

การวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ MG โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าของโปรตีนที่ได้มีหลายขนาด เนื่องจากนำเชื้อ MG แบบ whole cell มาศึกษา และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบของโปรตีนของ porcine serum ที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าโปรตีนที่ได้มีรูปแบบ และขนาดที่เหมือนกัน ทำให้เห็นได้ว่าแอนติเจนของเชื้อ MG ที่เตรียมเองในครั้งนี้ อาจมีโปรตีนของ porcine serum ปนอยู่บ้าง แต่จากผลการทดสอบก็แสดงให้เห็นว่า ยังไม่มีผลกระทบใดๆ อย่างไรก็ตามการพัฒนาชุดทดสอบก็ยังจำเป็นต้องทำให้แอนติเจนที่จะนำมาใช้ทดสอบบริสุทธิ์ก่อนการนำมาใช้ เพื่อให้ชุดทดสอบที่ผลิตนั้นมีประสิทธิภาพสูงสุด

การพัฒนาเทคนิคในการเตรียมชุดทดสอบ ELISA และ SPA ครั้งนี้ สามารถนำไปใช้สำหรับการตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในห้องปฏิบัติการ และในท้องที่ ตามลำดับ อันจะเป็นกลไกที่สำคัญประการหนึ่งในการควบคุมโรค ช่วยลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ และชุดทดสอบที่เตรียมได้เองก็มีราคาไม่แพง เป็นการลดภาระการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

- วาสนา แสงสุวรรณ อกัสสร วรราช และศุภลักษณ์ จันทร์อุดม. 2537. การเตรียมแอนติเจน มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติคัม สำหรับ Rapid Plate Agglutination Test. ว. สงขลานครินทร์. 16: 245-251.
- CFSPH (the center of food security and public health). 2007. <http://www.cfsph.iastate.edu/Species/poultry.php>
- Butcher, G.D. 2002. *Mycoplasma Gallisepticum* - A Continuing Problem in Commercial Poultry. The Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. pp. 1-2

- Christensen, N.H., Yavari, C.A., McBain, A.J. and Bradbury, J.M. 1994. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. Avian Pathol. 23: 127-143.
- Collett, S.R., Thomson, D.K., York, D. and Bisschop, S.P.R. 2005. Floor pen study to evaluate the serological response of broiler breeders after vaccination with ts-11 strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. Avian Dis. 49:133-137.
- Council Directive 90/539/EEC of 15 October 1990 on animal health conditions governing intra-community trade in, and imports from third countries of, poultry and hatching eggs. Official Journal L 303, 31/10/1990. p. 6-28.
- Fan, H.H., Kleven, S.H. and Jackwood, M.W. 1995. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 39: 729-735.
- Feberwee, A., von Bannisht-Wysmuller, Th., Vernooij, J.C.M., Gielkens, A.L.J. and Stegeman, J.A. 2006. The effect of vaccination with a bacterin on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Pathol. 35: 35-37.
- Garcia, M., Ikuta, N., Levisohn, S. and Kleven, S.H. 2005. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis. 49: 125-132.
- Glisson, J.R., Dawee, J.F. and Kleven, S.H. 1984. The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of non specific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 28: 397-405.

- Grodio, J.L., Dhondt, K.V., O'Connell, P.H. and Schat, K.A. 2008. Detection and quantification of *Mycoplasma gallisepticum* genome load in conjunctival samples of experimentally infected house finches (*Carpodacus mexicanus*) using real-time polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 37: 385-391.
- Guanson, J.E., Phillip, C.J., Whithear, K.G. and Browning, G.F. 2000. Lymphocytic infiltration in the chicken trachea in response to *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Microbiol.* 146: 1223-1229.
- Hnatow, L.L., Keeler, C.L., Tessmer, L.L., Czymmek, K. and Dohms, J.E. 1998. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect. and Immunity.* 66: 3436-3442.
- Hong, Y., Garcia, M., Levisohn, S., Savelkoul, P., Leiting, V., Lysnyansky, I., Ley, D.H. and Kleven, S.H. 2005. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Dis.* 49: 43-49.
- Kempf, I., Gesbert, F., Guittet, M., Bennejean, G. and Stripkovits, L. 1994. Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies. *Avian Pathol.* 23: 329-338.
- Kempf, I. and Gesbert, F. 1998. Comparison of serological tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens. *Vet. Microbiol.* 60: 207-213.

- Kleven, S.H. 1990. Fingerprinting of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from multiple-age layers vaccinated with live F strain. *Avian Dis.* 34: 984-990.
- Kleven, S.H. 1994. Avian mycoplasmas. In: *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. H.W. Whiteford, R.F. Rosenbusch and L.H. Lauerman eds. Iowa State University Press, Ames. pp.31-38.
- Kleven, S.H. 1997. Changing expectations in the control of *Mycoplasma gallisepticum*. *Acta Vet. Hung.* 45: 299-305.
- Kleven, S.H. 1998. Mycoplasmosis. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4th edition. Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. and Reed, W.M. (eds). Kennett Square: American Association of Avian Path. 74-80.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lam, K.M. 2004. Morphologic changes in chicken cells after in vitro exposure to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 48: 488-493.
- Lauerman, L.H., Chilina, A.R., Closser, J.A. and Johansen, D. 1995. Avian mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 39:804-811.
- Levisohn, S. and Kleven, S.H. 2000. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19: 425-442.

- Levisohn, S., Rosengarten, R. and Yogev, D. 1995. In vivo variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Vet. Microbiol.* 45: 219-231.
- Ley, D.H. 2003. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Diseases of Poultry. Edited by Y.M. Saif, H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald and D.E. Swayne. Iowa State Press, Ames, Iowa. pp. 722-744.
- Ley, D.H., McLaren, J.M., Miles, A.M., Barnes, H.J., Miller, S.H. and Franz, G. 1997. Transmissibility of live mycoplasma *gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.* 41:187-194.
- Liu, T., Garcia, M., Levisohn, S., Yogev, D., AND Kleven, S. H. 2001. Molecular variability of the Adhesin-encoding Gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strain and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1882-1888.
- Loughnane, J.P., Bradbury, J.M. and Jordan, F.T.W. 1993. Effect of duration of incubation of *Mycoplasma gallisepticum* culture on the sensitivity and specificity of antigens for ELISA and microimmunofluorescence tests. *Avian Pathol.* 22: 455-468.
- Marois, C., Dufour-Gesbert, F. and Kemf, I. 2002. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.* 31: 163-168.
- Mohammed, O.H., Yamamoto, R., Carpenter, T.E. and Ortmayer, H.B. 1985. Comparison of egg yolk and serum for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 30: 398-408.

- Moscoso, H., Thayer, S.G., Hofacre, C.L. and Kleven, S.H. 2004. Inactivation, storage and PCR detection of mycoplasma on FTA[®] filter paper. *Avian Dis.* 40: 841-850.
- Nascimento, E.R., Yamamoto, R., Herrick, K.R and Tait, R.C. 1991. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 35: 62-69.
- Noormahammadi, A.H., Jones, J.F., Underwood, G. and Whithear, K.G. 2002. Poor systemic antibody response after vaccination of commercial broiler breeders with *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 not associated with susceptibility to challenge. *Avian Dis.* 46: 623-628.
- OIE, 2008. Avian mycoplasmosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6th edition. pp. 482-496.
- Pakpinyo, S., Pitayachamrat, P., Saccavadit, S., Santaswang, T., Tawatsin, A., Sasipreeyajan, J. 2006. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection in experimental layer chicken receiving MG vaccines and MG organisms. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 36: 29-37.
- Papazisi, L., Gorton, T.S., Kutish, G., Markham, P.F., Browning, G.F., Nguyen, D.K., Swartzell, S., Madan, A., Mahairas, G. and Geary, S.J. 2003. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R_{low}. *Microbiol.* 149: 2307-2316.
- Rosenbusch, R.F. 1994. Biology and taxonomy of the mycoplasmas. In: *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory diagnosis*. Edited by H.W. Whiteford, R.F. Rosenbusch and L.H. Lauerma. Iowa State University Press, Ames. pp. 3-11.

- Ross, T., Slavik, M., Bayari, G. and Skeeles, J. 1990. Elimination of mycoplasma plate agglutination cross reactions in sera from chickens inoculated with infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 34: 663-667.
- Stipkovits, L. 2001. Development in mycoplasma infection: diagnosis and control. In: Proceedings XII International Congress of the World Veterinary Poultry Association. Edited by A.A. Sami Ahmed, M.M.Z. Sabry, Y.I. Uousef, A.A. El-Gohary and M.M. Hashim. The Egyptian Branch of the World Veterinary Poultry Association. pp. 50-58.
- Thorne Steinlage, S.J., Ferguson, M., Sander, J.E., Garcia, M., Subramanian, S., Leiting, V.A. and Kleven, S.H. 2003. Isolation and characterization of a 6/85-like *Mycoplasma gallisepticum* from commercial laying hens. *Avian Dis.* 47: 499-505.
- Wanasawaeng, W., Nimitkun, C. and Chansiripornchai, N. 2006. Current knowledge of avian mycoplasmosis. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 57: 1-22.
- Wang, C., Ewing, M. and A'Arabi, S.Y. 2001. *In vitro* susceptibility of avian Mycoplasmas to enrofloxacin, sarafloxacin, tylosin, and oxytetracycline. *Avian Dis.* 45:456-460.
- Whithear, W.G. 1996. Control of avian mycoplasmosis by vaccination. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15 : 1527-1553.

ภาคผนวก ก

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mycoplasma broth (Frey's medium) (Whitford et al., 1994)

Mycoplasma broth base	22.5	กรัม
Dextrose	3.0	กรัม
Swine serum*	120.0	มิลลิลิตร
Cystein hydrochloride	0.1	กรัม
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	0.1	กรัม
Phenol red (1%)	2.5	มิลลิลิตร
Thallium acetate (10%)	5.0	มิลลิลิตร
Penicillin G potassium	1,000,000	units
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดยกเว้น Swine serum, Cystein hydrochloride, NAD และ Penicillin G potassium ปรับ pH ด้วย 20% NaOH ให้ได้ 7.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเติม Swine serum, Cystein hydrochloride, NAD และ Penicillin G potassium

* Swine serum ต้องนำไป Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

2. Mycoplasma Agar (Whitford et al., 1994)

Mycoplasma broth base	22.5	กรัม
Dextrose	3.0	กรัม
Swine serum	120.0	มิลลิลิตร
Cysteine hydrochloride	0.1	กรัม
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	0.1	กรัม
Thallium acetate (10%)	5.0	มิลลิลิตร
Penicillin G potassium	1,000,000	units
Agar	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดยกเว้น Swine serum, Cysteine hydrochloride, NAD และ Penicillin G potassium ปรับ pH ด้วย 20% NaOH ให้ได้ 7.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเติม Swine serum, Cysteine hydrochloride, NAD และ Penicillin G potassium

* Swine serum ต้องนำไป Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

3. Fluid Thioglycolate medium

Thioglycollate medium	29.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 6.9 - 7.3 ต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สูตรการเตรียมสารเคมี

1. 1% Crystal violet

- Crystal violet	1	กรัม
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	100	มิลลิลิตร

2. 5X TBE

-Tris base	13.5	กรัม
-Boric acid	6.85	กรัม
-0.5M EDTA (pH 8.0)	5.0	มิลลิลิตร
-น้ำกลั่นปลอดประจุ	245	มิลลิลิตร

3. 0.5X TBE

-5X TBE	10	มิลลิลิตร
-น้ำกลั่นปลอดประจุ	90	มิลลิลิตร

4. Agarose gel 1%

- Agarose	1	กรัม
- 0.5X TBE	100	มิลลิลิตร

5. Agarose gel 2%

-Agarose	2	กรัม
-0.5X TBE	100	มิลลิลิตร

6. Agarose gel 3%

-Agarose	3	กรัม
-0.5X TBE	100	มิลลิลิตร

7. 0.05 M Carbonates-bicarbonate Buffer

- Carbonate – bicarbonate	1	แคปซูล
-น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วนำไปปรับ pH 9.6

8. 0.1 M PBS (pH 7.5)

- Na_2HPO_4	12.02	กรัม
- KH_2PO_4	2.09	กรัม
-น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นแล้วนำไปปรับ pH 7.5 นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนี้ อุดหนุนมี 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Blocking Solution (BSA 1%)

- BSA	1	กรัม
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	100	มิลลิลิตร

10. Washing buffer

- NaCl	8.0	กรัม
- KH_2PO_4	0.2	กรัม
- Na_2HPO_4	1.15	กรัม
- KCl	0.2	กรัม
- Tween-20	0.5	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายสารเคมีในน้ำกลั่น ปรับ pH 9.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Stop solution

-85% Phosphoric acid	5.7	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	44.3	มิลลิลิตร

12. Stacking gel 4 %

-40% Acrylamide	0.48	มิลลิลิตร
-2% Bis- Acrylamide	0.26	มิลลิลิตร
-0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.26	มิลลิลิตร
-10% SDS	50	ไมโครลิตร
-น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.92	มิลลิลิตร

13. Separating gel 12 %

-40% Acrylamide	2.912	มิลลิลิตร
-2% Bis- Acrylamide	1.608	มิลลิลิตร
-1.5 โมลาร์ Tris-HCl pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
-10% SDS	0.10	มิลลิลิตร
-น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.83	มิลลิลิตร

14. 1.5M Tris-HCl

-Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	181.71	กรัม
- น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Trisma base น้ำกลั่น ปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เข้ากัน และวัด pH ให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำกลั่นจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. 0.5M Tris-HCl pH 6.8

-Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	60.57	กรัม
----------------------------------	-------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 6.8 เติมน้ำกลั่นจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

16. Sodium Dodecyl Sulfate 10 %

-Sodium Dodecyl Sulfate	10	กรัม
-------------------------	----	------

-น้ำกลั่นปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร
--------------------	-----	-----------

ชั่ง Sodium Dodecyl Sulfate (ปฏิบัติในตู้ดูดควัน) น้ำหนัก 10 กรัม ละลายในน้ำ ปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

17. Ammonium persulfate 10%

-Ammonium persulfate	100	มิลลิกรัม
----------------------	-----	-----------

-น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร
-----------------------------	---	-----------

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป 1 มิลลิลิตร ละลายจนหมด

18. สารละลาย 10X อิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

-Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	30	กรัม
- Glycine	145	กรัม
-SDS	10	กรัม

แยกละลายสารทั้งสามชนิดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมารวมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

19. 2X Laemmli buffer

-กลีเซอรอล (87%)	2.29	มิลลิลิตร
- Tris-HCl pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
-น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.71	มิลลิลิตร
-Bromphenol blue	0.001	กรัม
-10% SDS	4	มิลลิลิตร

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน และนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ให้ผสม 2-Mercaptoethanol ในอัตราส่วน สารละลาย 950 ไมโครลิตร ต่อ 50 ไมโครลิตร 2-Mercaptoethanol

20. สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

-Coomassie brilliant blue R 250	2	กรัม
-Ethanol	400	มิลลิลิตร
-Acetic acid	100	มิลลิลิตร



ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปแช่ยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

21. สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining solution)

-Ethanol	400	มิลลิลิตร
-Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

