บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมตัวอย่างโดยการรวบรวมซีรัมจากฟาร์ม

คัดเลือกตัวอย่างซีรัมจากฟาร์มไก่พันธุ์ที่ให้ผลเลือดด้วยวิธี SPA เป็นบวกต่อ MG (Nobilis®, Intervet International B.V. BOXMEER, Holland) ชุดการผลิต A006A55 จำนวน 10 ฟาร์ม ที่มีการใช้วัคซีนเชื้อเป็นและเชื้อตาย และฟาร์มไก่เนื้อที่ให้ผลเลือดด้วยวิธี SPA เป็นลบ จำนวน 10 ฟาร์มสำหรับการศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้วิธี SPA และ ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง และมีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

ตารางที่ 7. ตัวอย่างซีรัมฟาร์มไก่พันธุ์

วันที่เก็บตัวอย่าง	ฟาร์ม	อายุ (สัปดาห์)	ผลการทดสอบ SPA		
			บวก	ลบ	จำนวนทั้งหมด
02/01/2553	A	6-8	15	0	15
12/01/2553	B	16-17	15	0	15
12/01/2553	C	28-30	15	0	15
12/01/2553	D	54-58	15	0	15
14/01/2553	E	6-7	15	0	15
28/01/2553	F	68-70	15	0	15
28/01/2553	G	12-14	15	0	15
28/01/2553	H	14-16	15	0	15
10/02/2553	I	46-47	15	0	15
25/02/2553	J	10-12	15	0	15
รวม			150	0	150

ตารางที่ 8. ตัวอย่างซีรัมฟาร์มไก่เนื้อ

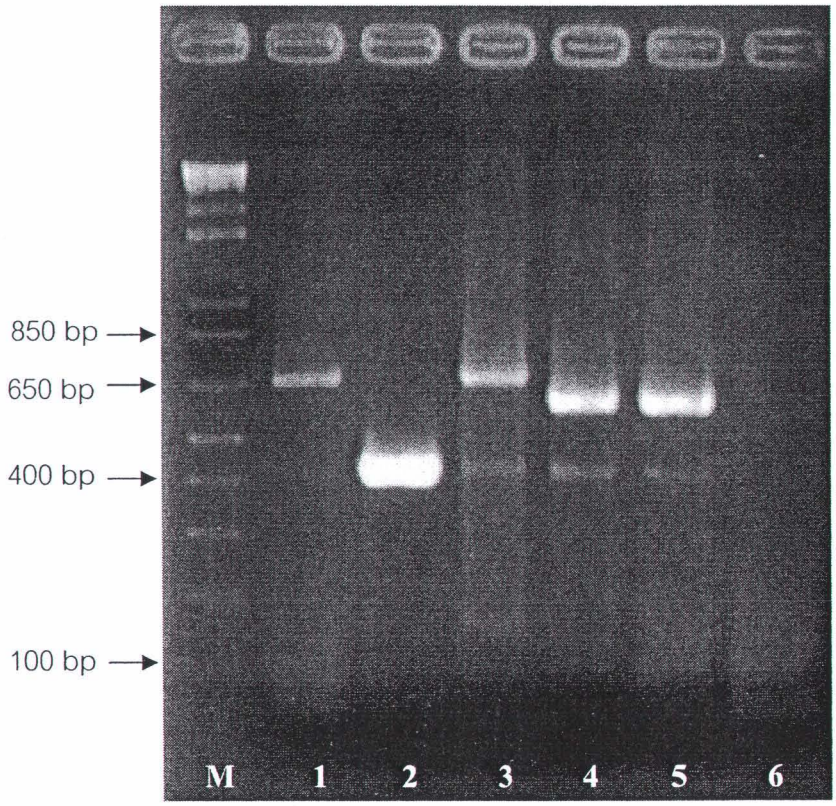
วันที่เก็บตัวอย่าง	ฟาร์ม	อายุ (วัน)	ผลการทดสอบ SPA		
			บวก	ลบ	จำนวนทั้งหมด
29/12/2552	K	30	0	15	15
11/01/2553	L	28	0	15	15
14/01/2553	M	28	0	15	15
14/01/2553	N	38	0	15	15
19/01/2553	O	35	0	15	15
22/01/2553	P	28	0	15	15
25/01/2553	Q	28	0	15	15
24/01/2553	R	28	0	15	15
29/01/2553	S	28	0	15	15
11/02/2553	T	35	0	15	15
รวม			0	150	150

4.2 ผลการแยกเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่น

4.2.1 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* โดยใช้วิธี PCR

การใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ MS ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในตัวอย่างเชื้อ *Mycoplasma* ที่แยกได้จากตัวอย่าง

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ primer pvpA1F และ primer pvpA2R ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4. Gel electrophoresis ของการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* ด้วย Primer pvpA1F และ pvpA2R

ช่องที่ M คือ 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen, U.S.A.)

ช่องที่ 1 คือ MG ที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อ ขนาด 650 bp

ช่องที่ 2 คือ MG สายพันธุ์ F ขนาด 450 bp

ช่องที่ 3 คือ MG สายพันธุ์วัคซีน ts-11 ขนาด 650 + 450 bp

ช่องที่ 4 คือ MG สายพันธุ์ S6 ขนาด 630 + 450 bp

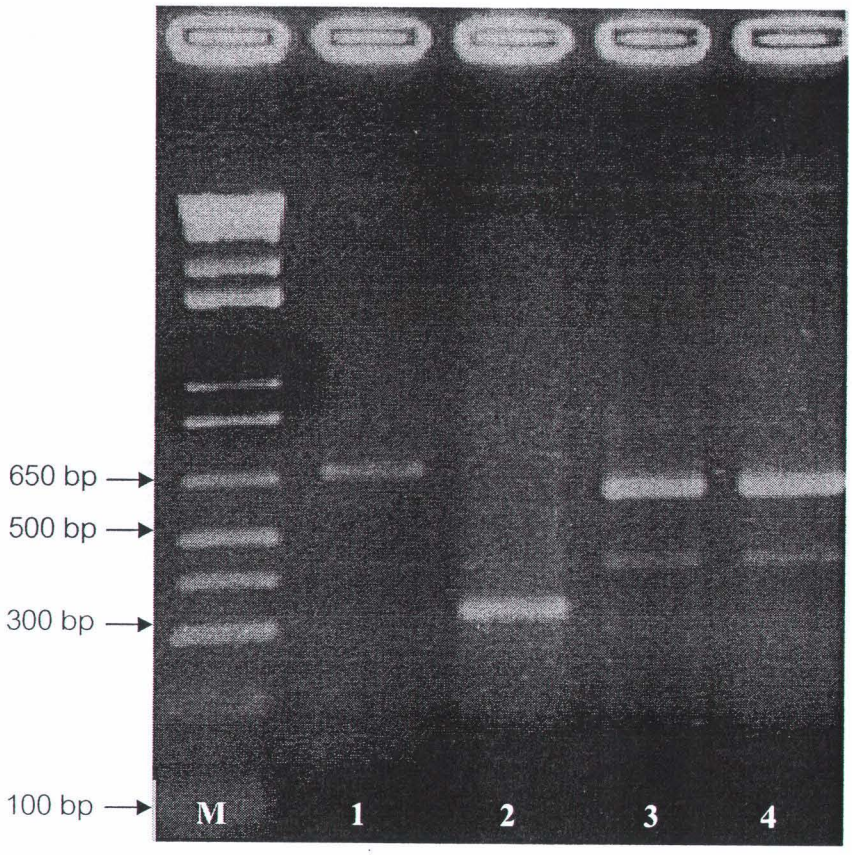
ช่องที่ 5 คือ MG สายพันธุ์วัคซีน 6/85 ขนาด 630 + 450 bp

ช่องที่ 6 คือ Nucleus free water (Negative control)

PCR product ของตัวอย่างจากฟาร์มมีขนาด 650 bp วัคซีนสายพันธุ์ ts-11 มีขนาด 650 และ 450 bp ส่วนเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 และวัคซีนสายพันธุ์ 6/85 มีขนาด PCR product เท่ากันคือ 630 และ 450 bp ส่วน MG สายพันธุ์ F มีขนาด 450 bp แตกต่างจาก band อื่นอย่างชัดเจน

4.2.2 การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อ MG ด้วยปฏิกิริยา RFLP

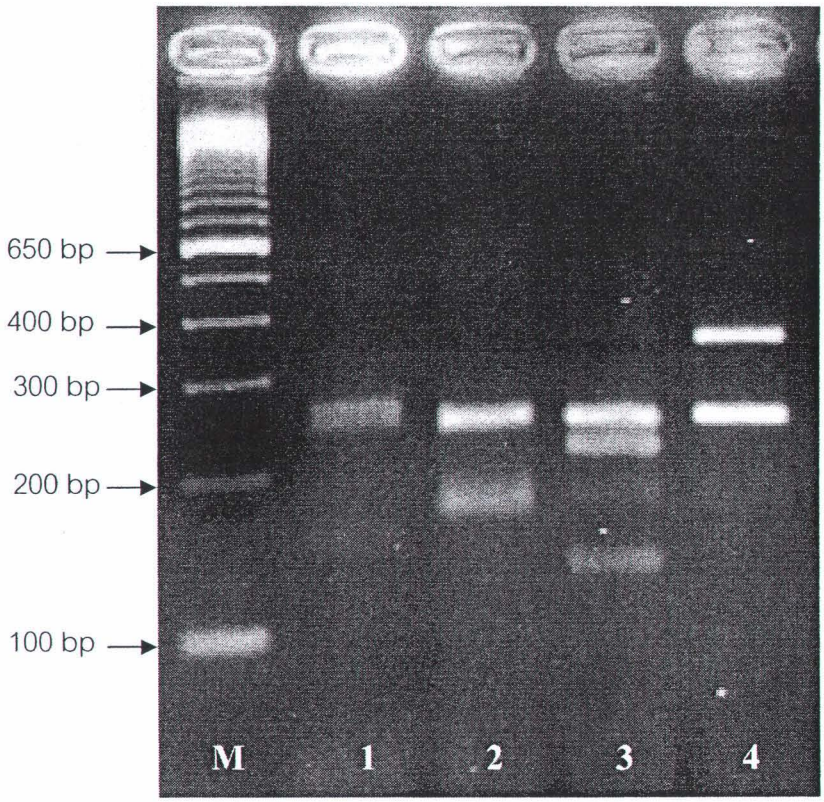
จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I พบว่าภายหลังการตัดเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 และ วัคซีน 6/85 มีขนาดเท่าเดิมคือ 630 + 450 bp ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มมีชิ้นดีเอ็นเอ 650 bp ขณะที่วัคซีนสายพันธุ์ ts-11 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 350 bp แยกความแตกต่างจาก band อื่นอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5. Gel electrophoresis ของการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I

ช่องที่ M คือ	1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, U.S.A.)		
ช่องที่ 1 คือ	MG ที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อ	ขนาด	650 bp
ช่องที่ 2 คือ	MG สายพันธุ์วัคซีน ts-11	ขนาด	350 bp
ช่องที่ 3 คือ	MG สายพันธุ์ S6	ขนาด	630 + 450 bp
ช่องที่ 4 คือ	MG สายพันธุ์วัคซีน 6/85	ขนาด	630 + 450 bp

การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อ MG ด้วยปฏิกิริยา RFLP โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ScrFI* พบว่าภายหลังการตัด วัคซีนสายพันธุ์ 6/85 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 375+265+180 bp ส่วน วัคซีนสายพันธุ์ S6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 265+235+180+150 bp ในขณะที่ตัวอย่างจากฟาร์มมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 265+150 bp แตกต่างจากวัคซีนทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6. Gel electrophoresis ของการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ScrFI

ช่องที่ M คือ 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen coporation, USA)

ช่องที่ 1 คือ MG ที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อ ขนาด 265 + 150 bp

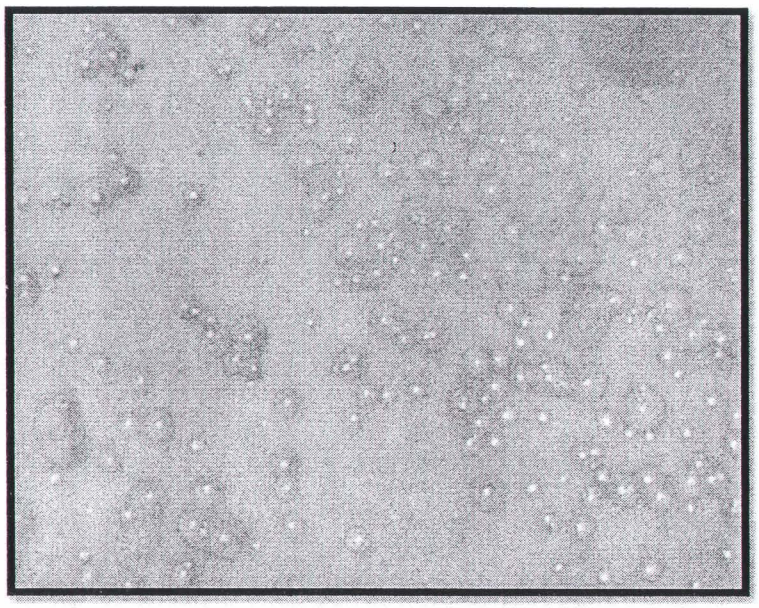
ช่องที่ 2 คือ MG สายพันธุ์วัคซีน ts-11 ขนาด 260 + 180 bp

ช่องที่ 3 คือ MG สายพันธุ์ S6 ขนาด 265 + 235 + 180 + 150 bp

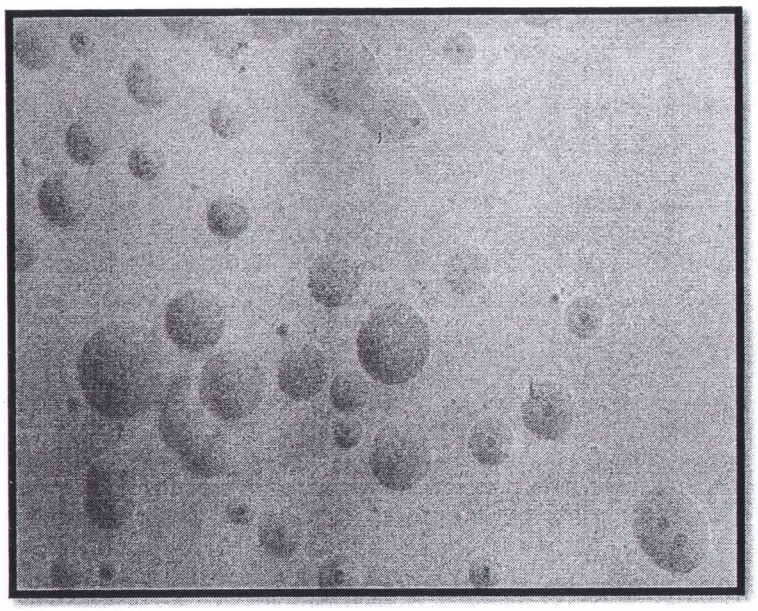
ช่องที่ 4 คือ MG สายพันธุ์วัคซีน 6/85 ขนาด 375 + 265 + 180 bp

การใช้ primer pvpA1F และ pvpA2R สามารถแยกความแตกต่างของ MG สายพันธุ์ F ออกจากสายพันธุ์อื่นได้ แต่ยังไม่สามารถแยกวัคซีนสายพันธุ์ ts-11, 6/85 และ S6 ได้ เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I ตัดชิ้นดีเอ็นเอใน PCR product สามารถจำแนกวัคซีนสายพันธุ์ ts-11 ออกจาก สายพันธุ์ 6/85 และ S6 ได้ และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ScrF*I ตัดชิ้นดีเอ็นเอใน PCR product สามารถจำแนกวัคซีนสายพันธุ์ 6/85 และ S6 ออกจากกันได้ ตัวอย่างจากฟาร์มภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I และ *ScrF*I ได้รูปแบบชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกับวัคซีนทั้ง 3 สายพันธุ์และ MG S6 จึงจำแนกเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่น

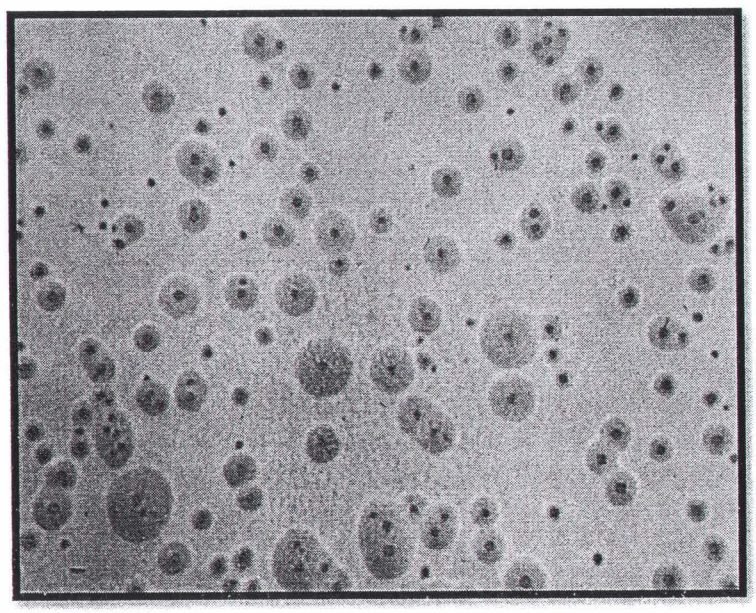
4.3 ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ MG



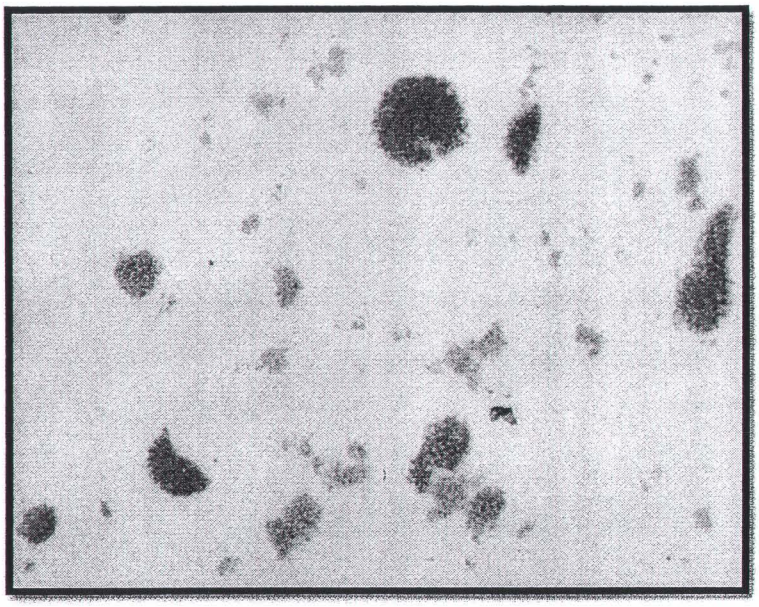
ภาพที่ 7. ลักษณะโคโลนีเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่นบน Mycoplasma agar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X



ภาพที่ 8. ลักษณะโคโลนีเชื้อ MG สายพันธุ์ F บน Mycoplasma agar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X



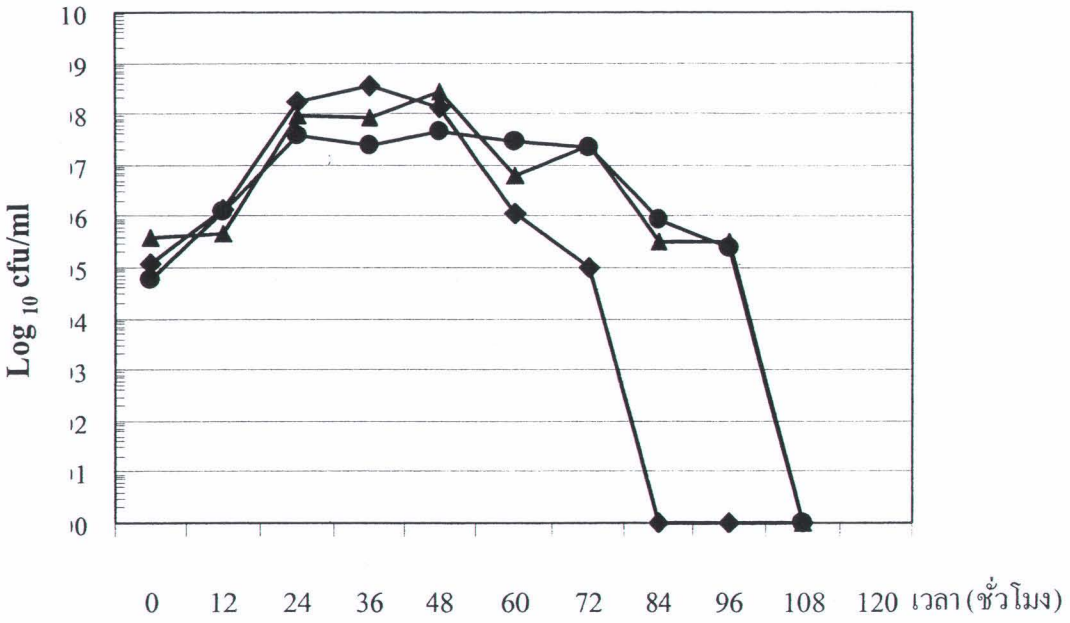
ภาพที่ 9. ลักษณะโคโลนีเชื้อ MG S6 สายพันธุ์ บน Mycoplasma agar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X



ภาพที่ 10. ลักษณะเชื้อ MG ภายหลังการย้อมด้วยสี Giemsa stain ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

โคโลนีของเชื้อ MG ที่เจริญ บน Mycoplasma agar ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะกลม ขอบเรียบ ตรงกลางโคโลนีจะนูนเหมือนรูปไข่ดาว ดังแสดงในภาพที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

การศึกษาการเจริญของเชื้อ MG ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycoplasma broth (Frey's medium) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดปริมาณเชื้อเป็นทุกๆ 12 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 11.



ภาพที่ 11. กราฟการเจริญของเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่น ( ) สายพันธุ์ S6 ( ) และ สายพันธุ์ F ( )

การทดลองครั้งนี้พบว่าเชื้อ MG สายพันธุ์ F มีอัตราการเจริญสูงกว่าเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่น และ สายพันธุ์ S6 โดยมีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ 2.4 $\times 10^8$ cfu/ml ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ MG สายพันธุ์ ท้องถิ่นมีการเจริญสูงสุดที่ 1.4×10^8 cfu/ml ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง เชื้อ MG สายพันธุ์ S6 มีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ 2.4×10^8 cfu/ml ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ MG สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ท้องถิ่นมีช่วงระยะการเจริญที่ยาวนานกว่าเชื้อ MG สายพันธุ์ F โดยจะเข้าสู่ระยะ Dead phase ในช่วงชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป

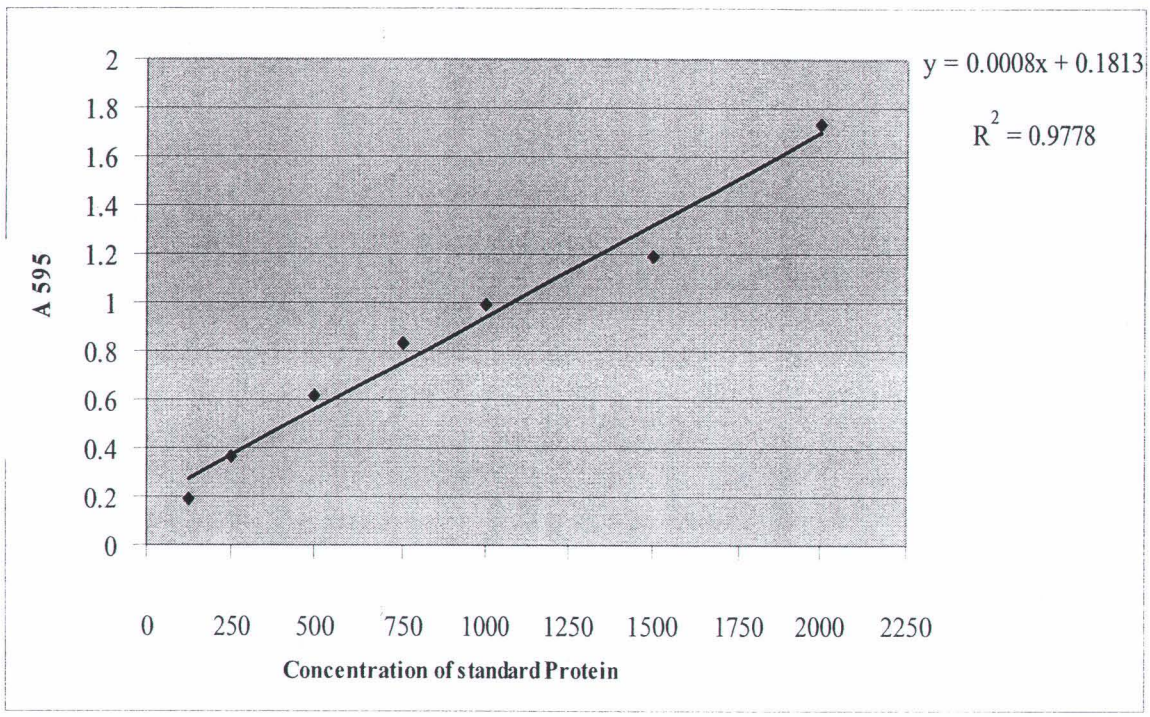
ตารางที่ 9. ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไปในช่วงเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ		
	MG สายพันธุ์ท้องถิ่น	MG สายพันธุ์ S6	MG สายพันธุ์ F
0	7	7	7
12	7	6	7
24	7	6	6
36	7	6	6
48	7	6	6
60	6	6	6
72	6	6	6
84	6	6	6
96	6	6	6
108	6	6	6
120	6	6	6

จากการวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycoplasma broth (Frey's medium) ที่มีการเจริญของเชื้อ MG ทั้ง 3 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F) โดยการสุ่มตัวอย่างวัดค่า pH ทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่า MG สายพันธุ์ท้องถิ่นมีการเปลี่ยน ค่า pH ช้าที่สุด โดยที่ค่า pH จะเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป ส่วน MG อีก 2 สายพันธุ์ จะมีค่า pH ลดลง ประมาณชั่วโมงที่ 12-24

4.4. ผลการเตรียมแอนติเจน

ใช้วิธี Bradford วัดความเข้มข้นโปรตีนของแอนติเจนที่เตรียมได้ โดยสามารถเขียนกราฟของโปรตีนมาตรฐานได้ดังภาพที่ 12.



ภาพที่ 12. กราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) วัดโดยวิธี Bradford

นำค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานคำนวณความเข้มข้นโปรตีนของแอนติเจน MG ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังนี้

MG สายพันธุ์ท้องถิ่น มีความเข้มข้น 1063 µg/ml

MG สายพันธุ์ S6 มีความเข้มข้น 2160 µg/ml

MG สายพันธุ์ F มีความเข้มข้น 2286 µg/ml

แอนติเจน MG ที่เตรียมเองทั้ง 3 สายพันธุ์ในครั้งนี้พบว่า MG สายพันธุ์ F และสายพันธุ์ S6 มีปริมาณโปรตีนประมาณ 2 เท่าของ MG สายพันธุ์ท้องถิ่น

แอนติเจนที่เตรียมเองทั้ง 3 สายพันธุ์ผ่านการทดสอบดังนี้

Contamination test – เมื่อย้อมสีทั้ง 2 ชนิด แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อน

Sterility test – ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

Character test – เมื่อนำแอนติเจนผสมสี Crystal violet 1% เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์ พบว่ามีลักษณะใส เป็นเนื้อเดียวกัน และเมื่อทดสอบกับ 0.85% $NaCl_2$ ไม่เกิด Auto agglutination

Specificity test – แอนติเจนให้ผลบวกกับซีรัมควบคุมผลบวก MG และให้ผลลบกับซีรัมควบคุมผลบวก MS ที่มาพร้อมกับชุดทดสอบ ELISA (Biocheck, Holland)

Potency test – แอนติเจนให้ผลบวกกับซีรัมควบคุมผลบวกทั้ง 10 ตัวอย่าง และให้ผลลบกับซีรัมควบคุมผลลบทั้ง 10 ตัวอย่าง

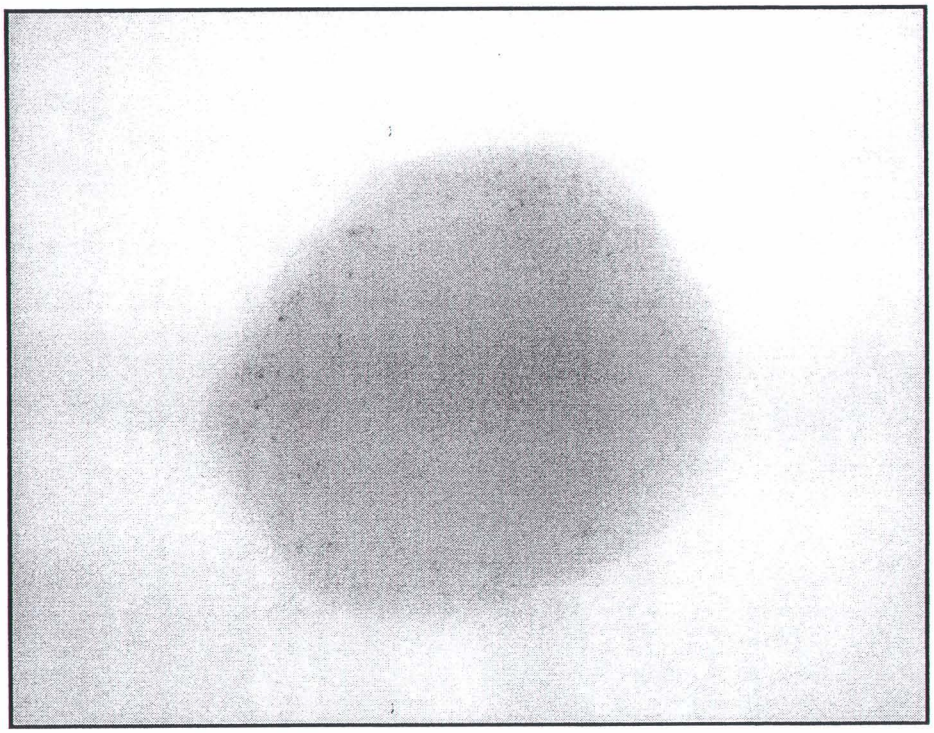
4.5. ผลการทดสอบด้วยวิธี SPA

เมื่อนำแอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์S6 และสายพันธุ์ F ที่เตรียมเอง ซึ่งผ่านการทดสอบคุณภาพของแอนติเจน แล้วทดสอบกับตัวอย่างซีรัมได้ผลดังตารางที่ 10

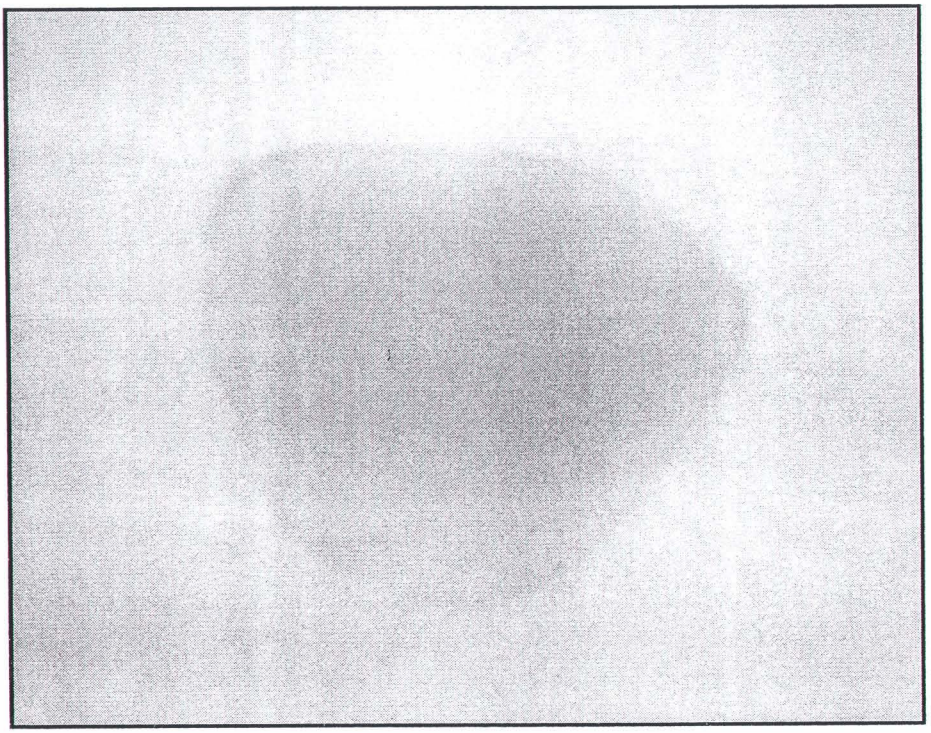
ตารางที่ 10. แสดงผลการทดสอบ MG serum plate agglutination (MG SPA) เปรียบเทียบระหว่าง MG สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์S6 สายพันธุ์ F และแอนติเจนที่ผลิตเชิงพาณิชย์

แอนติเจน MG	ผลการทดสอบ SPA กับซีรัม		จำนวนทั้งหมด
	ผลบวก	ผลลบ	
สายพันธุ์เชิงพาณิชย์	150	150	300
สายพันธุ์ท้องถิ่น	149	151	300
สายพันธุ์ S6	150	150	300
สายพันธุ์ F	149	151	300

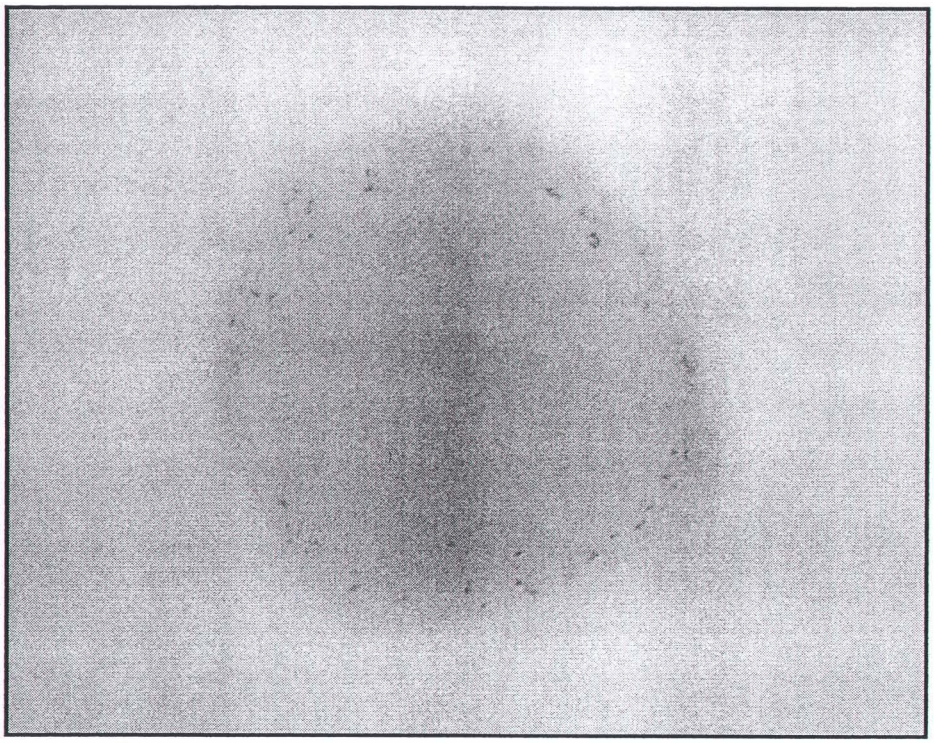
จากการทดสอบวิธี SPA แอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 ที่เตรียมเองให้ผลบวกต่อซีรัมไก่พันธุ์ 100 % และให้ผลลบต่อซีรัมไก่เนื้อ 100 % เช่นเดียวกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์ ในขณะที่แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น และแอนติเจน MG สายพันธุ์ F ให้ผลบวกต่อซีรัมไก่พันธุ์ 99.33 % และให้ผลลบต่อซีรัมไก่เนื้อ 100%



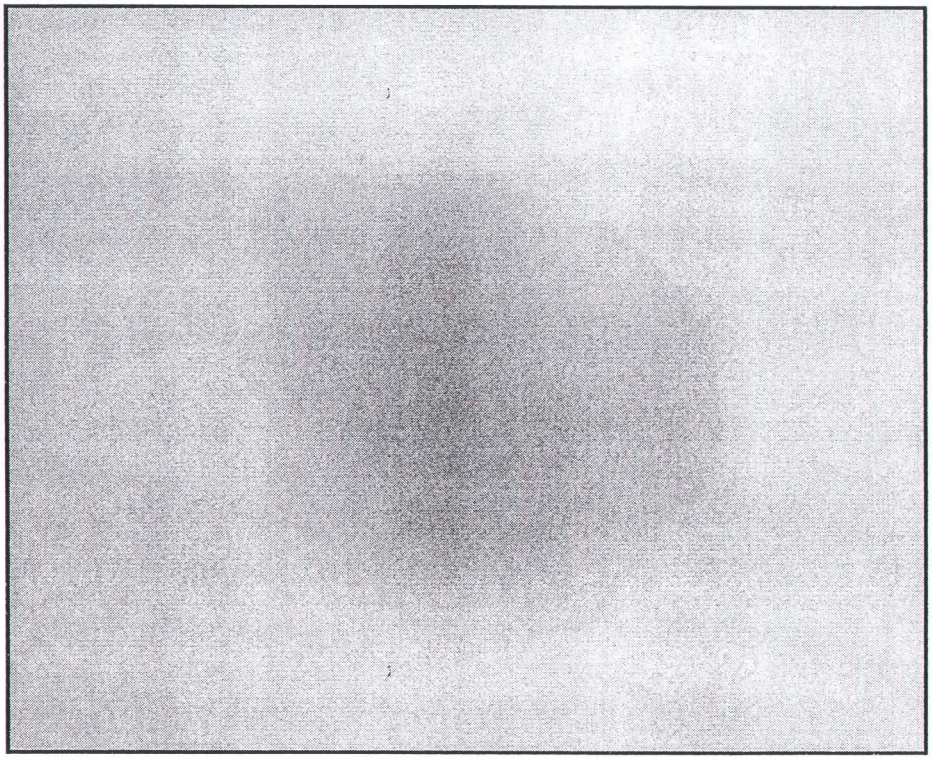
ภาพที่ 13. แอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่นตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก



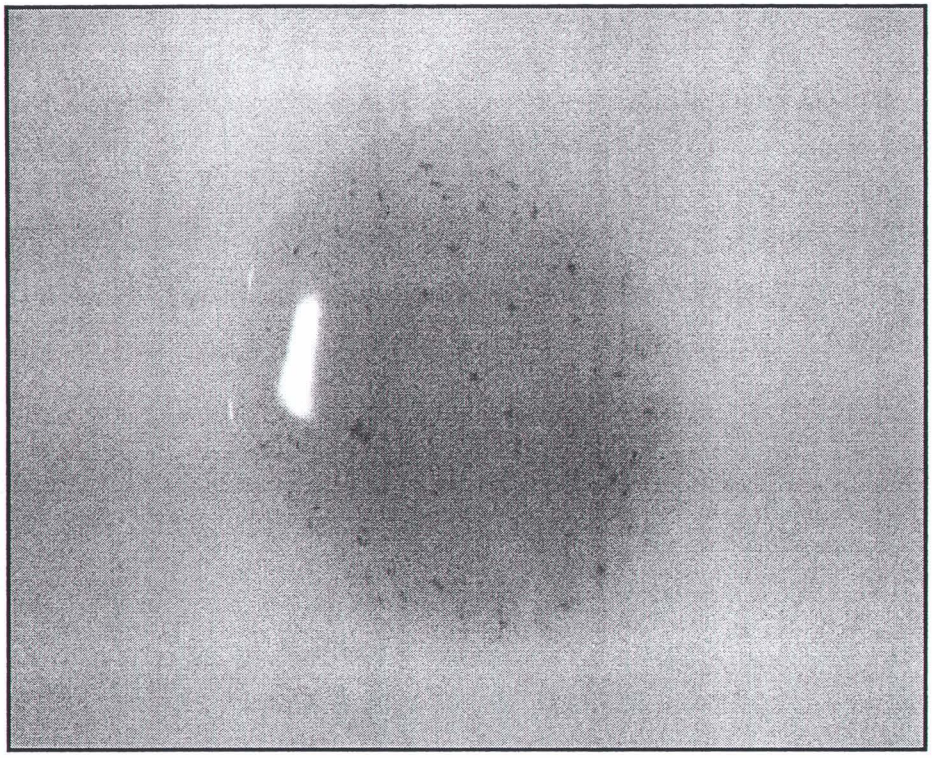
ภาพที่ 14. แอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่นไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ



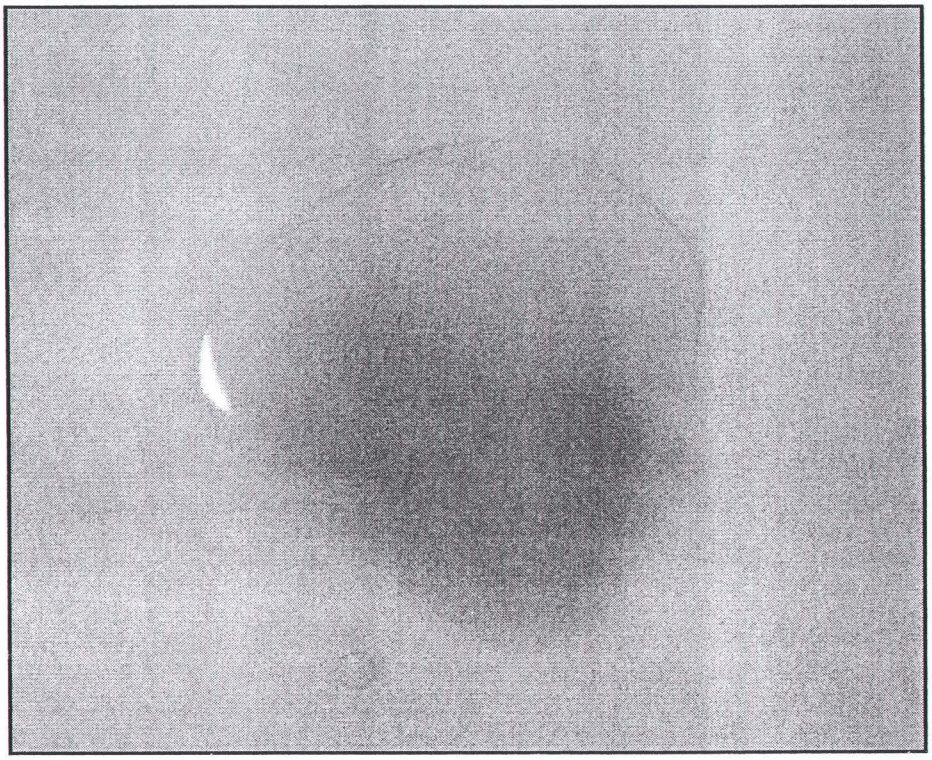
ภาพที่ 15. แอนติเจนสายพันธุ์ S6 ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก



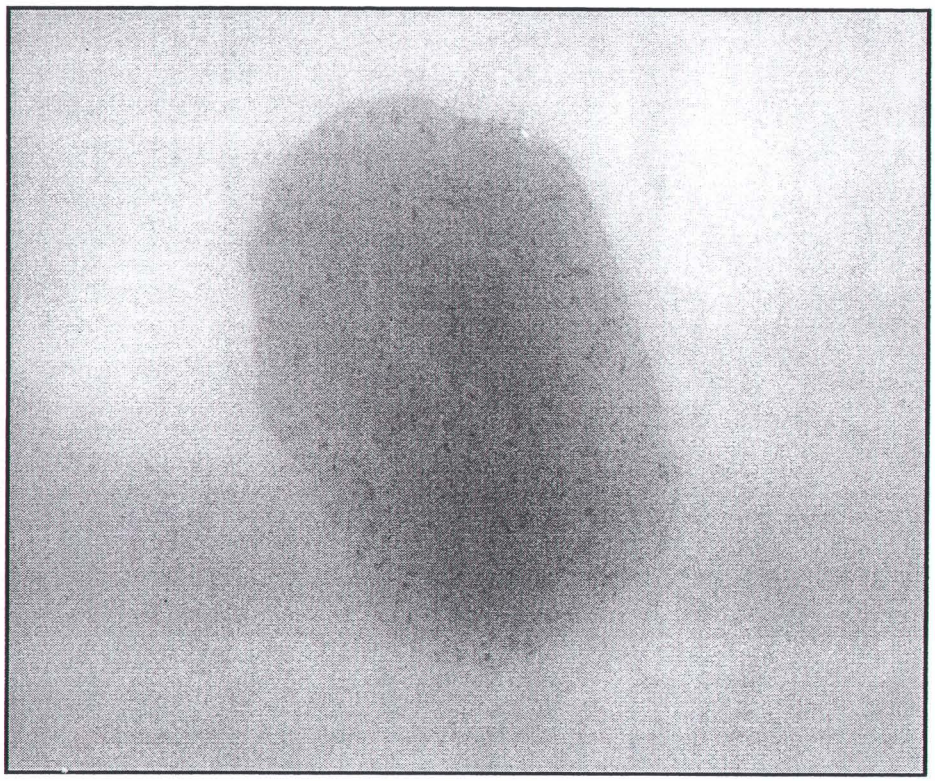
ภาพที่ 16. แอนติเจนสายพันธุ์ S6 ไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ



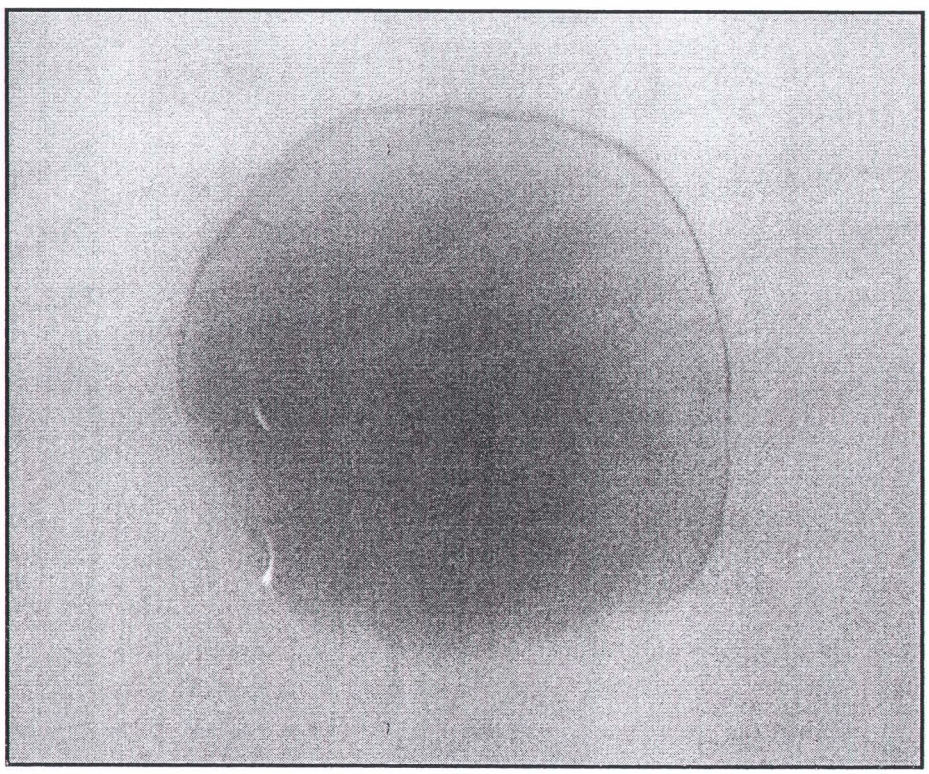
ภาพที่ 17. แอนติเจนสายพันธุ์ F ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก



ภาพที่18. แอนติเจนสายพันธุ์ F ไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ



ภาพที่ 19. แอนติเจนเชิงพาณิชย์ ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก



ภาพที่ 20. แอนติเจนเชิงพาณิชย์ ไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ

ตารางที่ 11. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์

ผลการทดสอบ	ซีรัม		รวม
	ซีรัมบวกต่อ MG	ซีรั่มลบต่อ MG	
ให้ผลบวก	149 (a)	0 (b)	149
ให้ผลลบ	1(c)	150 (d)	151
รวม	150 (a+c)	150 (b+d)	300

ค่าความไว a / (a+c) x 100 = 99.3%

ค่าความจำเพาะ d / (b+d) x 100 = 100.0%

ค่าความถูกต้อง (a+d) / (a+c) + (b+d) x 100 = 99.7%

ผลบวกเทียม b / (b+d) x 100 = 0.0%

ผลลบเทียม c / (a+c) x 100 = 0.7%

ตารางที่ 12. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์

ผลการทดสอบ	ซีรัม		รวม
	ซีรัมบวกต่อ MG	ซีรัมลบต่อ MG	
ให้ผลบวก	150 (a)	0 (b)	150
ให้ผลลบ	0 (c)	150 (d)	150
รวม	150 (a+c)	150 (b+d)	300

ค่าความไว a / (a+c) x 100 = 100.0%

ค่าความจำเพาะ d / (b+d) x 100 = 100.0%

ค่าความถูกต้อง (a+d) / (a+c) + (b+d) x 100 = 100.0%

ผลบวกเทียม b / (b+d) x 100 = 0.0%

ผลลบเทียม c / (a+c) x 100 = 0.0 %

ตารางที่ 13. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ F เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์

ผลการทดสอบ	ซีรัม		รวม
	ซีรัมบวกต่อ MG	ซีรัมลบต่อ MG	
ให้ผลบวก	149 (a)	0 (b)	149
ให้ผลลบ	1 (c)	150 (d)	151
รวม	150 (a+c)	150 (b+d)	300

ค่าความไว a / (a+c) x 100 = 99.3%

ค่าความจำเพาะ d / (b+d) x 100 = 100.0%

ค่าความถูกต้อง (a+d) / (a+c) + (b+d) x 100 = 99.7%

ผลบวกเทียม b / (b+d) x 100 = 0.0%

ผลลบเทียม c / (a+c) x 100 = 0.7%

ตารางที่ 14. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F

แอนติเจน	ความไว	ความจำเพาะ	ความถูกต้อง	ผลบวกเทียม	ผลลบเทียม
สายพันธุ์ท้องถิ่น	99.3 %	100.0 %	99.7 %	0.0 %	0.7 %
สายพันธุ์ S6	100.0 %	100.0 %	100.0 %	0.0 %	0.0 %
สายพันธุ์ F	99.3 %	100.0 %	99.7%	0.0 %	0.7 %

เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างแอนติเจนที่เตรียมเองทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า แอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด เนื่องจากมีค่าความไว 100 % ค่าความจำเพาะ 100 % ค่าความถูกต้อง 100 % ไม่มีผลบวกเทียม และไม่มีผลลบเทียมเหมือนกันกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์ทุกประการ ในขณะที่แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น และสายพันธุ์ F มีผลลบเทียม 0.7 % แต่ก็มีความไว และความถูกต้องในระดับที่สูง และมีค่าความจำเพาะของการทดสอบถึง 100 %

4.6 การทดสอบด้วยวิธี ELISA (Indirect method)

4.6.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA

ชุดทดสอบ ELISA ที่เคลือบเพลตด้วยเชื้อ MG ทั้ง 3 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F) พบว่า ความเข้มข้นของแอนติเจน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคอนจูเกต 1:500 มีค่าอัตราส่วนที่เหมาะสม ปริมาณแอนติเจนมีความสามารถในการจำแนกตัวอย่างผลบวก และผลลบจากกันได้อย่างชัดเจน และเพื่อเป็นการประหยัดปริมาณโปรตีนที่ใช้สำหรับการตรวจสอบ จึงเลือกใช้ปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 15, 16, 17

ตารางที่ 15. แสดงค่า S/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น และคอนจูเกตที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA

ความเข้มข้นของโปรตีน (μg/ml)	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต**				
	1:100	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
0.5	10.82	14.44	13.02	10.32	7.06
1	10.65	16.11	14.13	10.17	7.23
2	10.57	13.23	12.84	10.39	7.00
4	10.03	13.95	12.55	10.00	7.57
8	8.80	13.77	12.37	9.65	8.41
16	7.62	12.22	12.39	10.55	8.46

ตารางที่ 16. แสดงค่า S/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 และคอนจูเกตที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA

ความเข้มข้นของโปรตีน	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต**				
(µg/ml)	1:100	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
0.5	9.91	12.77	11.4	7.48	6.97
1	11.46	15.08	15.08	8.91	8.4
2	11.18	15.43	15.43	8.22	8.04
4	11.44	14.6	14.6	8.42	7.95
8	10.28	14.83	14.83	8.61	8.78
16	9.21	13.1	13.1	8.6	8.86

ตารางที่ 17. แสดงค่า S/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน MG สายพันธุ์ F และคอนจูเกตที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA

ความเข้มข้นของโปรตีน	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต**				
(µg/ml)	1:100	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
0.5	11.77	11.54	9.08	7.33	7.53
1	10.62	11.01	8.94	6.10	7.02
2	10.58	10.91	8.87	5.94	6.99
4	11.04	11.82	9.70	8.06	7.96
8	11.06	12.00	9.31	7.20	7.12
16	9.99	11.24	9.52	6.68	6.95

4.6.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเอง

เมื่อใช้ชุดทดสอบ ELISAที่เตรียมเองทดสอบกับซีรัมความคุมผลลบ ซีรัมควบคุมผลบวก ของเชื้อ IBV, IBD, Reo, ILTV, PM, MS ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18. แสดงค่าเฉลี่ย O.D.ของ MG ELISA ที่เตรียมเอง สายพันธุ์ S6 ทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวก/ลบของเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ MG

เชื้อ	ค่า O.D.	
	ซีรัมควบคุมผลลบ	ซีรัมควบคุมผลบวก
IBV	0.083 ± 0.001	0.099 ± 0.005
IBD	0.080 ± 0.004	0.189 ±0.004
Reo	0.078 ± 0.001	0.068 ± 0.003
ILTV	0.095 ± 0.014	0.103 ± 0.003
PM	0.099 ± 0.007	0.114 ± 0.001
MS	0.080 ± 0.003	0.085 ± 0.001

เกณฑ์การพิจารณาค่า O.D. ของการแปลผลการทดสอบ ELISA สำหรับตรวจเชื้อ MG ที่เตรียมเอง ผลบวก ต้องให้ค่า O.D. มากกว่าหรือเท่ากับ 0.372 ขึ้นไป

จากข้อมูลในตารางที่ 18 แสดงให้เห็นว่า MG ELISA ที่เตรียมเองไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมบวกต่อเชื้ออื่นที่ไม่ใช่เชื้อ MG

เมื่อนำชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทดสอบกับซีรัมของไก่พันธุ์ และไก่เนื้อที่รวบรวมไว้ แล้วนำผลการทดสอบที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบโดยการใช้ ชุดทดสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น กับชุดทดสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ พบว่า ชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองมีค่าความไวของการทดสอบ 66.67% มีความจำเพาะ 95.23% มีความถูกต้อง 82.65% เกิดผลบวกเทียม 4.76% และเกิดผลลบเทียม 33.33%

ตารางที่ 19. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์

In-house ELISA	MG ELISA (Synbiotics Corporation, CA)		รวม
	ผลบวก	ผลลบ	
ให้ผลบวก	88(a)	8(b)	96
ให้ผลลบ	44(c)	160(d)	204
รวม	88+44(a+c)	8+160(b+d)	300

ค่าความไว a / (a+c) x 100 = 66.67%

ค่าความจำเพาะ d / (b+d) x 100 = 95.23%

ค่าความถูกต้อง (a+d) / (a+c) + (b+d) x 100 = 82.66%

ผลบวกเทียม b / (b+d) x 100 = 4.76%

ผลลบเทียม c / (a+c) x 100 = 33.33%

ในตารางที่ 20 เมื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 กับชุดทดสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ พบว่า ชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองมีค่าความไวของการทดสอบ 96.21% มีความจำเพาะ 94.64% มีความถูกต้อง 95.33% เกิดผลบวกเทียม 5.36% และเกิดผลลบเทียม 3.79%

ตารางที่ 20. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของการทดสอบด้วยวิธี ELISA MG สายพันธุ์ S6 เปรียบเทียบกับ ELISA เชิงพาณิชย์

In-house ELISA	MG ELISA (Synbiotics Corporation, CA)		**รวม**
	ผลบวก	**ผลลบ**	
ให้ผลบวก	127(a)	9(b)	136
ให้ผลลบ	5 (c)	159 (d)	164
รวม	132 (a+c)	168 (b+d)	300

ค่าความไว a / (a+c) x 100 = 96.21%

ค่าความจำเพาะ d / (b+d) x 100 = 94.64 %

ค่าความถูกต้อง (a+d) / (a+c) + (b+d) x 100 = 95.33%

ผลบวกเทียม b / (b+d) x 100 = 5.36%

ผลลบเทียม c / (a+c) x 100 = 3.79%

ในตารางที่ 21 เมื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองโดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ F กับชุดทดสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ พบว่า ชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองมีค่าความไวของการทดสอบ 56.81% มีความจำเพาะ 93.45% มีความถูกต้อง 77.33% เกิดผลบวกเทียม 6.54% และเกิดผลลบเทียม 43.18%

ตารางที่ 21. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของการทดสอบด้วยวิธี ELISA MG สายพันธุ์ F เปรียบเทียบกับ ELISA เชิงพาณิชย์

In-house ELISA	MG ELISA (Synbiotics Corporation, CA)		**รวม**
	ผลบวก	**ผลลบ**	
ให้ผลบวก	75 (a)	11 (b)	86
ให้ผลลบ	57 (c)	157 (d)	214
รวม	132 (a+c)	168 (b+d)	300

ค่าความไว a / (a+c) x 100 = 56.81 %

ค่าความจำเพาะ d / (b+d) x 100 = 93.45 %

ค่าความถูกต้อง (a+d) / (a+c) + (b+d) x 100 = 77.33 %

ผลบวกเทียม b / (b+d) x 100 = 6.54%

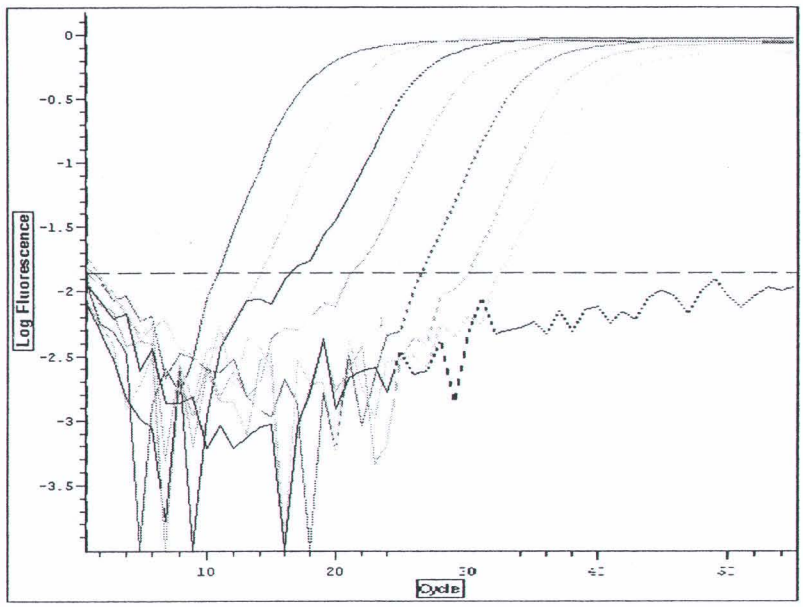
ผลลบเทียม c / (a+c) x 100 = 43.18%

ตารางที่ 22. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทดสอบด้วยวิธี ELISA MG สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F

ELISA	ความไว	ความจำเพาะ	ความถูกต้อง	ผลบวกเทียม	ผลลบเทียม
สายพันธุ์ท้องถิ่น	67 %	95 %	83 %	5 %	33 %
สายพันธุ์ S6	96 %	95 %	95 %	5 %	4 %
สายพันธุ์ F	57 %	94 %	77 %	6 %	43 %

เมื่อนำผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทดสอบของชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมเองทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ELISA MG สายพันธุ์ S6 มีประสิทธิภาพในการทดสอบที่สูงกว่าสายพันธุ์ท้องถิ่น และสายพันธุ์ F ในขณะที่ ELISA MG สายพันธุ์ท้องถิ่น และสายพันธุ์ F ยังมีผลลบเทียมในระดับที่ค่อนข้างสูง แต่ก็มีค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องค่อนข้างสูงเช่นกัน

4.7 ผลการทำ Quantitative Real time PCR



ภาพที่ 21. ผลการทำ Real time PCR ของเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 ปริมาณ DNA 10^{12} (—), 10^{11} (—), 10^{10} (—), 10^{9} (—), 10^{8} (—), 10^{7} (—), 10^{6} (—) copies และ Nucleus free water (—)

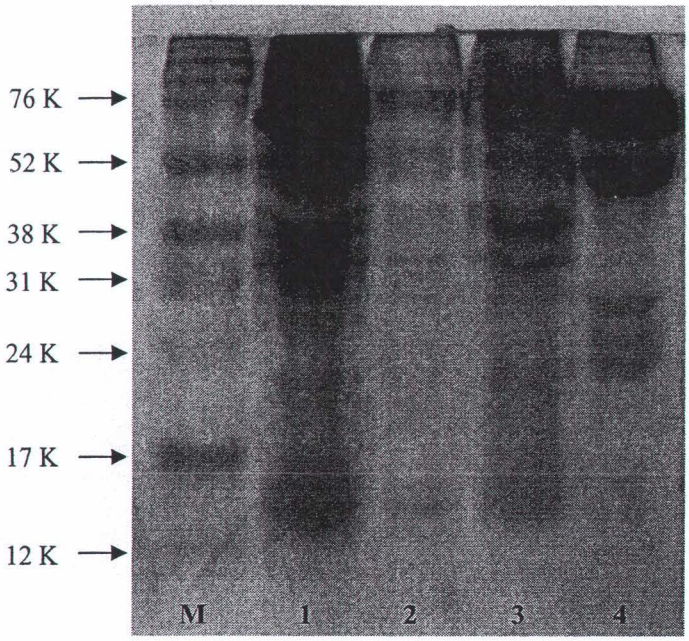
ตารางที่ 23. แสดงปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ MG S6 ค่า C_T และ melting temperature ภายหลังจากการทำปฏิกิริยา Real time PCR

ปริมาณเชื้อ MG (cfu/ml)	DNA Copies	ค่า C_T	Melting Temperature
2.4×10^{8}	2.02×10^{12}	10.84	84.5
-	2.02×10^{11}	14.10	84.5
-	2.02×10^{10}	16.49	84.5
-	2.02×10^{9}	21.21	84.5
-	2.02×10^{8}	26.60	84.5
-	2.02×10^{7}	30.09	84.5
-	2.02×10^{6}	32.35	85

การทำปฏิกิริยา Real time PCR จากเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.4×10^8 cfu/ml มีปริมาณ 2.02×10^{12} DNA copies ค่า C_t 10.84 ค่า Melting Temperature 84.5 และเมื่อปริมาณ DNA copies ลดลง ค่า C_t จะเพิ่มขึ้น และยืนยันผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมายจากค่า Melting Temperature ดังแสดงในตารางที่ 17.

4.8 การวิเคราะห์โปรตีน ของเชื้อ MG โดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

จากการนำโปรตีนของแอนติเจน MG มาวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ใช้โปรตีนตัวอย่างละ 5 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยทดสอบโปรตีนของแอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 สายพันธุ์ F และสายพันธุ์ท้องถิ่น ดังแสดงในภาพที่ 22 (ช่องที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับรูปแบบของโปรตีนใน porcine serum (ช่องที่ 4) ที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycoplasma broth พบว่าในช่องของโปรตีนของเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 สายพันธุ์ F และสายพันธุ์ท้องถิ่น เกิดแถบโปรตีนหลายแถบ และมีบางแถบมีขนาดตรงกับโปรตีนของ Porcine serum ซึ่งอาจสื่อให้เห็นว่าในกระบวนการเตรียมแอนติเจนยังมีโปรตีนของ porcine serum หลงเหลืออยู่ แต่จากการทดสอบพบว่า ไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบแต่อย่างใด



ภาพที่ 22. การวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ MG โดยวิธี SDS-PAGE

ช่อง M คือ Full-Range Rainbow Molecular Weigh Marker 12000-225000 Da (GE Healthcare Bio-Science, Sweden)

ช่องที่ 1 คือ โปรตีนของ MG สายพันธุ์ S6

ช่องที่ 2 คือ โปรตีนของ MG สายพันธุ์ F

ช่องที่ 3 คือ โปรตีนของ MG สายพันธุ์ท้องถิ่น

ช่องที่ 4 คือ โปรตีนของ porcine serum