บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบหลายขั้นตอน (Multistage random sampling) โดยเริ่มจากการหาจำนวนฟาร์มสุกรทั่วประเทศไทย จากข้อมูลสำนักงานสถิติการเกษตรแห่งชาติปี 2537 รายงานว่ามีฟาร์มเลี้ยงสุกรอยู่ประมาณ 10,000 ฟาร์มทั่วประเทศ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของชมรมผู้เลี้ยงสุกรพบว่ามีเพียง 3,800 ฟาร์ม ที่มีรายชื่อเป็นผู้เลี้ยงสุกรเป็นอาชีพหลัก นอกนั้นเป็นฟาร์มผู้เลี้ยงรายย่อย เลี้ยงสุกรเป็นอาชีพเสริมมีการเลี้ยงไม่สม่ำเสมอกับเลี้ยงสุกรแบบใต้ถุนบ้าน ขอบเขตของการคัดเลือกตัวอย่างมาศึกษาจึงอยู่ใน 3800 ฟาร์มนี้ โดยมีสัดส่วนของปริมาณฟาร์มสุกรตามภาคต่างๆได้ดังนี้ คือ ภาคเหนือ : ภาคกลาง : ภาคตะวันออก : ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : ภาคใต้ เท่ากับ 1.2 : 2.8 : 1 : 1.3 : 1 ขั้นตอนแรกจึงสุ่มหาฟาร์มที่จะเก็บตัวอย่างตามแบบ stratified random sampling จากรายชื่อฟาร์มที่แยกเป็นภาคตามสัดส่วนข้างต้น ได้ฟาร์มจากภาคเหนือในจังหวัดเชียงใหม่ 2 ฟาร์ม, ภาคกลางจากจังหวัดอยุธยา 1 ฟาร์ม จังหวัดนครปฐม 1 ฟาร์ม และจังหวัดราชบุรี 4 ฟาร์ม รวม 6 ฟาร์ม, ภาคตะวันออกจากจังหวัดชลบุรี 2 ฟาร์ม, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจากจังหวัดนครราชสีมา 1 ฟาร์ม และจังหวัดชัยภูมิ 1 ฟาร์ม รวม 2 ฟาร์ม ส่วนภาคใต้ไม่สามารถหาฟาร์มที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาครั้งนี้ได้ รวมจำนวนฟาร์มที่ทำการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 12 ฟาร์ม

ขั้นตอนที่สองคือการหาจำนวนตัวอย่างปอดที่จะต้องเก็บทั่วประเทศ เพื่อเป็นการสำรวจอัตราการเกิดโรคของสุกรในประเทศไทย จากตารางการกำหนดจำนวนตัวอย่างเพื่อประเมินความชุกของโรค (Cannon and Roe, 1982) ในระดับความเชื่อมั่น 95% ค่า desired accuracy 10 % และสมมติความชุกเท่ากับ 50% เพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างมากที่สุด ได้จำนวนตัวอย่างที่ควรจะเก็บ 96 ตัวอย่าง เมื่อคำนึงปัจจัยต่างๆ ได้แก่ การติดต่อขอความร่วมมือจากฟาร์ม, การเดินทางเพื่อไปเก็บตัวอย่าง ตลอดจนเงินทุนวิจัย และความเป็นไปได้ จึงสุ่มเก็บตัวอย่างปอดสุกรแบบ random sampling ในวันที่สุกรเข้าโรงฆ่าในจังหวัดนั้นๆ ฟาร์มละ 10-20 ตัวอย่าง จนครบ 200 ตัวอย่าง

3.2 การเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์

วิธีการเก็บตัวอย่าง คือ หลังจากทำความสะอาดภายนอกตัวสุกรและขูดขนที่ผิวหนังแล้ว สุกรจะถูกชำแหละบริเวณกลางตัวตามทางยาวตั้งแต่ลำคอ ช่องอกและช่องท้อง ส่วนของปอดถูกเลาะออกจากตัวสุกรและถูกยกขึ้นทั้งหมดโดยไม่ถูกกรีดเนื้อปอดส่วนใดเลย เก็บใส่ถุงพลาสติกขนาดใหญ่พร้อมระบุเลขที่ตัวอย่าง ปอดละ 1 ถุง ปิดปากถุงให้แน่นใส่ลงในถังโฟมที่มีน้ำแข็งเพื่อรักษาความสด นำส่งสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติภายใน 24 ชั่วโมง

3.3 การเก็บตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการ

3.3.1 ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาเพื่อตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา

ปอดที่เก็บมาทุกตัวอย่างจะถูกจดบันทึกรอยโรคที่เห็นด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นทำการตัดบริเวณที่มีรอยโรคกับปอดปกติขนาดประมาณ 2x3x2 ซม. ใส่ลงในกระป๋องที่มี 10% buffered formalin เพื่อตรึงเนื้อเยื่อปอด สำหรับนำไปทำสไลด์ในการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป ตัวอย่างปอดที่ไม่พบรอยโรคตาเปล่า จะถูกตัดเนื้อปอดตรงบริเวณลอนหน้าด้านขวา (right apical lobe) เนื่องจากเป็นปอดส่วนแรกที่มีแขนงหลอดลมแยกจากหลอดลมเข้ามาในเนื้อปอด

รอยโรคที่ทำการจดบันทึก ได้แก่ cranioventral pneumonia, peribronchiolar lymphocytic infiltration, hyperplastic lymphoid nodules ซึ่งเป็น Mycoplasma- like lesions นอกจากนี้จะจดรอยโรคอื่นๆ ที่ตรวจพบได้ที่ปอดด้วย เช่น pleuritis, edema และ abscess เป็นต้น

3.3.2 ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยาเพื่อเพาะเชื้อและทำพีซีอาร์

ชิ้นปอดขนาดใหญ่ที่มีรอยโรคบริเวณเดียวกับที่ตัดใส่ลงในฟอร์มาลิน จะถูกตัดใส่ถุงพลาสติก ตัวอย่างละ 1 ถุง เพื่อนำไปทำการเพาะเชื้อและสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำพีซีอาร์

3.4 วิธีการเพาะเชื้อ

นำตัวอย่างปอดที่ตัดมาในถุงพลาสติกแช่ลงใน absolute ethanol เพื่อทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ภายนอก ซับด้วยผ้าก๊อซจนแห้ง ตัดเล็มเนื้อปอดบริเวณรอบนอก

ออก ตัดชิ้นเนื้อปอดตรงบริเวณรอยต่อของปอดปกติกับปอดที่มีรอยโรคประมาณ 1 กรัม ตัดย่อยให้เล็กลงด้วยกรรไกร ใส่ถุงพลาสติกใบใหม่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (modified Friis broth) 9 มล. ขยี้เนื้อปอดจากนอกถุงให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แยกส่วนน้ำใสกับกากออกจากกัน นำส่วนน้ำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที แยกส่วนน้ำมาเก็บเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปกรองด้วย 0.45 μ membrane filter เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนของแบคทีเรียอื่นๆ ส่วนที่สองนำไปใช้ในขั้นตอนพีซีอาร์

นำส่วนที่หนึ่งที่กรองแล้วมาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Friis broth โดยการใส่ตัวอย่าง 0.2 มล. ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ 1.8 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการเจือจางลงทุก 10 เท่าลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อถัดไป (ten fold serial dilution) จนถึงหลอดที่ 10^{-7} นำไปเพาะในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน หลอดที่มีการเปลี่ยนสีเป็นส้มเหลืองหรือเหลืองจะถูกผ่านเชื้อ (subculture) ลงในอาหารหลอดใหม่จนเปลี่ยนสีเช่นนี้ประมาณ 5 ครั้ง เพื่อให้เชื้อปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี จึงนำไปเพาะลงในวุ้นอาหาร (modified Friis agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 5-7 วัน สังเกตโคโลนีที่ขึ้นบนวุ้นอาหาร

ทำเชื้อให้บริสุทธิ์ วิธีการคือ ใช้ใบมีดตัดวุ้นอาหารรอบโคโลนีเดี่ยวของเชื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ใช้ปลายมีดตักก้อนวุ้นใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว บ่มที่ 37°C จนอาหารเปลี่ยนสี นับเป็นหนึ่งรอบ นำเชื้อในอาหารเหลวมาเพาะลงบนวุ้นอาหารอีกครั้ง จนเชื้อขึ้นเป็นโคโลนี ตัดโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลวเช่นนี้ ทั้งสิ้นสามรอบ สุดท้ายเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวรอบที่ 3 จะถือว่าเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture)

3.5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

เชื้อที่บริสุทธิ์จะนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ในการวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อมัยโคพลาสมาจะทำการทดสอบ การหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose fermentation) การใช้อาร์จีนีน (arginine hydrolysis), การผลิตเอ็นไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase test) และการเกิด film และ spot

3.5.1 การทดสอบน้ำตาลกลูโคส

นำเชื้อบริสุทธิ์เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Friis broth 2 หลอด หลอดแรกเติมกลูโคสให้มีความเข้มข้น 1% หลอดหลังไม่มีกลูโคส บ่มที่ 37°C 3-5 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีทั้งสองหลอดเปรียบเทียบกัน

3.5.2 การสลายอาร์จีนีน

ใช้ modified Friis broth 2 หลอด หลอดแรกมี 0.2% arginine hydrochloride ส่วนหลอดหลังไม่มีอาร์จีนีน ใส่เชื้อที่จะทดสอบ บ่มที่ 37°C นาน 3-5 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีทั้งสองหลอดเปรียบเทียบกัน

3.5.3 การผลิตเอ็นไซม์ฟอสฟาเตส

หยดเชื้อมัยโคพลาสมาที่จะทดสอบให้ไหลเป็นทางยาวลงบนวุ้นอาหาร modified Friis agar ที่มี phenolphthalein diphosphate 0.01% นำไปบ่มที่ 37°C นาน 7 วัน แล้วหยด 5 M NaOH ลงบนวุ้นอาหาร ประมาณ 30 วินาที สังเกตสีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.4 การเกิด film และ spot

เพาะเชื้อลงใน modified Friis agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 10-14 วัน ตรวจดูการเกิด film และ spot ทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope

3.6 การวินิจฉัยแยกชนิดมัยโคพลาสมาโดยวิธี Growth inhibition test

หยดเชื้อตัวอย่างความเข้มข้น 10^5 CFU. / ml. ปริมาณ 0.1 มล. ลงบน modified Friis agar ให้ทั่วทั้งจาน ทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ที่มีแอนติซีรั่มของเชื้อ *M. hyopneumoniae* อยู่วางบนจานนั้น นำไปบ่มที่ 37°C นาน 3-5 วัน สังเกตการขึ้นของเชื้อรอบๆแผ่นกระดาษกรอง

3.7 การทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์

3.7.1 ทดสอบความจำเพาะและความไวของการตรวจในห้องปฏิบัติการ

ก. ความจำเพาะของ primers ในการตรวจวิธีพีซีอาร์

เพาะเชื้อมัยโคพลาสมาและแบคทีเรียต่างๆ ที่พบได้ในระบบทางเดินหายใจสุกร ตามที่แสดงในตารางที่ 3-1 และตารางที่ 3-2 ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Kobayashi และคณะ (1996) โดยการปั่นแยกเชื้อออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย lysis buffer (ส่วนประกอบแสดงไว้ในภาคผนวก ข) อุ่นในน้ำร้อน 60°C นาน 2 ชม. แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นให้ตกตะกอน ส่วนน้ำใสนำมาทำพีซีอาร์กับ primers ตามวิธีการของ Mattsson และคณะ (1995) รวมทั้งทดสอบความจำเพาะเมื่อตรวจเชื้อที่ปนอยู่ในปอด โดยใส่เชื้อแบคทีเรียหรือมัยโคพลาสมาประมาณ 10^6 CFU ในปอดปกติ 1 กรัม ต่อเชื้อ 1 สายพันธุ์ ใช้วิธีเตรียมตัวอย่างปอดตามข้อ 3.4 และตามที่กล่าวไว้ข้างต้นทำพีซีอาร์ ตรวจดูผล

ตารางที่ 3-1 เชื้อแบคทีเรียนำมาทดสอบความจำเพาะในการทำพีซีอาร์

Actinobacillus pleuropneumoniae	Shope 4074 type 1
Actinobacillus pleuropneumoniae	Sw 492/41 type 1
Actinomyces pyogenes	Sw 97/1
Bordetella bronchiseptica	Phage type
Erysipelotrix rhusiopathiae	ME 7 type 1a
Erysipelotrix rhusiopathiae	Sw 545/36
Klebsiella pneumoniae	Sw 238/31
Pasteurella multocida	Kobe strain type A
Pasteurella multocida	Sw 1601/2
Staphylococcus aureus	Cowan 1 strain
Streptococcus species	Group R
Streptococcus species	Group S

ตารางที่ 3-2 เชื้อมัยโคพลาสมาที่นำมาทดสอบความจำเพาะในการทำพีซีอาร์

Mycoplasma hyopneumoniae	J strain
Mycoplasma hyopneumoniae	ATCC 25934
Mycoplasma hyopneumoniae	a4
Mycoplasma hyopneumoniae	a7
Mycoplasma hyopneumoniae	a35
Mycoplasma hyopneumoniae	b3
Mycoplasma hyopneumoniae	b5
Mycoplasma hyopneumoniae	b14
Mycoplasma hyopneumoniae	f4
Mycoplasma hyopneumoniae	f9
Mycoplasma hyopneumoniae	f10
Mycoplasma hyopneumoniae	f15
Mycoplasma hyorhinis	PG 29
Mycoplasma hyorhinis	BTS-7
Mycoplasma hyosynoviae	PG 16
Mycoplasma arginini	PG 230
Acholeplasma laidlawii	PG 8

ข. ความไวของการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์

เชื้อ *M. hyopneumoniae* ขนาด 10, 10^2, 10^1, 10^4, 10^5 และ 10^6 CFU / ml 1 มล. ใส่ลงในปอดปกติขนาด 1 กรัม สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปอดตามวิธีข้างต้น นำไปทำพีซีอาร์ แล้วตรวจดูผล

I19010850

ค. การหาลำดับเบสของ PCR product

ทดสอบความถูกต้องของ PCR product ที่เกิดขึ้นจากการขยายดีเอ็นเอว่าเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จำเพาะของเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยการสุ่มตัวอย่าง PCR product จำนวน 4 ตัวอย่างและจากเชื้อ *M. hyopneumoniae* ATCC 25934 อีก 1 ตัวอย่าง รวม 5 ตัวอย่าง ส่งไปหาลำดับเบสที่ ศูนย์อณูชีววิทยา ศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือรวม อ.ศาลายา จ. นครปฐม

3.7.2 การเตรียมตัวอย่าง

ส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที (ข้อ3.4) อีกส่วนหนึ่งนำมาใส่ลงในหลอดปั่นขนาด 1.5 มล. ปั่นด้วยเครื่อง refrigerated centrifugation ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างหนึ่งครั้งด้วย PBS แล้วจึงละลายตะกอนด้วย Lysis buffer ปริมาณ 100 µl. นำไปแช่ในหม้อน้ำที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชม. แล้วต้มในหม้อน้ำเดือด นาน 5 นาที ปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสไว้เป็นตัวอย่างสำหรับการทดสอบพีซีอาร์

3.7.3 การขยายดีเอ็นเอของ *M. hyopnuemoniae* โดยเทคนิคพีซีอาร์

เลือกใช้ primers ตามวิธีของ Mattsson และคณะ (1995) ซึ่งออกแบบจาก 16S rRNA ของเชื้อ *M. hyopneumoniae* มีลำดับเบสดังนี้ คือ

forward primer:5'- GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A-3' (ลำดับเบสที่ 212-233)

reverse primer : 5'-TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C-3' (ลำดับเบสที่839-860)

ซึ่งจะให้ PCR product จำเพาะขนาด 649 bp

ดีเอ็นเอตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ใส่ใน PCR reaction mixture ปริมาณ 45 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 0.2 mM dNTP แต่ละชนิด (dATP,dGTP, dTTP, dCTP), 20 pmol ของแต่ละ primer, 50 mM KCl., 10 mM Tris-HCl buffer, และ 2 mM $MgCl_2$ เติม *taq* DNA polymerase 1 U หยด mineral oil 2 หยดปิดทับบนผิวหน้าป้องกันการระเหย เข้าเครื่อง thermal cycler โมเดล 480 (Perkin-Elmer Cetus)

โปรแกรมที่ใช้ในการขยายดีเอ็นเอประกอบด้วย :-

Preheating 95°C 5 นาที 1 รอบ

Denaturation	95°C	45 วินาที	ทั้งสิ้น 35 รอบ
Annealing	60°C	1 นาที	
Extension	72°C	2 นาที	

3.7.4 การวิเคราะห์การขยายดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis

ตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์แล้ว 10 ไมโครลิตร จะนำมาใช้ตรวจหา PCR product โดยการทำ electrophoresis บน 1.5% agarose gel ใน TBE ที่เติม 0.5 μg / ml. ethidium bromide ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลท์ ประมาณ 40 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV

3.8 การตัดดีเอ็นเอด้วย Restriction endonucleases (REs)

3.8.1 การคัดเลือกเอ็นไซม์ restriction endonucleases

คัดเลือกเอ็นไซม์ที่เหมาะสมที่จะนำมาตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขยายได้ เพื่อใช้ตรวจสอบว่า product ที่เกิดขึ้นเป็นดีเอ็นเอของ *M. hyopneumoniae* จริง โดยใช้โปรแกรม MacDNASIS (HITACHI co. ltd.)

3.8.2 วิธีการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์

PCR product ที่ได้จากตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร เติม 10X buffer ที่เหมาะสม 1 ไมโครลิตร, RE (0.2-10 U) 1 ไมโครลิตร และ น้ำให้ได้เป็น 10 ไมโครลิตร นำไปอุ่นในหม้อน้ำที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. ตามวิธีของ Davis และคณะ (1986) นำมาตรวจดูชิ้นส่วนที่ถูกตัดด้วย 1.5 % agarose gel ใน TBE ที่เติม 0.5 μg / ml. ethidium bromide ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลท์ ประมาณ 40 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV

3.9 การแปลผล (Interpretation)

ตัวอย่างปอดจะติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* หรือไม่ เกณฑ์การตัดสินเป็นดังนี้ คือ ตัวอย่างปอดที่เพาะแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้ วินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อ ตัวอย่างปอดที่มีรอยโรค Mycoplasma-like และ เกิด PCR product วินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อเช่นกัน ส่วนตัวอย่างปอดมีรอยโรค Mycoplasma-like หรือเกิด PCR product เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง จะวินิจฉัยว่าไม่

ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ดังแสดงในตารางที่ 3-3 นอกจากนี้จะทำการเปรียบเทียบความจำเพาะและความไวในการตรวจทั้งสามวิธี โดยถือเอาผลการตัดสินเป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 3-3 เกณฑ์การตัดสินการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*

ผลการเพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae*	ผลพีซีอาร์	ผลการตรวจรอยโรค	การตัดสิน
ตรวจพบเชื้อ	ไม่เกิด product	ไม่มีรอยโรค	ติดเชื้อ
ตรวจพบเชื้อ	เกิด product	ไม่มีรอยโรค	ติดเชื้อ
ตรวจพบเชื้อ	ไม่เกิด product	มีรอยโรค	ติดเชื้อ
ตรวจพบเชื้อ	เกิด product	มีรอยโรค	ติดเชื้อ
ตรวจไม่พบเชื้อ	เกิด product	มีรอยโรค	ติดเชื้อ
ตรวจไม่พบเชื้อ	เกิด product	ไม่มีรอยโรค	ไม่ติดเชื้อ
ตรวจไม่พบเชื้อ	ไม่เกิด product	มีรอยโรค	ไม่ติดเชื้อ
ตรวจไม่พบเชื้อ	ไม่เกิด product	ไม่มีรอยโรค	ไม่ติดเชื้อ