, 2009; สโม สรณิ สิต คณ ะ ประ มง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2531)



ภาพประกอบ 1 ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

ที่มา: <https://freyafish.com/product/barramundilatescalcarifer/?lang=en>.

1.3 การแพร่กระจาย

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม พบการกระจายตัวในบริเวณเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ในพื้นที่เขตกึ่งวันตกและส่วนกลางของมหาสมุทรแปซิฟิกจนถึงมหาสมุทรอินเดีย ระหว่างลองจิจูดที่ 50 องศาตะวันออก ถึง 160 องศาตะวันตก ละติจูดที่ 24 องศาเหนือ ถึง 25 องศาใต้ ตั้งแต่บริเวณคาบสมุทรอาระเบีย บังคลาเทศ อินเดีย

ศรีลังกา สาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา ไทย มาเลเซีย จนถึงสาธารณรัฐประชาชนจีน ได้ค้นพบปลาชนิดนี้และตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย (Marshall, 2005) โดยสามารถพบปลาที่โตเต็มวัยได้ในบริเวณปากแม่น้ำหรือทะเลสาบที่มีความเค็มระหว่าง 30-32 ppt และความลึกที่ 10-15 เมตร (ภาพประกอบ 2) สำหรับในประเทศไทยพบการกระจายตัวของปลากะพงตามธรรมชาติบริเวณแถบชายฝั่งทะเลทั้งในอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน มักพบมากบริเวณปากแม่น้ำลำคลอง ปากทะเลสาบและปากอ่าวบริเวณที่เป็นป่าชายเลนที่มีน้ำเค็มท่วมถึงโดยเฉพาะบริเวณปากแม่น้ำใหญ่ ๆ ที่มีทางออกติดต่อกับทะเลมีป่าชายเลนขึ้นปกคลุม เช่น จังหวัดตราด จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสงคราม เป็นต้น



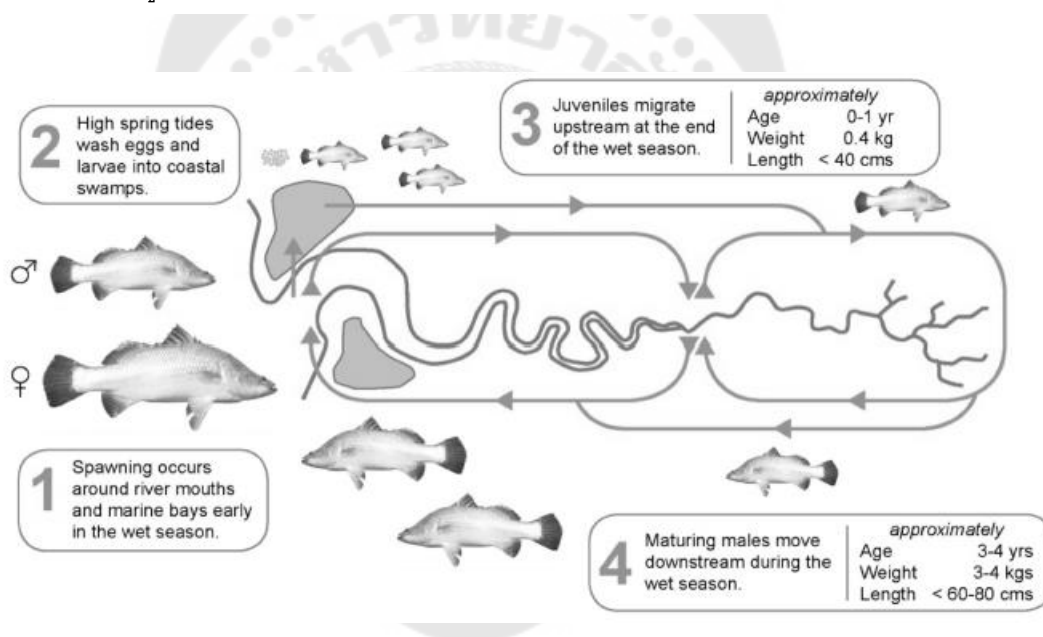
ภาพประกอบ 2 การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*)

ที่มา : Marshall, C. R. E. (2005). Evolutionary genetics of barramundi (*Lates calcarifer*) in the Australian region. Western Australia: Murdoch University.

1.4 วงจรชีวิตของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวจัดได้ว่าเป็นปลาประเภท 2 น้ำ คือในช่วงชีวิตของปลากะพงขาวพบว่าการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีอัตราการเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถเติบโตจนมีขนาด 3-5 กิโลกรัมภายใน 2-3 ปี ปลาที่โตเต็มวัยจะย้าย

จากบริเวณปากแม่น้ำไปยังทะเลที่มีระดับความเค็มอยู่ที่ประมาณ 30-32 ppt เพื่อการพัฒนาของ อวัยวะสืบพันธุ์และทำการผสมพันธุ์ในทะเล โดยปลามีวางไข่ตามวงจรการเกิดข้างขึ้นข้างแรมของ ดวงจันทร์ ซึ่งสอดคล้องกับช่วงเวลาที่น้ำกระแสน้ำพัดเข้าฝั่ง ทำให้ไข่ที่วางแล้วถูกพัดพาเข้าสู่ บริเวณชายฝั่ง ไข่จะฟักออกเป็นตัวในระยะประมาณ 24 ชั่วโมง และดำรงชีวิตในบริเวณเขตป่า ชายเลน เมื่อมีอายุประมาณ 1 ปี ปลาจะเคลื่อนที่มาอาศัยในบริเวณชายฝั่งและใช้เวลาส่วนใหญ่ เจริญเติบโต (2-3 ปี) ในแหล่งน้ำจืด เช่น แม่น้ำและทะเลสาบที่มีช่องทางเชื่อมต่อกับทะเลได้และ จะว่ายน้ำออกสู่ทะเล เพื่อทำการผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไป ปลาจะพ่วงขาจัดเป็นปลา 2 เพศ จำพวก protandrous hermaphrodite คือ เป็นกลุ่มปลาที่มีไโกนาตเป็นอันดับก่อนที่จะทำหน้าที่ เป็นรังไข่ภายหลังจากการเจริญเติบโตได้ระยะหนึ่ง โดยเมื่ออายุประมาณ 6-8 ปี ปลาจะพ่วงขาจะ เปลี่ยนจากเพศผู้ไปเป็นเพศเมีย (ภาพประกอบ 3) (Crook et al., 2017)



ภาพประกอบ 3 แบบจำลองแนวความคิดเกี่ยวกับวงชีวิตของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*)

ที่มา: Crook, D. A., Buckle, D. J., Allsop, Q., Baldwin, W., Saunders, T. M., Kyne, P. M., ... Douglas, M. M. (2017). Use of otolith chemistry and acoustic telemetry to elucidate migratory contingents in barramundi *Lates calcarifer*. Marine and Freshwater Research, 68(8), 1554.

1.5 ขั้นตอนการพัฒนาของตัวอ่อน

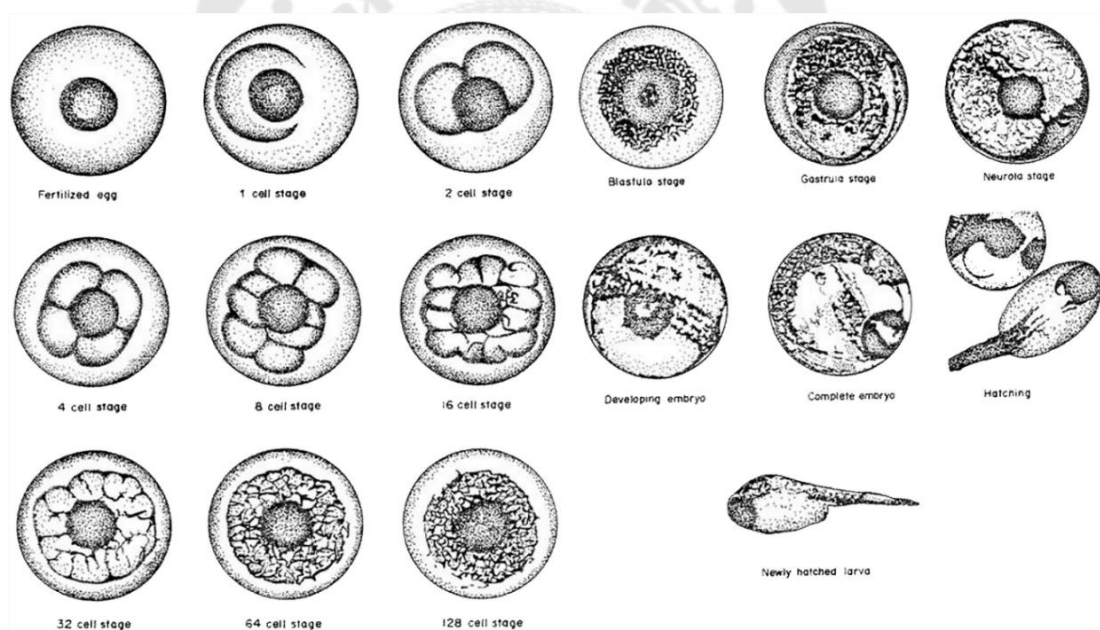
ระยะที่ไข่โกตมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกเริ่มหลังจากปฏิสนธิประมาณ 35 นาทีและเกิดการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องทุก ๆ 15-25 นาทีและไข่จะพัฒนาไปสู่ขั้นตอนแบบหลายเซลล์ (multi-celled stage) ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง การพัฒนาจะเริ่มเข้าสู่ระยะบลาสทูลา แกสทูลา นิวรูลาและระยะเอ็มบริโอตามลำดับ เอ็มบริโอจะใช้เวลาพักเป็นตัวประมาณ 18 ชั่วโมงหลังจากการปฏิสนธิที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสและความเค็มของน้ำที่ 30-32 ppt (ตาราง 1) (ภาพประกอบ 4) ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่จะมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 1.49 มิลลิเมตร ความยาวของถุงไข่แดงโดยเฉลี่ยคือ 0.86 มิลลิเมตร ภายในไข่แดงมีหยดน้ำมัน (oil globule หรือ oil droplet) อยู่บริเวณด้านหน้าของถุงไข่แดงซึ่งทำให้ไข่สามารถลอยตัวได้ในแนวตั้งหรือประมาณ 45 องศาจากแนวนอน การสะสมของเม็ดสียังไม่เป็นระเบียบทำให้ดวงตา ท่อทางเดินอาหาร cloaca และครีบทองมีลักษณะโปร่งใส สามวันหลังจากฟัก ไข่แดงในถุงไข่แดงส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมและหยดน้ำมันจะลดขนาดลง ในขั้นตอนนี้ปากจะเปิดและกรามเริ่มมีการพัฒนาเพื่อให้ตัวอ่อนสามารถกินอาหารได้ ตัวอ่อนจะอาศัยในบริเวณแหล่งน้ำที่ฟักตัวออกมาเป็นเวลาหลายเดือนก่อนที่จะว่ายน้ำขึ้นสู่แหล่งต้นน้ำ จนอายุประมาณ 3-4 ปีและเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะมีการย้ายลงมายังบริเวณปากแม่น้ำเพื่อผสมพันธุ์และวางไข่ในทะเล (Mathew, 2009)

ตาราง 1 การเจริญของเอ็มบริโอของไข่ปลากะพง (Mathew, 2009)

Embryonic stage	Hours & minutes after spawning	
	Hours	Minutes
Fertilization	-	5
2-cell	-	35
4-cell	-	55
8-cell	1	10
16-cell	1	30
32-cell	1	50
64-cell	2	20
122-cell	3	-

ตาราง 1 (ต่อ)

Embryonic stage	Hours & minutes after spawning	
	Hours	Minutes
Blastula stage	5	3
Neurola stage	9	10
Embryonic stage	11	50
Heart functioning	15	30
Hatch out	18	-

ภาพประกอบ 4 การพัฒนาเป็นตัวอ่อนของไขปลากระพงขาว (*L. calcarifer*)

ที่มา Mathew, G. (2009) Taxonomy, identification and biology of Seabass (*Lates calcarifer*) . In: Course manual: National Training on Cage Culture (Ed. Imelda Joseph et al.), Central Marine Fisheries Research Institute, December 14-23, 2009, Cochin, pp. 38-

2. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว

ในปัจจุบันเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากะพงขาวส่วนใหญ่ต้องประสบกับปัญหาเรื่องของการต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น โดยต้นทุนส่วนใหญ่ที่เกษตรกรต้องแบกรับมาจากค่าอาหารทั้งแบบการใช้ปลาสดจากธรรมชาติและการใช้อาหารสำเร็จรูป ซึ่งคิดเป็นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิต ซึ่งราคาอาหารจะผันแปรไปตามฤดูกาลและราคาน้ำมัน นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นที่จะต้องซื้อพันธุ์ปลาที่มีคุณภาพจากสถานีประมงของทางราชการหรือฟาร์มเอกชนที่ได้รับการรับรอง การอนุบาลพันธุ์ปลาก่อนที่จะทำการเพาะเลี้ยงในกระชังหรือบ่อ การควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การลงทุนในเรื่องของสถานที่ ค่าดูแลรักษาอุปกรณ์การเลี้ยงไม่ว่าจะเลี้ยงแบบกระชังหรือแบบบ่อดิน เป็นต้น

วัลภา ชีววิสิทธิ์ (2550) ศึกษาวิเคราะห์ต้นทุนและแนวทางการจัดการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังกรณีศึกษาทะเลสาบสงขลาตอนนอก บริเวณพื้นที่ตำบลเกาะยอ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา เมื่อจำแนกตามขนาดของกระชัง พบว่า กระชังขนาดเล็กมีต้นทุนทั้งหมดเท่ากับ 5,858.51 บาท คิดเป็นกำไรสุทธิเท่ากับ 430.67 บาท สำหรับกระชังขนาดใหญ่พบว่า ต้นทุนทั้งหมดเท่ากับ 4,459.41 บาท และกำไรสุทธิเท่ากับ 249.76 บาท

ต้นทุนทั้งหมดในการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังในการเลี้ยงโดยภาพรวมของเกษตรกรตำบลเกาะยอ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ปีการผลิต 2548 พบว่า มีต้นทุนทั้งหมดเท่ากับ 5,302.01 บาท แบ่งเป็นต้นทุนผันแปรและต้นทุนคงที่ เท่ากับ 4,742.65 บาท (ร้อยละ 89.45) และ 559.36 บาท (ร้อยละ 10.55) ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายด้านอาหารสด เท่ากับ 3,456 บาท (ร้อยละ 65.18) และมีผลตอบแทนเป็นกำไร เท่ากับ 558.2 บาท กำไรสุทธิเท่ากับ -1.01 บาท หมายถึงว่าเกษตรกรมีกำไรเพราะคิดเฉพาะต้นทุนที่จ่ายไปในรูปเงินสดที่อยู่ในรายการของต้นทุนผันแปร ซึ่งไม่นำค่าจ้างแรงงานในครัวเรือน ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน และค่าเสื่อมอุปกรณ์การผลิตต่าง ๆ มาคิดรวมด้วย แต่หากพิจารณาทางต้นทุนเศรษฐศาสตร์ ซึ่งได้รวมเอาต้นทุนที่มีได้จ่ายเป็นต้นทุนหรือเรียกว่าค่าเสียโอกาสที่ตนควรจะได้รับเมื่อใช้แรงงานลงไป และคิดค่าเสื่อมในอุปกรณ์การผลิตต่าง ๆ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของต้นทุนเข้าไปด้วย เกษตรกรจะขาดทุนจากการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง ตารางเมตรละ 1.01 บาท สำหรับปัญหาและอุปสรรคในการเลี้ยง ได้แก่ น้ำเสีย ศัตรูปลา โรคระบาด คุณภาพพันธุ์ปลาและน้ำดื่ม ตามลำดับ

จักรกฤษณ์ อาจารย์มรยาท (2552) จากผลการศึกษาเรื่องการวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตปลากะพงขาวในกระชัง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ปี พ.ศ. 2550 โดยใช้ข้อมูลจากการสำรวจผู้เพาะเลี้ยงปลากะพง จำนวน 56 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผู้เพาะเลี้ยงที่ใช้กระชังลักษณะแบบ

ทุนลอยและผู้เพาะเลี้ยงที่ใช้กระชังลักษณะแบบยึดติดจำนวน 20 และ 36 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบว่าเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงที่ใช้กระชังลักษณะแบบทุนลอยมีต้นทุนการผลิตทั้งหมดเท่ากับ 3,952.06 บาท กำไรสุทธิเฉลี่ย 1.01 บาทต่อลูกบาศก์เมตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ใช้กระชังลักษณะแบบยึดติดมีต้นทุนการผลิตทั้งหมดเท่ากับ 1,442.06 บาท กำไรสุทธิเฉลี่ย 73.82 บาทต่อลูกบาศก์เมตร และต้นทุนการผลิตที่เป็นเงินสดของผู้เพาะเลี้ยงทั้ง 2 ลักษณะกระชัง ส่วนใหญ่เป็นค่าอาหารปลาคิดเป็นร้อยละ 82.25 และ 85.31 ของต้นทุนทั้งหมด ตามลำดับ ส่วนต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสดส่วนใหญ่เป็นค่าเสื่อมราคาอุปกรณ์คิดเป็นร้อยละ 2.41 และ 1.40 ของต้นทุนทั้งหมด ตามลำดับ

จุฑารัตน์ จุลศิริพงษ์ (2553) วิเคราะห์ต้นทุนและผลตอบแทนการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังในอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา เพื่อศึกษาต้นทุนและผลตอบแทนจากการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังของเกษตรกรโดยเปรียบเทียบตามขนาดฟาร์ม กำหนดให้ฟาร์มขนาดเล็กมีเนื้อที่กระชัง 48-480 ตารางเมตร และฟาร์มขนาดใหญ่มีเนื้อที่กระชังมากกว่า 480 ตารางเมตร พบว่าต้นทุนทั้งหมดต่อตารางเมตรของทุกขนาดฟาร์มเท่ากับ 8,838.96 บาท เมื่อแยกตามขนาดฟาร์มพบว่าฟาร์มขนาดเล็กและฟาร์มขนาดใหญ่มีต้นทุนทั้งหมดต่อตารางเมตรเท่ากับ 13,243.95 และ 7,179.75 บาท ตามลำดับ คิดเป็นต้นทุนทั้งหมดต่อน้ำหนักปลากะพงขาว 1 กิโลกรัมของทุกขนาดฟาร์ม เท่ากับ 89.45 บาท ในขณะที่ฟาร์มขนาดเล็กและขนาดใหญ่เท่ากับ 98.08 และ 84.34 บาท ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับรายได้ต่อตารางเมตรของรวมทุกขนาดฟาร์ม ฟาร์มขนาดเล็กและฟาร์มขนาดใหญ่เท่ากับ 12,100.06, 15,013.12 และ 11,002.84 บาท ตามลำดับ คิดเป็นรายได้ทั้งหมดต่อน้ำหนักปลากะพงขาว 1 กิโลกรัมของรวมทุกขนาดฟาร์มเท่ากับ 122.48 บาท ฟาร์มขนาดเล็กและฟาร์มขนาดใหญ่เท่ากับ 111.17 และ 129.25 บาท ตามลำดับ สำหรับรายได้สุทธิเฉลี่ยของทุกขนาดฟาร์มอยู่ที่ 41.13 บาท ต่อกิโลกรัม รายได้สุทธิของฟาร์มขนาดเล็กและรายได้สุทธิของฟาร์มขนาดใหญ่อยู่ที่ 21.80 และ 52.66 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อหักต้นทุนทั้งหมดออกจากรายได้ทั้งหมดแล้ว ปรากฏว่า มีกำไรสุทธิเฉลี่ยของทุกขนาดฟาร์ม 33.03 บาทต่อกิโลกรัม กำไรสุทธิของฟาร์มขนาดเล็ก 13.09 บาทต่อกิโลกรัม และกำไรสุทธิของฟาร์มขนาดใหญ่ 44.91 บาทต่อกิโลกรัม จากผลการศึกษาจะพบว่าฟาร์มที่มีขนาดใหญ่มีกำไรสุทธิเฉลี่ยสูงกว่าฟาร์มขนาดเล็กเนื่องจากสามารถผลิตปลากะพงได้ในปริมาณมากกว่าและยังมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า ส่วนปัญหาที่ผู้เลี้ยงปลากะพงขาวพบมากที่สุด คือปัญหาเรื่องอาหารปลา ร้อยละ 93.05 รองลงมา คือปัญหาน้ำ ลูกพันธุ์ปลา โรคปลา และเทคนิคการเลี้ยงปลาร้อยละ 91.67, 88.89, 77.78 และ 22.22 ตามลำดับ

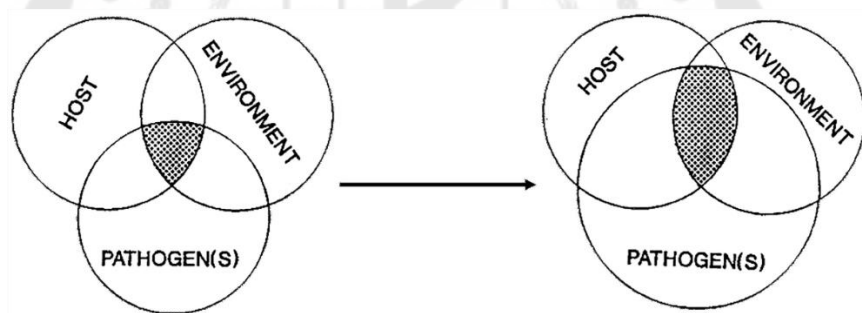
นิตยา ร่วมชาติ และ อภิสิทธิ์ นุชนทร (2558) ศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนและอัตราผลตอบแทนระหว่างการเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อน้ำกร่อยและบ่อน้ำเค็ม กรณีศึกษากลุ่มผู้เลี้ยงปลากะพงขาวในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างรายได้ ต้นทุนผลตอบแทน และจุดคุ้มทุน โดยใช้วิธีการรวบรวมข้อมูลจากแบบสัมภาษณ์เกษตรกร จำนวน 24 ราย บนพื้นที่ 1 ไร่ กำหนดระยะเวลา 5 ปี อัตราดอกเบี้ย 6% ผลการศึกษาพบว่าต้นทุนการผลิตของการเลี้ยงแบบบ่อน้ำกร่อยและบ่อน้ำเค็มอยู่ที่ 850,784.15 และ 788,305.00 บาท ตามลำดับ มีรายได้จากผลผลิตของการเลี้ยงแบบบ่อน้ำกร่อย 1,914,250.00 บาท บ่อน้ำเค็ม 1,908,750.00 บาท โดยมีระยะเวลาคืนทุนบ่อน้ำกร่อย 1 ปี 9 เดือน 6 วัน บ่อน้ำเค็ม 1 ปี 8 เดือน 4 วัน และมีจุดคุ้มทุนบ่อน้ำกร่อย 96,529.25 บาทและบ่อน้ำเค็ม 86,643.80 บาท พบว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อน้ำเค็มให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่าน่ากว่าเนื่องจากมีอัตราผลตอบแทนสูง ระยะเวลาคืนทุนเร็ว จุดคุ้มทุนต่ำ

จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นธุรกิจที่มีมูลค่าการลงทุนสูง ทำให้กำไรสุทธิของเกษตรกรต่ำ ประกอบกับปัญหาแหล่งเลี้ยงมีสภาพเสื่อมโทรม ความอ่อนแอของพันธุ์ปลาที่นำมาเลี้ยงต้องเดินทางมาเป็นระยะไกลจากการขนส่ง หรือประเด็นการนำเข้าปลากะพงขาวจากประเทศมาเลเซียในราคาถูกและส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในประเทศ ดังนั้นหนทางหลักในการเพิ่มกำไรสุทธิคือการลดต้นทุนการผลิต เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน แต่เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่ขาดอำนาจต่อรองเรื่องต้นทุนและราคาขายหน้าฟาร์ม ทำให้จำเป็นต้องหาหนทางในการเพิ่มปริมาณหรือคุณภาพของผลผลิตเข้ามาทดแทน ยกตัวอย่างเช่น การปล่อยเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง การเพิ่มปริมาณอาหาร การให้อาหารเสริม ซึ่งการกระทำเหล่านี้หากขาดการบริหารจัดการที่เหมาะสมย่อมส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของปลา ทำให้แหล่งเลี้ยงเกิดการหมักหมมของเศษอาหาร และปัญหาน้ำเสียอันเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค ซึ่งทำให้ปลาเกิดความเครียด กินอาหารน้อยลง การให้น้ำน้อยลง โตช้า อ่อนแอและง่ายต่อการเกิดโรค

3. การเกิดโรคในปลากะพงขาว

ลักษณะการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยได้ขยายตัวเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว กลายเป็นลักษณะของอุตสาหกรรมที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด จนบางครั้งเกิดสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีความหนาแน่นของจำนวนสัตว์น้ำต่อพื้นที่เพาะเลี้ยงมากเกินไป ซึ่งสภาพการเลี้ยงที่หนาแน่นเช่นนี้มักก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของสัตว์น้ำและ

สิ่งแวดล้อมได้ง่าย เนื่องจากการก่อให้เกิดสภาพความเครียดต่อสัตว์น้ำหรือสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงหรือคุณภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยงไม่ครบตามหลักโภชนาการ หรือผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง เช่น ความเค็มหรืออุณหภูมิ ย่อมทำให้ปลาอ่อนแอ และทำให้ต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคจากเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา ปรสิต ซึ่งปัญหาเหล่านี้ก่อให้เกิดผลกระทบผลผลิตเป็นอย่างมาก จากที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการเกิดโรคมักมีลักษณะเป็นความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างปลา (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogens) เมื่อปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งมีอิทธิพลเพิ่มมากขึ้นย่อมส่งผลต่อสมดุลและส่งผลให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (ภาพประกอบ 5) (Lightner & Redman, 1998) หนึ่งในสาเหตุสำคัญก็คือโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสในปลา ซึ่งก่อให้เกิดการตายเป็นวงกว้าง มีความสามารถในการแพร่ระบาดสูง อีกทั้งโรคที่มีสาเหตุจากไวรัสยังไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยการให้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมี ทำให้ส่งผลกระทบรุนแรงต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นอย่างมาก โดยโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไวรัสในปลากะพงขาว ได้แก่



ภาพประกอบ 5 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างปลา (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogens) กับการก่อโรคในปลา โดยพื้นที่สีเทาเป็นบริเวณที่เกิดโรคซึ่งมีปัจจัยส่งผลกระทบ เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค เมื่อเพิ่มมากขึ้นย่อมส่งผลให้การก่อโรคหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (ดัดแปลงจาก Lightner & Redman, 1998)

ที่ ม า Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1-4), 201-220.

1. Nervous necrosis virus (NNV) เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคระบบประสาทตาและสมองเสื่อมจากเชื้อไวรัส (viral encephalopathy and retinopathy) หรือโรคดวงสว่าง มีรายงานครั้งแรกในฟาร์มปลากะพงที่ออสเตรเลียในช่วงกลางทศวรรษ 1980 ถูกจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Betanodavirus* วงศ์ *Nodaviridae* เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) มีรูปร่างแบบ icosahedral ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25-30 นาโนเมตร สารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 2 สาย โดยที่สายแรกไม่สร้างโปรตีน มีขนาดประมาณ 3.1 กิโลเบส (kb) สายที่ 2 มีการสร้างโปรตีน มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส (van Regenmortel et al., 2000) โดยไวรัสจะเข้าทำลายระบบประสาทส่วนกลางของปลา เช่น สมอง ตา ทำให้เกิดการตายเฉพาะส่วนของเซลล์และการสลายตัวของเซลล์ (Azad, Shekhar, Thirunavukkarasu, & Jithendran, 2006) ทำให้ปลาที่ป่วยแสดงอาการผิดปกติของระบบประสาท ได้แก่ การว่ายน้ำแบบดวงสว่าง อาการตัวอืด หงอยมากกว่าปกติ มีอัตราการตายสูงถึง 90-100% ภายใน 1-2 วัน มักส่งผลกระทบในลูกปลาวัยอ่อนและปลาวัยรุ่น ซึ่งสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาเป็นจำนวนมาก โดยเชื่อว่าการแพร่ระบาดของโรคมีความสัมพันธ์กับการเพาะเลี้ยงในอัตราที่หนาแน่นมากเกินไป จากการศึกษาพบว่าเชื้อสามารถแพร่กระจายได้ทั้งรูปแบบ horizontal transmission คือแพร่กระจายได้โดยการสัมผัสกับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ไปสู่ลูกหรือที่เรียกว่า vertical transmission ได้อีกด้วย (Alvarez-Pellitero, 2004) มีรายงานการระบาดของโรคนี้ในภูมิภาคเอเชีย เช่น ประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย อิสราเอล มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ สิงคโปร์ ตาฮิติ ไต้หวันและไทย (Munday, Kwang, & Moody, 2002)

2. Lymphocystis disease virus (LCDV) ก่อให้เกิดโรค lymphocystis โดยไวรัสชนิดนี้ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในวงศ์ *Iridoviridae* สกุล *Lymphocystivirus* เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) มีสารพันธุกรรมแบบดีเอ็นเอสายคู่เส้นเดี่ยว รูปร่างแบบ icosahedral ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 215-240 นาโนเมตร โดยขนาดของไวรัสขึ้นอยู่กับปลาที่เป็นโฮสต์ (Roberts, 2012) โรค lymphocystis มักเป็นการติดเชื้อที่ผิวหนัง พบมากในปลากะดุกแฉ่ง พบการติดเชื้อทั้งในปลาทะเลและปลาน้ำจืดทั่วโลก มีรายงานการติดเชื้อในปลากะพงขาวในประเทศออสเตรเลีย ไทยและสิงคโปร์ (Hutson, 2013) โดยปลาที่ติดเชื้อพบการเจริญที่ผิดปกติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิวหนังปลาทำให้เกิดเป็นตุ่มสีขาวครีมหรือเทาคล้ายหูดมีขนาดต่าง ๆ กัน มักพบบริเวณหลังและครีบหลังของปลา ตุ่มเหล่านี้มักอยู่รวมกันเป็นกระจุกเนื่องจากการขยายตัวของเซลล์ที่ติดเชื้อของไวรัสดังกล่าว (Samalecos, 1986) โรคนี้มักมีลักษณะแบบเรื้อรังและการพัฒนาของโรคซ้ำทำให้มีอัตราการตายในปลาต่ำ แต่เนื่องจากลักษณะภายนอก

ของปลาติดเชื้อที่มีตุ่มเนื้อทำให้ลักษณะภายนอกไม่สวย ส่งผลต่อมูลค่าทางเศรษฐกิจและยังเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรียหรือปรสิตชนิดอื่นอีกด้วย

3. Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค Infectious spleen and kidney necrosis จัดอยู่ในสกุล *Megalocytivirus* วงศ์ Iridoviridae เป็นเชื้อไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped) มีรูปร่างแบบ icosahedral มีสารพันธุกรรมแบบดีเอ็นเอเส้นคู่ (Jancovich, Steckler, & Waltzek., 2015) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 150–200 นาโนเมตร ในปี 2541 มีรายงานการระบาดอย่างรุนแรงของโรคนี้ในฟาร์มปลาแมนดารินในเซตหนานไห่ มณฑลกว่างตง ซึ่งทำให้เกิดการตายถึง 100% ภายใน 7-10 วัน โดยปลาที่ติดเชื้อมีอาการกินอาหารน้อยลง ว่ายน้ำผิดปกติที่ด้านข้างของบ่อ ลำตัวและเหงือกมีสีซีดลง พบจุดเลือดออกบริเวณผิวของลำตัว เช่น แผ่นปิดเหงือก ขากรรไกรล่าง บริเวณรอบ ๆ ดวงตา มีจุดเลือดออกกระจายอยู่ทั่วลำตัวบริเวณโคนครีบหลัง ครีบอก ครีบกาง ส่วนท้องและยังพบอาการเกล็ดหลุดในช่วงท้ายของการติดเชื้ออีกด้วย (He, Wang, Zeng, Huang, & Chan, 2000) จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางมิชฌูวิทยาพบว่าในปลาที่ตายมีการตายของเซลล์ (necrosis) ในเนื้อเยื่อและพบการเพิ่มขนาดของเซลล์ที่ผิดปกติ (hypertrophy cells) ในไตและม้าม เมื่อมีอาการติดเชื้อที่ม้ามและไตส่งผลให้ไตบวม ขยายขนาดขึ้นผิดปกติ หัวใจและตับมีสีซีดและจุดเลือดออกและยังสามารถตรวจพบเซลล์ที่มีการติดเชื้อ ISKNV ได้ในไต ม้าม ไต ตับ เหงือก ทางเดินอาหาร ลำไส้และกล้ามเนื้ออีกด้วย (Xu et al., 2010; Xu et al., 2008) โดยเชื้อ ISKNV เป็นเชื้อไวรัสที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากมีความสามารถในการก่อโรคสูงและสามารถติดเชื้อได้ทั้งในปลาน้ำจืดและน้ำเค็มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก

4. โรค scale drop syndrome หรือ scale drop disease

โรค scale drop syndrome (SDS) ได้ถูกรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ.2535 จากฟาร์มปลากะพงขาวในรัฐปีนัง ประเทศมาเลเซีย ซึ่งลักษณะสำคัญของโรคคือ ปลาที่ติดเชื้อจะมีอาการเกล็ดหลุด ต่อมา มีรายงานถึงปลาที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติคล้ายคลึงกับโรค SDS ในประเทศสิงคโปร์ในปี พ.ศ.2545, 2549 และ 2552 และในปี พ.ศ.2553 พบการระบาดของโรคในจังหวัดบันตัม ประเทศอินโดนีเซียและประเทศสิงคโปร์ และอีกครั้งในปี พ.ศ. 2554 บริเวณช่องแคบมะละกา (de Groof et al., 2015) แต่เดิมนั้นมีการเข้าใจว่าโรคนี้เกิดจากการติดเชื้อ *Tenacibaculum maritimum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มักพบในปลาทะเลโดยทำให้ปลาที่ติดเชื้อเป็นแผลเปื่อยที่ผิวหนัง (Avendaño-Herrera, Toranzo, & Magariños, 2006) เมื่อมีการทดลอง

ใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาพบว่าไม่เกิดการตอบสนอง จึงมีการตั้งสมมติฐานว่าโรคนี้อาจเกิดจากไวรัส ในปี พ.ศ. 2559 Ad de Groof และคณะได้ทำการศึกษาเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการตายของปลากะพงขาวที่มีลักษณะอาการของโรคแบบนี้โดยสามารถพิสูจน์ว่าโรค scale drop syndrome (SDS) ที่พบเกิดจากไวรัสที่มีชื่อว่า scale drop disease virus (SDDV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ถูกจัดอยู่ในสกุล *Megalocytivirus* วงศ์ Iridoviridae โดยโรคดังกล่าวส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงและส่งออกปลากะพงขาวเป็นอย่างมาก เนื่องจากลูกปลาที่ติดเชื้อมีอัตราการตายสูงและมีการระบาดอย่างรวดเร็ว

สำหรับประเทศไทยพบว่าเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในภาคตะวันออกได้รายงานถึงโรคที่ไม่เป็นที่รู้จักมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 โดยโรคนี้ส่งผลกระทบต่อปลาในวัยเจริญพันธุ์ (sub-adult) และโตเต็มวัย (adult) ทั้งในระบบการเลี้ยงแบบกระชังและบ่อ โดยปลามีการแสดงอาการเกล็ดหลุดและบางตัวพบว่าผิวหนังบริเวณท้องมีสีแดงหรืออาการตกเลือดที่ผิวหนัง เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงจึงเรียกโรคนี้ว่า โรคท้องแดง (red belly syndrome) (Senapin et al., 2019)

ปลาที่ติดเชื้อมีลักษณะอาการของโรคคือ อาการเซื่องซึม ว่ายน้ำผิดปกติ ลำตัวมีสีเข้ม (ภาพประกอบ 6) มีอาการเกล็ดหลุด ครีบและหางกร่อน เหงือกมีสีซีด บางครั้งพบอาการตาบวม ปูด นอกจากนี้ยังพบอาการหลอดเลือดอักเสบที่ผิวหนังและอวัยวะภายใน มีการสะสมของไขมันในตับ พบจุดเลือดออกหรือแต้มเลือดขนาดใหญ่ในเนื้อเยื่อตับ ไต ม้าม เซลล์ม้ามโต (de Groof et al., 2015; Gibson-Kueh et al., 2012) ปลาที่ติดเชื้อในธรรมชาติมีอัตราการตายสะสมที่ 40-50% ในระยะเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ จากการทดลองใช้เชื้อ SDDV ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง seabass kidney (SK21) ฉีดเข้าไปในช่องท้อง (intraperitoneal injection, IP) และกล้ามเนื้อ (intramuscular injection, IM) ของปลากะพงขาว จากผลการทดลองพบว่า ปลา มีอัตราการตายที่ประมาณ 20%–60% ในระยะเวลา 10-15 วัน ขึ้นกับปริมาณและช่องทางการได้รับไวรัส (de Groof et al., 2015) และเสียชีวิตภายใน 3-4 วันหลังจากเริ่มมีอาการทางคลินิก



ภาพประกอบ 6 ปลากะพงขาวที่เป็นโรค scale drop syndrome พบลักษณะผิวหนังที่มีสีเข้มและเกิดบริเวณเหนือโคนหางหลุด (ลูกศร)

ที่มา: Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y. H., Tay, S., Leong, L. N., ... Ferguson, H. W. (2012). The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. *Journal of Fish Diseases*, 35(1), 19–27.

ในปี พ.ศ. 2563 Nurliyana และคณะ ได้ทำการศึกษาถึงสาเหตุของโรคที่ไม่ทราบสาเหตุในฟาร์มปลากะพงขาวในประเทศมาเลเซีย ซึ่งเป็นสาเหตุการตายในปลากะพงขาวตัวเต็มวัย โดยมีลักษณะของโรคคล้ายกับโรคเกล็ดหลุด คือ ลำตัวมีสีเข้มขึ้น เกล็ดหลุดออกง่าย ท้องแดง และว่ายบนผิวน้ำ จากผลการศึกษาพยาธิสภาพของโรค พบว่า มีความผิดปกติที่อวัยวะภายใน มีอาการเลือดคั่งในม้ามและสมอง มีการอักเสบของเซลล์ต่อมน้ำเหลือง พบว่ามี inclusion bodies ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับ เมื่อทำการศึกษาด้วย TEM พบว่ามีอนุภาคของไวรัสในเซลล์ และเมื่อตรวจวินิจฉัยด้วย PCR พบว่า ปลาที่มีลักษณะอาการดังกล่าวติดเชื้อ SDDV ภายหลังเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ พบว่าเชื้อ SDDV จากประเทศมาเลเซียมีความเหมือนกับเชื้อ SDDV ที่มาจากประเทศสิงคโปร์และประเทศไทยอยู่ที่ 99.20% (Nurliyana et al., 2020)

ในปี พ.ศ. 2563 ได้มีการรายงานถึงการติดเชื้อ SDDV ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* ในฟาร์มปลากะพงขาว ซึ่งถือเป็นรายงานแรกที่มีการระบุถึงการติดเชื้อ SDDV ในปลากะพงขาวที่ทำการเพาะเลี้ยงในน้ำจืด โดยพบว่าปลามีการแสดงออกของโรค

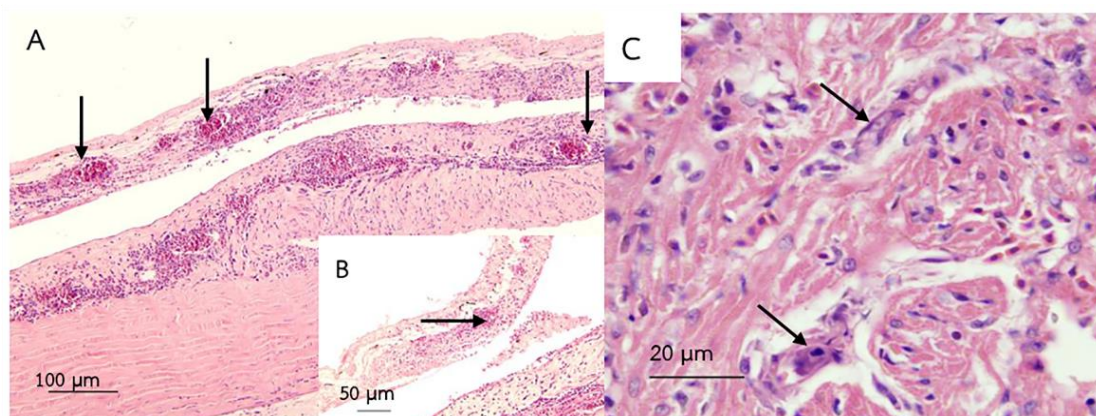
จากการติดเชื้อทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานของการติดเชื้อ SDDV ว่า ปลากระพงขาวดังกล่าวอาจมีการติดเชื้อมาตั้งแต่ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงในน้ำกร่อยก่อนที่จะมีการย้ายมาเพาะเลี้ยงต่อในน้ำจืด ภายหลังเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม กระตุ้นให้เกิดสภาพของโรคจากการติดเชื้อ SDDV และเชื้อฉวยโอกาส คือ *F. columnare* (Kerddee et al., 2020)

ในปี พ.ศ. 2564 Fu และคณะ ได้ทำการศึกษาถึงสาเหตุของโรค yellowfin seabream ascites diseases (YFSBAD) ที่เกิดการระบาดในฟาร์มปลา yellowfin seabream ในเขตจินวาน เมืองจูไห่ มณฑลกวางตุ้ง ภายหลังการนำน้ำในช่องท้องของปลาที่มีอาการของโรค มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เพาะเลี้ยง MFF-1 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงเกิด cytopathic effect ภายใน 6 วัน หลังการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการศึกษาด้วย TEM พบอนุภาคของไวรัสที่มีขนาดประมาณ 140 นาโนเมตร และเมื่อทำการศึกษา whole genome ของเชื้อ ซึ่งตั้งชื่อว่า ZH-06/20 โดยการใช้ Illumina sequencer พบว่ามีสารพันธุกรรมขนาดประมาณ 131,122 คู่เบส มี open reading frame (ORF) ประมาณ 135 ORF เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ ZH-06/20 โดยใช้ยีนอนุรักษ์ (conserved gene) 26 ยีนของเชื้อไวรัสในวงศ์ Iridoviridae พบว่าเชืวดังกล่าวมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ Singaporean SDDV (accession no. NC_027778.1) และ Thailand SDDV (accession no. MN562489.1) อยู่ที่ 99.94% และ 99.91%, ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นรายงานแรกทีกล่าวถึงการติดเชื้อ SDDV ในปลาชนิดอื่น นอกจากปลากระพงขาว (Fu et al., 2021)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เชื้อ SDDV มักมีการระบาดในฟาร์มปลากระพงขาวที่มีการเพาะเลี้ยงแบบกระชังในเขตน้ทะเลหรือเขตน้กร่อย แต่จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อ SDDV ในน้ำจืด เนื่องจากเป็นไวรัสในวงศ์ Iridoviridae ดังนั้นจึงมีการคาดการณ์ถึงรูปแบบการแพร่กระจายที่คล้ายคลึงกัน คือสามารถแพร่กระจายจากโฮสต์ไปสู่กลุ่มประชากรอื่นได้โดยอาศัยการส่งผ่านจากน้ำหรือโดยการกินเนื้อเยื่อจากสิ่งมีชีวิตที่ติดเชื้อ (horizontal transmission) (Go & Whittington, 2006) หรือการขนย้ายลูกปลาที่ติดเชื้อ แต่ไม่พบหลักฐานการแพร่กระจายไวรัสจากแม่พันธุ์ปลาไปสู่ไข่หรือลูกปลา (vertical transmission) (He, Zeng, Weng, & Chan, 2002)

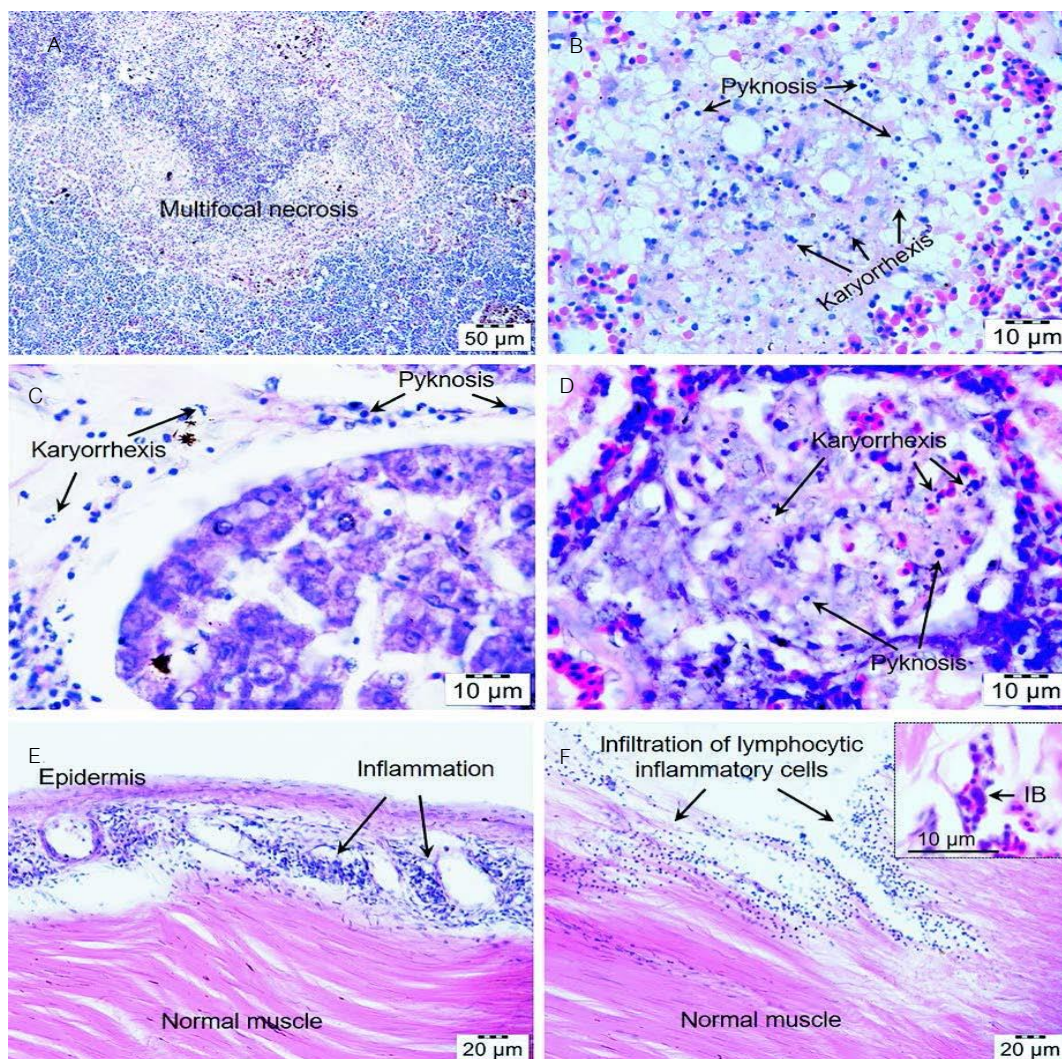
5. พยาธิสภาพของปลาที่ติดเชื้อ SDDV

การศึกษาพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อพบลักษณะเด่นของโรคคือ การเกิดหลอดเลือดอักเสบ (vasculitis) ในอวัยวะภายในที่สำคัญทั้งหมดและพบการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อซึ่งทำให้เกิดอาการตกเลือดและเซลล์ตาย ในบางกรณีมีการเกิดลิ่มเลือดและพบการอักเสบที่หลอดเลือดของอวัยวะสำคัญ เช่น เหงือก ตับ ไตและม้าม พบการตายของเซลล์ผนังหลอดเลือดและเนื้อเยื่อรอบหลอดเลือดอักเสบ ทำให้ขนาดของหลอดเลือดลดลง บริเวณผิวหนังมีเนื้อเยื่อตาย (ภาพประกอบ 7C) ซึ่งสอดคล้องกับบริเวณที่มีอาการเกล็ดหลุด (ภาพประกอบ 7A, B) และพบการแทรกของเซลล์ลิมโฟไซต์ในบริเวณที่เกิดการอักเสบ (ภาพประกอบ 8E, F) มีการพบเซลล์ตายกระจายทั่วตับของปลาที่ติดเชื้อ (multifocal necrosis) (ภาพประกอบ 8A) พบการหดตัวของนิวเคลียส (nuclear pyknosis) และมีการแตกของนิวเคลียส (karyorrhexis) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับและไกลเมอรูลัสของไต (ภาพประกอบ 8B-D) ม้าม กระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าอวัยวะเป้าหมายของไวรัสคืออวัยวะที่มีต้นกำเนิดจากเยื่อเมือก (epithelial tissue) และพบ inclusion bodies ในไซโทพลาซึมของเซลล์กล้ามเนื้อที่ติดเชื้อซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของโรคที่เกิดจากไวรัสในวงศ์ Iridoviridae (ภาพประกอบ 8F) (Senapin et al., 2019)



ภาพประกอบ 7 ฝัวหนัของปลาเกะพงขาว ที่มีอาการของโรค scale drop syndrome ; (A) อาการเกิดหลุดร่วมาับการอักเสบที่รุนแรงของเนื้อเยื่อรอบหลอดเลือด (ลูกศร) (B) เซลล์ตายบริเวณฐานเกิด ในบริเวณที่เกิดหลุด (C) พบการตายของเซลล์ผนังหลอดเลือดโคโรนารีในกล้ามเนื้อหัวใจ (ลูกศร)

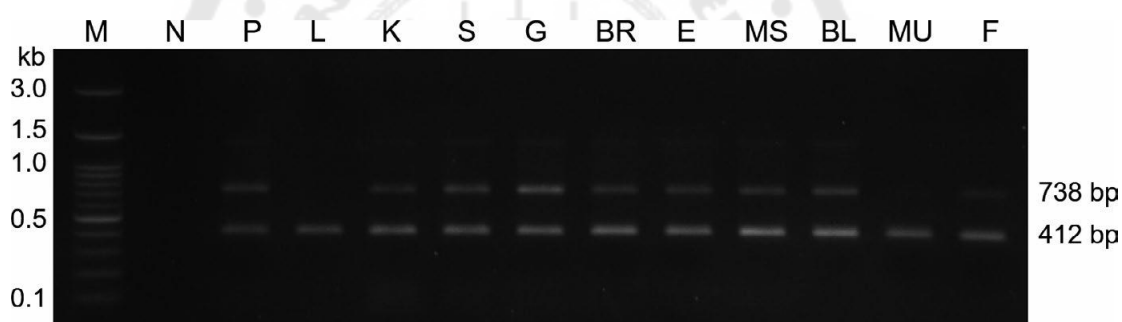
ที่มา: Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y. H., Tay, S., Leong, L. N., ... Ferguson, H. W. (2012). The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. Journal of Fish Diseases, 35(1), 19–27.



ภาพประกอบ 8 เนื้อเยื่อของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ติดเชื้อ SDDV ตามธรรมชาติโดยผ่าน การย้อมสี hematoxylin และ eosin ; (A) กำลังขยายต่ำ พบการตายของเซลล์มี้ามในตำแหน่ง ต่างๆ (B) กำลังขยายสูง พบการตายของเซลล์มี้ามในตำแหน่งต่างๆ (C) พบการเกิด karyorrhexis และ pyknosis ในเซลล์มี้าม เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในตับ และ (D) โกลเมอรูลัสของไต (E) พบการแทรก ตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ในบริเวณผิวหนังที่มีการอักเสบและ (F) พบ inclusion bodies ในไซโทพลาซึมของเบโซฟิล (เส้นประสีเหลี่ยม)

ที่มา : Senapin, S., Dong, H. T., Meemetta, W., Gangnonngiw, W., Sangsuriya, P., Vanichviriyakit, R., ... & Nuangsaeng, B. (2019). Mortality from scale drop disease in farmed *Lates calcarifer* in Southeast Asia. *Journal of fish diseases*, 42(1), 119-127.

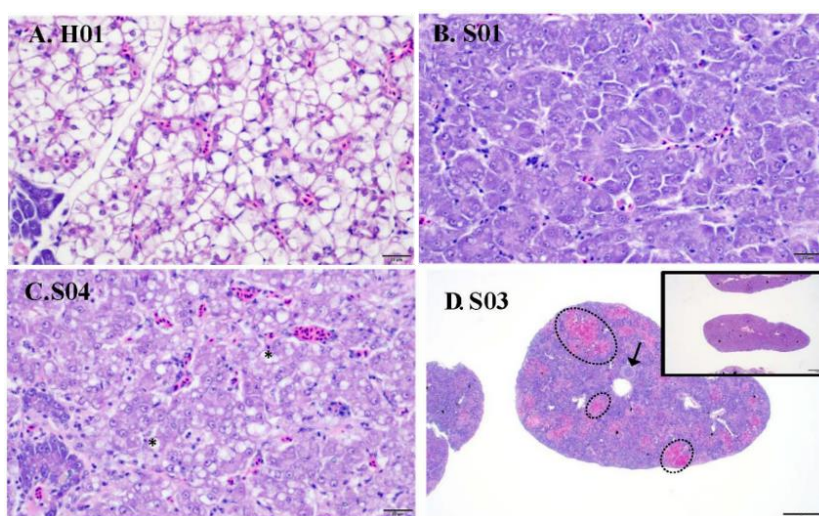
จากการศึกษาของอรอนงค์ เจริญไวย์ และคณะในปี พ.ศ. 2563 เรื่อง การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลากะพงขาวและพาหะนำโรค พบว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างจากปลากะพงขาวในจังหวัดจันทบุรี โดยมีตัวอย่างที่ต้องทำลายปลา (lethal sample) ได้แก่ ตับ ไต ม้าม เหงือก สมอง ตา และกล้ามเนื้อ และตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา ได้แก่ เลือด เมือก และครีบท่าง จากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค semi-nested PCR ที่จำเพาะต่อยีน *ATPase* ของไวรัส พบว่าตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ ไตกับเหงือกมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV และตัวอย่างกลุ่ม non-lethal ได้แก่ เลือดและเมือกจะมีความไวในการตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV สูงกว่าครีบท่าง เมื่อพิจารณาถึงระดับการติดเชื้อในแต่ละอวัยวะของปลา พบว่า เหงือกและม้ามมีความเข้มข้นของแบน *ATPase* มากกว่าเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่น เช่นเดียวกับแบนของเลือดที่มีความเข้มข้นมากกว่าเมือกและครีบท่าง (ภาพประกอบ 9) (Charoenwai, Senapin, Dong, & Sonthi, 2021)



ภาพประกอบ 9 ผลการตรวจสอบยีน *ATPase* ของเชื้อไวรัส SDDV ในอวัยวะต่าง ๆ ของตัวแทนปลาติดเชื้อ ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ซึ่งมีขนาดยีน 412 และ 738 bp ได้แก่ ตับ (L, Liver) ไต (K, Kidney) ม้าม (S, Spleen) เหงือก (G, Gill) สมอง (BR, Brain) ตา (E, Eye) กล้ามเนื้อ (MS, Muscle) เลือด (BL, Blood) เมือก (MU, Mucus) และครีบท่าง (F, Caudal fin) M คือ 100 bp DNA ladder; N คือ ตัว ควบคุมลบ (negative control); P คือ ตัวควบคุมบวก (positive control)

ที่มา: Charoenwai, O., Senapin, S., Dong, H. T., & Sonthi, M. (2021). Detection of scale drop disease virus from non-destructive samples and ectoparasites of Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of Fish Diseases*, 44(4), 461-467.

ต่อมาในปี พ.ศ. 2564 Domingos และคณะ ได้ทำการศึกษาถึงการแสดงออกที่ลดลงของยีนที่เกี่ยวข้องระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว เมื่อเกิดการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ SDDV และ *Lates calcarifer* Herpes Virus (LCHV) จากการศึกษาถึงพยาธิสภาพของปลา พบว่า ไซโทพลาซึมของเซลล์ตับจากปลาติดเชื้อถูกย้อมติดสีน้ำเงินมากกว่าปกติ (basophilic cytoplasm) ร่วมกับไขมันสะสมของเซลล์ตับที่ลดลง (S01) (ภาพประกอบ 10B) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับที่มาจากปลาที่มีสุขภาพดี (H01) (ภาพประกอบ 10A) หรือพบภาวะที่มีการสะสมของไขมันในตับมากจนเกินไป (severe hepatic lipidosis) และ lipid vacuole ขนาดใหญ่ (*) ในเนื้อเยื่อตับของปลาติดเชื้อ (S04) (ภาพประกอบ 10C) และภาวะม้ามอักเสบร่วมกับการตายของเซลล์กระจายเป็นจุดในม้าม (multifocal necrosis) ของปลาติดเชื้อ (S03) (ภาพประกอบ 10D) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสำนวนของไวรัสที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค qPCR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่สกัดจากเนื้อเยื่อตับและม้ามของตัวอย่างปลา (Domingos et al., 2021)

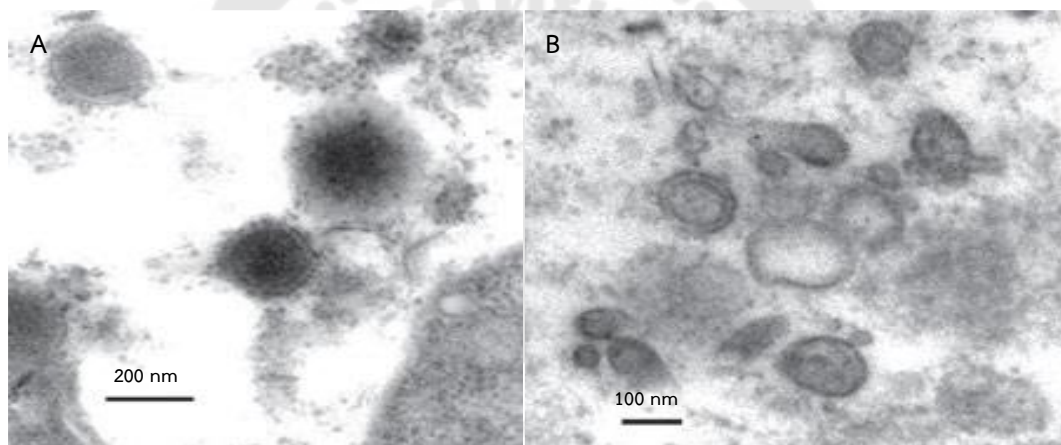


ภาพประกอบ 10 ภาพแสดงพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ (S) และปลาที่มีสุขภาพดี (H) โดยผ่านการย้อมสี hematoxylin และ eosin

ที่มา: Domingos, J. A., Shen, X., Terence, C., Senapin, S., Dong, H. T., Tan, M. R., ... & Jerry, D. R. (2021). Scale Drop Disease Virus (SDDV) and *Lates calcarifer* Herpes Virus (LCHV) Coinfection Downregulate Immune-Relevant Pathways and Cause Splenic and Kidney Necrosis in Barramundi Under Commercial Farming Conditions. *Frontiers in Genetics*, 12, 983.

6. การศึกษาลักษณะทั่วไปของอนุภาคไวรัสและจีโนมของเชื้อ SDDV

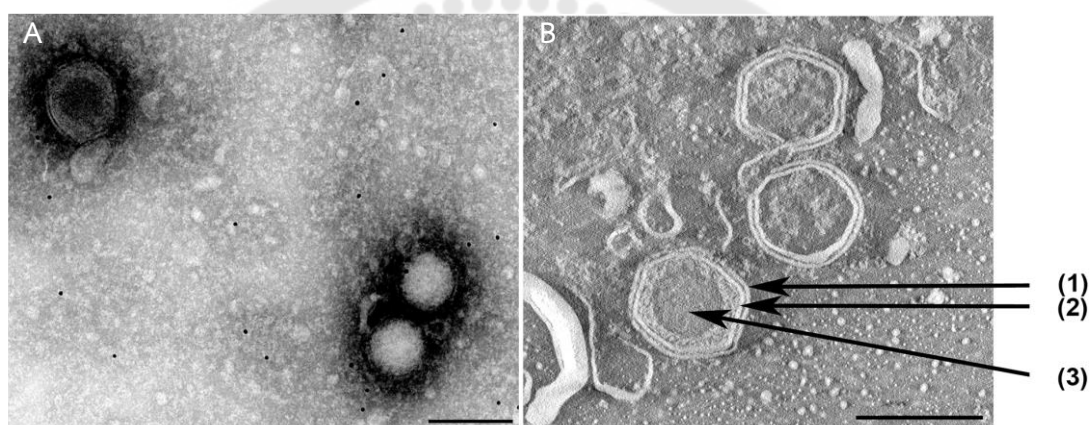
การศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (morphology) และโครงสร้างของอนุภาคไวรัส SDDV เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2555 โดย Susan Gibson-Kueh และคณะ ทำการศึกษาถึงสาเหตุของการเกิดโรค SDS ในปลากะพงขาว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy: TEM) ร่วมกับการย้อมสีด้วยเทคนิค uranyl acetate และ lead citrate staining พบอนุภาครูปร่างกลมเหลี่ยมที่มีเยื่อหุ้มของไวรัส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 188-269 นาโนเมตร ในเนื้อเยื่อ้ามและไตของปลาติดเชื้อ พบอนุภาคของไวรัสขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 133 นาโนเมตร และแกนกลางของอนุภาคไวรัสมีการกระจายของอิเล็กตรอนน้อยกว่ารอบนอก (electron lucent) (Gibson-Kueh et al., 2012) (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 ภาพถ่ายอนุภาคของไวรัส SDDV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ; (A) อนุภาครูปร่างกลมเหลี่ยมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 188-269 นาโนเมตร (B) อนุภาคของไวรัสขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 133 นาโนเมตร ในไซโทพลาซึมของเซลล์ไตของปลาติดเชื้อ SDDV โดยบริเวณที่มีการกระจายของอิเล็กตรอนน้อยกว่าคาดว่าจะป็น nucleocapsids

ที่มา: Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y. H., Tay, S., Leong, L. N., ... Ferguson, H. W. (2012). The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. *Journal of Fish Diseases*, 35(1), 19–27.

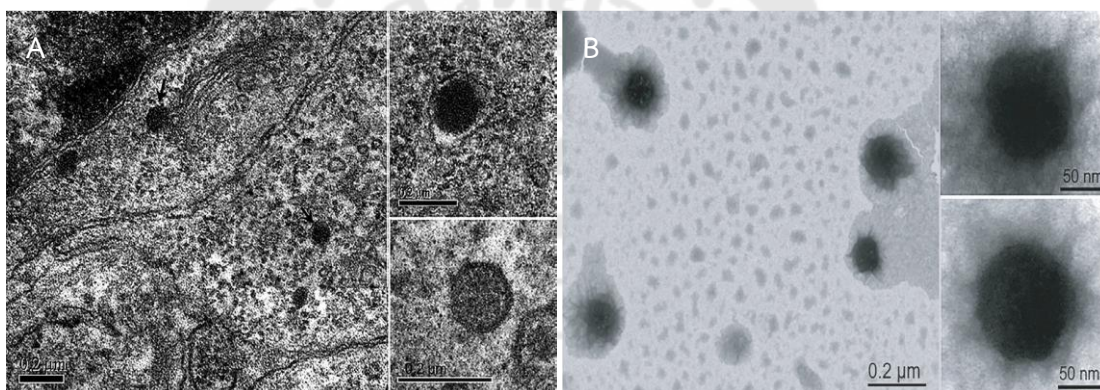
ในปี พ.ศ. 2558 ได้มีการศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของอนุภาคไวรัส SDDV โดยเก็บสารละลายของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการบ่มร่วมกับชีรุ่มของตัวอย่างปลาติดเชื้อจาก อินโดนีเซียเป็นเวลา 4 วัน และทำให้เข้มข้นขึ้นโดย ultracentrifuge ที่ $30,000 \times g$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และย้อมสีด้วยเทคนิค negative staining หลังจากนั้นศึกษา โดยใช้ TEM และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแช่แข็ง (cryo-electron microscopy) พบว่าไวรัส มีรูปร่างแบบ icosahedral มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 140 นาโนเมตร โดยไวรัสมีทั้งแบบ มีเปลือกหุ้ม (enveloped) และไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) ขึ้นอยู่กับรูปแบบการออกจาก เซลล์โฮสต์ (ภาพประกอบ 12) (de Groof et al., 2015)



ภาพประกอบ 12 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไวรัส SDDV โดยการย้อมด้วย negative staining; (A) อนุภาครูปร่างหกเหลี่ยมที่มี (ซ้าย) และไม่มี (ขวาล่าง) outer membrane และ (B) อนุภาคของไวรัสที่ประกอบด้วย (1) outer membrane, (2) capsid และ (3) inner core

ที่มา: De Groof, A., Guelen, L., Deijis, M., Van Der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., ... Van Der Hoek, L. (2015). A novel virus causes scale drop disease in *Lates calcarifer*. PLoS Pathogens, 11(8).

ในปี พ.ศ. 2562 การศึกษาอนุภาคของไวรัสชนิดนี้ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ้ามและไตของปลาที่มีลักษณะอาการของโรค โดยการใช้ TEM ทำงานที่ 100 กิโลโวลต์ (kV) และย้อมสีด้วยเทคนิค negative staining พบอนุภาคไวรัสขนาดเล็ก (viral-like particles) มีเปลือกหุ้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 100-180 นาโนเมตร ในไซโทพลาซึมของเซลล์จากทั้งสองเนื้อเยื่อตัวอย่าง เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานพบว่ามีความใกล้เคียงกับไวรัสในวงศ์ Iridoviridae (ภาพประกอบ 13A) และหลังทำบริสุทธิ์ไวรัสด้วยเทคนิค sucrose gradient ultracentrifugation จากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาติดเชื้อ พบแถบที่บ่งชี้ความเข้มข้นระหว่าง 30–40% และพบอนุภาคของไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 100-110 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 13B) (Senapin et al., 2019)



ภาพประกอบ 13 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของเนื้อเยื่อไตจากปลาติดเชื้อ SDDV ร่วมกับการย้อมสีด้วยเทคนิค negative staining; (A) พบอนุภาครูปกลมเหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 100-180 นาโนเมตร, (B) อนุภาคของไวรัสภายหลังการทำบริสุทธิ์ด้วย sucrose gradient ultracentrifugation พบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 100-110 นาโนเมตร

ที่มา : Senapin, S., Dong, H. T., Meemetta, W., Gangnonngiw, W., Sangsuriya, P., Vanichviriyakit, R., ... & Nuangsaeng, B. (2019). Mortality from scale drop disease in farmed *Lates calcarifer* in Southeast Asia. *Journal of fish diseases*, 42(1), 119-127.

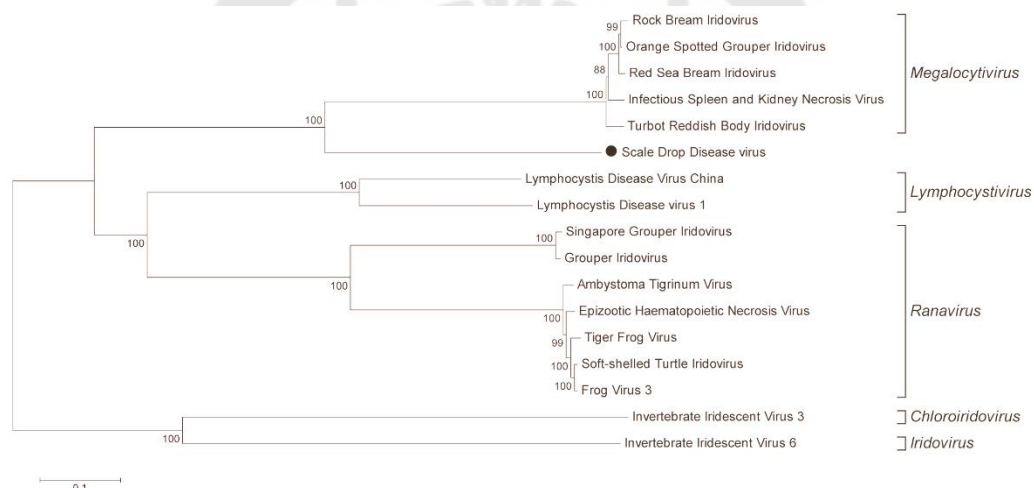
การศึกษาสารพันธุกรรมของไวรัสเริ่มจากการใช้ซีรัมของตัวอย่างปลาติดเชื้อจากประเทศสิงคโปร์จำนวน 4 ตัวอย่าง มาศึกษาถึงการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรม ด้วยวิธี Virus discovery based on cDNA-AFLP (VIDISCA) หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ด้วย blastn และ blastp พบว่าจากทั้งหมด 42,918 sequence reads มีเพียง 15 sequence reads เท่านั้นที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่มีในฐานข้อมูล Genbank และเมื่อพิจารณาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความเหมือน (identity) กับลำดับอนุกรมของไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* ในวงศ์ Iridoviridae หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ VIDISCA มาทำ genome sequence ด้วยวิธี genome walking พบว่าสารพันธุกรรมของไวรัสมีขนาดประมาณ 124,244 คู่เบส (bp) สารพันธุกรรมเป็นแบบดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) 1 โมเลกุล พบว่ามี open reading frame (ORF) ประมาณ 129 ORF เมื่อทำ blastn เพื่อหาสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันพบว่า SDDV มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* แต่พบว่าค่าความเหมือนต่ำ (ขึ้นอยู่กับชนิดของยีนโดยพบค่า identity มากสุดที่ 60%) และมีค่า %G+C อยู่ที่ประมาณ 37% ซึ่งต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของไวรัสในกลุ่ม *Megalocytivirus* อื่นที่มีค่า % G+C อยู่ระหว่าง 53% และ 55% (de Groof et al., 2015) ต่อมาในปี พ.ศ. 2561 ได้มีการศึกษาถึงจีโนมของเชื้อ SDDV จากตัวอย่างปลากะพงขาวที่ทำการเพาะเลี้ยงในฟาร์มน้ำกร่อย ทางภาคตะวันออกของประเทศไทย ด้วยเทคนิค De novo metagenomic assembly พบว่าเชื้อ SDDV สายพันธุ์ TH2019 มีสารพันธุกรรมขนาดประมาณ 131,129 คู่เบส พบว่ามี open reading frame (ORF) ประมาณ 135 ORF และพบ tRNA 1 โมเลกุล (Kayansamruaj, Soontara, Dong, Phiwsaiya, & Senapin, 2020)

7. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ SDDV

การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ SDDV กับไวรัสในวงศ์ Iridoviridae โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid sequence) ของยีนอนุรักษ์ (conserved genes) 26 ยีนที่ได้จากการทำ genome sequence ของ SDDV (ตาราง 2) (Eaton et al., 2010) พบว่าตำแหน่งของยีนอนุรักษ์ของ SDDV มีความแตกต่างจากไวรัสอื่นอย่างชัดเจนเมื่อนำมาทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW และทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไวรัสโดยการสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม MEGA5 โดยใช้วิธี neighbor-joining และทำการวิเคราะห์เฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มี ORF เท่านั้น หลังจากนั้นทำการยืนยันความน่าเชื่อถือของการสร้าง phylogenetic trees โดย bootstrap

analysis ทำซ้ำ 500 ซ้ำ พบว่าเชื้อ SDDV มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* แต่ยังไม่รวมกลุ่มอย่างชัดเจนเหมือนไวรัสอื่นในกลุ่ม (de Groof et al., 2015) (ภาพประกอบ 14)

อย่างไรก็ตามการใช้ full genome sequences ไม่เหมาะสมสำหรับไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* เนื่องจากบางชนิดยังไม่มีการศึกษาถึงข้อมูลของยีนอนุรักษ์ทั้ง 26 ยีน ทำให้มีข้อมูลไม่ครบถ้วนจึงได้มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าแปลรหัสให้ major capsid protein (MCP) มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับ MCP ของไวรัสอื่นที่อยู่ในวงศ์ Iridoviridae จากผลการทดลองพบว่าไม่มีไวรัสใดที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ SDDV (ภาพประกอบ 15) (de Groof et al., 2015)



ภาพประกอบ 14 การสร้าง phylogenetic tree เพื่อการจัดกลุ่มของ SDDV โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid sequence) ของยีนอนุรักษ์ทั้ง 26 ยีนที่ได้จากการทำ genome sequence กับยีนอนุรักษ์จากไวรัสอื่นในวงศ์ Iridoviridae

ที่มา: De Groof, A., Guelen, L., Deijs, M., Van Der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., ... Van Der Hoek, L. (2015). A novel virus causes scale drop disease in *Lates calcarifer*. PLoS Pathogens, 11(8).

ตาราง 2 ตำแหน่งของยีนอนุรักษ์ที่พบในจีโนมของไวรัสในวงศ์ Iridoviridae
(Eaton, Ring, & Brunetti, 2010)

		Megalocytivirus										Lymphocystivirus		Ranavirus						Iridovirus		Chloroiridovirus	
		SDDV ^a	ISKNV	OSGIV	RBIV	TRBIV	RSIV	LCDV-1	LCDV-C	SGIV	GIV	FV3	STIV	TFV	ATV	EHNV	IIV-6	IIV-3					
1	Gene Names ^b Putative replication factor and/or DNA binding/packing	17L	61L	60L	57L	56L	92R	91L	180R	116R	67R	1R	1R	105R	95R	100R	282R	79L					
2	Myristilated membrane protein	30L	90,5L	88,5L	85L	83R	575R	89L	38R	19R	4R	2L	2L	2L	1L	1L	337L	47R					
3	DNA-dep RNA pol-II largest subunit	76L	28L	31L	29L	28L	239R	7L	190R	104L	59L	8R	10R	8R	6R	7R	176R/343L	90L					
4	Putative NTPase I	104L	63L	63L	59L	58L	13R	70L	075L	60R	30R	9L	11L	9L	7L	8L	22L	87L					
5	Unknown	33L	96L	93L	92.0	88L	550R	57L	100L	118R	68R	12L	14L	12L	91R	95R	287R	56L					
6	ATPase-like protein	35L	123R	119R	116R	113R	407R	30R	114L	134L	73L	15R	16R	16R	87R	92L	75L	88R					
7	Serine-threonine protein kinase	15L	55L	56L	53L	52L	111R	5L	45R	39L	17L	19R	21R	19R	84L	89L	380R	10L					
8	Helicase family	16L	56L	57L	54L	53L	101R	4L	7L	54R	28R	21L	24L	21L	82R	86R	67R	4R					
9	D5 family NTPase involved in DNA replication	40R	109L	106L	101L	99L	493R	69L	78L	52L	27L	22R	25R	22R	81L	85L	184R	121R					
10	Putative tyrosine kinase/lipolysaccharide modifying enzyme	37R	114L	111L	109L	105L	463R	110R	172R	78L/81L	44L	27R	31R	29R	60R	62R	179R	35R					

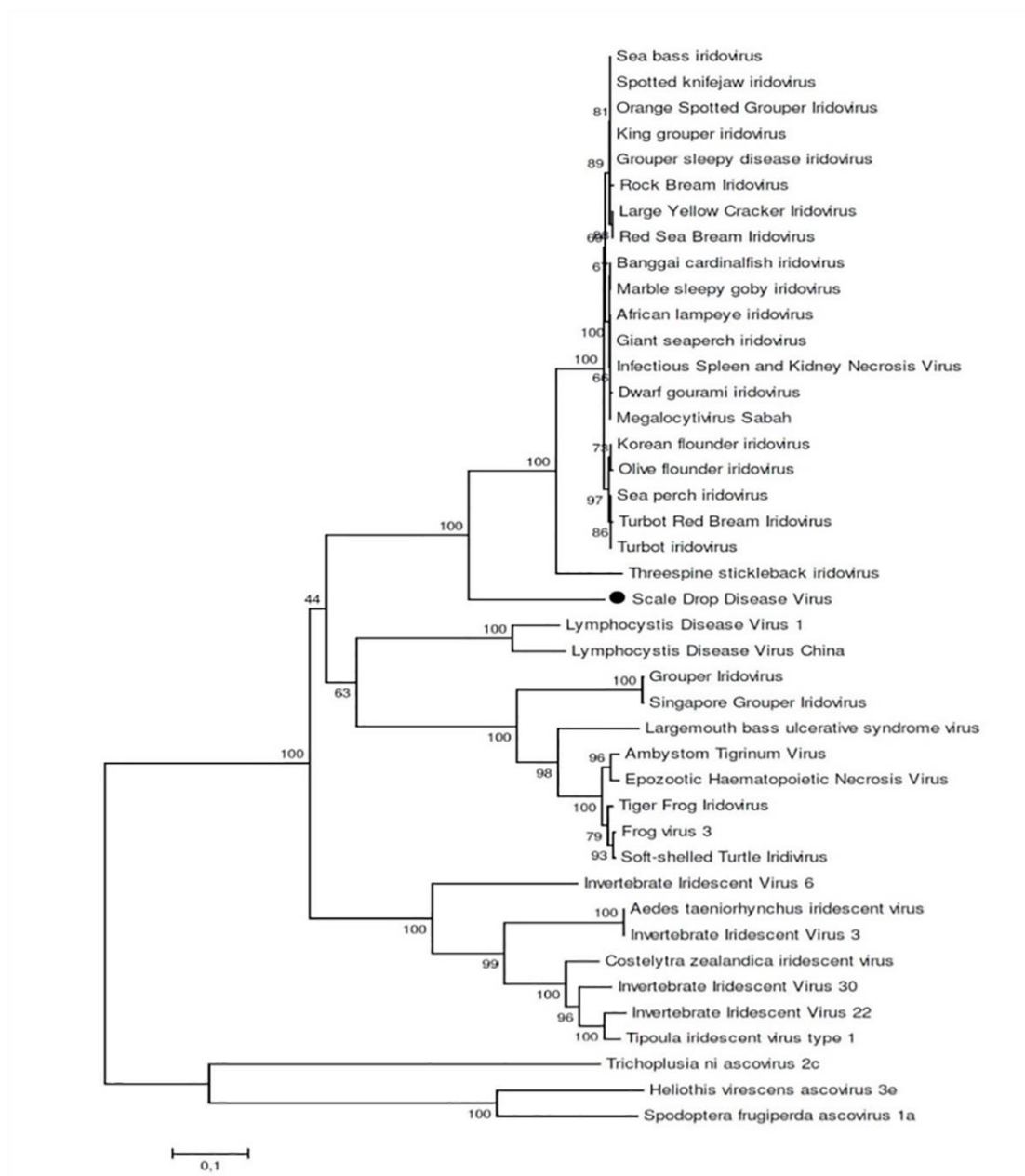
ตาราง 2 (ต่อ)

	Gene Names ^b	Megalocytivirus						Lymphocystivirus		Ranavirus						Iridovirus		Chloroiridovirus
		SDDV ^a	ISKNV	OSGIV	RBIV	TRBIV	RSIV	LCDV-1	LCDV-C	SGIV	GIV	FV3	STIV	TFV	ATV	EHNV	IIV-6	IIV-3
11	NIF-NLI interaction factor	99L	5L	6L	6L	5L	385R	43L	147L	61R	31R	37R	41R	40R	67R	72R	355R	104L
12	Unknown	91L	76L	75L	72L	69L	639R	92R	234R	57L	29L	41R	45R	45R	72R	77R	295L	16R
13	Myristilated membrane protein	61L	7L	8L	8L	7L	374R	35L	157R	88L	49L	53R	55R	55R	53L	53L	458R	6R
14	Serine-threonine protein kinase	65R	13R	15R	13R	13R	349R	77L	177L	150L	83L	57R	60R	59R	49L	58L	98R	98L
15	DNA pol family B exonuclease	70R	19R	22R	20R	20R	317L	72R	202L	128R	71R	61R	63R	63R	46L	44L	37L	120R
16	DNA-dep RNA pol-II second largest subunit	122L	34R	36R	33R	33R	224L	13L	25R	73L	40L	63L	64R	65L	44R	43R	428L	9R
17	Ribonucleotide reductase small subunit	52R	24R	27R	26R	25R	268L	15L	41L	47L	22L	68L	71L	71L	39R	38R	376L	48L
18	Ribonuclease III	25R	87R	85R	83R	80R	596L	74R	186R	84L	46L	81L	87L	85L	25R	24R	142R	101R
19	Transcription elongation factor TFIIS	126R	29L	32L	31L	29L	238R	97R	115R	85R	47R	82R	88R	86R	24L	23L	349L	55R
20	Proliferating cell nuclear antigen	39L	112R	109R	107R	102R	487L	2L	196L	68L	35L	85R	91R	90R	20L	19L	436R	60L

ตาราง 2 (ต่อ)

	Gene Names ^b	Megalocytivirus					Lymphocystivirus				Ranavirus					Iridovirus		Chloro-iridovirus
		SDDV ^a	ISKNV	OSGIV	RBIV	TRBIV	RSIV	LCDV-1	LCDV-C	SGIV	GIV	FV3	STIV	TFV	ATV	EHNV	IIV-6	IIV-3
21	Deoxynucleoside kinase	125L	32R	34R	31R	31R	234L	73R	27R	67L	34L	86R	92R	91R	19L	18L	143R	29R
22	ErV/Alr family	3L	43L	45L	44L	42L	156R	55L	141L	70R	37R	89R	94R	94R	16L	16L	347L	96R
23	Major capsid protein	60L	6L	7L	7L	6L	380R	80L	43L	72R	39R	91R	96R	96R	14L	14L	274R	14L
24	Immediate early protein ICP-46	36L	115R	112R	108R	106R	458L	24L	161R	162L	90L	92R	97R	97R	13L	13L	393L	39R
25	Hypothetical protein - Clostridium tetani	24R	86L	84.5R	83.5R	79R	600L	9R	152L	98R	56R	94L	99L	100R	11R	11R	307L	33L
26	Putative XPPG-RAD2 type nuclease	73L	27L	30L	28L	27L	256R	107R	168R	97L	55L	96R	100R	101R	10L	10L	369L	76L

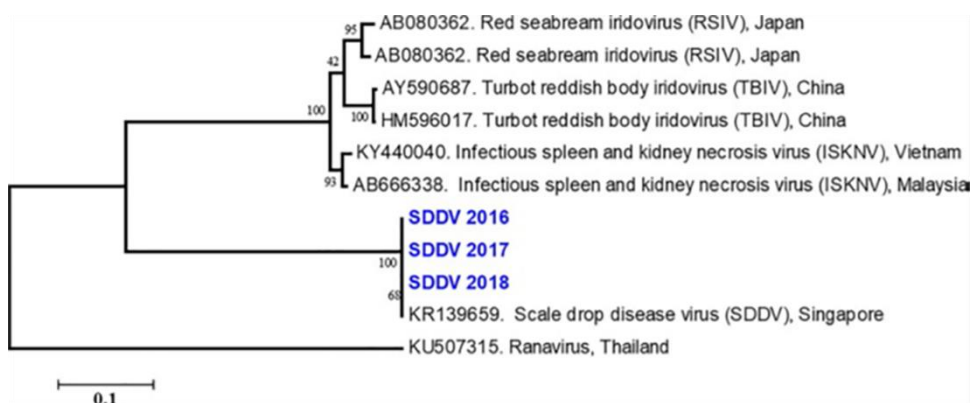
- a: SDDV: scale drop disease virus; ISKNV: infectious spleen and kidney necrosis virus; OSGIV: orange-spotted grouper iridovirus; RBIV: rock bream iridovirus; TRBIV: turbot reddish body virus; RSIV: red sea bream iridovirus; LCDV-1: lymphocystis disease virus 1; LCDV-C: lymphocystis disease virus China; SGIV: Singapore grouper iridovirus; GIV: grouper iridovirus; FV3: Frog virus 3; STIV: soft-shelled turtle iridovirus; TFV: tiger frog virus; ATV: Ambystoma tigrinum virus; EHNv: epizootic haematopoietic necrosis virus; IIV-6: invertebrate iridovirus type 6; IIV-3: invertebrate iridescent virus 3.
- b: Gene name according to (Eaton, Ring, & Brunetti, 2010)
- L: Leftward transcription, R: Rightward transcription



ภาพประกอบ 15 การสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid sequence) ที่คาดว่าแปลรหัสเป็น MCP ของเชื้อ SDDV กับยีน MCP ของไวรัสอื่นในวงศ์ Iridoviridae

ที่มา: De Groof, A., Guelen, L., Deijs, M., Van Der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., ... Van Der Hoek, L. (2015). A novel virus causes scale drop disease in *Lates calcarifer*. PLoS Pathogens, 11(8).

สำหรับการศึกษาเชื้อ SDDV ที่มีการระบาดในประเทศไทย พบว่าจากการทำ partial genome sequences สามารถแยกชิ้นบางส่วนของ SDDV (ORF 060L) ได้ ซึ่งมีขนาด 1,047, 738 และ 1,551 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีความยาว 348, 245 และ 516 amino acid residues (GenBank accession numbers MH152406-MH152408) รวมทั้งพบ 3 ORFs (030L, 035L และ 061L) จากการศึกษาพบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 98.7%, 99.9% และ 99.9% ค่าความเหมือนของกรดอะมิโน 98.3%, 99.6% และ 99.6% กับยีน myristoylated membrane protein, ATPase-like protein และ myristoylated membrane protein เมื่อเปรียบเทียบกับ SDDV จากสิงคโปร์ (GenBank accession number KR139659) ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MCP จากตัวอย่างปลา 3 ตัวอย่างที่เก็บมาระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 99.9-100% และจากผลการทำ blast พบว่าค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 99.9-100% ค่าความเหมือนของกรดอะมิโนอยู่ที่ 100% เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SDDV ในสิงคโปร์ สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่าง SDDV ในไทยและสิงคโปร์โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MCP ที่ได้จากการทดลอง 3 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SDDV ที่ระบาดในสิงคโปร์ (GenBank accession number KR139659) จำนวน 1 ตัวอย่าง red seabream iridovirus (RSIV) (GenBank accession number AB080362 และ AY285746) จำนวน 2 ตัวอย่าง turbot reddish iridovirus (TBIV) (GenBank AY590687 และ HM596017) จำนวน 2 ตัวอย่าง และ infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) (GenBank accession number KY440040 และ AB666338) จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Ranavirus* (GenBank accession number KU507315) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) เมื่อนำมาทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยใช้วิธี maximum-likelihood หลังจากนั้นทำการยืนยันความน่าเชื่อถือของการสร้าง phylogenetic trees โดย bootstrap analysis ทำซ้ำ 1000 ซ้ำ พบว่าเชื้อ SDDV ถูกจัดให้อยู่ใน clade เดียวกันกับ SDDV ที่พบในสิงคโปร์ และแยกออกจาก clade ของไวรัสอื่นในสกุล หรือ outgroup (ภาพประกอบ 16) (Senapin et al., 2019)

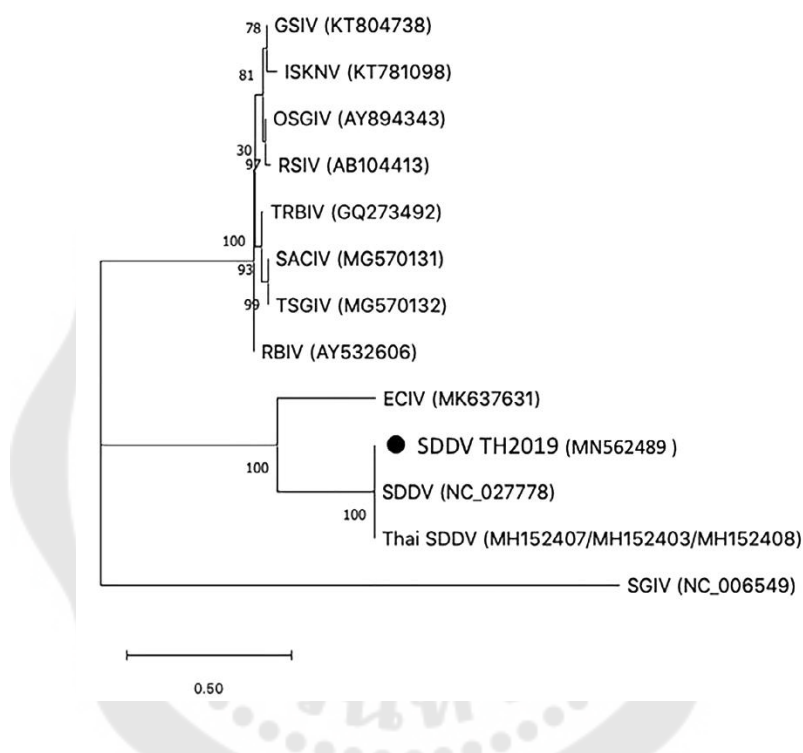


ภาพประกอบ 16 การสร้าง phylogenetic tree ด้วย maximum-likelihood แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MCP ในไวรัสวงศ์ Iridoviridae ที่มีการระบาดในพื้นที่แตกต่างกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MCP ที่แยกได้จากประเทศไทยทั้ง 3 ตัวอย่าง (ตัวอักษรสีน้ำเงิน) และ MCP ของ *Ranavirus* (GenBank accession number KU507315) เป็น outgroup

ที่มา : Senapin, S., Dong, H. T., Meemetta, W., Gangnonngiw, W., Sangsuriya, P., Vanichviriyakit, R., ... & Nuangsaeng, B. (2019). Mortality from scale drop disease in farmed Lates calcarifer in Southeast Asia. *Journal of fish diseases*, 42(1), 119-127.

ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ SDDV สายพันธุ์ TH2019 ที่แยกได้จากฟาร์มปลากะพงขาวทางภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่พบในสิงคโปร์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกัน (concatenated) ของยีน *ATPase*-like protein, major capsid protein และ myristoylated membrane ของเชื้อ giant seaperch iridovirus, GSIV; orange-spotted grouper iridovirus, OSGIV; red seabream iridovirus, RSIV; rock bream iridovirus, RBIV; South American cichlid iridovirus, SACIV; turbot reddish body iridovirus, TBIV; turbot reddish body iridovirus, TRBIV; three spot gourami iridovirus, TSGIV; infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV; European chub iridovirus, ECIV โดยใช้ยีนของเชื้อ SDDV คือ *ATPase*, major capsid protein (MCP) และ myristoylated membrane proteins ที่อ้างอิงตาม ORF 035L, 060L และ 061L ของเชื้อ SDDV จากสิงคโปร์ (NC_027778) ตามลำดับ และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Singapore grouper iridovirus (SGIV) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) ด้วยวิธี maximum-likelihood หลังจากนั้นทำการยืนยันความน่าเชื่อถือของการสร้าง phylogenetic trees โดย bootstrap analysis ทำซ้ำ 1000 ซ้ำ พบว่าสายพันธุ์ TH2019

ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกันกับเชื้อ European chub iridovirus (ECIV) ที่เป็นไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* ที่แยกจากปลา European Chub (*Squalius cephalus*) และอยู่ใน subclade เดียวกับเชื้อ SDDV จากประเทศไทยและสิงคโปร์ที่เก็บจากฟาร์มปลากะพงขาวในปี 2010 และ 2016 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของเชื้อทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 17) (Kayansamruaj et al., 2020)



ภาพประกอบ 17 การสร้าง phylogenetic tree ด้วย maximum-likelihood โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกัน (concatenated) ของยีน *ATPase*-like protein, major capsid protein และ myristoylated membrane ของไวรัสในสกุล *Megalocytivirus*

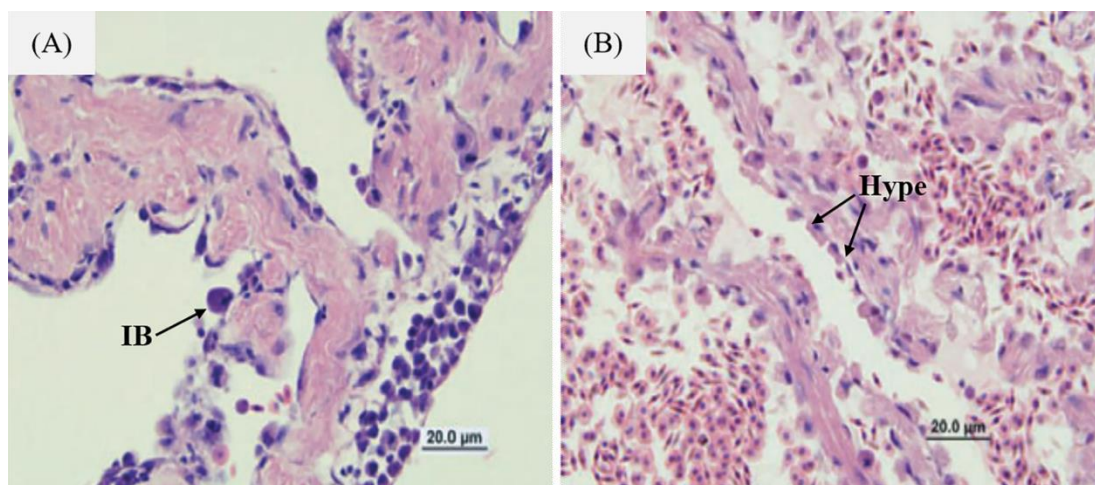
ที่มา: Kayansamruaj, P., Soontara, C., Dong, H. T., Phiwsaiya, K., & Senapin, S. (2020). Draft genome sequence of scale drop disease virus (SDDV) retrieved from metagenomic investigation of infected barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Journal of Fish Diseases*, 43(10), 1287-1298.

8. การตรวจการติดเชื้อ SDDV

การตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV สามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบโดยอาศัยการสังเกตอาการและความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา การใช้ transmission electron microscopy เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล หรือการทดลองการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) เป็นต้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการตรวจและความพร้อมของห้องปฏิบัติการ

8.1 การตรวจเชื้อโดยการสังเกตอาการและการศึกษาทางพยาธิสภาพ

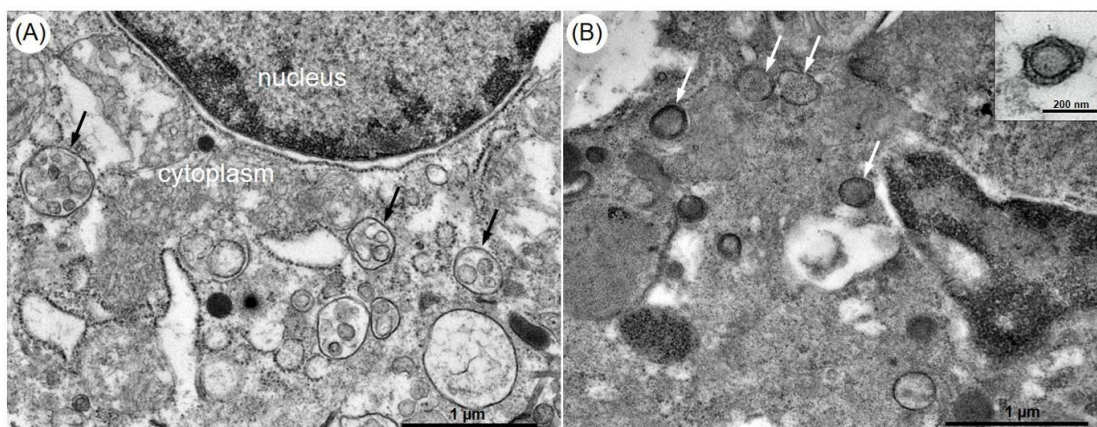
ปลาโดยทั่วไปที่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV พบลำตัวสีเข้มขึ้น เกิดหูด ครีบและหางกร่อน เหงือกมีสีซีด ว่ายน้ำผิดปกติ นอกจากนี้ยังแสดงอาการเซื่องซึมก่อนที่จะตาย และยังพบการเปลี่ยนแปลงในตับ ม้ามและไต พบการตายของเซลล์ม้าม (splenocyte) และ hematopoietic cells พบเซลล์ที่มีการขยายขนาดใน ม้าม ไต ตับและหัวใจของปลาที่ติดเชื้อ (ภาพประกอบ 18) และมีการปรากฏของ inclusion body-bearing cell (IBC) โดยจะใช้ไตและม้ามเป็นอวัยวะเป้าหมายเพื่อตรวจสอบเนื่องจากพบว่าไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้มากในอวัยวะทั้งสองนี้ (Choi, Kwon, Nam, Kim, & Kim, 2006; Fauquet, Mayo, Maniloff, Desselberger, & Ball, 2005; Mahardika, Yamamoto, & Miyazaki, 2004) ซึ่งลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะอาการเฉพาะโรค (pathognomonic) สำหรับการติดเชื้อไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ SDDV ได้ เนื่องจากบางครั้งการแสดงออกถึงอาการเกิดหูดหรือว่ายน้ำผิดปกติอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Tenacibaculum maritimum* หรือ *Vibrio harveyi* บางสายพันธุ์ หรือในบางกรณีไม่สามารถสังเกตเห็น IBC ในตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อได้จึงอาจทำให้เกิดการวินิจฉัยที่คลาดเคลื่อน (Senapin et al., 2019)



ภาพประกอบ 18 เนื้อเยื่อหัวใจของปลาที่ติดเชื้อ SDDV ที่แสดงลักษณะทางพยาธิของโรค; (A) เนื้อเยื่อหัวใจที่พบ basophilic inclusion bodies ฐานยื่นออกมาจากเยื่อหัวใจ (ลูกศร) (B) ภาพรวมกล้ามเนื้อหัวใจหนา (hypertrophied myocardial: Hype) ที่แตกต่างจากปกติเนื่องจากการปรากฏของ IB ที่เยื่อหัวใจ (ลูกศร)

ที่มา: Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y. H., Tay, S., Leong, L. N., ... Ferguson, H. W. (2012). The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. *Journal of Fish Diseases*, 35(1), 19–27.

8.2 การใช้ transmission electron microscopy สมาชิกของวงศ์ Iridoviridae จะมีโปรตีนแคปซิดด้านนอกซึ่งประกอบด้วย capsomers ล้อมรอบเยื่อหุ้มด้านในซึ่งห่อหุ้มสารพันธุกรรมของไวรัส เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ TEM พบว่ามีอนุภาคของไวรัสที่มีเยื่อหุ้มบริเวณเหงือก ชั้น submucosa ของทางเดินอาหาร ม้าม basement membranes ของเส้นเลือดฝอยในไกลเมอรูลัสของไต (Shi, Wang, Yang, Huang, & Wang, 2004) โดยอนุภาคของไวรัสปรากฏอยู่ในไซโทพลาซึม บริเวณที่เรียกว่า viral assembly site (VAS) (Mahardika et al. 2004) มีลักษณะเป็น icosahedral ขนาดประมาณ 100–200 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 19) (Nurliyana et al., 2020) คล้ายคลึงกับไวรัสชนิดอื่นในวงศ์นี้ ทำให้การวินิจฉัยอย่างจำเพาะถึงสาเหตุของโรคว่าเกิดจากเชื้อ SDDV เป็นไปได้ยาก อีกทั้งยังต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและผู้มีความเชี่ยวชาญเพื่อการอ่านและแปลผล



ภาพประกอบ 19 ภาพถ่ายเซลล์ม้ามของปลาติดเชื้อมัลดีงูทรรคนี้อเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (A) พบ intracytoplasmic vesicle ที่ประกอบด้วยอนุภาคของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ (immature viral particle) ในเซลล์ม้าม (ลูกศรสีดำ) (B) อนุภาคของไวรัสในไซโทพลาซึมของเซลล์ม้าม (ลูกศรสีขาว) และอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200 นาโนเมตร (กรอบเส้นประสี่เหลี่ยม)

ที่มา: Nurliyana, M., Lukman, B., Ina-Salwany, M. Y., Zamri-Saad, M., Annas, S., Dong, H. T., ... & Amal, M. N. A. (2020). First evidence of scale drop disease virus in farmed Asian seabass in Malaysia. *Aquaculture*, 528, 735600.

8.3 การเพาะเลี้ยงไวรัส

การเพาะเลี้ยงไวรัสจำเป็นต้องมีเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาการเจริญเติบโต การแยกและการศึกษาลักษณะของไวรัส ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 ได้มีรายงานถึงการพัฒนา cell line ของปลามากกว่า 200 สายพันธุ์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเนื้อเยื่อนำมาพัฒนา cell line นั้นมีหลากหลายตั้งแต่ ไข่ ครีบก้น กระจก หัวใจ ม้าม เป็นต้น และในปี พ.ศ. 2505 ได้มีการพัฒนา permanent cell line สำเร็จขึ้นเป็นครั้งแรกโดยพัฒนามาจากโกนาคของปลา rainbow trout โดย Wolf และ Quimby หลังจากความสำเร็จในครั้งนั้นจึงเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนา cell line (Wolf & Quimby, 1962) ในปี พ.ศ. 2551 Dong และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนา cell line จากปลาแมนดาริน (MFF-1 cell line) สำหรับทดลองการติดเชื้อ ISKNV ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนและโปรตีนของไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* ซึ่งช่วยให้สามารถเข้าใจปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสและโฮสต์ได้ (Dong et al., 2008) ในปี พ.ศ. 2545 ได้มีการพัฒนา cell line จาก

ส่วนไตของปลากะพงขาวเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสที่มีความจำเพาะกับปลาและใช้ชื่อว่า seabass kidney (SK) (เรวัตร์ คงประดิษฐ์, กิจการ ศุภมาตร์, จิราพร เกษรจันทร์, & วุฒิพร พรหมขุนทอง, 2546) ต่อมาในปี พ.ศ. 2550 มีการพัฒนา cell line ที่มีความเหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อและการแยก RSIV โดยพัฒนามาจาก fibroblast cells ที่ได้มาจากครีบหางของ red sea bream เรียกว่า CRF-1 cells (Imajoh, Ikawa, & Oshima, 2007) สำหรับการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบเชื้อ SDDV ได้มีการพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2558 โดย De Groof และคณะ ได้ทดลองเพาะเลี้ยงไวรัส SDDV ในเซลล์เพาะเลี้ยง seabass kidney (SK) SK21 จากการศึกษพบว่า เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงและจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมีการขยายขนาดขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับไวรัส 2 วันและหลังจากการเพาะเลี้ยงร่วม 6 วัน พบว่ามีระดับของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายหลังการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น (cytopathic effect: CPE) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงด้วย seabass brain cells (SBB) และได้รับการยืนยันด้วยวิธี quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (de Groof et al., 2015)

8.4 การใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสในสกุล *Megalocytivirus* เป็นวิธีการที่ Office International des Epizooties (OIE) แนะนำให้ใช้ในการตรวจสอบ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง การแพร่ระบาดของเชื้อ SDDV ไปยังบริเวณที่มีการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว ทำให้นักวิจัยต่างให้ความสนใจในการพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบเชื้อกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ. 2558 Ad de Groof และคณะ ได้มีการออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA dependent RNA polymerase (beta subunit) ที่ได้จากการทำ genome sequence เป็นต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบ red sea bream iridovirus (RSIV) ซึ่งเป็นไวรัสในสกุลเดียวกันเป็นตัวควบคุม จากการทดลองตรวจสอบการติดเชื้อในตัวอย่างปลา พบว่าให้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่มีขนาด 164 คู่เบส รวมทั้งผู้วิจัยยังใช้เทคนิค qPCR ในการทดลองด้วย โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA dependent RNA polymerase (beta subunit) เช่นเดียวกัน โดยการนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR โคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR-4TOPO (Invitrogen) เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก จากการทดลองพบค่า correlation (r^2) ระหว่างเทคนิค PCR และ qPCR อยู่ที่ >0.99 และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 50 copies/ μ L (de Groof et al., 2015) หลังจากนั้นในปี พ.ศ.

2561 แสงจันทร์และคณะได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน major capsid protein (MCP) (GenBank accession number KR139659) เพื่อตรวจสอบปลาดตัวอย่างที่เก็บมาระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 จากฟาร์มปลากะพงขาวในภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างอวัยวะปลา เช่น ตา สมอง ตับ ไต ม้าม ลำไส้และกล้ามเนื้อ พบว่ามีปลา 15 ตัวอย่างจากทั้งหมด 17 ตัวอย่างให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR ขนาดของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาอยู่ที่ 1,362 คู่เบส (Senapin et al., 2019) ต่อมาในปี พ.ศ. 2562 อรอนงค์และคณะได้มีการพัฒนาเทคนิค semi-nested PCR (snPCR) เพื่อตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษของยีน *ATPase* (adenosine triphosphatase) (GenBank accession number MH152407) โดยเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวที่แสดงลักษณะของโรค scale drop disease และปลาที่ตายโดยไม่ทราบสาเหตุ รวมทั้งปลากะพงขาวและปลาเก๋า (*Epinephelus* sp.) ที่มีสุขภาพดีจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออกและภาคใต้ ระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 จากการทดลองพบว่าตรวจพบการติดเชื้อในปลาที่แสดงลักษณะอาการของโรค SDD ในทุกตัวอย่าง โดยผลผลิตของปฏิกิริยาที่มีขนาด 738 คู่เบสและ 412 คู่เบสในขั้นที่ 1 และ 2 ของการทำ snPCR ตามลำดับ และไม่พบการติดเชื้อในปลาที่มีสุขภาพดี จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค snPCR สามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ระดับ 100 copies/ μ L มีความไวมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค single step PCR 100 เท่า (10,000 copies/ μ L) แต่พบว่ามีควมไวในการตรวจสอบต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค qPCR สำหรับตรวจสอบ SDDV ที่ถูกพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้ (Charoenwai et al., 2019) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาวิธี loop-mediated isothermal amplification ร่วมกับ xylene orange โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ATPase* (GenBank accession number KR139659) ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 60 องศาเซลเซียส และทราบผลภายในเวลา 60 นาที ทั้งยังมีการใช้ xylene orange เพื่อให้สามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของผลผลิตในสารละลายปฏิกิริยาอื่น พบว่ามีควมไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 10^2 copies/reaction ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าวิธี semi-nested PCR ที่มีความไวอยู่ที่ 10^3 copies/reaction เมื่อใช้ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) ที่สกัดจากปลาติดเชื้อ พบว่ามีควมไวอยู่ที่ 100 ng และ 1 ng ตามลำดับ (Dangtip et al., 2019) นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2564 ได้มีการพัฒนาเทคนิค recombinase polymerase amplification (RPA) ร่วมกับการใช้โปรตีน Cas12a ที่จำเพาะต่อยีน *ATPase* ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยแสดงผลเป็นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และการใช้ lateral flow dipstick ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง และมีความไวในการ

ตรวจลบอยู่ 40 copies/reaction (Sukonta, Senapin, Meemetta, & Chaijarasphong, 2021)

9. Cross-priming amplification (CPA)

Cross-priming amplification (CPA) ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัท Ustar Biotechnologies Co., Ltd. เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองที่ใช้อุณหภูมิเดียว มีความไวและประสิทธิภาพสูง (Xu et al., 2012) ซึ่งเทคนิค CPA มีความแตกต่างจากเทคนิค PCR คือ

1. มีการใช้ไพรเมอร์ 4-8 เส้นโดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย (Zhai et al., 2020) โดยทั่วไปประกอบด้วย 5 เส้น คือ 1s (cross primer) 2a, 3a (inner primer) และ 4s, 5a (displacement primer) ซึ่งจดจำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะบนสารพันธุกรรมต้นแบบต่างเส้นกัน โดยใช้ cross primer ในการเพิ่มปริมาณผลผลิตที่มีโครงสร้างเป็น semi-loop single-strand หรือโครงสร้างที่มีการแตกกิ่ง (branched structures)

2. มีการใช้ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส ที่มีคุณสมบัติที่เรียกว่า strand displacement ทำหน้าที่ในการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อแยกสายดีเอ็นเอหรือการเติม nicking enzyme และยังมีคุณสมบัติในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA polymerase) โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาเติมทางด้านปลาย 3'-OH ของสายดีเอ็นเอที่กำลังมีการสังเคราะห์

3. ปฏิกริยา CPA จำเป็นต้องอาศัยโครงสร้างที่เป็น semi-loop single-strand หรือโครงสร้างที่มีการแตกกิ่ง ที่เกิดจาก cross primer เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

4. เมื่อวิเคราะห์ผลของปฏิกริยาโดยอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าผลผลิตของปฏิกริยามีขนาดที่แตกต่างกัน ทำให้มองเห็นเป็นลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder-like pattern) ทั้งยังสามารถพบแถบของโครงสร้าง 1s/2a และ 1s/3a

เทคนิค CPA สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่หลากหลายทั้งในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียและไวรัสที่ก่อโรคในตัวอย่างทางคลินิก เช่น การตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* จากเสมหะของผู้ป่วย (Fang et al., 2009) การตรวจหาเชื้อไวรัส African swine fever (ASF) ในตัวอย่างเลือดและซีรัมของหมูและหมูป่า (Frączyk et al., 2016) การตรวจหาเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (Yang et al., 2014) การตรวจหาพืชที่

ผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม (genetically modified organisms: GMOs) (Huang et al., 2014) เป็นต้น

10. กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ CPA

1. Generation of cross-priming sites

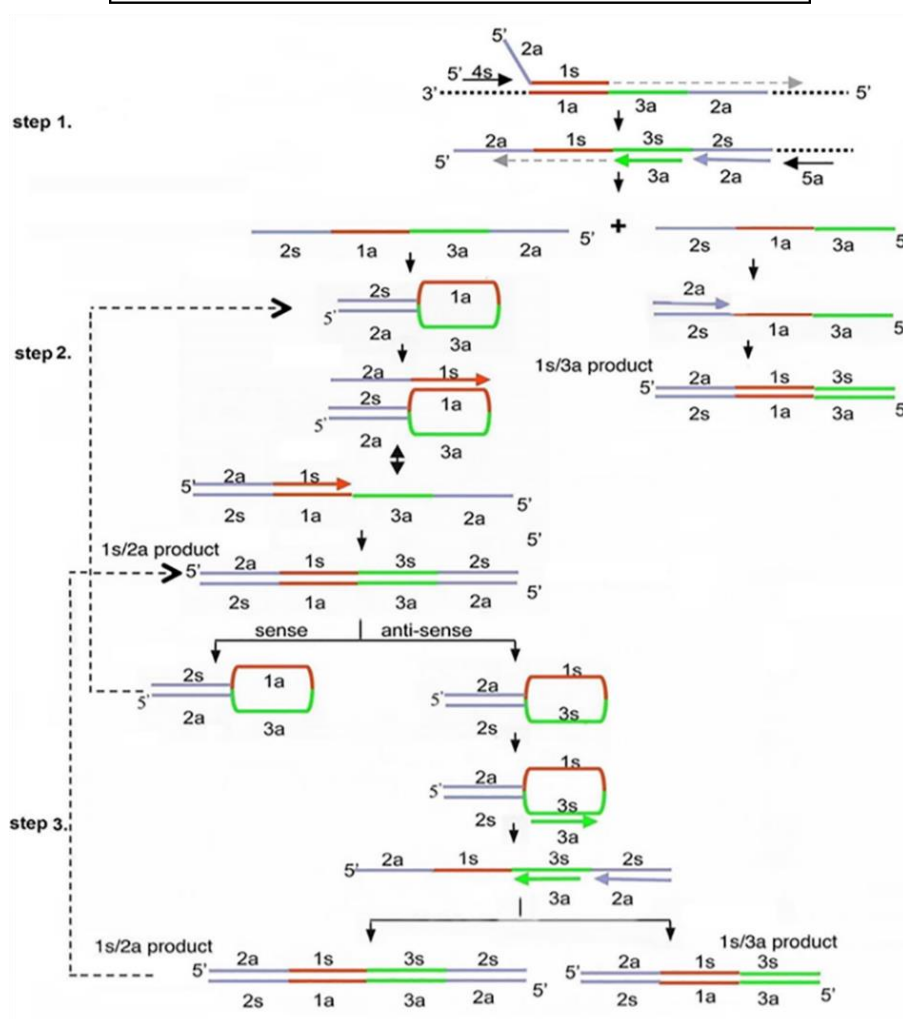
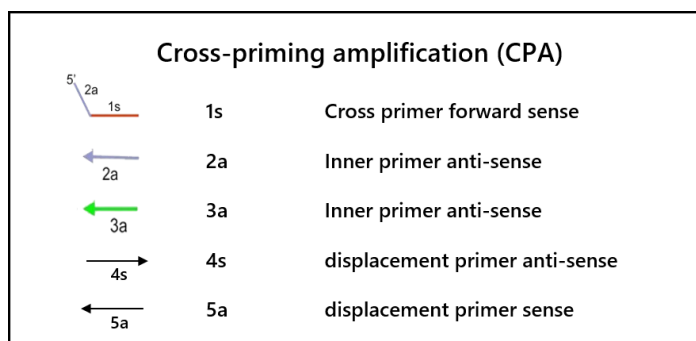
ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเริ่มจาก cross primer (1s) รวมทั้ง displacement primer (4s) เข้าจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่จำเพาะบนสายดีเอ็นเอต้นแบบและเกิดการแยกสายดีเอ็นเอด้วยคุณสมบัติ strand displacement ของ *Bst* DNA polymerase และเริ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จะเห็นได้ว่าที่ปลายทางด้าน 5' ของ cross primer จะเป็นบริเวณที่ไพรเมอร์อื่นสามารถเข้ามาจับได้ (priming site) ดังนั้นเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่จะมีการเพิ่ม priming site เข้าไปในแต่ละรอบ ในขณะที่ดีเอ็นเออีกสายหนึ่งที่ถูกแยกออกจะมีบริเวณที่จำเพาะกับไพรเมอร์ inner primer (2a, 3a) และ displacement primer (5a) และเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้น โดยผลผลิตของ inner primer (2a, 3a) ที่เป็น ssDNA แตกต่างกัน 2 สายจะเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ในขั้นต่อไป (ภาพประกอบ 20 Step 1)

2. Cross-priming amplification

ผลผลิตของ inner primer (3a) จะถูกจับด้วยไพรเมอร์ 2a หรือ 1s เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นโครงสร้าง 1s/3a และผลผลิตของ inner primer (2a) ซึ่งมีส่วน 3' และ 5' ที่มีเบสที่เข้าคู่กัน (complementary bases) จะวนเข้ามาจับกันภายในโมเลกุล (intramolecular) เป็นโครงสร้างคล้ายกับติดผม (hairpin-like structure) ซึ่งสามารถเป็นต้นแบบให้ cross primer (1s) เข้ามาจับและสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเส้นใหม่เกิดเป็นโครงสร้าง 1s/2a (ภาพประกอบ 20 step 2)

3. Extension with hairpin-like structures

หลังจากนั้นเส้นดีเอ็นเอจากโครงสร้าง 1s/2a ที่มีลักษณะคล้ายกับติดผม (hairpin-like structure) จะสามารถเป็นต้นแบบให้แก่ไพรเมอร์ 1s, 2a และ 3a เกิดเป็นโครงสร้าง 1s/2a หรือ 1s/3a (ภาพประกอบ 20 step 3)



ภาพประกอบ 20 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยปฏิกิริยา cross-priming amplification (CPA) (ดัดแปลงจาก Xu et al., 2012)

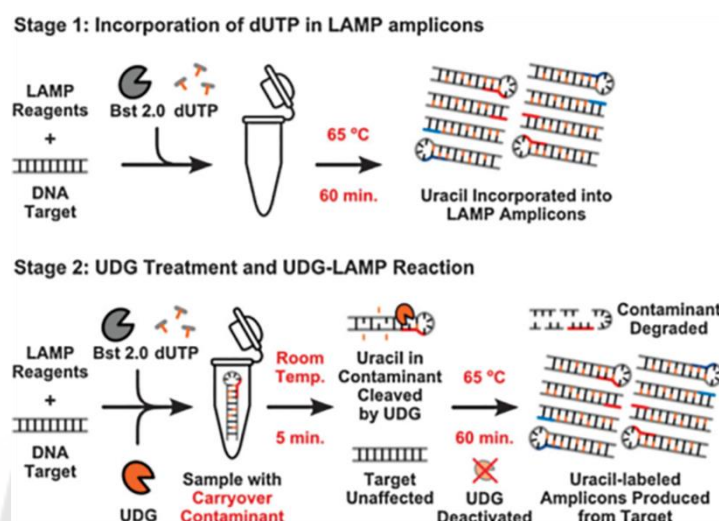
ที่ ม า : Xu, G., Hu, L., Zhong, H., Wang, H., Yusa, S., Weiss, T. C., ... You, Q. (2012). Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. Scientific Reports, 2, 246.

11. Uracil-DNA glycosylase (UDG)

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยส่วนใหญ่มีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเข้ามาช่วย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะ มีความไวสูงทั้งยังใช้เวลาไม่นานในการทราบผลที่แม่นยำ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการทดลองซ้ำๆ ย่อมทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยาเกิดการฟุ้งกระจายสะสมในบริเวณปฏิบัติการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำการทดลอง ร่วมกับเทคนิคการตรวจสอบที่มีความไวสูง ทำให้ประสบกับปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ผลผลิตของปฏิกิริยา เกิดการเพิ่มจำนวนซ้ำ (re-amplification) เกิดผลบวกปลอม (false positive) ซึ่งส่งต่อการวินิจฉัย นักวิจัยจึงได้พยายามพัฒนาเทคนิคต่างๆ ขึ้นเพื่อช่วยลดการปนเปื้อน หนึ่งในนั้นคือการใช้เอนไซม์ uracil-DNA glycosylase (UDG) หรือ uracil-N glycosylase (UNG) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย (DNA repair enzymes) มีหน้าที่หลักในการจดจำและกำจัดยูราซิล (uracil) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการตัดหมู่อะมิโน (deamination) ของไซโตซีน (cytosine) ที่เกิดขึ้นเองในดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) ด้วยกระบวนการ excision-repair process บริเวณ ในปี พ.ศ. 2533 Longo และคณะได้มีการประยุกต์ใช้ UNG ในการตรวจหาเชื้อ Human papillomavirus types 16 (HPV type 16) ด้วยเทคนิค PCR หลังจากนั้นจึงมีการใช้ในงานวิจัยกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น (Aslanzadeh, 2004; Longo, Berninger, & Hartley, 1990)

ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 เริ่มจากการเติม deoxyuridine triphosphate (dUTP) เข้าไปในปฏิกิริยาร่วมกับ deoxythymidine triphosphate (dTTP) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้มั่นใจว่าปฏิกิริยายังสามารถเกิดได้ตามปกติ ดังนั้นเมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นจึงมีการดึงเบส U เข้าไปรวมอยู่ในผลผลิตของปฏิกิริยาด้วย ในขั้นตอนที่ 2 เป็นการทำงานของเอนไซม์ UDG เมื่อนำสารละลายสำหรับปฏิกิริยาที่อาจมีการปนเปื้อนผลผลิตในรอบแรกมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เอนไซม์ UDG ทำงานและตัดเบส U ออกจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ เกิดเป็นเบสว่าง (abasic site) ทำให้ดีเอ็นเอนั้นไม่สามารถเป็นต้นแบบในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (ภาพประกอบ 21) สำหรับการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเส้นใหม่ด้วยเทคนิค CPA ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ UDG อยู่ด้วยสามารถทำได้ เนื่องจากเมื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ อุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาจะอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียสซึ่งเหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase แต่เอนไซม์ UDG ไม่สามารถทำงานได้ เมื่อหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาจะมีการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80-95 องศาเซลเซียสที่

ขั้นตอนสุดท้ายเพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (Hsieh, Mage, Csordas, Eisenstein, & Soh, 2014)



ภาพประกอบ 21 กลไกแสดงการทำงานของเอนไซม์ uracil-DNA glycosylase (UDG) ในปฏิกิริยา LAMP

ที่มา: Hsieh, K., Mage, P. L., Csordas, A. T., Eisenstein, M., & Soh, H. T. (2014). Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chemical Communications*, 50(28), 3747-3749.

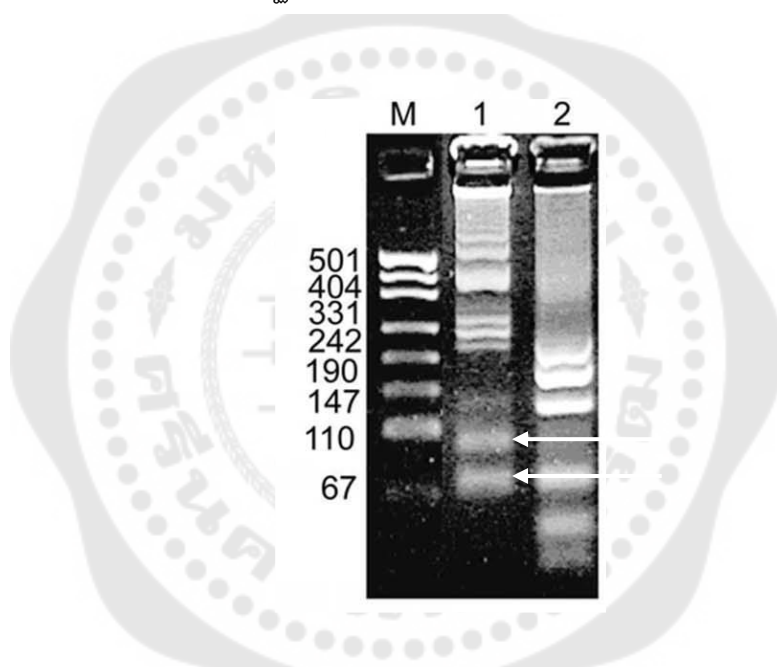
เนื่องจากการใช้เอนไซม์ UDG ไม่รบกวนการเกิดปฏิกิริยา จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้เข้ามาช่วยในการตรวจสอบร่วมกับเทคนิคต่างๆ เพื่อป้องกันหรือลดการปนเปื้อน เช่น การตรวจสอบเชื้อ Tomato chlorosis virus ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับการใช้ uracil-DNA glycosylase เพื่อควบคุมการปนเปื้อน (Kil et al., 2015) การตรวจสอบเชื้อ Tembusu virus ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (UDG-rRT-LAMP) ร่วมกับการใช้ uracil-DNA glycosylase (Tang, Chen, & Diao, 2016) การตรวจสอบเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับการใช้ uracil-DNA glycosylase และ nanogold probe (UDG-LAMP-AuNP) (Manajit, Longyant, Sithigorngul, & Chaivisuthangkura, 2018) การตรวจสอบเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ด้วยเทคนิค cross-

priming amplification ร่วมกับ nanoparticles-based biosensor และ uracil-DNA glycosylase (Zhang et al., 2019) เป็นต้น

12. วิธีการวิเคราะห์ผลของปฏิกิริยา CPA

12.1 การวิเคราะห์ผลโดยใช้ agarose gel electrophoresis

เมื่อนำผลผลิตของวิธี CPA มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis จะพบว่าผลผลิตของ CPA ที่ได้มีขนาดที่แตกต่างกันเห็นเป็นลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder-like pattern) ซึ่งต่างจากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ให้เพียง 1 band

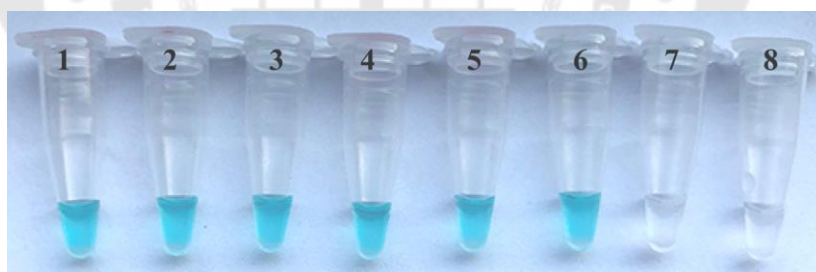


ภาพประกอบ 22 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา CPA โดยใช้ agarose gel electrophoresis; (M) DNA marker (1) ผลผลิตของปฏิกิริยา CPA ที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดและแถบของโครงสร้าง 1s/2a (ลูกศรบน) และ 1s/3a (ลูกศรล่าง) (2) ผลผลิตของปฏิกิริยา CPA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Xba*I

ที่มา : Xu, G., Hu, L., Zhong, H., Wang, H., Yusa, S., Weiss, T. C., ... You, Q. (2012). Cross priming amplification: Mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. *Scientific Reports*, 2, 246.

12.2 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยการใช้อินดิเคเตอร์ที่ให้สี

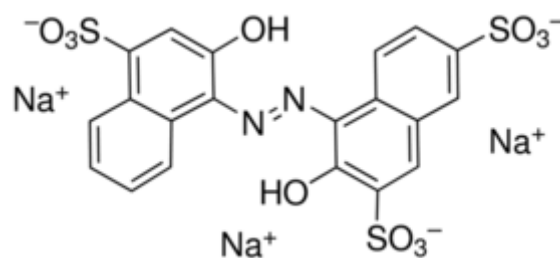
การใช้อินดิเคเตอร์ที่ให้สีซึ่งสามารถเติมลงไปในห้องปฏิบัติการได้โดยตรงเป็นการลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนเนื่องจากไม่มีการเปิดหลอดทดลองภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา ยกตัวอย่าง เช่น calcein ใช้ร่วมกับไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ซึ่งก่อนการเกิดปฏิกิริยาจะเข้าจับกับ calcein เกิด quenching effect ต่อการเรืองแสงทำให้เห็นเป็นสีส้ม เมื่อทำปฏิกิริยาจะเกิดไฟโรฟอสเฟต ($P_2O_7^{4-}$) ซึ่งสามารถจับได้ดีกับไอออนแมงกานีส ทำให้ calcein ถูกปลดปล่อยออกมาและเข้าจับกับไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะพบการเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเขียวเหลือง (Fischbach, Xander, Frohme, & Glöckler, 2015) หรือการใช้ malachite green (MG) ซึ่งเป็น pH-sensitive indicator ชนิดหนึ่ง เป็นสารที่มีประจุบวกจึงสามารถจับกับกรดนิวคลีอิกได้ในบริเวณหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) การเปลี่ยนสีของ MG จะขึ้นอยู่กับความเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในสารละลาย (pH < 2: เหลือง, pH 3-9: ฟ้ำ-เขียว, pH > 10: ไม่มีสี) โดยเมื่อเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสารละลายปฏิกิริยาจะมีสีฟ้ำหรือสีเขียวอ่อนและหากไม่เกิดปฏิกิริยาสารละลายจะไม่มีสี (Zhang et al., 2019)



ภาพประกอบ 23 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา CPA โดยใช้ malachite green (MG) สำหรับเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* โดยหลอดทดลองที่เกิดปฏิกิริยาจะมีสีฟ้ำและหลอดที่ไม่เกิดปฏิกิริยาจะไม่มีสีที่มา: Wang, Y., Sun, L., Li, J. Q., Wang, Z. M., Jiao, W. W., Xiao, J., ... & Shen, A.D. (2019). Detection of nucleic acids and prevention of carryover contamination using cross-priming amplification combined with nanoparticles-based biosensor and antarctic thermal sensitive uracil-DNA-glycosylase. Journal of biomedical nanotechnology, 15(5), 878-892.

13. Hydroxynaphthol blue (HNB)

Hydroxynaphthol blue (HNB) เป็นตัวบ่งชี้โลหะไอออน (metal ion indicator) สำหรับใช้เป็น colorimetric reagent เพื่อตรวจสอบไอออนของโลหะประเภทแอลคาไลน์เอิร์ท (alkaline earth metal ions) เช่น แมกนีเซียม (magnesium: Mg) แคลเซียม (calcium: Ca) เป็นต้น โดยอาศัยเทคนิคการไทเทรตสำหรับปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อน (complexometric titration) เนื่องจากประจุลบของกรดซัลโฟนิกของสาร HNB สามารถจับกับประจุบวกของแมกนีเซียมในสารละลายได้ (ภาพประกอบ 24) ดังนั้นจึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยเมื่อเติมลงในสารละลายก่อนการทำปฏิกิริยาจะให้สีม่วง การเปลี่ยนสีของ HNB ขึ้นกับปริมาณของไอออนแมกนีเซียมอิสระ (Mg^{2+}) ในสารละลายปฏิกิริยา โดยระหว่างการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะเกิด magnesium pyrophosphate ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในสารละลายปฏิกิริยาลดลง สีของ HNB จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงินหรือฟ้า ซึ่งสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าและสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ดีที่ 650 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 25) (Goto, Honda, Ogura, Nomoto, & Hanaki, 2009) การตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วย HNB นั้นมีข้อดีคือ ราคาถูก ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน มีความไวในการตรวจสอบใกล้เคียงกับ SYBR Green



ภาพประกอบ 24 ภาพแสดงประจุลบที่เกิดจากหมู่ซัลโฟนิกของ hydroxynaphthol blue (HNB)

ที่มา : https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure2/175/mfcd000-36393.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00036393-medium.png



ภาพประกอบ 25 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ร่วมกับการใช้ HNB สำหรับตรวจสอบ lampda (λ) DNA โดยสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงจากสีม่วงไปเป็นสีน้ำเงินหรือสีฟ้า

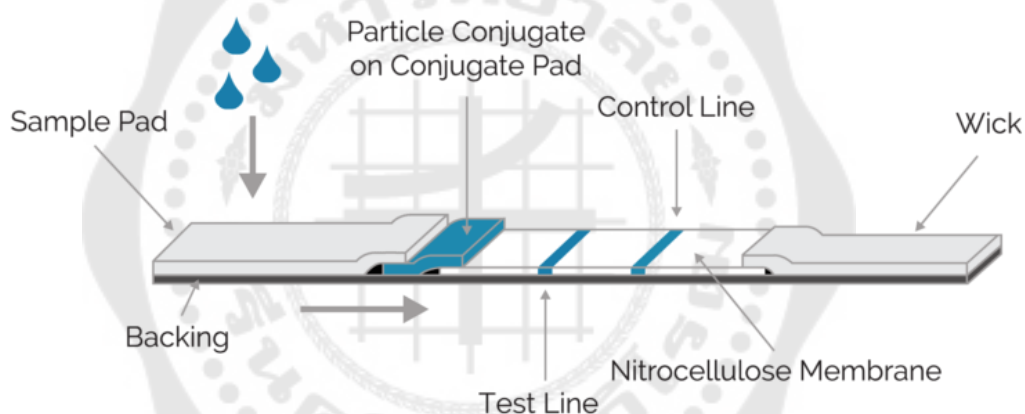
ที่ ม า : Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46(3), 167-172.

14. Lateral flow dipstick (LFD)

เทคนิค lateral flow dipstick (LFD) เป็นการตรวจสอบโดยพิจารณาผลจากแถบสีที่มีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบสารหรือองค์ประกอบต่าง เช่น ฮอโมนเปปไทด์ จุลินทรีย์ สารพิษ เป็นต้น โดยอาศัยระบบ chromatography บนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส ร่วมกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี สำหรับการประยุกต์ใช้เทคนิคในการผลิตชุดตรวจสอบที่ประสบผลสำเร็จเป็นครั้งแรก คือ ชุดทดสอบการตั้งครรภ์เพื่อตรวจหา human chorionic gonadotropin (hCG) ของมนุษย์ในปัสสาวะในปี พ.ศ. 2519 และมีการผลิตออกจำหน่ายครั้งแรกโดย Unilever ในประเทศสหราชอาณาจักร ในปี พ.ศ. 2527 ทั้งนี้ วัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวก็เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความสะดวก ง่ายต่อการนำไปใช้และไม่จำเป็นที่จะต้องใช้อุปกรณ์พิเศษหรือผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการตรวจสอบผล ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว อ่านผลได้ด้วยตนเอง (ปริญทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, ศิวาพร ลงยันต์, ประดิษฐ์ หวังมาน, & สิริกรกุล, 2560)

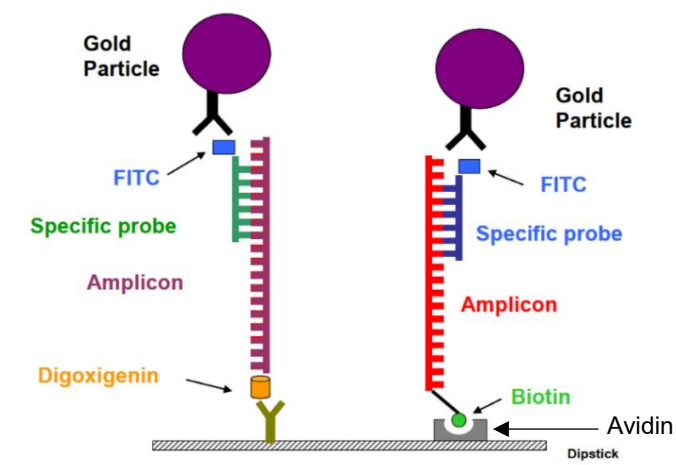
สำหรับการตรวจสอบสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค lateral flow dipstick (LFD) จำเป็นที่จะต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย biotin และโพรบที่ถูกติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) หรือ dioxygenin (DIG) อย่างใดอย่างหนึ่ง โดยภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา จะมีการเติมโพรบลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮบริดระหว่างผลผลิตของปฏิกิริยาที่ถูกติดฉลากด้วย biotin และโพรบที่ติดฉลากด้วย FITC หรือ DIG หลังจากนั้นจึงหยดสารละลายที่ต้องการ

ทดสอบลงบน sample pad ของ LFD จากนั้นตัวอย่างจะแพร่เข้าสู่ส่วนของ conjugate pad ที่มีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ FITC ที่ติดฉลากกับอนุภาคนาโนทองคำ (anti-FITC antibody conjugate with colloidal gold nanoparticle) เกิดเป็น triple complex ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณแถบทดสอบ (test line) และถูกจับด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ biotin หรือ streptavidin และเกิดการรวมกันจนเกิดเป็นสีแดง ส่วนโพรบที่ไม่เข้าจับกับผลผลิตของปฏิกิริยาที่เหลือจะจับอยู่กับ anti-FITC antibody ที่ติดฉลากกับอนุภาคนาโนทองคำ เกิดเป็น double complex และจะถูกจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน (anti-Ig antibody) เกิดเป็นสีแดงบริเวณแถบควบคุม (control line) โดยถ้าไม่มีตัวอย่างจะเกิดแถบสีเฉพาะบริเวณแถบควบคุมเท่านั้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าระบบเป็นปกติ



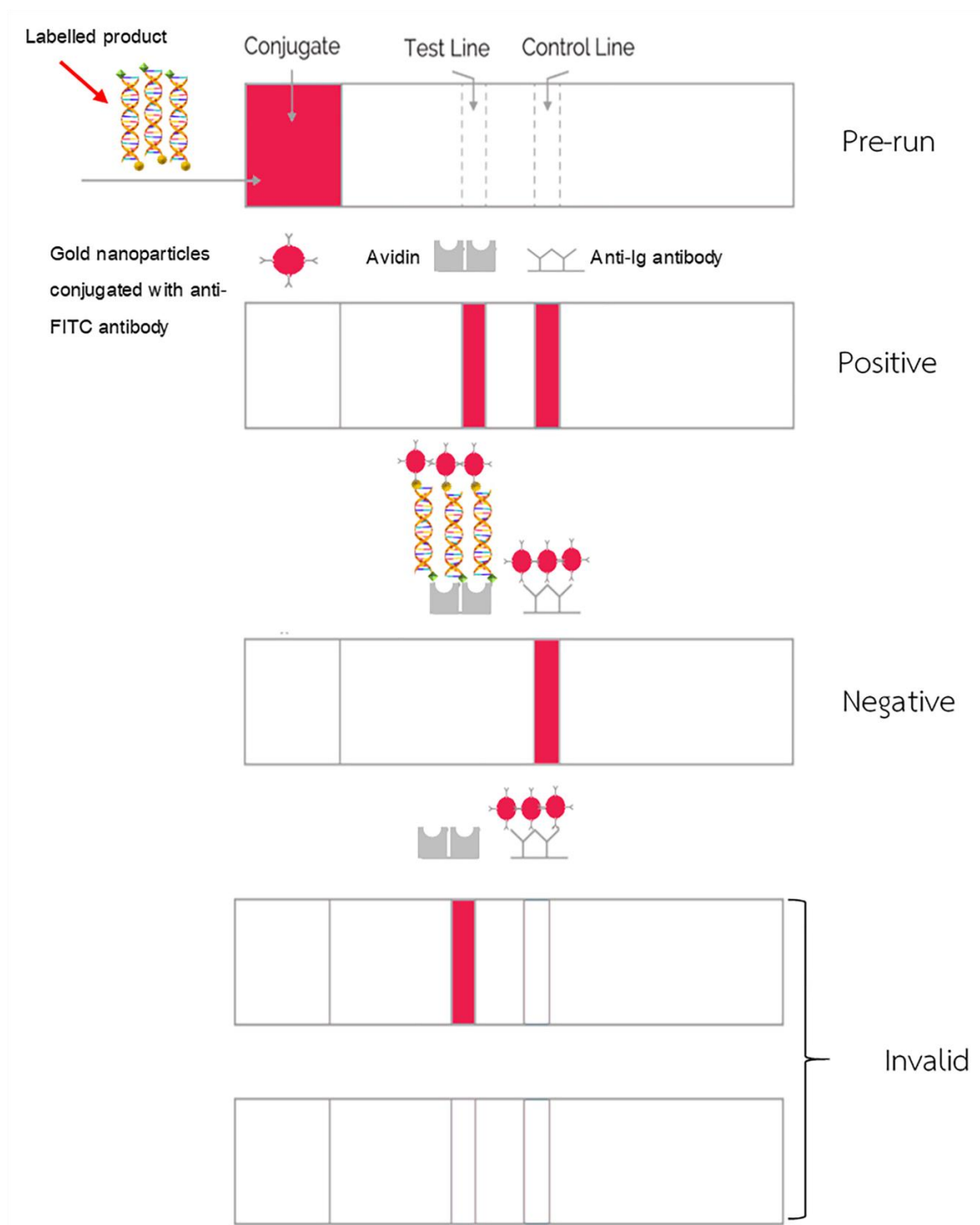
ภาพประกอบ 26 ภาพแสดงส่วนประกอบของ lateral flow dipstick (LFD)

ที่มา: <https://www.dcn dx.com/lateral-flow-rapid-diagnostic-test/>



ภาพประกอบ 27 ภาพแสดงโครงสร้างการเกิดไฮบริดระหว่างผลผลิตของปฏิกิริยาที่ถูกติดฉลากด้วย biotin และโพรบที่ติดฉลากด้วย FITC ถูกจับด้วย avidin หรือ DIG ที่ถูกจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ DIG ที่ถูกตรึงอยู่บนบริเวณแถบทดสอบ (test line)

ที่มา: บริษัท Milenia Biotec GmbH. (Germany)



ภาพประกอบ 28 ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาด้วย lateral flow dipstick (LFD)

ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://www.dcn dx.com/lateral-flow-rapid-diagnostic-test/>

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง electrophoresis apparatus และอุปกรณ์ (Bio-Rad, USA)
2. เครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™)
3. เครื่อง thermal cycler (Eppendorf, Germany)
4. เครื่องปั่นตกตะกอนตัวอย่างด้วยความเร็วสูง (Microcentrifuge) (Scilogex, USA)
5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (FINEPCR, Korea)
6. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator) (Gibthai, Thailand)

1.2 เคมีภัณฑ์

1. ชุด LFD strip test (Milenia® Genuine HybriDetect 2T, Germany)
2. ชุด NucleoSpin® plasmid EasyPure kit (Macherey-nagel, Germany)
3. ชุด NucleoSpin® virus kit (Macherey-nagel, Germany)
4. ชุด QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA)
5. ยาปฏิชีวนะ ampicillin (Sigma-Aldrich, USA)
6. สี hydroxynaphthol blue (Sigma-Aldrich, Germany)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy agar (TSA) (Difco, USA)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic soy broth (TSB) (Difco, USA)
9. เอนไซม์ Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase (New England Biolab, UK)
10. เอนไซม์ Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA)
11. เอนไซม์ uracil-DNA glycosylase (UDG) (New England Biolab, UK)
12. เอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI (New England Biolab, UK)

2. แบคทีเรีย พลาสมิดและไวรัสที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1-MCP-SDDV ซึ่งมียีนแคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV

แบคทีเรียและไวรัสชนิดอื่นๆ สำหรับใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะแสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงรายชื่อแบคทีเรียและไวรัสที่ก่อโรคในปลาที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	ชื่อย่อ	รหัส	แหล่งที่มา	แยกได้จาก
<i>Aeromonas caviae</i>	AC	22106	DMST	Stool
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AH	04082	AAHRI	unknown
<i>Escherichia coli</i>	EC	25922	ATCC	unknown
<i>Flavobacterium columnare</i>	FC	1301	CPF	<i>L. calcarifer</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	PS	22107	DMST	Rectal swab
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA	N/A	CENTEX	<i>O. niloticus</i>
<i>Streptococcus iniae</i>	SI	N/A	CENTEX	<i>L. calcarifer</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	VA	24047	DMST	Stool
<i>Vibrio cholerae</i>	VC	22117	DMST	Stool
<i>Vibrio harveyi</i>	VH	N/A	Dong et al. 2017	<i>L. calcarifer</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VP	N/A	DMSC	unknown
<i>Vibrio vulnificus</i>	VV	N/A	DMSC	unknown
<i>Lates calcarifer herpes virus</i>	LCHV	N/A	Meemetta et al. 2020.	<i>L. calcarifer</i>
infectious spleen and kidney necrosis virus	ISKNV	N/A	Laboratory sample	<i>L. calcarifer</i>
red-spotted grouper nervous necrosis virus	RGNNV	N/A	CENTEX	<i>Epinephelus</i> spp.

AHRI = Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries of Thailand

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

CENTEX = Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University.

CPF = Charoen Pokphand Foods Public Co. Ltd.

DMSC = Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health Thailand

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ จากตาราง 3 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy agar (TSA) (Difco, USA) จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Gibthai, Thailand) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อโคโลนีของแบคทีเรียปรากฏขึ้น ทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic soy broth (TSB) (Difco, USA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังครบระยะเวลาที่กำหนด นำแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ได้ไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุด QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ และตรวจสอบความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่สกัดด้วยเครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™) จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธีการที่พัฒนาขึ้นต่อไป

3. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

ปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ติดเชื้อ SDDV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (center of excellence for shrimp molecular biology and biotechnology: CENTEX Shrimp) มหาวิทยาลัยมหิดล

ปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ถูกทำให้ติดเชื้อจาก ห้องปฏิบัติการวิจัยศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ พืช และปรสิต (center of excellence in animal plant and parasite biotechnology: COE Biotech) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 การตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในปลากะพงด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

4.1.1 การสกัด DNA ของไวรัสในปลาตัวอย่าง

นำเนื้อเยื่อปลาตัวอย่างที่แสดงอาการคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ SDDV มาเติมด้วย lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 3% sodium dodecyl sulfate, 1% β -mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และบดด้วยแท่งบด

ตัวอย่าง หลังจากนั้นก็ปั่นเหวี่ยงที่ 3500 x g นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยชุด NucleoSpin® virus kit (Macherey-nagel, Germany) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

4.1.2 การตรวจการติดเชื้อ SDDV ด้วยวิธี PCR

การตรวจการติดเชื้อ SDDV ในปลากะพงขาวด้วยวิธี PCR เริ่มจากการเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีน (major capsid protein: MCP) ของไวรัสจากสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากข้อ 4.1.1 เป็นต้นแบบ โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เริ่มจากผสมสารเคมีตามตาราง 4 แล้วใส่สารเคมีที่ผสมแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf, Germany) กำหนดอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัส ตามตาราง 5 โดยโปรแกรมที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV ได้รับการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แปลรหัสเป็นแคปซิดโปรตีน (MCP หรือ ORF 060L) (GenBank accession number KR139659) (Senapin et al., 2019) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรแกรม ดังนี้

Forward primer 5'- ATG TCA TCT ATT GCA GGA GC-3'
Reverse primer 5'- TTA CAA GAT CGG AAA TCC AA-3'

ตาราง 4 ส่วนผสมของการทำ polymerase chain reaction (PCR)

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	Final concentration
DNA ของปลาตัวอย่าง	2.0	-
10X reaction buffer (-MgCl ₂)	2.5	-
10 mM dNTPs	0.5	200 µM
50 mM MgCl ₂	0.75	2.0 mM
Forward primer (10 pmol/ µL)	0.5	0.2 µM
Reverse primer (10 pmol/ µL)	0.5	0.2 µM
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.4	2 units

ตาราง 4 (ต่อ)

Sterile water	17.85	-
ปริมาตรสุทธิ	25	-

ตาราง 5 ขั้นตอน อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV ด้วยวิธี PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
1. Pre-denaturation	95	2.00 นาที	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นจำนวน 35 รอบ
2. Denaturation	95	30 วินาที	
3. Annealing	56	30 วินาที	
4. Extension	72	30 วินาที	
5. Final extension	72	5 นาที	

จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยามาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ 1.5% agarose gel ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV พบผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,362 คู่เบส

4.2 การเตรียมรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1-MCP-SDDV มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) (Difco, USA) ที่มีส่วนผสมของ NaCl₂ 2.0% และ spread ด้วยยาปฏิชีวนะ ampicillin (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลโคไนด์ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 1 โคไนด์มาเพาะเลี้ยงต่อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic soy broth (TSB) (Difco, USA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมด้วยยาปฏิชีวนะ ampicillin (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียโดยใช้ชุด NucleoSpin® plasmid EasyPure kit (Macherey-nagel, Germany)

ทำการปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้จากข้อ 4.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (TSB+Amp+pGEX-6P-1-MCP-SDDV) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 2.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $3000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนออก เติมบัฟเฟอร์ A1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติมบัฟเฟอร์ A3 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาจนสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นทำการดูดสารละลายซึ่งมีพลาสมิดอยู่ ใส่ใน NucleoSpin® plasmid EasyPure spin column ปั่นเหวี่ยงที่ $3000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ AQ ปริมาตร 450 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนล่างทิ้งและทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อแยกบัฟเฟอร์ที่ตกค้างอยู่จนคอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดทดลองขนาด 2.0 มิลลิลิตรและเติมบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงบนเมมเบรนของคอลัมน์ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1,362 คู่เบส ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือคล้ายกับดีเอ็นเอของเชื้อ SDDV จากฐานข้อมูล GenBank จาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST และ blastx

4.4 การออกแบบไพรเมอร์ (primers) และโพรบ (probe) สำหรับปฏิกิริยา CPA-LFD

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนแคปซิดโปรตีน (MCP หรือ ORF 060L) ของ SDDV (GenBank accession number KR139659) ตามกลไกของปฏิกิริยา CPA โดยที่ไพรเมอร์ 1s จะถูกเติมด้วยบริเวณตัดจำเพาะ (restriction site) ของเอนไซม์ *XhoI* เพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค CPA ตามรายงานของ Xu และคณะ ในปี 2012 (Xu et al., 2012) และทางด้านปลาย 5' ของ 3a inner primer ถูกติดฉลากด้วย biotin จากนั้นทำการออกแบบโพรบ โดยโปรแกรม Primer3 version 4.1.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) และติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) ทางด้าน

ปลาย 5' เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา CPA ด้วย lateral flow dipstick (LFD) (ภาพประกอบ 29) (ตาราง 6)

```

1   CGATGCAGCT GTATAATTAC TGTGAATATT TGGATGAGTT ACATTTTAA CAGCAAAGAA
    GCTACGTCGA CATATTAATG AACTTATAA ACCTACTCAA TGTA AAAATT GTCGTTTCTT
                                5a
61  GAGCTCTTTA ATGGGATGAC TAAATCGCAG ATCAATATGG GGCATCTCAT TTTCCAAGGG
    CTCGAGAAAT TACCCTACTG ATTTAGCGTC TAGTTATACC CCGTAGAGTA AAAGGTTCCC
                                3a
121 TCTGATAGGA ATTCTAGGTC CCATCTGACA CTGTTCAATA ATCATATCTC TACTGACAAG
    AGACTATCCT TAAGATCCAC GGTAGACTGT GACAAAGTTAT TAGTATAGAG ATGACTGTTT
                                2a
181 AGACATTGCT TCACGCTCTT CGTTGGTCAG GATAGCATAA GTACCCATAA CACTAACTTC
    TCTGTAACGA AGTGCGAGAA GCAACCAGTC CTATCGTATT CATGGGTATT GTGATTGAAG
                                1s
241 AGTCAGAGCG GGTGTCACGT TTTCCATGTC ACTTGTTAAA GGTACAGAAA TTGCATTATC
    TCAGTCTCGC CCACAGTGCA AAAGGTACAG TGAACAATTT CCATGTCCTT AACGTAATAG
                                4s
301 ATTAGTGCTT TGAGAAATGA GCAAATCCTT CCAATCTCTC AATTTAAAAT GAATTTTAAT
    TAATCACGAA ACTCTTTACT CGTTTAGGAA GGTAGAGAG TTAATTTTA CTTAAAATTA
361 TTCATTGTAA GGTAGTGCTG CAGTAGGAAG AGCAAGTCCA GTATCACGAG TAAAGAAGAA
    AAGTAACATT CCATCACGAC GTCATCCTTC TCGTTCAGGT CATAGTGCTC ATTTCTTCTT

```

ภาพประกอบ 29 ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายยืนแคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV (GenBank accession number KR139659) (ขีดเส้นใต้=บริเวณที่โพรบจับกับเป้าหมาย)

ตาราง 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทำ CPA-LFD

Primer	Length in bases	Sequence (5'-3')
1s cross primer	48	GGT GCC ATC TGA CAC TGT TCA <u>CTC GAG</u> GAC ATG GAA AAC GTG ACA CCC
2a inner primer	20	TTC ACG CTC TTC GTT GGT CA
3a inner primer	21	Biotin--GGT GCC ATC TGA CAC TGT TCA
4s displacement primer	28	GCA CTA ATG ATA ATG CAA TTT CTG TAC C
5a displacement primer	20	ATC GCA GAT CAA TAT GGG GC
Probe	20	FITC—ACA TTG CTT CAC GCT CTT CG

Note: Underline = restriction site of *Xho*I

4.5 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA

4.5.1 การทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง dUTP และ dTTP ในการทำปฏิกิริยา CPA โดยใช้ uracil-DNA glycosylase (UDG) (UCPA)

การทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง dUTP และ dTTP สำหรับทำปฏิกิริยา UCPA โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง dTTP และ dUTP (มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิโมลาร์) ที่ 25:0, 20:5, 15:10, 10:15, 5:20 และ 0:25 ตามลำดับ สำหรับส่วนผสมอื่น ๆ ในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตาราง 7

4.5.2 การทดสอบหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA

สำหรับการตรวจสอบอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา UCPA ได้มีการกำหนดอุณหภูมิอยู่ที่ 55, 57, 59, 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียส โดยอ้างอิงอุณหภูมิต่ำสุดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามการทดลองของ Zhang และคณะในการตรวจสอบเชื้อ Giant salamander iridovirus (GSIV) (Zhang et al., 2019) ภายหลังเมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาแล้ว จึงมีการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัส โดยกำหนดให้ใช้เวลาที่แตกต่างกันเริ่มตั้งแต่ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที โดยระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาอ้างอิงจากการทดลองของ Tanner และคณะ ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา LAMP ด้วยเทคนิค colorimetric pH detection (Tanner, Zhang, & Evans Jr, 2015)

4.5.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา UCPA

ทำการตรวจสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา ภายหลังการตรวจสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาก่อนหน้านี้ เช่น Betaine, dNTPs และ $MgCl_2$ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ betaine อยู่ที่ 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, และ 10.0 มิลลิโมลาร์

4.5.4 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี hydroxynaphthol blue (HNB) ที่ใช้ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA

ทำการตรวจสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี hydroxynaphthol blue (HNB) เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยา UCPA ภายหลังการตรวจสอบด้วยตาเปล่า โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของสารละลายภายในหลอดทดลอง โดยกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นของ HNB

อยู่ที่ 120 และ 150 ไมโครโมลาร์ ตามการทดลองของ (Goto et al., 2009) และการตรวจสอบเชื้อ *Botrytis cinerea* ด้วยเทคนิค LAMP (Duan, Ge, Zhang, Wang, & Zhou, 2014)

ตาราง 7 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา UCPA

ส่วนผสมของ UCPA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	Final concentration
DNA ของปลาที่ติดเชื้อ SDDV (100 ng/μL)	2.0	-
10X ThermoPol buffer	2.5	-
1s cross primer (10 pmol/ μL)	2.0	0.8 μM
2a inner primer (10 pmol/ μL)	2.0	0.6 μM
3a inner primer (10 pmol/ μL)	2.0	0.6 μM
4s displacement primer (10 pmol/ μL)	0.5	0.2 μM
5a displacement primer (10 pmol/ μL)	0.5	0.2 μM
5M betaine	5.0	1.0 M
50 mM MgCl ₂	2.0	4.0 mM
10 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP และ dUTP)	2.0	0.8 mM
<i>Bst</i> DNA polymerase	1.0	8.0 units
Uracil-DNA glycosylase (UDG)	0.5	2.5 units
Sterile water	3.0	-
ปริมาตรสุทธิ	25	-

นำหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ตามข้อ 4.5.1 หรือ 4.5.2 หรือ 4.5.3 หรือ 4.5.4 เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf, Germany) โดยกำหนดให้ป้อนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีสำหรับการทำงานของเอนไซม์ UDG จากนั้นป้อนต่อ ด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิตของปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ผ่าน กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV

4.6 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI*

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของปฏิกิริยา UCPA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการนำสารละลายของปฏิกิริยา UCPA ปริมาณ 8 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* (New England Biolabs, UK) ปริมาณ 6 units และ 10X CutSmart® Buffer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

4.7 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วย lateral flow dipstick (LFD)

นำนิวคลีโอไทด์โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ทางด้านปลาย 5' ที่มีการออกแบบให้จำเพาะต่อผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA มาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบ โดยเลือกความเข้มข้นของโพรบที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้นคือ 100, 10 และ 1 พิโคโมล/ไมโครลิตร การทำปฏิกิริยา UCPA โดยใช้ส่วนผสมและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (ตาราง 7) แต่มีการใช้ 3a inner primer ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ทางปลายด้าน 5' แทนไพรเมอร์ที่ไม่มีการติดฉลาก จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้มาไฮบริไดซ์กับโพรบโดยแบ่งสารละลายภายหลังการเกิดปฏิกิริยา UCPA มา 8 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด ที่มีความเข้มข้นของโพรบแตกต่างกันคือ 100, 10 และ 1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 62 หรือ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้แต่ละหลอดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี LFD buffer (Milenia® Genuine HybriDetect 2T, Germany) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำแผ่น lateral flow dipstick (LFD) ลงไปจุ่มทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาทีเพื่อสังเกตผลการทดลอง

4.8 การทดสอบหาความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ SDDV

การตรวจสอบความจำเพาะของเทคนิค UCPA-HNB และ UCPA-LFD โดยการใช้สารพันธุกรรมของไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคในปลา (ตาราง 3) เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยการปรับความเข้มข้นของสารพันธุกรรมตั้งต้นให้เป็น 100 นาโนกรัม ด้วย sterile water และใช้สารพันธุกรรมที่สกัดจากปลาที่ไม่พบการติดเชื้อและสารพันธุกรรมของปลาติดเชื้อ SDDV เป็นตัวควบคุมเชิงลบและตัวควบคุมเชิงบวก ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB เปรียบเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้ 1.5% agarose gel

electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV หรือร่วมกับการตรวจสอบด้วย lateral flow dipstick (LFD)

4.9 การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR โดยใช้ recombinant plasmid ของ SDDV-MCP

ทำการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดที่มีเยื่อแคปซิดโปรตีนของ SDDV ที่สกัดได้ โดยใช้เครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™) จากนั้นทำการคำนวณเปลี่ยนความเข้มข้นของพลาสมิดให้เป็นจำนวนสำเนา (copy number) ของไวรัสตามสูตรของ Whelan และคณะ ในปี 2003 (Whelan, Russell, & Whelan, 2003)

$$\text{Number of copies (molecules)} = \frac{X \text{ ng} \times 6.02 \times 10^{23} \text{ molecules/mole}}{(N \times 650 \text{ g/mol}) \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

โดย X	หมายถึง	ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng)
N	หมายถึง	ความยาวของเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ (bp)
650 g/mole	หมายถึง	น้ำหนักโดยเฉลี่ยของ 1 คู่เบสในดีเอ็นเอ
$1 \times 10^9 \text{ ng/g}$	หมายถึง	แฟคเตอร์เปลี่ยนหน่วย (conversion factor)

ทำการปรับปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดให้ลดลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ด้วย sterile water ($10^5 - 1$ สำเนาต่อไมโครลิตร) เพื่อใช้สำหรับเป็นต้นแบบในการหาจำนวนสำเนาของแคปซิดโปรตีน SDDV ที่น้อยที่สุดที่วิธี UCPA-HNB และ UCPA-LFD สามารถตรวจสอบได้ หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB เปรียบเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV หรือการตรวจสอบด้วย lateral flow dipstick (LFD)

4.10 การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างของปลาที่ติดเชื้อด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR

ทำการปรับความเข้มข้นของสารพันธุกรรมตั้งต้นที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ SDDV ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และทำให้เจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (ten-

fold serial dilution) ด้วย sterile water ให้ได้ความเข้มข้นของสารพันธุกรรมตั้งต้นเท่ากับ 100, 10, 1, 0.1, 0.01 นาโนกรัม และ 1 พิโคกรัม ตามลำดับ สำหรับเป็นสารพันธุกรรมต้นแบบเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความไวด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB เปรียบเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV หรือร่วมกับการตรวจสอบด้วย lateral flow dipstick (LFD)

4.11 การตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาที่ทราบสถานะการติดเชื้อด้วยเทคนิค UCPA-HNB และ UCPA-LFD ที่พัฒนาขึ้น

นำสารพันธุกรรมของปลาที่ได้รับการตรวจสอบสถานะการติดเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และ qPCR จากรายงานของ Charoenwai และคณะ ในปี 2019 และรายงานของ Sriisan และคณะ ในปี 2020 เป็นต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา UCPA-HNB และ UCPA-LFD เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ของเทคนิคที่ได้รับการพัฒนาขึ้น โดยหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้ว ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB เปรียบเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV หรือการตรวจสอบด้วย lateral flow dipstick (LFD)

4.12 การตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD

นำตัวอย่างปลาที่ไม่ทราบการติดเชื้อจำนวน 30 ตัวอย่าง จากการทดลองการทำให้ติดเชื้อ (experimental infection) โดยการฉีดสารละลายที่ได้จากเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ SDDV ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เข้าช่องท้องของปลากะพงขาวขนาดประมาณ 10-15 เซนติเมตร หลังจากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุด NucleoSpin® virus kit (Macherey-nagel, Germany) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้ไปเป็นต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค semi-nested PCR โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา semi-nested PCR ดังแสดงในตาราง 8 โดยใช้ไพรเมอร์ RB-ATPase-F1 และ RB-ATPase-R1 และ RB-ATPase-R2 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

Forward primer: (RB-ATPase-F1) 5'-ATG TCT GTT CCT GTG AAG GAA-3'

Reverse primer1: (RB-ATPase-R1) 5'-TTA TTC AAC AAC AGC AAT TGC G-3'

Reverse primer2: (RB-ATPase-R2): 5'-ACA AGT TCC AAT GTC TAC CGT-3'

จากนั้นนำหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ผสมสารต่าง ๆ เรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาตามตาราง 9

ตาราง 8 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา semi-nested PCR ในขั้นตอนแรก

ส่วนผสมของ semi-nested PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	Final concentration
DNA ของปลาที่ติดเชื้อ SDDV (100 ng/ μ L)	2	-
10X reaction buffer (-MgCl ₂)	2.5	-
10 mM dNTPs	0.5	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	0.75	2.0 mM
Forward primer (10 pmol/ μ L)	0.5	0.2 μ M
Reverse primer1 (10 pmol/ μ L)	0.5	0.2 μ M
Platinum™ Taq DNA Polymerase	1	5 units
Sterile water	17.25	-
ปริมาตรสุทธิ	25	-

ตาราง 9 ขั้นตอน อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV ด้วยวิธี semi-nested PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
1. Pre-denaturation	94	5 นาที	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นจำนวน 30 รอบ
2. Denaturation	94	30 วินาที	
3. Annealing	60	30 วินาที	
4. Extension	72	30 วินาที	
5. Final extension	72	5 นาที	

หลังเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก นำผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้ไปเป็นต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา semi-nested PCR ในขั้นตอนสุดท้าย โดยผสมสารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยาตามตาราง 10 จากนั้นกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาตามตาราง 11

ตาราง 10 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา semi-nested PCR ในขั้นตอนสุดท้าย

ส่วนผสมของ semi-nested PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	Final concentration
ผลผลิตของปฏิกิริยา semi-nested PCR ในขั้นตอนแรก	5	-
10X reaction buffer (-MgCl ₂)	2	-
10 mM dNTPs	0.4	0.2 mM
Forward primer (10 pmol/ μ L)	0.4	0.2 μ M
Reverse primer2 (10 pmol/ μ L)	0.4	0.2 μ M
Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2	1 units
Sterile water	11.6	-
ปริมาตรสุทธิ	20	-

ตาราง 11 ขั้นตอน อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV ด้วยวิธี semi-nested PCR ในขั้นตอนสุดท้าย

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
1. Pre-denaturation	94	5 นาที	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นจำนวน 30 รอบ
2. Denaturation	94	30 วินาที	
3. Annealing	67	30 วินาที	
4. Extension	72	30 วินาที	
5. Final extension	72	5 นาที	

หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา semi-nested PCR ด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV และทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB เปรียบเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และส่องดูภายใต้แสง UV ร่วมกับการตรวจสอบด้วย lateral flow dipstick (LFD)

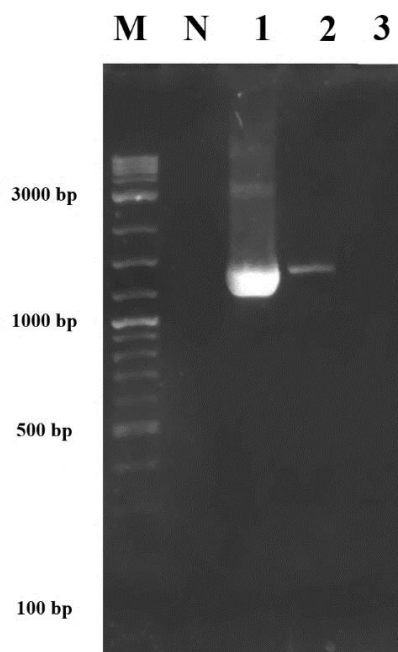
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การตรวจการติดเชื้อ SDDV ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

จากการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลากะพงขาวและปลาส้มดัดดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยยีนแคปซิดโปรตีน (major capsid protein: MCP) ของเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MCP ของเชื้อ จากรายงานของ Senapin และคณะ ในปี 2019 พบว่ามีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาเบ้าหมายที่มีขนาด 1,362 คู่เบส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (ภาพประกอบ 30)

เมื่อนำปลาส้มที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ SDDV ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง เปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายกับดีเอ็นเอของเชื้อ SDDV จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแปลรหัสให้ แคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนด้วยโปรแกรม blastx พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนในปลาส้มมีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพประกอบ 31) และลำดับกรดอะมิโน (ภาพประกอบ 32) ของยีนแคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (100% identities)



ภาพประกอบ 30 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลากะพงขาวและปลาสมิต
 ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยยีน MCP ของเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค PCR; Lane M: 1 kb plus DNA
 marker, Lane 1: ปลาสมิตดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยยีน MCP ของเชื้อ SDDV, Lane 2: สาร
 พันธุกรรมที่สกัดจากเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ SDDV จาก CENTEX Shrimp, Lane 3:
 สารพันธุกรรมที่สกัดจากเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่ไม่ทราบสถานะการติดเชื้อ และ Lane N: No
 template control (negative control)

Scale drop disease virus isolate SDDV_2016 MCP gene, complete cds
Sequence ID: [MH152403.1](#) Length: 1362 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1362 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2516 bits(1362)	0.0	1362/1362(100%)	0/1362(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGTCATCTATTGCAGGAGCTAATGTTACCAAGTGGGTTATCGACTTGGCTGCCACGAT	60		
Sbjct 1	ATGTCATCTATTGCAGGAGCTAATGTTACCAAGTGGGTTATCGACTTGGCTGCCACGAT	60		
Query 61	GCCATGGAGACTCATCTCTACGGTGGCGATAATTCAATCACCCTACTTCTTGCCTGAAACT	120		
Sbjct 61	GCCATGGAGACTCATCTCTACGGTGGCGATAATTCAATCACCCTACTTCTTGCCTGAAACT	120		
Query 121	ACACGATCTTCTTGGTTCAGTAAACTTCTGTGCAGCTGTCTAAACAACAGGGACTGCA	180		
Sbjct 121	ACACGATCTTCTTGGTTCAGTAAACTTCTGTGCAGCTGTCTAAACAACAGGGACTGCA	180		
Query 181	AATTTGGACAAGAAATTTAGCGTGGTTGTGGCCAGAGGAGGTGACTATCTTATGAATGTT	240		
Sbjct 181	AATTTGGACAAGAAATTTAGCGTGGTTGTGGCCAGAGGAGGTGACTATCTTATGAATGTT	240		
Query 241	TGGCTTCGCTTAAAGTTCAGCCCCCAAAAATACTAAAGCAAAATCAAGCATAAAGATGG	300		
Sbjct 241	TGGCTTCGCTTAAAGTTCAGCCCCCAAAAATACTAAAGCAAAATCAAGCATAAAGATGG	300		
Query 301	ACCGACAATTTATGCACAATCTCGTTCAAGAAGTTACAATCTCAATTAACGATCTCACT	360		
Sbjct 301	ACCGACAATTTATGCACAATCTCGTTCAAGAAGTTACAATCTCAATTAACGATCTCACT	360		
Query 361	GCACAGACTATTACTAGTGAGTTCTTGATTTTGGTCAACATGTAACTTCCCCTGGGA	420		
Sbjct 361	GCACAGACTATTACTAGTGAGTTCTTGATTTTGGTCAACATGTAACTTCCCCTGGGA	420		
Query 421	AAGTCGTGAGGATGCTAATATGATAGGATACACTCATGACTTGGTTGGAGGTACTGTG	480		
Sbjct 421	AAGTCGTGAGGATGCTAATATGATAGGATACACTCATGACTTGGTTGGAGGTACTGTG	480		
Query 481	CAAAATGCAACTATGCCATCTAAGTATCTCAATCTGCCAATTCGTTCTTCTTACTCGT	540		
Sbjct 481	CAAAATGCAACTATGCCATCTAAGTATCTCAATCTGCCAATTCGTTCTTCTTACTCGT	540		
Query 541	GATACTGGACTTGCTCTTCTACTGCAGCACTACCTTACAATGAAATTAATAATCAATTT	600		
Sbjct 541	GATACTGGACTTGCTCTTCTACTGCAGCACTACCTTACAATGAAATTAATAATCAATTT	600		
Query 601	AAATGAGAGATTGGAAGGATTTGCTCATTTCTCAAAGCACTAATGATAATGCAATTTCT	660		
Sbjct 601	AAATGAGAGATTGGAAGGATTTGCTCATTTCTCAAAGCACTAATGATAATGCAATTTCT	660		
Query 661	GTACCTTTAAACAAGTGACATGGAAAACGTGACACCCGCTCTGACTGAAGTTAGTGTATG	720		
Sbjct 661	GTACCTTTAAACAAGTGACATGGAAAACGTGACACCCGCTCTGACTGAAGTTAGTGTATG	720		
Query 721	GGTACTTATGCTATCCTGACCAACGAAGAGCGTGAAGCAATGTCTCTTGTGAGTAGAGAT	780		
Sbjct 721	GGTACTTATGCTATCCTGACCAACGAAGAGCGTGAAGCAATGTCTCTTGTGAGTAGAGAT	780		
Query 781	ATGATTATTGAACAGTGTGAGATGGCACCTAGAAATTCCTATCAGACCCCTGGAAAATGAG	840		
Sbjct 781	ATGATTATTGAACAGTGTGAGATGGCACCTAGAAATTCCTATCAGACCCCTGGAAAATGAG	840		
Query 841	ATGCCCATATTGATCTGCGATTTAGTCATCCCATTAAGAGGCTCTTCTTGTGTTAAA	900		
Sbjct 841	ATGCCCATATTGATCTGCGATTTAGTCATCCCATTAAGAGGCTCTTCTTGTGTTAAA	900		
Query 901	AATGTAACATCAACAAATTTACAGTAATATACAGCTGCATCGCCCATCATTGCCAGT	960		
Sbjct 901	AATGTAACATCAACAAATTTACAGTAATATACAGCTGCATCGCCCATCATTGCCAGT	960		
Query 961	GGTACAAACAAAGTTACAAATGCCTCCAAAAGCTCAAAACCCATTGTACACGTGTCACTC	1020		
Sbjct 961	GGTACAAACAAAGTTACAAATGCCTCCAAAAGCTCAAAACCCATTGTACACGTGTCACTC	1020		
Query 1021	ATTTATGAAAACACAGCACGATTGAACAATATGGGTGTGACTACTTTTCGTATGTTGAT	1080		
Sbjct 1021	ATTTATGAAAACACAGCACGATTGAACAATATGGGTGTGACTACTTTTCGTATGTTGAT	1080		
Query 1081	CCATACTTCTTTGCACCATGCATTCCTAAAATCGATGGGGTCATGGCTTATTGTTATACC	1140		
Sbjct 1081	CCATACTTCTTTGCACCATGCATTCCTAAAATCGATGGGGTCATGGCTTATTGTTATACC	1140		
Query 1141	ATGAACATGGGTGATGTCGATCCTATGGGTTCACAAATTTCCGCCGGTGTCAAATATT	1200		
Sbjct 1141	ATGAACATGGGTGATGTCGATCCTATGGGTTCACAAATTTCCGCCGGTGTCAAATATT	1200		
Query 1201	ACGCTGTCTGCAAGGTTACCGCAAATTCAAAACCACTCAGCTGCTAGCGGTAAACACA	1260		
Sbjct 1201	ACGCTGTCTGCAAGGTTACCGCAAATTCAAAACCACTCAGCTGCTAGCGGTAAACACA	1260		
Query 1261	GATGGACATAAAGTTGCTCAAAAGTTTGAACGGTGTAAATGGTGTAAATCATAATGTT	1320		
Sbjct 1261	GATGGACATAAAGTTGCTCAAAAGTTTGAACGGTGTAAATGGTGTAAATCATAATGTT	1320		
Query 1321	GCACGTATCAGCAATGGTTCAATGGATTTCCGATCTTGTA 1362			
Sbjct 1321	GCACGTATCAGCAATGGTTCAATGGATTTCCGATCTTGTA 1362			

ภาพประกอบ 31 ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SDDV เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SDDV มีความคล้ายกับ major capsid protein (MCP) ของเชื้อ SDDV (100% identities)

ORF_060L [Scale drop disease virus]

Sequence ID: [YP_009163821.1](#) Length: 453 Number of Matches: 1[▶ See 4 more title\(s\)](#)Range 1: 1 to 453 [GenPept](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

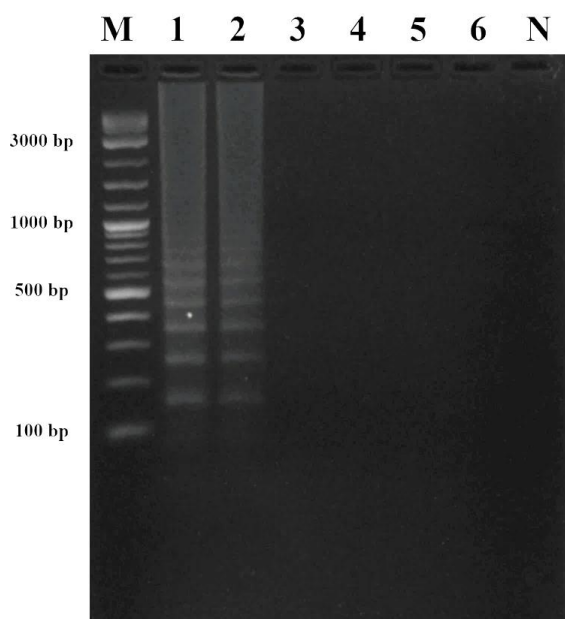
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
944 bits(2439)	0.0	Compositional matrix adjust.	453/453(100%)	453/453(100%)	0/453(0%)	+1
Query 1	MSSIAGANVTSGFIDLAAYDAMETHLYGGDNSITYFLRETTSSWFSKLPVQLSKQTGTA				180	
Sbjct 1	MSSIAGANVTSGFIDLAAYDAMETHLYGGDNSITYFLRETTSSWFSKLPVQLSKQTGTA				60	
Query 181	NFGQEFSSVVARGGDYLMNWLRVKVPALKNTKANSSIRWTDNFMHNLVQEVTSIFNDLT				360	
Sbjct 61	NFGQEFSSVVARGGDYLMNWLRVKVPALKNTKANSSIRWTDNFMHNLVQEVTSIFNDLT				120	
Query 361	AQTITSEFLDFWSTCNVPGGKSSGYANMIGYTHDLVGGTVQATMPSKYLNLPIPFFFTR				540	
Sbjct 121	AQTITSEFLDFWSTCNVPGGKSSGYANMIGYTHDLVGGTVQATMPSKYLNLPIPFFFTR				180	
Query 541	DTGLALPTAALPYNEIKIHFKLRDWDLLISQSTNDNAISVPLTSDMENVTALTEVSVM				720	
Sbjct 181	DTGLALPTAALPYNEIKIHFKLRDWDLLISQSTNDNAISVPLTSDMENVTALTEVSVM				240	
Query 721	GTVAILTNEEREAMSLVSRDMIEQCMAPRIPIRPLENEMPHIDLRFSPHPIKELFFAVK				900	
Sbjct 241	GTVAILTNEEREAMSLVSRDMIEQCMAPRIPIRPLENEMPHIDLRFSPHPIKELFFAVK				300	
Query 901	NVTHPNIHSNYTAASPIIASGTNKVTMPKQNPPLSHVSLIYENTARLNNMGVDYFSYVD				1080	
Sbjct 301	NVTHPNIHSNYTAASPIIASGTNKVTMPKQNPPLSHVSLIYENTARLNNMGVDYFSYVD				360	
Query 1081	PYFFAPCIPKIDGVMAYCYTMNMGHVDPMGSTNFGRLSNITLSAKVTANSKTTSAASGNT				1260	
Sbjct 361	PYFFAPCIPKIDGVMAYCYTMNMGHVDPMGSTNFGRLSNITLSAKVTANSKTTSAASGNT				420	
Query 1261	DGHKVAQKFELVWIGVNHVVARISNGSFGFPIL		1359			
Sbjct 421	DGHKVAQKFELVWIGVNHVVARISNGSFGFPIL		453			

ภาพประกอบ 32 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SDDV เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม blastx พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SDDV ที่ถูกแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับเชื้อ SDDV (100% identities)

2. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA

2.1 การทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง dUTP และ dTTP ในการทำปฏิกิริยา CPA โดยใช้ uracil DNA glycosylase (UDG) (UCPA)

ผลการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง dUTP และ dTTP สำหรับการทำปฏิกิริยา CPA โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง dTTP และ dUTP (มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิโมลาร์) โดยไม่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นรวมของ dNTPs ที่ 25:0, 20:5, 15:10, 10:15, 5:20 และ 0:25 ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที จากผลการทดลอง พบแถบดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder-like pattern) เมื่ออัตราส่วนระหว่าง dUTP และ dTTP อยู่ที่ 25:0 และ 20:5 โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ uracil-DNA glycosylase (UDG) เท่ากับ 2.5 units เมื่อทำการวิเคราะห์ผลของปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (ภาพประกอบ 33)

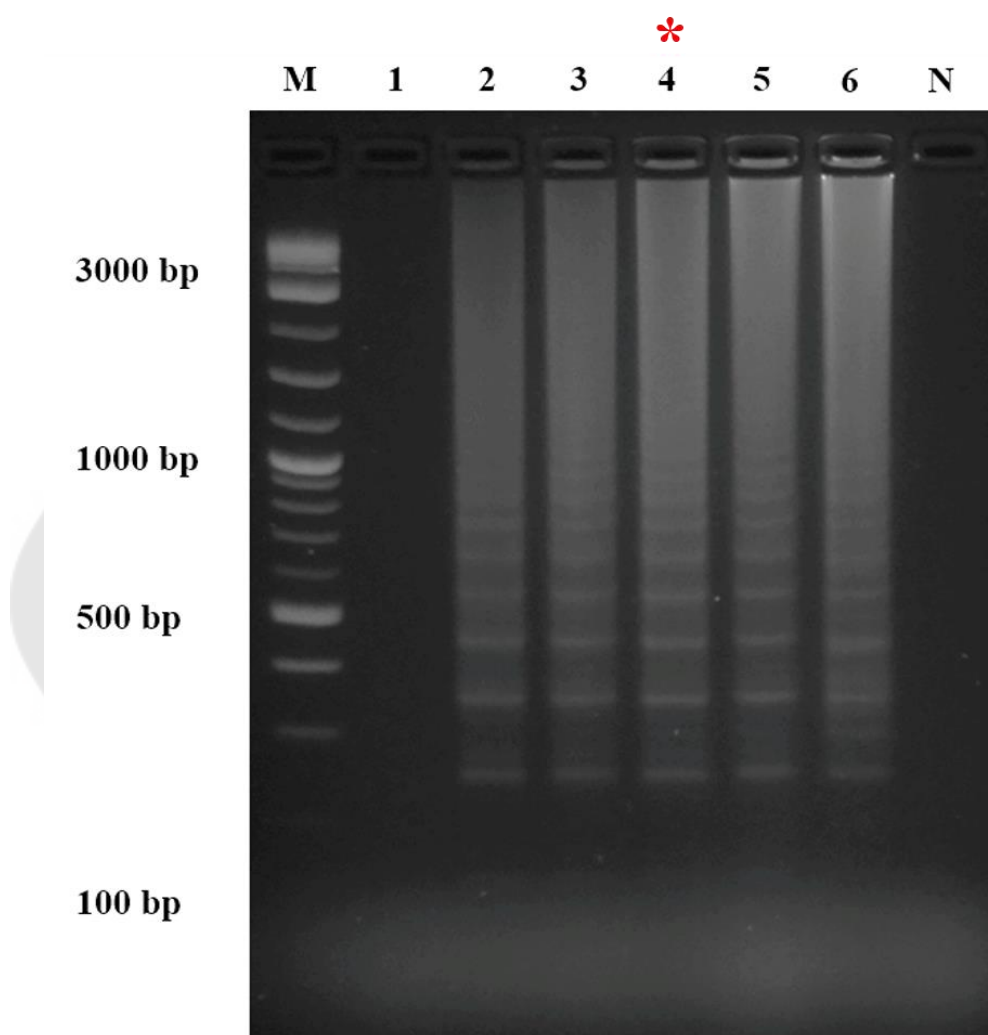


ภาพประกอบ 33 การตรวจสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง dUTP และ dTTP สำหรับการทำปฏิกิริยา CPA ; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane 1-6 อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง dTTP และ dUTP (mM:mM) ที่ 25:0, 20:5, 15:10, 10:15, 5:20 และ 0:25 ตามลำดับ; Lane N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control); dUTP: deoxyuridine triphosphate; dTTP: deoxythymidine triphosphate

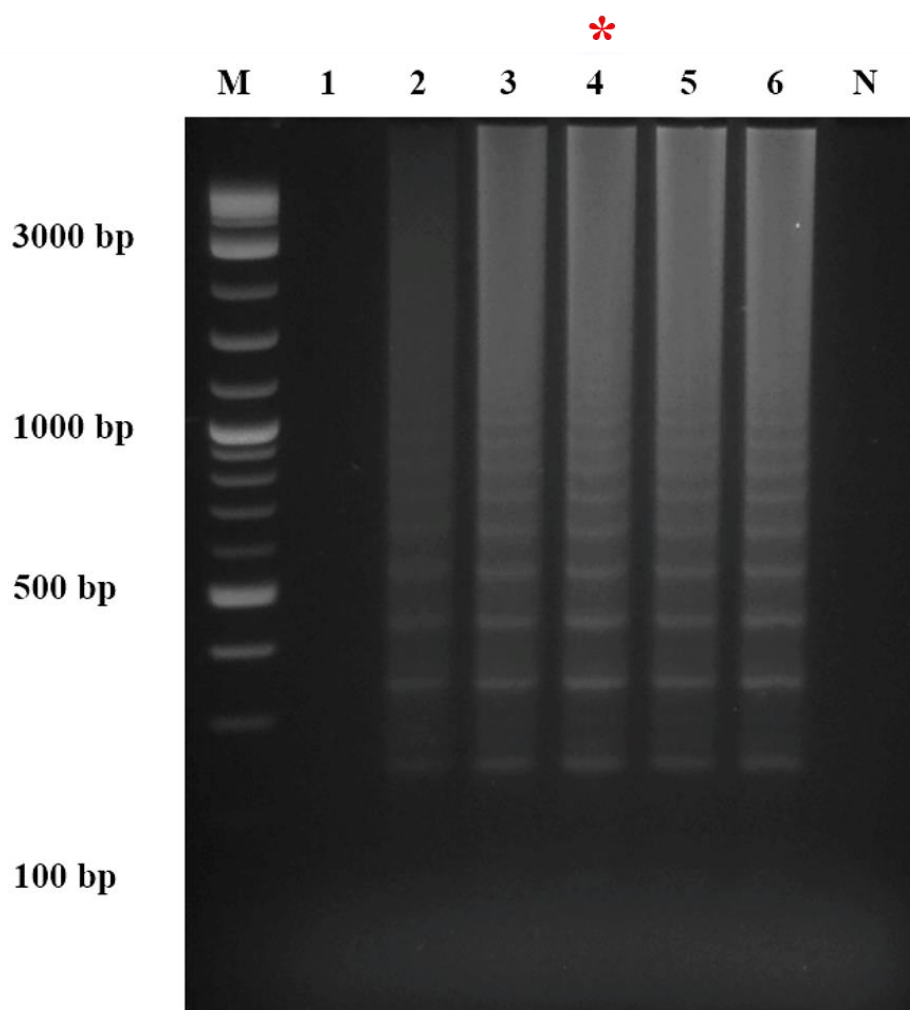
2.2 การทดสอบหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA

การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่กำหนด คือ 55, 57, 59, 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าปฏิกิริยา UCPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสได้ตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 57-65 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส แถบผลผลิตของปฏิกิริยามีความชัดเจนมากกว่าเมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่น ดังนั้นจึงสรุปว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA อยู่ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบ 34) สำหรับการตรวจสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยกำหนดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยา UCPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ตั้งแต่ระยะเวลา 30-90 นาที เมื่อตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis และที่

ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 60 นาที พบว่าแถบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA มีความเข้มและความชัดเจนมากกว่าระยะเวลา 30 และ 45 นาที (ภาพประกอบ 35) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA อยู่ที่ 60 นาที



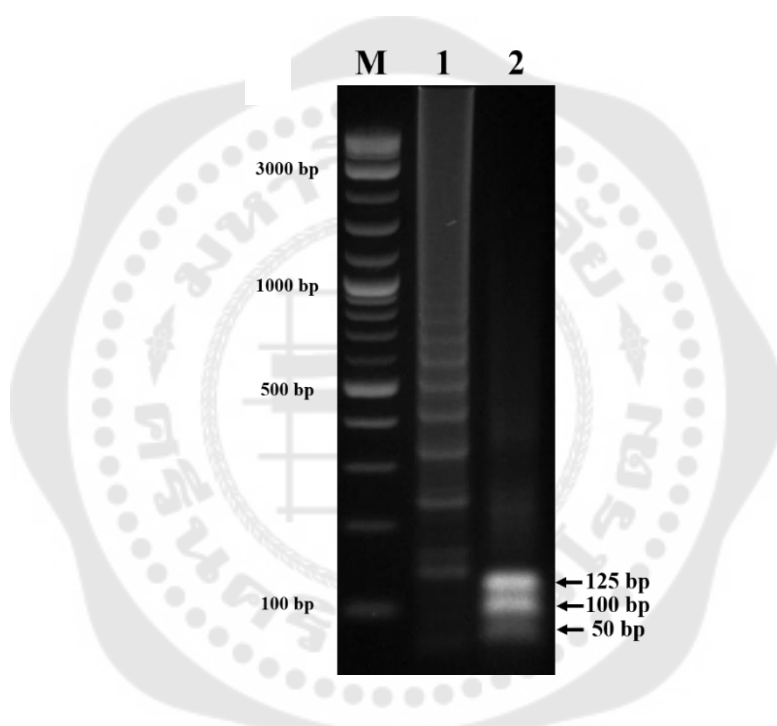
ภาพประกอบ 34 ผลการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA โดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 60 นาที เมื่อทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane 1-6: อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 55, 57, 59, 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ; Lane N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control) พบว่าอุณหภูมิที่ 61 องศาเซลเซียส (*) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา



ภาพประกอบ 35 ผลการตรวจสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA โดยใช้ ระยะเวลาที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส; เมื่อทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane 1-6: ระยะเวลาที่ เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ตามลำดับ; Lane N: สาร พันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control) พบว่าระยะเวลา 60 นาที (*) เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

2.3 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I

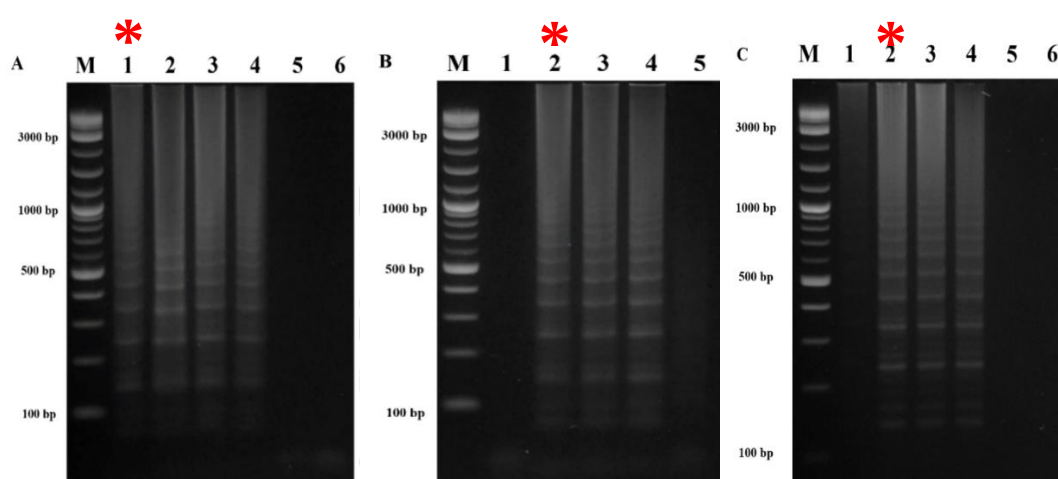
ภายหลังการตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา UCPA พบว่า ผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Xho*I และผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ที่ถูกตัดมีขนาดประมาณ 125, 100 และ 50 คู่เบส ดังนั้น ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I จึงแสดงให้เห็นความถูกต้องของปฏิกิริยา UCPA สำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV (ภาพประกอบ 36)



ภาพประกอบ 36 ผลการตรวจสอบความถูกต้องในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ SDDV ด้วยปฏิกิริยา UCPA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane 1: ผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I, Lane 2: ผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ที่มีขนาดประมาณ 125, 100 และ 50 คู่เบส

2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา UCPA

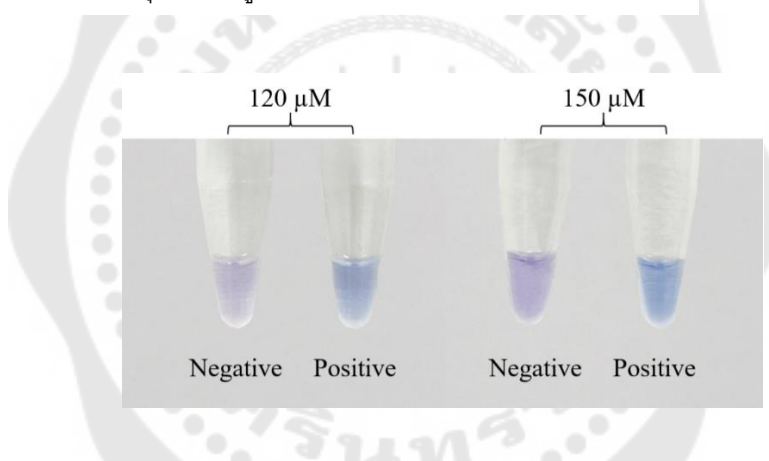
การตรวจสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา UCPA ประกอบด้วย dNTPs, $MgCl_2$ และ Betaine พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ dNTPs, $MgCl_2$ และ Betaine อยู่ที่ 1.0, 4.0 และ 1.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพประกอบ 37)



ภาพประกอบ 37 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา UCPA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis; (A) การตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ dNTPs; Lane 1-6: ความเข้มข้นของ dNTPs ที่แตกต่างกัน คือ 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, (B) การตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$; Lane 1-5: ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่แตกต่างกัน คือ 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, (C) การตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Betaine; Lane 1-6: ความเข้มข้นของ Betaine ที่แตกต่างกัน คือ 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ; Lane M: 1 kb plus DNA marker, (*) = ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ dNTPs, $MgCl_2$ และ Betaine ในการทำปฏิกิริยา UCPA

2.5 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี hydroxynaphthol blue (HNB) ที่ใช้ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA

ภายหลังจากการตรวจสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมี ระยะเวลา และ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี HNB เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA โดยเติมสีที่มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 120 และ 150 ไมโครโมลาร์ ลงในสารละลายปฏิกิริยา ก่อนทำการบ่มที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที จากผลการทดลองพบว่า สีของสารละลายปฏิกิริยา UCPA เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วง (negative control) เป็นสีน้ำเงิน (positive control) เมื่อสี HNB มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 120 และ 150 ไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามพบว่า ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 150 ไมโครโมลาร์ สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย UCPA ได้ชัดเจนกว่าสี HNB ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 120 ไมโครโมลาร์ (ภาพประกอบ 38)

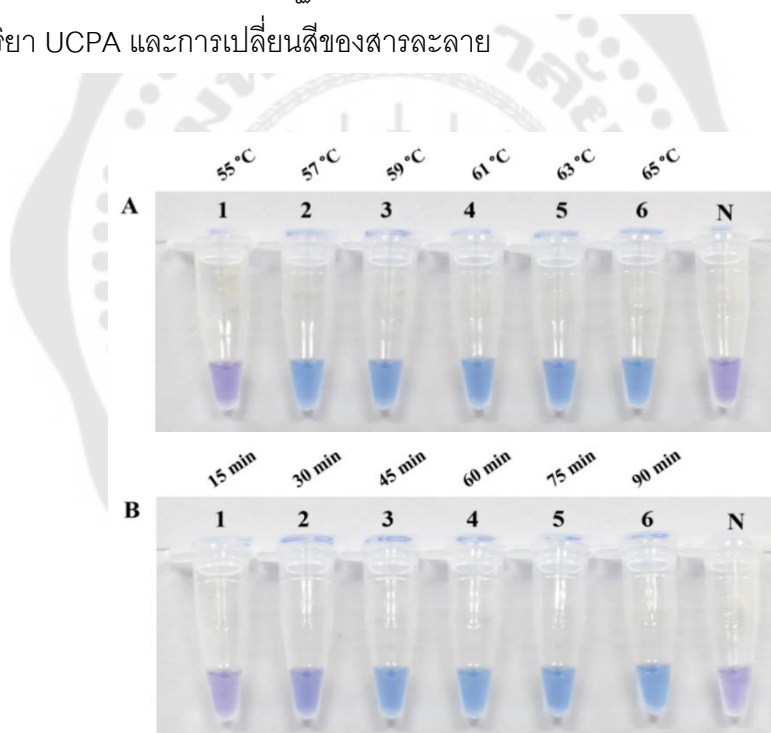


ภาพประกอบ 38 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี hydroxynaphthol blue (HNB) เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA

จากนั้นทำการตรวจสอบอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ HNB ในสารละลาย โดยทำการเติมสี HNB ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 150 ไมโครโมลาร์ลงไปในสารละลายปฏิกิริยา UCPA และทำการบ่มที่อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่กำหนด คือ 55, 57, 59, 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ จากผลการทดลองพบว่า สีของสารละลายปฏิกิริยา UCPA เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วง (negative control) เป็นสีน้ำเงิน (positive control) ได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 57-65 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบ 39A) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

(ภาพประกอบ 34) อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ 61 องศาเซลเซียส

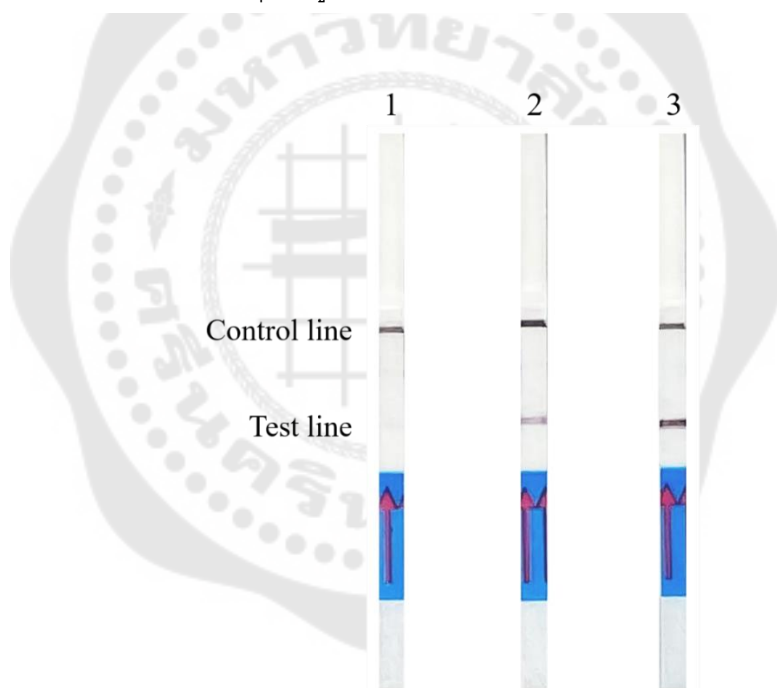
จากนั้นทำการตรวจสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยการเปลี่ยนสีของ HNB โดยกำหนดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยา UCPA สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลาย พบว่าสีของสารละลายเริ่มมีการเปลี่ยนสีเล็กน้อยที่ระยะเวลา 30 นาที และมีการเปลี่ยนสีที่ชัดเจนขึ้นเมื่อมีระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 45-90 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) (ภาพประกอบ 39B) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (ภาพประกอบ 35) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 60 นาที โดยพิจารณาจากความเข้มของแถบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA และการเปลี่ยนสีของสารละลาย



ภาพประกอบ 39 ผลการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB ในสารละลายปฏิกิริยา UCPA; (A) การเปลี่ยนสีของ HNB เมื่อใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 55-65 องศาเซลเซียส (B) การเปลี่ยนสีของ HNB เมื่อใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 15-90 นาที ตามลำดับ; N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control)

2.6 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วย lateral flow dipstick (LFD)

ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของนิวคลีโอไทด์โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ทางด้านปลาย 5 สำหรับตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย lateral flow dipstick (LFD) โดยกำหนดความเข้มข้นของโพรบที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้นคือ 100, 10 และ 1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของโพรบตามที่กำหนด ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แถบสีบริเวณ test line ของ LFD มีความเข้มและความชัดเจนน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส (ไม่แสดงรูปภาพ) เมื่อใช้ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์โพรบเดียวกัน ดังนั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร เมื่อทำการบ่มร่วมกับผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ที่ติดฉลากด้วย biotin ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (ภาพประกอบ 40)

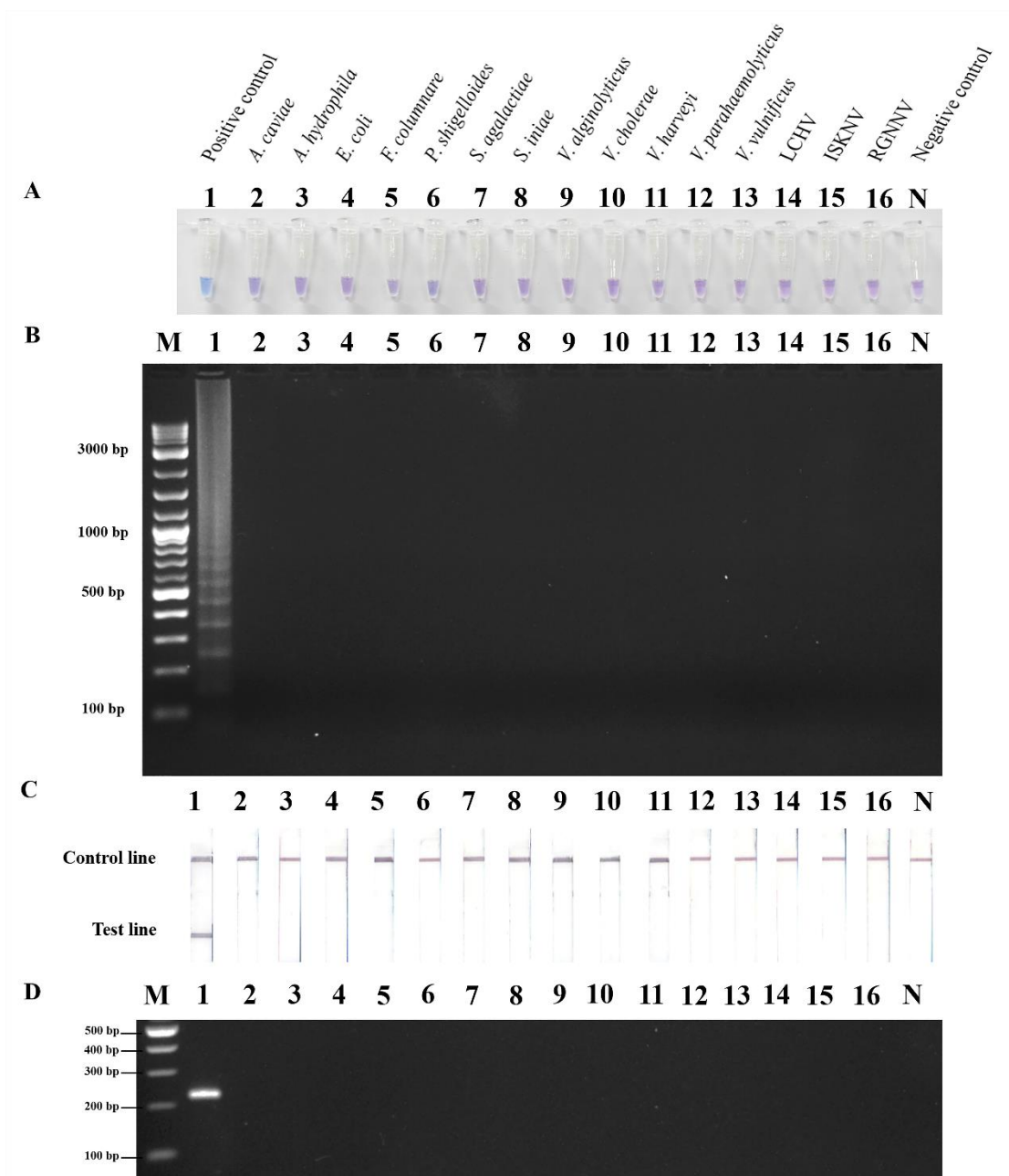


ภาพประกอบ 40 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์โพรบ เพื่อตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย LFD; โดยใช้ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์โพรบที่แตกต่างกัน คือ (1) ความเข้มข้นที่ 100, (2) ความเข้มข้นที่ 10 และ (3) ความเข้มข้นที่ 1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์โพรบที่ 1 พิโคโมลต่อไมโครลิตรให้ผลชัดเจนที่สุด

3. การตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค UCPA และ PCR

เพื่อตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา UCPA ที่พัฒนาขึ้น จึงมีการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสอื่นตามตาราง 3 ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา พบว่า มีเพียงหลอดทดลองที่มีสารพันธุกรรมของเชื้อ SDDV เท่านั้นที่เกิดปฏิกิริยาเมื่อทำการตรวจสอบผลด้วยสี HNB, agarose gel electrophoresis และ LFD ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า ไพรเมอร์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมีความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค UCPA และเทคนิค PCR โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียหรือไวรัสอื่น (ภาพประกอบ 41)



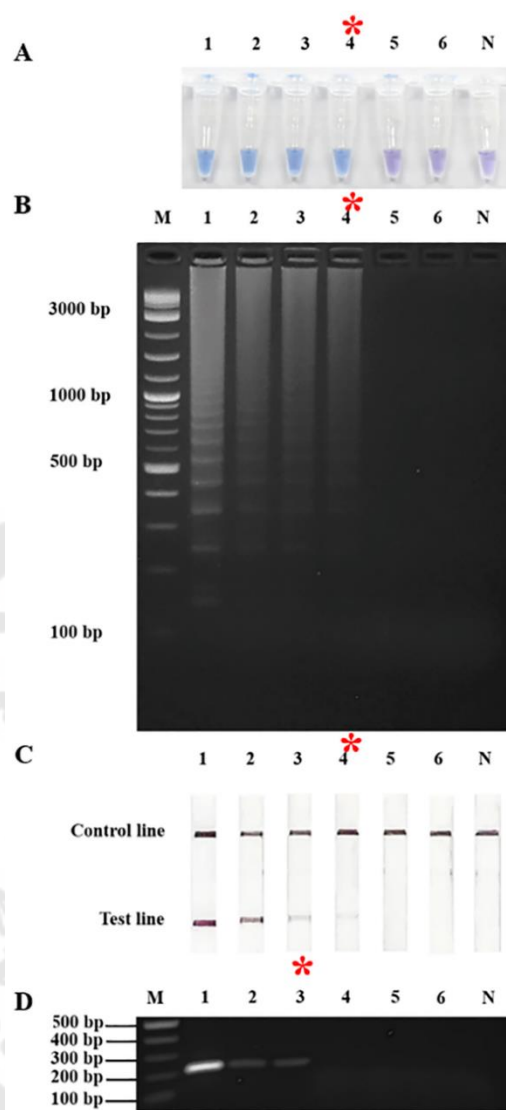


ภาพประกอบ 41 การตรวจสอบความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค UCPA และเทคนิค PCR; (A) การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB, (B) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis, (C) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย LFD และ (D) การตรวจสอบความจำเพาะของ outer primer (4s, 5a) โดยปฏิกิริยา PCR ด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane 1: สารพันธุกรรมของปลาที่ติดเชื้อ SDDV (positive control),

Lane 2-16: สารพันธุกรรมของเชื้อ *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium columnare*, *Plesiomonas shigelloides*, *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, *Vibrio alginolyticus*, *V. cholera*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Lates calcarifer herpes virus* (LCHV), infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) และ Lane N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control)

4. การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR โดยใช้ recombinant plasmid ที่มียีนแคปซิดโปรตีนของ SDDV

การตรวจสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA ที่ถูกพัฒนาขึ้นและเทคนิค PCR ที่ใช้ outer primer (4s, 5a) โดยใช้พลาสมิดที่มียีน MCP ของเชื้อ SDDV โดยการคำนวณจำนวนสำเนา (copy number) ของไวรัสโดยแทนค่าตัวแปลต่าง ๆ ดังนี้ X หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เท่ากับ 46 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ N หมายถึง ความยาวของเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ เท่ากับ 6,362 คู่เบส ในสูตรตามหัวข้อ 11 พบว่าจำนวนสำเนาของไวรัสที่คำนวณได้ เท่ากับ 6.698716×10^9 สำเนาต่อไมโครลิตร จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของจำนวนสำเนาตั้งต้นให้เท่ากับ 10^5 สำเนาต่อไมโครลิตร และทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ด้วย sterile water ให้ได้ความเข้มข้นของจำนวนสำเนาของไวรัสตั้งต้นเท่ากับ 10^5-1 สำเนาต่อไมโครลิตร จากการทดลองพบว่าหลอดทดลองที่มีสารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control) สีของสารละลายยังคงเป็นสีม่วงเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ในขณะที่หลอดทดลองที่มีพลาสมิดของยีน MCP ของเชื้อ SDDV ปริมาณตั้งแต่ 10^2-10^5 สำเนาต่อไมโครลิตร มีการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค gel electrophoresis ที่พบแถบลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder-like patterns) และสอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วย LFD ดังนั้น เทคนิค UCPA ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 10^2 สำเนาต่อไมโครลิตร (ภาพประกอบ 42A-C) ในขณะที่ความไวในการตรวจสอบต่ำสุดของเทคนิค PCR อยู่ที่ 10^3 สำเนาต่อไมโครลิตร (ภาพประกอบ 42D)

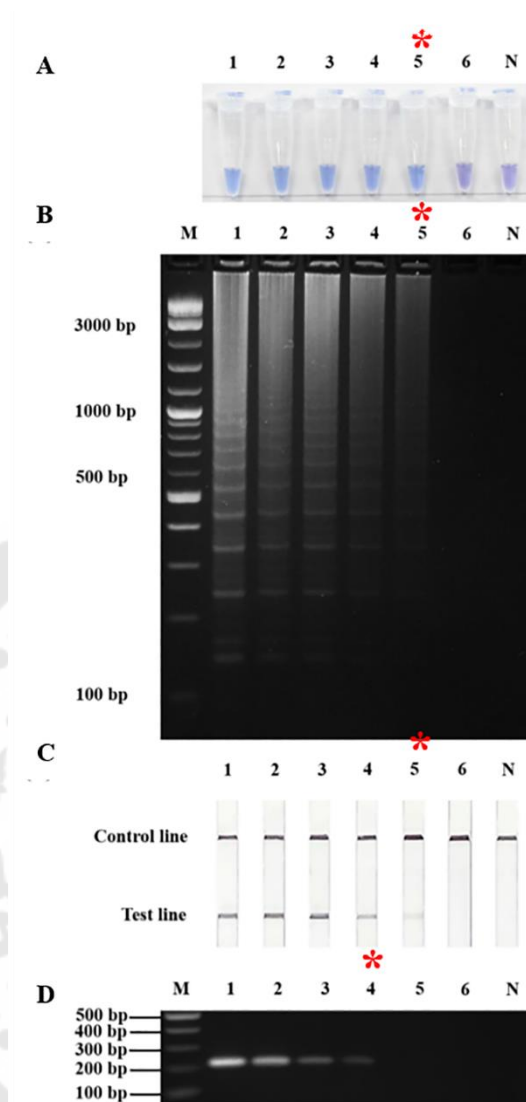


ภาพประกอบ 42 ผลการตรวจสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยใช้พลาสมิดที่มียีน MCP ของเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA และ PCR; (A) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB, (B) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis, (C) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย LFD และ (D) การตรวจสอบความไวของเทคนิค PCR ที่ใช้ outer primer (4s, 5a) ด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane 1-6: ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ต่างกัน ได้แก่ 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 และ 1 สำเนาต่อไมโครลิตร ตามลำดับ, Lane N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control), (*) ความไวต่ำสุดที่สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้

5. การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างของปลาติดเชื้อ ระหว่างเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค PCR

การตรวจสอบความไวต่ำสุดในการตรวจสอบเชื้อ SDDV จากตัวอย่างปลาด้วยเทคนิค UCPA ที่ถูกพัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR โดยใช้สารพันธุกรรมที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อเป็นต้นแบบ พบว่า เทคนิค UCPA ร่วมกับการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB, gel electrophoresis และ LFD มีความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 10 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพประกอบ 43A-C) ในขณะที่ความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดของเทคนิค PCR อยู่ที่ 100 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพประกอบ 43D)





ภาพประกอบ 43 ผลการตรวจสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อระหว่างเทคนิค UCPA และ PCR; (A) ผลการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB, (B) ผลการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis, (C) ผลการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย LFD, (D) ผลการตรวจสอบความไวของเทคนิค PCR ที่ใช้ outer primer (4s, 5a) ด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane 1-6: ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่แตกต่างกัน ได้แก่ 100, 10, 1, 0.1, 0.01 นาโนกรัม และ 1 พิโคกรัม ตามลำดับ, Lane N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control), (*) ความไวต่ำสุดที่สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้

6. การตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาที่ทราบสถานะการติดเชื้อด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD ที่พัฒนาขึ้น

ภายหลังการพัฒนาเทคนิค UCPA ร่วมกับการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยการเปลี่ยนสีของ HNB และ LFD ขึ้น ผู้วิจัยจำเป็นต้องตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของเทคนิคโดยทำการทดสอบเทียบความถูกต้องกับเทคนิคมาตรฐานที่ถูกพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้ ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD มาตรวจสอบสารพันธุกรรมของปลาที่ได้รับการยืนยันการติดเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR (Charoenwai et al., 2019) และ qPCR (Sriisan et al. 2020) พบว่า เทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD ที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบเชื้อ SDDV ทั้งหมด 25 ตัวอย่างและแสดงผลลบทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบในรายงานที่ได้รับการตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ก่อให้เกิดโรคที่มีลักษณะคล้ายกับการติดเชื้อ SDDV เช่น *F. columnare* พบว่าสารพันธุกรรมของปลาที่ได้รับการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ทั้ง 30 ตัวอย่าง ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว (ตาราง 12) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า เทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD ที่พัฒนาขึ้น เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องและเชื่อถือได้ (ภาพประกอบ 44)

ตาราง 12 การเปรียบเทียบผลการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ระหว่างเทคนิค UCPA และ qPCR ในตัวอย่างปลาที่มีลักษณะอาการของโรค 30 ตัวอย่าง

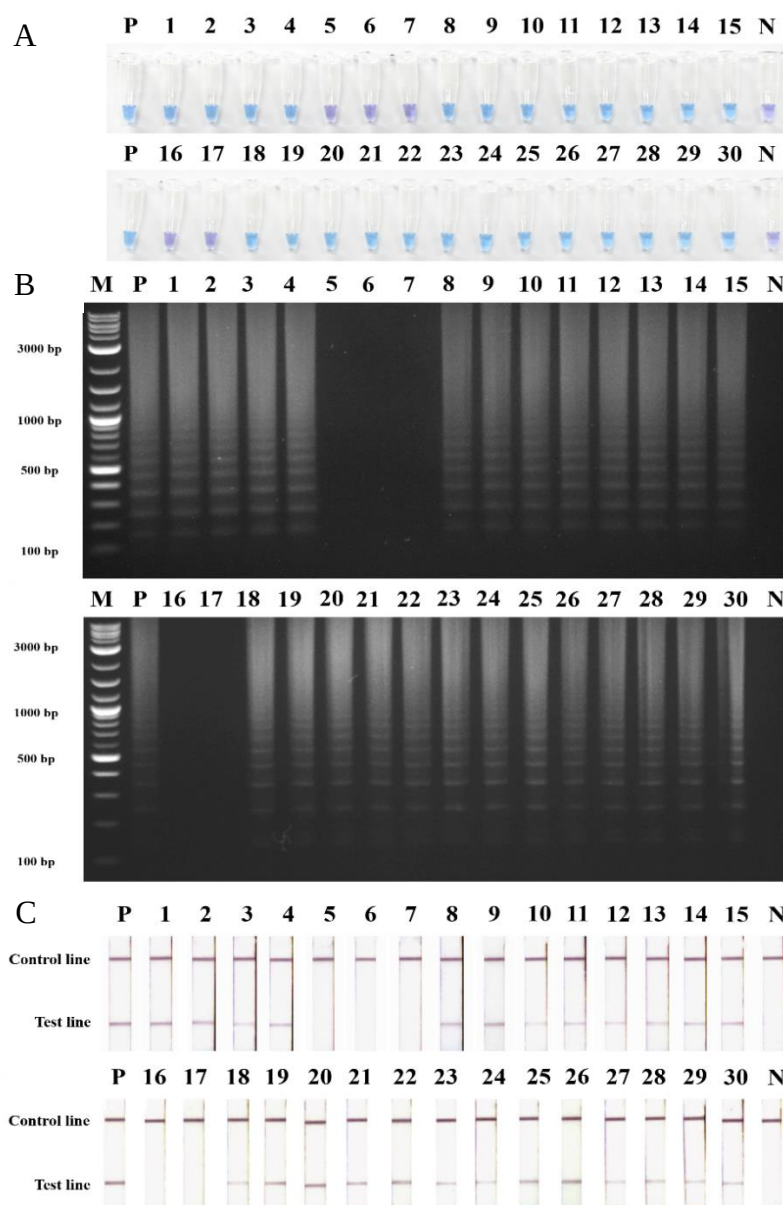
No	Year	Sample code	qPCR	References	CPA	<i>F. columnare</i>
1	2016	F1L	+	Charoenwai et al. 2019.	+	-
2		F2L	+		+	-
3		F3L	+		+	-
4		F4L	+		+	-
5	2017	F122	-	Sriisan et al. 2020.	-	-
6		L147	-		-	-
7		L167	-		-	-
8		K31	+		+	-
9		K33	+		+	-

ตาราง 12 (ต่อ)

No	Year	Sample code	qPCR	References	CPA*	<i>F. columnare</i> *
10		K61	+		+	-
11		K107	+		+	-
12		K139	+		+	-
13		L22	+		+	-
14		L24	+		+	-
15		L35	+		+	-
16		L93	-		-	-
17		L110	-		-	-
18		BL2	+		+	-
19		BL3	+		+	-
20	2017	BL4	+	Sriisan et al. 2020.	+	-
21		CL6	+		+	-
22		CL7	+		+	-
23		CL8	+		+	-
24		CL9	+		+	-
25		CL10	+		+	-
26		CK6	+		+	-
27		CK7	+		+	-
28		CK8	+		+	-
29		CK9	+		+	-
30		CK10	+		+	-

+, Positive; -, Negative

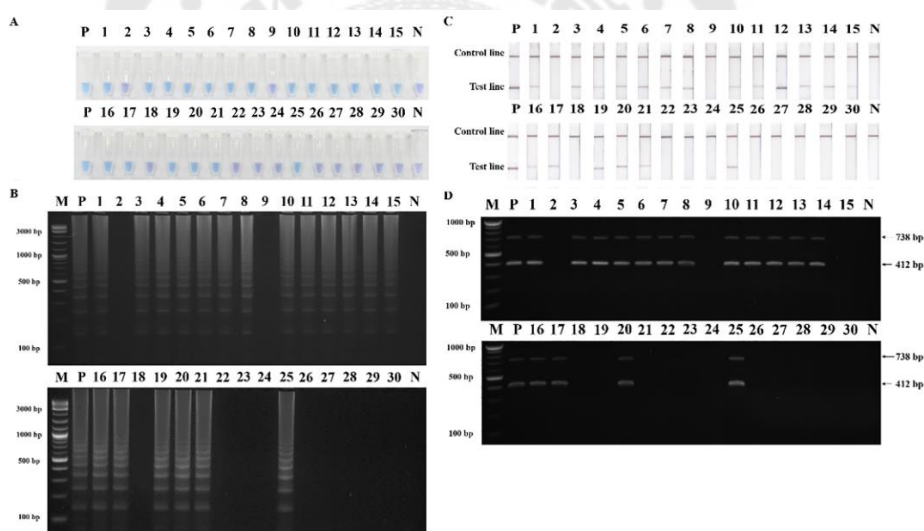
*In this study



ภาพประกอบ 44 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (validation) และแม่นยำในการตรวจสอบเชื้อ SDDV; (A) ผลการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB, (B) ผลการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis, (C) ผลการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย LFD; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane P: สารพันธุกรรมของปลาติดเชื้อ SDDV (positive control) Lane 1-30: สารพันธุกรรมของปลาที่ได้รับการยืนยันการติดเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และ qPCR, Lane N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control)

7. การตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลาด้วยเทคนิค UCPA-HNB, UCPA-LFD และเทคนิค semi-nested PCR

จากการตรวจสอบตัวอย่างปลากะพงขาวที่ไม่ทราบสถานะการติดเชื้อจำนวน 30 ตัว โดยนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค UCPA และเทคนิค semi-nested PCR จากการทดลอง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค UCPA พบว่ามีตัวอย่างปลาติดเชื้อทั้งหมด 19 จาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการติดเชื้อที่ 63.33% โดยผลจากการตรวจสอบด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB หรือ gel electrophoresis หรือ LFD ให้ผลที่สอดคล้องกัน (ภาพประกอบ 45A-C) ในขณะที่การตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-nested PCR พบปลาติดเชื้อทั้งหมด 16 จาก 30 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 45D) คิดเป็นอัตราการติดเชื้อที่ 53.33%



ภาพประกอบ 45 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ในตัวอย่างปลากะพงขาว; (A) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB, (B) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis, (C) การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ด้วย LFD และ (D) การตรวจสอบตัวอย่างปลาที่ไม่ทราบสถานะการติดเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR; Lane M: 1 kb plus DNA marker, Lane P: สารพันธุกรรมของปลาติดเชื้อ SDDV (positive control) Lane 1-30: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่ทราบสถานะการติดเชื้อ, Lane N: สารพันธุกรรมของปลาที่ไม่พบการติดเชื้อ SDDV (negative control)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค cross-priming amplification (CPA) โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ hydroxynaphthol blue (HNB) เป็นตัวตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าหรือการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค lateral flow dipstick (LFD) เพื่อเพิ่มความจำเพาะและความถูกต้องในการตรวจสอบผล สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา CPA ได้ทำการออกแบบโดยอาศัยบริเวณยีนที่ถอดรหัสเป็น แคปซิดโปรตีนของไวรัส (GenBank accession number KR139659) ทั้งหมด 5 เส้น คือ 1. 1s cross primer (5'- GGT GCC ATC TGA CAC TGT TCA CTC GAG GAC ATG GAA AAC GTG ACA CCC -3'), 2. 2a inner primer (5'-TTC ACG CTC TTC GTT GGT CA-3'), 3. 3a inner primer (5'-GGT GCC ATC TGA CAC TGT TCA-3'), 4. 4s displacement primer (5'-GCA CTA ATG ATA ATG CAA TTT CTG TAC C-3') และ 5. 5a displacement primer (5'-ATC GCA GAT CAA TAT GGG GC-3')

ผู้วิจัยได้มีการประยุกต์ใช้ Uracil-DNA Glycosylase (UDG) ในการทำปฏิกิริยา CPA (UCPA) เพื่อป้องกันการเกิด carryover contamination โดยเริ่มจากการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแทนที่นิวคลีโอไทด์ thymine (T) ด้วย uracil (U) เนื่องจากยีนในระหว่างการทำปฏิกิริยา เอนไซม์ Bst DNA Polymerase พบการเติมเบส U เข้าไปแทนที่ในบางตำแหน่งของเบส T เพราะเบสทั้ง 2 มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน ทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยา CPA ที่เกิดขึ้นมีเบส U แทรกอยู่ ภายหลังเมื่อมีการทำปฏิกิริยา CPA อีกครั้ง เอนไซม์ UDG มีการย่อยผลผลิตของปฏิกิริยา CPA ที่แทรกด้วยเบส U ที่ปนเปื้อนมา เหลือเพียงสารพันธุกรรมต้นแบบที่ผู้วิจัยใช้เพื่อการเพิ่มปริมาณ เท่านั้น จากการทดลองพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเบส T และ U อยู่ที่ 80% ต่อ 20% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Manajit et al., 2018)

เมื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา UCPA โดยทำการบ่มสารละลายเพื่อให้เกิดการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 55-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเมื่อตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ 61 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ทำให้เกิดแถบที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder-like pattern) ของผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA มีความเข้มและความคมชัดมากกว่าอุณหภูมิอื่น ขณะเดียวกันผู้วิจัยได้ทำการ

ตรวจสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 15-90 นาที ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบผลของปฏิกิริยา UCPA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่ามีการปรากฏของแถบผลผลิตปฏิกิริยา UCPA ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 30 นาทีเป็นต้นไป อย่างไรก็ตามพบว่าที่ระยะเวลาดังกล่าวมีความเข้มและความคมชัดของแถบผลผลิตปฏิกิริยา UCPA น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 45-90 นาที ในครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกระยะเวลาในการบ่มสารละลายปฏิกิริยา UCPA ที่ 60 นาที ซึ่งสอดคล้องกับเทคนิค CPA ที่ถูกพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสอื่นในปลา เช่น เชื้อ infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) (Liu et al., 2018) และเชื้อ red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) (Su et al., 2015) เป็นต้น

ผู้วิจัยได้มีการเติมสี hydroxynaphthol blue (HNB) ลงในสารละลายปฏิกิริยาเพื่อใช้ในการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา UCPA ด้วยตาเปล่า โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้โลหะไอออน (metal ion indicator) รูปแบบหนึ่ง โดย HNB ถูกใช้เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในสารละลายปฏิกิริยา ในระหว่างการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พบการปลดปล่อย pyrophosphate ions ซึ่งสามารถเข้าจับกับ Mg^{2+} เกิดเป็น magnesium pyrophosphate ทำให้ปริมาณ Mg^{2+} ในสารละลายลดลงและส่งผลกระทบต่อค่า pH ของสารละลายทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ HNB จากสีม่วงเป็นสีน้ำเงินในหลอดที่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (Goto et al., 2009) พบว่าเมื่อตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ HNB ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 57-65 องศาเซลเซียส สารละลายปฏิกิริยา UCPA มีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงิน เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่เกิดปฏิกิริยา (negative control) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และจากการตรวจสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า พบว่า ที่ระยะเวลา 30 นาที สารละลายปฏิกิริยา UCPA เริ่มมีการเปลี่ยนสีเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายในตัวควบคุมเชิงลบและมีการเปลี่ยนสีอย่างชัดเจนที่ระยะเวลาดังกล่าวตั้งแต่ 45-90 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่มีการปรากฏของแถบผลผลิตปฏิกิริยา UCPA ที่ระยะเวลา 30 นาทีที่มีความเข้มและความคมชัดน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 45-90 นาที ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค UCPA ที่ถูกพัฒนาขึ้นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ 61 องศาเซลเซียส และมีระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มสารละลายปฏิกิริยาที่ 60 นาที เพื่อตรวจสอบผลของการเกิดปฏิกิริยาด้วยการเปลี่ยนสีของ HNB หรือเทคนิค agarose gel electrophoresis ได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ

เมื่อทำการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา UCPA พบว่า ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ผู้วิจัยเลือกใช้ คือ 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีความเข้มข้นของแถบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ dNTPs อื่น อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาร่วมกับการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ HNB ในสารละลายปฏิกิริยา UCPA พบว่า ที่ความเข้มข้นของ dNTPs ดังกล่าวทำให้สีของสารละลายเมื่อใช้ความเข้มข้นของสี HNB เท่ากับ 150 ไมโครโมลาร์ สามารถสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายปฏิกิริยาจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงินได้ชัดเจนกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มข้นของสีที่ 120 ไมโครโมลาร์ ขณะเดียวกันเมื่อมีความเข้มข้นของ dNTPs มากขึ้น ทำให้สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายปฏิกิริยา UCPA ได้ยากขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของสี HNB ที่ 120 และ 150 ไมโครโมลาร์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการวินิจฉัยการติดเชื้อได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ dNTPs ในการทำปฏิกิริยา อยู่ที่ 1.0 มิลลิโมลาร์

การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis หรือ LFD ซึ่งก่อนหน้านี้ในงานวิจัยของ Wang และคณะ ได้มีการประยุกต์ใช้สี malachite green ที่เป็นตัวบ่งชี้ที่ไวต่อความเปลี่ยนแปลงของค่า pH (pH-sensitive indicator) ร่วมกับเทคนิค UCPA เพื่อตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยความแตกต่างของสีของสารละลายในหลอดทดลอง โดยพบว่าในหลอดที่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารพันธุกรรม สารละลายจะมีสีฟ้าและไม่มีสีในหลอดที่ไม่เกิดปฏิกิริยา (Wang et al., 2019; Wang et al., 2019) อย่างไรก็ตามการวิจัยในครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการประยุกต์ใช้ HNB ร่วมกับเทคนิค UCPA เพื่อตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับ malachite green เพียงแต่มีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงในหลอดทดลองที่ไม่เกิดปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินในหลอดที่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารพันธุกรรม จากผลการทดลองพบว่าการประยุกต์ใช้ HNB ในปฏิกิริยา UCPA ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ความจำเพาะและความไวของเทคนิค UCPA และจากการศึกษาก่อนหน้านี้สามารถสรุปข้อดีของการใช้ HNB เป็นตัวบ่งชี้ปฏิกิริยาได้ 3 ข้อ คือ 1. HNB มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาเทียบเท่ากับการใช้ SYBR green ที่จำเป็นต้องเติมลงไปหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา 2. การใช้สี HNB ในปฏิกิริยา UCPA ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากผลผลิตของปฏิกิริยาก่อนหน้า ที่เรียกว่า carryover contamination ที่มักเกิดจากการฟุ้งกระจายเนื่องจากการเปิดหลอดทดลองภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis หรือการเติมสี intercalating dyes เช่น SYBR Green และ 3. ผลบวกและผลลบของปฏิกิริยาสามารถตัดสินได้

อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่า (Yang et al., 2014) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสี HNB มีความเหมาะสมในการเป็นตัวชี้วัดการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากมีราคาถูก สามารถเตรียมสารละลายได้ง่าย ไม่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถอ่านผลการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า ไม่จำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์ราคาแพงในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา เช่น เครื่อง gel electrophoresis หรือเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตสำหรับส่องเจล (UV-transilluminator) และช่วยประหยัดเวลาในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค LFD ในการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจวัดผลผลิตของปฏิกิริยา เนื่องจากเทคนิค LFD เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง โดยอาศัยการออกแบบโพรบที่จำเพาะต่อผลผลิตของปฏิกิริยา ทำให้ช่วยลดปัญหาการเกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เทคนิค LFD ยังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อก่อโรคในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การตรวจสอบเชื้อ giant salamander iridovirus (GSIV) ในซาลาแมนเดอร์ยักษ์ (Zhang et al., 2019) ด้วยเทคนิค cross-priming amplification (CPA) การตรวจสอบเชื้อ white spot syndrome virus ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (Jaroenram, Kiatpathomchai, & Flegel, 2009) การตรวจสอบเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) ในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ด้วยเทคนิค reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) (Kiatpathomchai, Jaroenram, Arunrut, Jitrapakdee, & Flegel, 2008) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค lateral flow dipstick (LFD) ในการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา ผู้วิจัยจึงได้มีการติดฉลากไพรเมอร์ inner primer (3a) ด้วย biotin และออกแบบโพรบที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) (5'-ACA TTG CTT CAC GCT CTT CG-3') ที่จำเพาะต่อผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA โดยภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา UCPA ทำการแบ่งสารละลายจากการเกิดปฏิกิริยาออกไปผสมร่วมกับโพรบ (probe) และบ่มที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ที่มี biotin ถูกติดฉลากด้วย FITC หลังจากนั้นทำการหยดสารละลายลงบน sample pad แล้วสารละลายตัวอย่างจะไหลไปยังบริเวณที่เรียกว่า conjugate pad ที่ประกอบด้วย อนุภาคทองคำ (colloidal gold) ที่ติดด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ FITC (anti-FITC antibody) ซึ่งสามารถเข้าจับกับ FITC ที่ผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ที่ถูกติดฉลากไว้ก่อน จากนั้นผลผลิตของปฏิกิริยาจะถูกดูดซึมไปยัง test line (T) ที่ถูกตรึงด้วย biotin-ligand ที่สามารถจับกับ biotin ได้ ดังนั้นหากผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ถูกติดฉลากด้วย

biotin จะถูกตรึงไว้บริเวณ test line และเกิดการสะสมของอนุภาคทองจนเห็นเป็นแถบที่เข้มและชัดเจน ในส่วนของอนุภาคทองที่ไม่เข้าจับกับผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA จะถูกดูดซึมไปยัง control line (C) ที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 (secondary antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่ติดกับอนุภาคทองคำ ทำให้เกิดสีขึ้นที่บริเวณ control line ดังนั้นในตัวอย่างสารละลายที่ไม่มีผลผลิตของปฏิกิริยาที่ต้องการจะไม่ถูกติดฉลากด้วย biotin หรือ FITC เมื่อนำมาตรวจด้วย LFD จึงเกิดสีขึ้นเฉพาะบริเวณ control line เท่านั้น อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของโพรบมากเกินไปจนความต้องการ จะทำให้โพรบอิสระที่ไม่ได้เข้าจับกับผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA ถูกดูดซึมไปยังบริเวณ test line ก่อน เนื่องจากมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับโพรบที่เข้าจับกับผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA และเกิดการสะสม จนขัดขวางการเข้าจับของผลผลิตของปฏิกิริยา UCPA กับบริเวณ test line ทำให้ไม่เห็นแถบสีที่ test line แต่ยังสามารถพบเห็นแถบสีที่บริเวณ control line ได้ ดังนั้น การตรวจสอบปริมาณโพรบที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วย LFD มีประสิทธิภาพและแม่นยำ การวิจัยในครั้งนี้จึงมีการตรวจสอบปริมาณโพรบที่เหมาะสม โดยกำหนดความเข้มข้นของโพรบที่แตกต่างกันคือ 100, 10 และ 1 พิโคโมลาร์ พบว่าปริมาณโพรบที่เหมาะสมอยู่ที่ 1 พิโคโมลาร์

ในการตรวจสอบความจำเพาะของเทคนิค UCPA พบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับแบคทีเรียหรือไวรัสที่พบการติดเชื้อในปลากระพงขาว เช่น *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, Nervous necrosis virus (NNV) และ Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) เป็นต้น ซึ่งเมื่อตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย HNB หรือ agarose gel electrophoresis หรือ LFD ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องเช่นเดียวกับที่มีรายงานในงานวิจัยอื่นที่ได้รับการตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ เช่น เทคนิค semi-nested PCR (Charoenwai et al., 2019), เทคนิค LAMP (Dangtip et al., 2019) และเทคนิค real-time PCR (Sriisan et al., 2020)

การตรวจสอบหาความไวต่ำสุด (limit of detection; LOD) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV โดยอาศัยพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนแคปซิดโปรตีนของเชื้อ SDDV พบว่าเทคนิค UCPA ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจสอบที่ 10^2 สำเนาต่อไมโครลิตร เมื่อตรวจสอบโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสีของ HNB ในหลอดทดลอง หรือ agarose gel electrophoresis หรือเทคนิค LFD ในขณะที่เทคนิค PCR ที่ใช้ outer primer 4s และ 5a นั้น มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 10^3 สำเนาต่อไมโครลิตร ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำโดยอาศัยดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ SDDV พบว่าเทคนิค UCPA มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 10 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ในขณะที่เทคนิค

PCR สามารถตรวจสอบได้ที่ 100 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค UCPA ที่ถูกพัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบโดยอาศัย

พลาสมิดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่สกัดจากปลาติดเชื้อ 10 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และคณะในการตรวจสอบเชื้อ infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) ในปลาแมนดารินด้วยเทคนิค CPA ร่วมกับ LFD ที่จำเพาะต่อยีนแคปซิดโปรตีนของ ISKNV ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (Liu et al., 2018) งานวิจัยของ Zhang และคณะในการตรวจสอบเชื้อ giant salamander iridovirus (GSIV) ในซาลาแมนเดอร์ยักษ์จีนด้วยเทคนิค CPA ที่จำเพาะต่อยีนแคปซิดโปรตีนของ GSIV ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที (Zhang et al., 2019) งานวิจัยของ Dangtip และคณะ ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับการใช้สี xylene orange เป็นตัวบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยา โดยใช้ยีน *ATPase* ของไวรัส เป็นเป้าหมายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (Dangtip et al., 2019) และมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าเทคนิค semi-nested PCR ที่จำเพาะต่อยีน *ATPase* ของเชื้อ SDDV ที่มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 10^3 สำเนาต่อไมโครลิตร (Charoenwai et al., 2019) อย่างไรก็ตามพบว่าเทคนิค UCPA ที่ถูกพัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิค qPCR ที่จำเพาะต่อยีน putative DNA dependent RNA polymerase gene (beta subunit) ของเชื้อ SDDV ที่มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 50 สำเนาต่อไมโครลิตร (de Groof et al., 2015) เทคนิค SYBR Green-based qPCR ที่จำเพาะต่อยีน *ATPase* ของไวรัสที่มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 2 สำเนาต่อไมโครลิตร (Sriisan et al., 2020) หรืองานวิจัยของ Su และคณะ ที่พัฒนาเทคนิค CPA ร่วมกับ LFD ในการตรวจสอบเชื้อ red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) โดยอาศัยบริเวณอนุรักษ์ของ RNA1 ของไวรัสที่พบว่ามีความไวในการตรวจสอบต่ำสุด อยู่ที่ 10^1 สำเนาต่อไมโครลิตร (Su et al., 2015) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค UCPA ที่ถูกพัฒนาขึ้นมีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ SDDV เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้

ดังนั้นเทคนิค UCPA ร่วมกับ HNB หรือ LFD ที่ถูกพัฒนาขึ้นในครั้งนี้เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูงและน่าเชื่อถือเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบตัวอย่างปลาที่ได้รับการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV ที่ได้มีการรายงานก่อนหน้านี้ และจากการตรวจสอบโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีแคปซิดยีนของไวรัสและดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปลาติดเชื้อ พบว่าเทคนิค UCPA ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 10^2 สำเนาต่อไมโครลิตร และ 10 พิโคกรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเทคนิค PCR ที่

ใช้ outer primer (4s/5a) 10 เท่า และยังไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียหรือไวรัสชนิดอื่นที่มีรายงานการระบาดในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จากผลการทดลองข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค UCPA ร่วมกับ HNB หรือ LFD เป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการใช้งาน สามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิคงที่ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง เช่น thermo cycler และ ชุด gel electrophoresis เป็นต้น สามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบการติดเชื้อ SDDV นอกห้องปฏิบัติการหรือในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือจำกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ



บรรณานุกรม

- Alvarez-Pellitero, P. (2004). Report about fish parasitic diseases. *Etudes et Recherches, Options Mediterranennes. CIHEAM/FAO, Zaragoza*, 103-130.
- Aslanzadeh, J. (2004). Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 34(4), 389-396.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of aquatic organisms*, 71(3), 255-266.
- Azad, I., Shekhar, M., Thirunavukkarasu, A., & Jithendran, K. (2006). Viral nerve necrosis in hatchery-produced fry of Asian seabass *Lates calcarifer*: sequential microscopic analysis of histopathology. *Diseases of aquatic organisms*, 73(2), 123-130.
- Bloch, M. E. (1786). *D. Marcus Elieser Bloch's... Naturgeschichte des ausländischen Fische* (Vol. 1): Auf Kosten des Verfassers, und in Commission in der Buchhandlung der Realschule.
- Charoenwai, O., Meemetta, W., Sonthi, M., Dong, H. T., & Senapin, S. (2019). A validated semi-nested PCR for rapid detection of scale drop disease virus (SDDV) in Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Journal of virological methods*, 268, 37-41.
- Charoenwai, O., Senapin, S., Dong, H. T., & Sonthi, M. (2021). Detection of scale drop disease virus from non-destructive samples and ectoparasites of Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of fish diseases*, 44(4), 461-467.
- Choi, S. K., Kwon, S. R., Nam, Y. K., Kim, S. K., & Kim, K. H. (2006). Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV) DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transition of RSIV into acute phase. *Aquaculture*, 256(1-4), 23-26.
- Crook, D., Buckle, D., Allsop, Q., Baldwin, W., Saunders, T., Kyne, P., . . . Douglas, M. (2017). Use of otolith chemistry and acoustic telemetry to elucidate migratory contingents in barramundi *Lates calcarifer*. *Marine and Freshwater Research*, 68(8), 1554-1566.

- Dangtip, S., Kampeera, J., Suvannakad, R., Khumwan, P., Jaroenram, W., Sonthi, M., . . . Kiatpathomchai, W. (2019). Colorimetric detection of scale drop disease virus in Asian sea bass using loop-mediated isothermal amplification with xylenol orange. *Aquaculture*, 510, 386-391.
- de Groof, A., Guelen, L., Deijs, M., van der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., . . . Grisez, L. (2015). A novel virus causes scale drop disease in *Lates calcarifer*. *PLOS Pathogens*, 11(8), e1005074.
- Domingos, J. A., Shen, X., Terence, C., Senapin, S., Dong, H. T., Tan, M. R., . . . Jerry, D. R. (2021). Scale Drop Disease Virus (SDDV) and *Lates calcarifer* Herpes Virus (LCHV) Coinfection Downregulate Immune-Relevant Pathways and Cause Splenic and Kidney Necrosis in Barramundi Under Commercial Farming Conditions. *Frontiers in Genetics*, 12(983). doi:10.3389/fgene.2021.666897
- Dong, C., Weng, S., Shi, X., Xu, X., Shi, N., & He, J. (2008). Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Virus research*, 135(2), 273-281.
- Duan, Y.-B., Ge, C.-Y., Zhang, X.-K., Wang, J.-X., & Zhou, M.-G. (2014). Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for *Botrytis cinerea* based on loop-mediated isothermal amplification. *PloS one*, 9(10), e111094.
- Eaton, H. E., Ring, B. A., & Brunetti, C. R. (2010). The genomic diversity and phylogenetic relationship in the family Iridoviridae. *Viruses*, 2(7), 1458-1475.
- Fang, R., Li, X., Hu, L., You, Q., Li, J., Wu, J., . . . Mei, J. (2009). Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. *Journal of clinical microbiology*, 47(3), 845-847.
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Academic Press.
- Fischbach, J., Xander, N. C., Frohme, M., & Glökler, J. F. (2015). Shining a light on LAMP

- assays' A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*, 58(4), 189-194.
- Frączyk, M., Woźniakowski, G., Kowalczyk, A., Niemczuk, K., & Pejsak, Z. (2016). Development of cross-priming amplification for direct detection of the African Swine Fever Virus, in pig and wild boar blood and sera samples. *Letters in applied microbiology*, 62(5), 386-391.
- Fu, Y., Li, Y., Fu, W., Su, H., Zhang, L., Huang, C., . . . Dong, C. (2021). Scale Drop Disease Virus Associated Yellowfin Seabream (*Acanthopagrus latus*) Ascites Diseases, Zhuhai, Guangdong, Southern China: The First Description. *Viruses*, 13(8), 1617.
- Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y., Tay, S., Leong, L., . . . Ferguson, H. (2012). The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. *Journal of fish diseases*, 35(1), 19-27.
- Go, J., & Whittington, R. (2006). Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family *Iridoviridae*) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture*, 258(1-4), 140-149.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K.-I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46(3), 167-172.
- He, J. G., Wang, S. P., Zeng, K., Huang, Z. J., & Chan, S. M. (2000). Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *Journal of fish diseases*, 23(3), 219-222.
- He, J. G., Zeng, K., Weng, S. P., & Chan, S.-M. (2002). Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 204(1-2), 11-24.
- Hsieh, K., Mage, P. L., Csordas, A. T., Eisenstein, M., & Soh, H. T. (2014). Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP).

Chemical Communications, 50(28), 3747-3749.

- Huang, X., Zhai, C., You, Q., & Chen, H. (2014). Potential of cross-priming amplification and DNA-based lateral-flow strip biosensor for rapid on-site GMO screening. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(17), 4243-4249.
- Hutson, K. S. (2013). Infectious diseases of Asian seabass and health management. *Biology and Culture of Asian Seabass Lates calcarifer*. CRC Press, Taylor and Francis Group, USA, 102-136.
- Imajoh, M., Ikawa, T., & Oshima, S.-I. (2007). Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships of a recent RSIV isolate in Japan. *Virus research*, 126(1-2), 45-52.
- Jancovich, J. K., Steckler, N. K., & Waltzek, T. B. (2015). Ranavirus taxonomy and phylogeny. In *Ranaviruses*. Springer, Cham., 59-70.
- Jaroenram, W., Kiatpathomchai, W., & Flegel, T. W. (2009). Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular and cellular probes*, 23(2), 65-70.
- Kayansamruaj, P., Soontara, C., Dong, H. T., Phiwsaiya, K., & Senapin, S. (2020). Draft genome sequence of scale drop disease virus (SDDV) retrieved from metagenomic investigation of infected barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Journal of fish diseases*, 43(10), 1287-1298.
- Kerddee, P., Dong, H. T., Chokmangmeepisarn, P., Rodkhum, C., Srisapoome, P., Areechon, N., . . . Kayansamruaj, P. (2020). Simultaneous detection of scale drop disease virus and *Flavobacterium columnare* from diseased freshwater-reared barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of aquatic organisms*, 140, 119-128.
- Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Jitrapakdee, S., & Flegel, T. (2008). Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of virological methods*, 153(2), 214-217.
- Kil, E.-J., Kim, S., Lee, Y.-J., Kang, E.-H., Lee, M., Cho, S.-H., . . . Choi, H.-S. (2015). Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and

- specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination. *Journal of virological methods*, 213, 68-74.
- Lightner, D., & Redman, R. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1-4), 201-220.
- Liu, W., Zhou, Y., Fan, Y., Jiang, N., Cain, K., & Zeng, L. (2018). Development of cross-priming amplification coupled with vertical flow visualization for rapid detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Journal of virological methods*, 253, 38-42.
- Longo, M. C., Berninger, M. S., & Hartley, J. L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93(1), 125-128.
- Ma, C., Wang, F., Wang, X., Han, L., Jing, H., Zhang, H., & Shi, C. (2017). A novel method to control carryover contamination in isothermal nucleic acid amplification. *Chemical Communications*, 53(77), 10696-10699.
- Mahardika, K., Yamamoto, A., & Miyazaki, T. (2004). Susceptibility of juvenile humpback grouper *Cromileptes altivelis* to grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV). *Diseases of aquatic organisms*, 59(1), 1-9.
- Manajit, O., Longyant, S., Sithigorngul, P., & Chaivisuthangkura, P. (2018). Development of uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification coupled with nanogold probe (UDG-LAMP-AuNP) for specific detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular medicine reports*, 17(4), 5734-5743.
- Marshall, C. R. E. (2005). *Evolutionary genetics of barramundi (Lates calcarifer) in the Australian region*. Murdoch University,
- Mathew, G. (2009). Taxonomy, identification and biology of seabass (*Lates calcarifer*). In: course manual: national training on cage culture (Ed. Imelda Joseph et al.), central marine fisheries research institute, December 14-23, 2009, Cochin, pp. 38-43.
- Meng, S., Wang, Y., Wang, Y., Liu, D., & Ye, C. (2015). Development of cross-priming amplification assays for rapid and sensitive detection of *Aeromonas hydrophila*. *Letters in applied microbiology*, 61(2), 171-178.

- Munday, B., Kwang, J., & Moody, N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of fish diseases*, 25(3), 127-142.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
- Nurliyana, M., Lukman, B., Ina-Salwany, M., Zamri-Saad, M., Annas, S., Dong, H., . . . Amal, M. (2020). First evidence of scale drop disease virus in farmed Asian seabass (*Lates calcarifer*) in Malaysia. *Aquaculture*, 528, 735600.
- Roberts, R. J. (2012). *Fish pathology*: John Wiley & Sons.
- Samalecos, C. P. (1986). Analysis of the Structure of Fish Lymphocystis Disease Virions from Skin Tumours of Pleuronectes. *Archives of Virology*, 91, 1-10.
- Senapin, S., Dong, H. T., Meemetta, W., Gangnonngiw, W., Sangsuriya, P., Vanichviriyakit, R., . . . Nuangsaeng, B. (2019). Mortality from scale drop disease in farmed *Lates calcarifer* in Southeast Asia. *Journal of fish diseases*, 42(1), 119-127.
- Shi, C.-Y., Wang, Y.-G., Yang, S.-L., Huang, J., & Wang, Q.-Y. (2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, 236(1-4), 11-25.
- Sriisan, S., Boonchird, C., Thitamadee, S., Sonthi, M., Thanh Dong, H., & Senapin, S. (2020). A sensitive and specific SYBR Green-based qPCR assay for detecting scale drop disease virus (SDDV) in Asian sea bass. *Diseases of aquatic organisms*, 139, 131-137.
- Su, Z. D., Shi, C. Y., Huang, J., Shen, G. M., Li, J., Wang, S. Q., & Fan, C. (2015). Establishment and application of cross-priming isothermal amplification coupled with lateral flow dipstick (CPA-LFD) for rapid and specific detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Virology journal*, 12(1), 149.
- Sukonta, T., Senapin, S., Meemetta, W., & Chaijarasphong, T. (2021). CRISPR-based platform for rapid, sensitive and field-deployable detection of scale drop disease virus in Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Journal of fish diseases*.
- Tang, Y., Chen, H., & Diao, Y. (2016). Advanced uracil DNA glycosylase-supplemented

- real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (UDG-rRT-LAMP) method for universal and specific detection of Tembusu virus. *Scientific reports*, 6, 27605.
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans Jr, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*, 58(2), 59-68.
- van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Carstens, E., Estes, M., Lemon, S., . . . Pringle, C. (2000). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Academic Press.
- Wang, Y., Lin, S., Wang, Z.-m., Weiwei, J., Xiao, J., Chen, S., . . . Shen, A. (2019). Label-free cross-priming amplification coupled with endonuclease restriction and nanoparticles-based biosensor for simultaneous detection of nucleic acids and prevention of carryover contamination. *Frontiers in chemistry*, 7, 322.
- Wang, Y., Sun, L., Li, J.-Q., Wang, Z.-M., Jiao, W.-W., Xiao, J., . . . Wang, Y.-H. (2019). Detection of nucleic acids and prevention of carryover contamination using cross-priming amplification combined with nanoparticles-based biosensor and antarctic thermal sensitive uracil-DNA-glycosylase. *Journal of biomedical nanotechnology*, 15(5), 878-892.
- Wang, Y., Wang, Y., Li, D., Xu, J., & Ye, C. (2018). Detection of nucleic acids and elimination of carryover contamination by using loop-mediated isothermal amplification and antarctic thermal sensitive uracil-DNA-glycosylase in a lateral flow biosensor: application to the detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Microchimica Acta*, 185(4), 1-11.
- Whelan, J. A., Russell, N. B., & Whelan, M. A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of immunological methods*, 278(1-2), 261-269.
- Wolf, K., & Quimby, M. (1962). Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*, 135(3508), 1065-1066.
- Xu, G., Hu, L., Zhong, H., Wang, H., Yusa, S.-i., Weiss, T. C., . . . You, Q. (2012). Cross

- priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. *Scientific reports*, 2, 246.
- Xu, X., Huang, L., Weng, S., Wang, J., Lin, T., Tang, J., . . . Yu, X. (2010). Tetraodon nigroviridis as a nonlethal model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection. *Virology*, 406(2), 167-175.
- Xu, X., Zhang, L., Weng, S., Huang, Z., Lu, J., Lan, D., . . . He, J. (2008). A zebrafish (*Danio rerio*) model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection. *Virology*, 376(1), 1-12.
- Yang, Huang, Yang, Liu, & Zhang. (2014). The establishment and application of isothermal cross-priming amplification techniques in detecting penaeid shrimp white spot syndrome virus. *Letters in applied microbiology*, 59(2), 200-206.
- Yang, B.-Y., Liu, X.-L., Wei, Y.-M., Wang, J.-Q., He, X.-Q., Jin, Y., & Wang, Z.-J. (2014). Rapid and sensitive detection of human astrovirus in water samples by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *BMC microbiology*, 14(1), 38.
- Zhai, J., Yan, Z., Ping, F., Lei, Q., Chen, X., & Qi, Y. (2020). Establishment and application of isothermal amplification techniques for the detection of heat-stable I enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PloS one*, 15(4), e0230881.
- Zhang, H., Wang, F., Jia, R., Fan, J., Hao, J., Du, J., . . . Zhang, G. (2019). Rapid detection of giant salamander iridovirus by cross-priming amplification. *Journal of virological methods*, 274, 113678.
- กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง. (2562). รายงานปริมาณและมูลค่าการส่งออกสินค้าประมงทั้งหมดของไทย. Retrieved 5 กันยายน 2562. https://www.fisheries.go.th/strategytradestat/index.php?option=com_goods&view=imports&layout=search&Itemid=140
- จักรกฤษณ์ อารามรยาท. (2552). การวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตปลากะพงขาวในกระชัง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ปี 2550. (ปริญญาโท), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จุฑารัตน์ จุลศิริพงษ์. (2553). การวิเคราะห์ต้นทุนและผลตอบแทนการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง ในอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา. (ปริญญาโท) มหาวิทยาลัยบูรพา,

คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์, สาขาเศรษฐศาสตร์, ชลบุรี.

- นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์. (2562). Monthly Report; สิ้นค้าปลากะพงขาวและผลิตภัณฑ์ ประจำเดือน สิงหาคม 2563. from กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, กรมประมง <https://www.fisheries.go.th/strategy/index.php?name=news&category=3&page=5>
- นิตยา ร่วมชาติ & อภิสิตธิ์ นุชเนตร. (2558). A comparative study of the costs and returns of barramundi culture in ponds, brackish and salt water. a case study sea bass cultue in prachuap khiri khan province. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ, 80-90.
- ปริญทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, ศิวาพร ลงยันต์, ประดิษฐ์ หวังมาน, & ไพศาล สิทธิกรกุล. (2560). หลักการ พัฒนาชุดตรวจแบบแถบสีชนิดรู้ผลรวดเร็ว และแนวทางการปรับปรุง. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว, 33(2), 1-20.
- ปริญทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร. (2561). พันธุวิศวกรรมและการประยุกต์ใช้ในงานวิจัย. กรุงเทพฯ. บริษัทจรัล สนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด.
- เรวัตร คงประดิษฐ์, กิจการ ศุภมาตร์, จิราพร เกษรจันทร์, & วุฒิพร พรหมขุนทอง. (2546). การผลิต เซลล์ไลน์จากส่วนไตปลากะพงขาว. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 25(1), 29-39.
- วัลภา ชีวภิสันห์. (2550). การวิเคราะห์ต้นทุน ผลตอบแทน และแนวทางการจัดการการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง กรณีศึกษา ทะเลสาบสงขลาตอนนอก บริเวณพื้นที่ตำบลเกาะยอ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา. (ปริญญาโท), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สโมสรมนิตคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2531). การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว : หลักการและแนวปฏิบัติ โครงการหนังสือเผยแพร่ความรู้ทางการประมง.
- สำนักคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. (2561). Retrieved 20 สิงหาคม 2562 <http://www.nesdb.go.th/main.php>



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	5.00 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.50 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00 กรัม
น้ำกลั่น	500.00 มิลลิลิตร

ภายหลังการปรับ pH เป็น 7.3 + 0.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar)

ทริปโตน (Tryptone)	5.00 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.50 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00 กรัม
วุ้น (Agar)	7.50 กรัม
น้ำกลั่น	500.00 มิลลิลิตร

ภายหลังการปรับ pH เป็น 7.3 + 0.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 มิลลิลิตร

2. 10X Tris-borate-EDTA (TBE)

Tris base	54.0 กรัม
กรดบอริก (Boric acid)	27.5 กรัม
EDTA (pH 8.0)	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	500.0 มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 4M HCl	

3. 1.5% Agarose gel

ชั่ง agarose gel ผสมกับ 1X TBE ให้มีความเข้มข้น 1.5% จากนั้นนำไปต้มจน agarose gel และบัฟเฟอร์ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำเจลไปเทลงถาดสำหรับใส่เจล (gel chamber) ที่มีหวี (comp) ตั้งอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงดึงหวีออกและเท 1X TBE จนท่วมหน้าเจลเล็กน้อย

4. 2log DNA ladder ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

2log DNA ladder	10 ไมโครลิตร
6X Loadind dye	10 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	40 ไมโครลิตร

5. 3mM hydroxynaphtol blue

hydroxynaphtol blue

0.0186 กรัม

น้ำกลั่น

10.00 มิลลิลิตร

ภายหลังละลายสีในน้ำกลั่นจนไม่เหลือตะกอนของสีแล้ว นำสารละลายสีที่ได้ไปกรองผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดขนาดรูพรุน 0.3 ไมโครเมตรและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธีระวุฒิ ประสิทธิ์พร
วัน เดือน ปี เกิด	14 กุมภาพันธ์ 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดนครนายก, ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น (2551-2553) โรงเรียนเมืองใหม่ (ชลอราษฎร์รังสฤษดิ์) ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย (2554-2556) โรงเรียนพิบูลวิทยาลัย ระดับปริญญาตรี (2557-2561) วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 77 หมู่ 8 ตำบล บ้านพริก อำเภอ บ้านนา จังหวัด นครนายก รหัสไปรษณีย์ 26110
ผลงานตีพิมพ์	Prasitporn, T., Senapin, S., Vaniksampana, A., Longyant, S., & Chaivisuthangkura, P. (2021). Development of cross-priming amplification (CPA) combined with colorimetric and lateral flow dipstick visualization for scale drop disease virus (SDDV) detection. Journal of Fish Diseases, 44(9), 1411–1422. doi:10.1111/jfd.13448
รางวัลที่ได้รับ	- เอกสารเชิงแนวคิด / ผลงานสิ่งประดิษฐ์และนวัตกรรม “ระดับที่มีคุณภาพ” ระดับ 3 ดาว จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) จากผลงาน เรื่อง “ชุด CPA color test kit สำหรับตรวจ Scale Drop Disease Virus (SDDV) ในปลา” - การประกวดผลงานนวัตกรรมสายอุดมศึกษา ระดับเหรียญเงิน จาก สำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) จากผลงานเรื่อง ตู้อบฆ่าเชื้ออุปกรณ์การแพทย์ ด้วยโอโซน - รางวัลชนะเลิศ จาก “โครงการประกวดผลงานนวัตกรรมเพื่อสังคมของเยาวชน ประจำปี 2563” จัดโดย วิทยาลัยพัฒนศาสตร์ ป๋วย อึ๊งภากรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ร่วมกับ สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (NIA) จากผลงาน เรื่อง “การสร้างเชื่อมั่นด้านการฟื้นฟู และลดความเสี่ยงการติดเชื้อ COVID-19 ของทีม อสม. (อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน) และสาธารณสุข ต.ตาคลี จ. นครสวรรค์ ด้วยการประยุกต์ใช้ตู้อบฆ่าเชื้อแบบพกพาด้วยโอโซน”

