บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เตรียมตัวอย่างซีรัมจากฟาร์มไก่พันธุ์จำนวน 10 ฟาร์ม และฟาร์มไก่เนื้ออีกจำนวน 10 ฟาร์ม สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้วิธี SPA ที่เตรียมขึ้นเอง และมีการจำหน่ายเชิงพาณิชย์ และ ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง และมีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

เมื่อใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. synoviae* ทำปฏิกิริยา PCR กับดีเอ็นเอของเชื้อ Mycoplasma ที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่าง พบว่า ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เชื้อที่แยกได้จึงไม่ใช่เชื้อ *M. synoviae* และไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ *M. synoviae* ในการจำแนกสายเชื้อของ *Mycoplasma gallisepticum* นิยมใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis จากโปรตีนของเชื้อ เทคนิค Southern blot hybridization เทคนิค Restriction endonuclease analysis ของดีเอ็นเอ (Kleven, 1994) และ Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis (Thorn Steinlage et al., 2003) ผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่า การใช้ Primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ cytadhesion บริเวณ phase variable protein (pvpA1F / pvpA2R) สามารถจำแนกเชื้อ MG สายพันธุ์ F จากสายพันธุ์อื่น แต่ยังไม่สามารถแยกสายพันธุ์ ts-11, 6/85 และ S6 ออกจากกันได้ จึงต้องใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะแยกความแตกต่างอีกครั้งโดยเอนไซม์ *Acc*I ทำให้จำแนกสายพันธุ์ ts-11 ออกจาก 6/85 และ S6 ได้ และเอนไซม์ *ScrF*I สามารถจำแนก MG สายพันธุ์ 6/85 และ S6 ออกจากกันได้ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของเชื้อMG ที่เพาะแยกเชื้อได้จากตัวอย่างกับสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ ภายหลังจากการตัด

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด พบว่ารูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ไม่เหมือนกับสายพันธุ์อื่น จึงจำแนกเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่น

การศึกษาการเจริญของเชื้อ MG ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างเปรียบเทียบกับเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F พบว่า เชื้อ MG สายพันธุ์ F มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุด ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่นมีการเจริญที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง เชื้อ MG สายพันธุ์ S6 มีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่างกับวาสนา และคณะ (2537) พบว่า สายพันธุ์ S6 มีคุณสมบัติเจริญเติบโตได้ดีกว่าสายพันธุ์ท้องถิ่น ทั้งนี้ เนื่องจาก สายพันธุ์ท้องถิ่นที่ใช้อาจมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ทำการศึกษาครั้งนี้ เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการเจริญของเชื้อ MG ที่ทดสอบครั้งนี้อยู่ที่ประมาณ 3-4 วัน ซึ่งหลังจากนี้ปริมาณเชื้อจะเริ่มลดลง เนื่องจากค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดต่ำลง ซึ่งสังเกตได้จากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycoplasma broth (Frey's medium) เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มและ สีเหลืองตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ท้องถิ่นมีระยะเวลาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อนานกว่า สายพันธุ์ F เนื่องจากความสามารถในการเจริญที่แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์

ความไวในการทดสอบ SPA ขึ้นกับหลายปัจจัย รวมทั้ง ความผันแปรของคุณสมบัติแอนติเจนในการแสดงออก หรือโครงสร้างของแอนติเจนที่สำคัญบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ MG ระหว่างการเตรียมเชื้อ (Levisohn et al., 1995) การทดสอบ SPA โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมเอง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์พบว่า แอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด เนื่องจากให้ผลการทดสอบเหมือนกันกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์ทุกประการ (แอนติเจนเชิงพาณิชย์เป็นเชื้อ MG สายพันธุ์ S6) สอดคล้องกับ วาสนา และคณะ (2537) รายงานว่าแอนติเจนที่เตรียมจากสายพันธุ์ S6 ให้ผลการตรวจตรงกัน และชัดเจนเช่นเดียวกับแอนติเจนที่มีการ

จำหน่ายเชิงพาณิชย์ ในขณะที่ แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น และสายพันธุ์ F ก็มีความไว และความถูกต้องในระดับที่สูงมาก และมีค่าความจำเพาะของการทดสอบถึง 100%

การทดสอบ ELISA เปรียบเทียบระหว่างชุด ELISA ที่ผลิตเองโดยใช้เชื้อ MG ที่เตรียมเองทั้ง 3 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F) กับ ELISA เชิงพาณิชย์พบว่า ELISA MG สายพันธุ์ S6 ที่เตรียมเองมีค่าความไว ความจำเพาะ และค่าความถูกต้องอยู่ในระดับสูง ส่วนชุดทดสอบ ELISA MG ที่เตรียมเองสายพันธุ์ ท้องถิ่น และสายพันธุ์ F นั้นยังมีค่าผลลบเทียมอยู่มาก แต่ก็ยังให้ค่าความจำเพาะอยู่ในระดับสูง และมีค่าความถูกต้องที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน สอดคล้องกับผลการทดสอบความจำเพาะของชุดทดสอบ ELISA MG ที่เตรียมเองซึ่งไม่เกิดผลบวกข้ามกับซีรัมที่ให้ผลบวกต่อเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ MG รวมทั้ง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ Mycoplasma synoviae ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลให้ความจำเพาะในการทดสอบต่ำลง (Kleven, 1997) โดยแอนติเจนที่ใช้ในการเตรียมชุดทดสอบ ELISA จะเลือกเก็บในช่วงที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดซึ่งจะเป็นแอนติเจนที่ช่วยให้ความไวในการทดสอบสูงที่สุด (Lougnane et al., 1993) อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยครั้งนี้ขัดแย้งกับรายงานของ Noormohammdi และคณะ (2002) ที่พบว่า การใช้แอนติเจนชนิดเดียวกับเชื้อในพื้นที่ (Autologous antigens) ในการสำรวจทางซีโรโลยีจะช่วยเพิ่มความไวในการทดสอบแอนติบอดี

การทดลองทำ Real – time PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อ mgc2 gene บริเวณ cytadhesin protein สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งพบว่าเมื่อปริมาณ DNA copies ลดลง ค่า C_T จะเพิ่มขึ้น ซึ่งหมายถึงเมื่อปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อน้อยลง (สัมพันธ์กับปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนการสกัดดีเอ็นเอ) จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ต้องมากขึ้นจึงจะสามารถตรวจพบเชื้อได้ และเนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ใช้ชุดน้ำยาที่ใช้ Sybergreen เป็นตัวแสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงต้องยืนยันผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมายจากค่า melting temperature ซึ่งในการทดลองครั้งนี้มีค่า Tm เท่ากับ 84.5