ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245520

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การพัฒนาวิธีทดสอบอีไลซาและวิธีทดสอบการตกตะกอนของซีรัมต่อมัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม

โดย
นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย
วิษณุ วรรณแสวง
เสาวลักษณ์ อรรคนิวาส
สุภาวดี ชัยโชติ

กุมภาพันธ์ 2555

b00250525

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245520

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การพัฒนาวิธีทดสอบอีไลซาและวิธีทดสอบการตกตะกอนของซีรัมต่อมัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม

โดย
นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย
วิษณุ วรรณแสวง
เสาวลักษณ์ อรรคนิวาส
สุภาวดี ชัยโชติ

กุมภาพันธ์ 2555

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2552 สัญญาเลขที่ R_013_2552 คณะผู้ทำวิจัยขอขอบพระคุณ อ.วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์ อ.สุรชัย งามรัตนไพบูลย์ และภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการเตรียมแอนติเจน

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาวิธีทดสอบอีไลซา และวิธีทดสอบการตกตะกอนของซีรัมต่อเชื้อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม*

ชื่อผู้วิจัย 1. รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
2. รศ.น.สพ.ดร.ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย
3. น.สพ.ดร.วิษณุ วรรณแสวง
4. น.ส.เสาวลักษณ์ อรรคนิวาส
5. น.ส.สุภาวดี ชัยโชติ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ตุลาคม 2553

บทคัดย่อ

245520

การวิจัยครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีทดสอบอีไลซา (ELISA) และวิธีทดสอบการตกตะกอน (SPA) ของซีรัมต่อเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* (MG) โดยเปรียบเทียบทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ตามวิธี PCR-RFLP แล้วนำแต่ละสายพันธุ์เลี้ยงเพิ่มจำนวนผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ Frey's medium และปั่นเหวี่ยง เพื่อเตรียมแอนติเจนสำหรับการทดสอบตามวิธี SPA และ ELISA โดยเปรียบเทียบกับชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ ผลการทดสอบของวิธี SPA ของ MG สายพันธุ์ S6 มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลบวกเทียม และไม่มีผลลบเทียม ส่วนผลการทดสอบ ELISA ที่เคลือบเพลทด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ S6 พบว่ามีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องเท่ากับ 96, 95 และ 95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่สายพันธ์ท้องถิ่น และสายพันธ์ F มีค่าความจำเพาะมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าความถูกต้องอยู่ระหว่าง 70-80 เปอร์เซ็นต์ ค่าความไวน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และผลลบเทียมมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ กล่าวโดยสรุป MG-S6 มีความเหมาะสมสำหรับการพัฒนาวิธี การทดสอบ ELISA และ SPA มากกว่าสายพันธุ์ F และสายพันธุ์ท้องถิ่น

คำสำคัญ : *Mycoplasma gailisepticum*, สายพันธุ์ S6, สายพันธุ์ F, สายพันธุ์ท้องถิ่น, ELISA, SPA

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title	Development of ELISA and The Serum Plate agglutination test (SPA) for detecting antibodies of *Mycoplasma gallisepticum*
Name of the Investigator	1. Assoc.Prof.Dr.Niwat Chansiripornchai 2. Assoc.Prof.Dr.Piyarat Chansiripornchai 3. Dr.Wisanu Wanasawaeng 4. Miss Saowaluck Akkhaniwas 5. Miss Supawadee Chaichote
Year	October 2010

Abstract

245520

This study aimed to develop ELISA and SPA tests of sera against *Mycoplasma gallisepticum* (MG). The 3 strains (field, S6 and F) were classified by PCR-RFLP and were cultured in Frey's medium. The culture were centrifuged and collected to prepare the antigen of SPA and ELISA. The tests were compared with commercial kits. The SPA test of S6 strain revealed the best efficacy of 100% sensitivity, specificity and accuracy. No false positive and false negative had been found comparing to the commercial test kit. The coated ELISA test of S6 revealed 96, 95 and 95% of sensitivity, specificity and accuracy, respectively. The field and F strains revealed more than 90% specificity, 70-80% accuracy and less than 70% sensitivity. The false negative of these strains was more than 30%. In conclusion, MG-S6 strain was the most suitable to be developed the ELISA and SPA tests than the F and field strains.

Keyword(s) : *Mycoplasma gallisepticum*, S6, F, field Isolates, ELISA, SPA

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iv
สารบัญ	v
สารบัญภาพ	viii
สารบัญตาราง	x
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาในการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ชีววิทยา และอนุกรมวิธานของเชื้อมัยโคพลาสมา	4
2.2 พยาธิชีววิทยาของเชื้อ MG	9
2.3 การวินิจฉัยโรค	10
2.4 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อ MG	17
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 อุปกรณ์	20
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง	26
3.2.1 การเตรียมตัวอย่างโดยการรวบรวมซีรัมจากฟาร์ม	26
3.2.2 การแยกเชื้อ MG สายพันธุ์ในท้องถิ่น	26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.3 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ MG 31

3.2.4 การเตรียมแอนติเจน 31

3.2.5 การทดสอบด้วยวิธี SPA 33

3.2.6 การทดสอบด้วยวิธี ELISA 34

3.2.7 การทำ Quantitative Real - time PCR 36

3.2.8 การวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ MG โดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 38

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมตัวอย่างโดยการรวบรวมซีรัมจากฟาร์ม 40

4.2 ผลการแยกเชื้อ MG สายพันธุ์ในท้องถิ่น 43

4.3 ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ MG 47

4.4 ผลการเตรียมแอนติเจน 52

4.5 ผลการทดสอบด้วยวิธี SPA 53

4.6 ผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA (indirect method) 63

4.7 ผลการทำ Quantitative Real - time PCR 70

4.8 ผลการวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ MG โดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 71

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล 73

บรรณานุกรม 76

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 83

ภาคผนวก ข 86

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 อนุกรมวิธานของเชื้อมัยโคพลาสมา 5

ภาพที่ 2. แผนผังวงกลมแสดงจีโนมของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* สายพันธุ์ R_{low} 8

ภาพที่ 3. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมัยโคพลาสมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 15

ภาพที่ 4. Gel electrophoresis ของการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* 43
ด้วย Primer pvpA1F sense และ pvpA2R anti-sense

ภาพที่ 5. Gel electrophoresis ของการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ AccI 45

ภาพที่ 6. Gel electrophoresis ของการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ScrFI 46

ภาพที่ 7. ลักษณะโคโลนีเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่นบน Mycoplasma agar 47
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X

ภาพที่ 8. ลักษณะโคโลนีเชื้อ MG F vaccine บน Mycoplasma agar 48
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X

ภาพที่ 9. ลักษณะโคโลนีเชื้อ MG S6 strain บน Mycoplasma agar 48
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X

ภาพที่ 10. ลักษณะเชื้อ MG ภายหลังการย้อมด้วยสี Giemsa stain 49
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X

ภาพที่ 11. กราฟการเจริญของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* 50

ภาพที่ 12. กราฟมาตรฐานของโปรตีน (BSA) วัดโดยวิธี Bradford 52

ภาพที่ 13. แอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่นตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก 55

ภาพที่ 14. แอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่นไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ 55

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 15. แอนติเจนสายพันธุ์ S6 ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก 56

ภาพที่ 16. แอนติเจนสายพันธุ์ S6 ไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ 56

ภาพที่ 17. แอนติเจนสายพันธุ์ F ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก 57

ภาพที่18. แอนติเจนสายพันธุ์ F ไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ 57

ภาพที่ 19. แอนติเจนเชิงพาณิชย์ ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลบวก 58

ภาพที่ 20. แอนติเจนเชิงพาณิชย์ ไม่ตกตะกอนกับซีรัมควบคุมผลลบ 58

ภาพที่ 21. ผลการทำ Real time PCR ของเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 70

ภาพที่ 22 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE 72

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. คุณสมบัติของเชื้อมัยโคพลาสมาในสัตว์ปีก 6

ตารางที่ 2. ตำแหน่งของไพร์เมอร์ในยีนเป้าหมาย และขนาดของเป้าหมาย 17

ตารางที่ 3. ส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา PCR 28

ตารางที่ 4. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา RFLP 30

ตารางที่ 5. แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Real time PCR 36

ตารางที่ 6. ส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา Real time PCR 37

ตารางที่ 7. ตัวอย่างซีรัมฟาร์มไก่พันธุ์ 41

ตารางที่ 8. ตัวอย่างซีรัมฟาร์มไก่เนื้อ 42

ตารางที่ 9. ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไปในช่วงเวลาต่างๆ 51

ตารางที่ 10. แสดงผลการทดสอบ MG serum plate agglutination 54

ตารางที่ 11. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบ 59
โดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์

ตารางที่ 12. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบ 60
โดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์

ตารางที่ 13. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบ 61
โดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ F เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์

ตารางที่ 14. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบ 62
โดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 15 แสดงค่า S/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน MG สายพันธุ์ S6 และคอนจูเกตที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA 63

ตารางที่ 16 แสดงค่า S/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น และคอนจูเกตที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA 64

ตารางที่ 17 แสดงค่า S/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน MG สายพันธุ์ F และคอนจูเกตที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA 64

ตารางที่ 18. แสดงค่าเฉลี่ย O.D.ของ MG ELISA ที่เตรียมเอง สายพันธุ์ S6 ทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวก/ลบของเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ MG 65

ตารางที่ 19. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะของวิธีทดสอบ โดยใช้แอนติเจน MG สายพันธุ์ท้องถิ่น เปรียบเทียบกับแอนติเจนเชิงพาณิชย์ 66

ตารางที่ 20. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะ ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA MG สายพันธุ์ S6 เปรียบเทียบกับ ELISA เชิงพาณิชย์ 67

ตารางที่ 21. ค่าความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะ ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA MG สายพันธุ์ F เปรียบเทียบกับ ELISA เชิงพาณิชย์ 68

ตารางที่ 22. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทดสอบด้วยวิธี ELISA MG สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F 69

ตารางที่ 23. แสดงปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ MG S6 ค่า C_t และ melting temperature ภายหลังจากการทำปฏิกิริยา Real time PCR 70