

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 24 ฉบับที่ 1-2 มี.ค. - ก.ย. 2558

สารบัญ

- จากกองบรรณาธิการ 6
- เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant ชนิดต่างๆ ในการเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃ 7
สุกิจ ประทุมชัย ธนรัตน์ จานุกิจ
- การสำรวจทางซีรัมวิทยาของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในช้างในประเทศไทย 20
ดิลก อ้วนพรมมา วิไล ถินจงสุขงกช กณัฐณ์ บุญมั่งมีปภา
ภัทร เจริญพันธ์ วีรศักดิ์ ปิ่นดาวงศ์ เทิดศักดิ์ ฉญาโน
- การตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* ใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ real-time 32
สายพิน ชุมทรัพย์ อนุรักษ์ ตระการรังสี
- การพัฒนาวิธี indirect ELISA สำหรับตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ 50
อารีรัตน์ แพงเพ็ง สายพิน ชุมทรัพย์

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 24 No. 1-2 Mar-Sep 2015

Contents

- **The editorial** 6

- **Comparison of the efficacy of different cryoprotectants in BHK₂₁C₁₃ cells storage** 7
Sukit Prathumchai Thanarat Janukit

- **Serosurveillance of foot and mouth disease virus in elephants in Thailand** 20
Dilok Ounpomma Wilai Linchongsubongkoch Kananut Bunmungmeepapha
Patara Charoenphan Weerasak Pintawong Terdsak Yano

- **Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in allantoic fluid using for live Newcastle disease, La Sota strain, vaccine production by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)** 32
Saipin Khumsab Anuruk Trakanrungsee

- **Development of indirect ELISA for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in specific pathogen-free (SPF) chicken** 50
Areerat Pangpeng Saipin Khumsap

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

<http://biologic.dld.go.th>

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านชีวผลิตภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้ชีวผลิตภัณฑ์
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	นิเทศ	เลิศลิ้มชลาลัย	Advisory board	Niteth	Lertlimchalalai
บรรณาธิการ	รัชณี	อรรถิ	Editor	Ratchanee	Atthi
หัวหน้ากองบรรณาธิการ	สหาวัชร	อึ้งวนิชบรรณ	Editorial director	Sahawatchara	Ungvanijban
กองบรรณาธิการ	วิไล	ลินจงสุขบงกช	Editorial board	Wilai	Linchongsubongkoch
	จารุณี	สาตรา		Jarunee	Satra
	นพพร	พัฒนประสิทธิ์		Nopporn	Patanaprasit
	กมลทิพย์	ชัยพิมล		Kamonthip	Thunpimon
	วรพร	ปัฐงเนิน		Woraporn	Poosungnoen
ฝ่ายจัดการวารสาร	สมเกียรติ	เลิศวิมลลักษณ์	Manager	Somkiat	Lerdwimonluk

สำนักงาน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 123 โทรสาร 0-4431-5931	Office:	Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand 30130 Tel. 0-4431-1476 extension 123 Fax. 0-4431-5931
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ เดือนมีนาคม และกันยายน	Publications:	Twice a year in March and September

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน

1. เรื่องที่จะนำลง

- 1.1 ผลงานวิจัย (Research article) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง มีการกำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน มีการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการวิจัย อันนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิชาการ
- 1.2 บทความทางวิชาการ (Technical article) เป็นงานเขียนขนาดสั้น ซึ่งมีการกำหนดประเด็นที่ชัดเจนโดยผู้เขียนเรียบเรียงจากผลงานทางวิชาการของตนเอง หรือของผู้อื่นในลักษณะที่เป็น การวิเคราะห์ วิจัย หรือเสนอแนวความคิดใหม่ ๆ จากพื้นฐานทางวิชาการนั้นๆ ที่รวบรวม ข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ ของผู้เขียน
- 1.3 บทความปริทรรศน์ (Review article) คือบทความที่รวบรวมผลงาน หรือแนวคิดเรื่องใดเรื่อง หนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์มาแล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจัย เพื่อให้เกิดความกระจ่าง ในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น
- 1.4 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะกรรมการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

2. การจัดทำต้นฉบับ

- 2.1 ต้นฉบับที่จะเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ต้องได้รับการอนุมัติให้เผยแพร่จากต้นสังกัด และ ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่หรืออยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในสื่ออื่น
- 2.2 การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ
 - 2.2.1 ตัวพิมพ์ ใช้ตัวอักษร Angsana New แบบปกติ ขนาด 15 ชื่อหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจัย สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 17 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา ขนาด 15
 - 2.2.2 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ใช้กระดาษ A4 พิมพ์หน้าเดียว จำนวนไม่เกิน 10 หน้า
 - 2.2.3 การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ ด้านบนที่ 6.5 ซม. และด้านซ้ายที่ 4.5 ซม. ส่วนด้านขวาและล่างที่ 1.5 ซม.
 - 2.2.4 การลำดับหน้า ใช้หมายเลข 1,2,3..... ที่กึ่งกลางหน้า ด้านบน และใช้ตัวอักษรปกติ ขนาด 15

2.2.5 ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ตาราง ระบุเลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) ให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทย ทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด ถ้าตารางมีความยาวเกิน 1 หน้า ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ) คำบรรยายตารางให้เขียนไว้ด้านบนของตาราง
- รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และทำเช่นเดียวกับตาราง แต่คำบรรยายให้เขียนไว้ด้านล่าง

2.2.6 การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) พิมพ์ด้วยตัวเอน เช่น *Escherichia coli* ในกรณีไม่ระบุชื่อสปีชีส์หรือต้องการกล่าวถึงหลายสปีชีส์ เช่น *Salmonella* spp.

3. ต้นฉบับเพื่อพิจารณาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์

- 3.1 จัดทำต้นฉบับผลงานทางวิชาการ (original manuscript) และสำเนา (photocopied manuscript) อีกจำนวน 3 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกไฟล์ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ที่ระบุรายละเอียดชื่อผลงาน ชื่อเจ้าของผลงาน และที่อยู่พร้อมเบอร์โทรศัพท์
- 3.2 ส่งต้นฉบับทั้งหมดพร้อมเอกสารนำส่งถึง
กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 122, 123 โทรสาร 0-4431-5931
- 3.3 ไม่ส่งคืนต้นฉบับ
- 3.4 ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาจะมีใบตอบรับให้เจ้าของผลงาน และจะแจ้งผลการพิจารณาให้ทราบภายใน 2 เดือน
- 3.5 ผลงานทางวิชาการที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสาร เจ้าของผลงาน (เฉพาะชื่อแรก) จะได้รับวารสารชีวผลิตภัณฑ์ จำนวน 1 เล่ม พร้อม reprint จำนวน 5 ชุด

4. การลำดับเรื่อง

- 4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี
- 4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก พิมพ์เป็นเชิงอรรถ

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) สั้นได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมด โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลองความยาวไม่ควรเกิน 15 บรรทัด ภาษาไทยและภาษาอังกฤษเขียนแยกหน้า

4.4 คำสำคัญ (Key words) คำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ไม่เกิน 5 คำสำคัญ โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับผลงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ (Introduction) บรรยายถึงความเป็นมาและวัตถุประสงค์ รวมทั้งควรมีการทบทวนวรรณกรรม (literature review) ประกอบ

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกัน ควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นชื่อการค้าให้ทำเป็นเชิงอรรถ

4.5.3 ผล (Results) บรรยายผลการทดลองให้เข้าใจง่าย อาจเสนอเป็นตาราง รูปภาพ หรือกราฟ พร้อมคำบรรยายประกอบ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) วิจารณ์ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง เพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น เน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง และการนำผลไปใช้ให้เป็นประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านเข้าใจได้ง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ระบุแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมือ อุปกรณ์ และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง

1. วารสารหรือหนังสือ เมื่ออยู่ต้นประโยค เช่น นพพร (2539), Lin and Lee (1981) เมื่ออยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (วิลและคณะ, 2532; Kumakai *et al.*, 1961) กรณีสื่ออ้างอิงเอกสารหลายเรื่องทีเขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีทีพิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีทีพิมพ์สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีทีพิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น เจือ และคณะ (2516ก), Katz (1984a)
2. บุคคลหรือข้อมูลที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปรวมในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Layton, R. B. and

Weathers, C. C., unpublished data),for other bacteria (Jones, A. X., personal communication)

3. เอกสารที่หน่วยงานเป็นผู้จัดทำ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างถึงครั้งแรก และระบุชื่อย่อที่เป็นทางการหลังเครื่องหมายจุลภาค (,) การอ้างถึงครั้งต่อไปให้ใช้ชื่อย่อนั้น กรณีที่ไม่มีชื่อย่อ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ศ.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง เริ่มจากเอกสารอ้างอิงภาษาไทยเขียนเรียงตามลำดับพยานของผู้อ่าน เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษเขียนเรียงลำดับชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้อ่าน

- 1) วารสาร ระบุชื่อผู้เขียน ตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่ อ้างถึง เช่น

สายพิน ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์ และจาตุรนต์ พลราช 2544 การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 11(1-2): 27-35

Johnson, R. H. and Collings, D. F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.

กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น

Carter, G. R. 1963a. A discussion of recent developments relating to *Pasteurella hemolytica* with special reference to strains pathogenic for cattle. Can. Vet. J. 4(7): 170-174.

Carter, G. R. 1963b. Immunological differentiation of type B and E strains of *Pasteurella multocida*. Can. Vet. J. 4(3): 61-63.

- 2) หนังสือ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง บรรณาธิการ (ถ้ามีบรรณาธิการหลายคนให้อ้างทุกคน) ชื่อหนังสือ ครั้งที่พิมพ์ สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ ประเทศ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง สำหรับหนังสือภาษาอังกฤษ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. เช่น

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ 2543 ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 81

ไพโรจน์ จ้วงพานิช 2520 โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา ใน เกษม สุขสถาน และอุดม พูลเกษ
บรรณาธิการ หลักการทำไร้อ้อย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
หน้า 141-145

Office International des Epizooties. 2000. Principles of Veterinary Vaccine
Production. In Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th
ed. OIE. Paris, France. p. 42.

Dutta, S. K., Shankarappa, B. and Mattingly-Napier, B. 1991. Antigenic analysis of
Ehrlichia risticii isolates. In Plowright, W., Rossdale, P. D., Wade, J. F. (ed.),
Equine Infectious Diseases VI Proceedings of the Sixth International Conference
7-11 July 1991. R&W Publication (Newmarket) Limited. Suffolk, UK.
pp. 61-65.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In Leman, A. D. (ed.), Diseases of
Swine, 6th ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 293-297.

3) เว็บไซต์ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ (ถ้ามี) แหล่งที่มาและวันที่
เข้าถึง เช่น

จันทร์หาเป็นดุ่ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึงพิศ ดุลยพัชร 2541
อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา
<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm> 27 มีนาคม 2541

Boscos, C. M. 2004. Canine TVT: Clinical findings, Diagnosis and Treatment. The
29th World Congress of the World Small Animal Veterinary
Association. 6-9 October 2004. Rhodes, Greece. Available from
<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx> [Accessed 10 January 2006].

จากกองบรรณาธิการ

เรียนนักวิชาการและผู้สนใจทุกท่าน ความพยายามในการจัดทำวารสารชีวผลิตภัณฑ์เพื่อให้สามารถออกได้ปีละ 2 ฉบับยังไม่เป็นผลสำเร็จจึงทำให้วารสารปีที่ 24 มีเพียงฉบับนี้ฉบับเดียว ด้วยข้อจำกัดของจำนวนบทความและผลงานทางวิชาการที่ส่งเข้ามายังกองบรรณาธิการมีจำนวนน้อยมาก อย่างไรก็ตามเนื้อหาภายในวารสารจะยังคงเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการจัดทำวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ในฉบับนี้ เนื้อหาประกอบด้วยผลงานที่เกิดจากการวิจัยและทดลองของนักวิชาการที่ทำงานด้านชีวผลิตภัณฑ์ ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และความร่วมมือของนักวิชาการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้กับหน่วยงานต่างๆ รวมทั้งสิ้น จำนวน 4 เรื่อง ซึ่งที่มาของการดำเนินงานทดลองเกิดจากความต้องการทราบข้อมูลต่างๆ เพื่อแก้ไขปัญหาหรือประกอบการปรับปรุงกระบวนการทำงานในส่วนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งนอกจากใช้แก้ไขปัญหในการดำเนินงานแล้วยังเกิดองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่องานด้านอื่นที่อาจนำมาดัดแปลงได้

กองบรรณาธิการขอขอบคุณผู้อ่านที่ยังให้ความสนใจและหวังว่าวารสารชีวภัณฑ์สัตว์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิชาการของนักวิชาการและเป็นข้อมูลแก่ผู้เกี่ยวข้องและผู้สนใจทุกท่าน

ขอขอบคุณ

สพ.ญ. รัชณี อัดติ

บรรณาธิการ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant ชนิดต่างๆ ในการเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃

สุกิจ ประทุมชัย¹ ธนรัตน์ จานุกิจ¹

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant 2 ชนิด คือ Glycerol (G) และ Ethylene glycol (EG) ที่ความเข้มข้น 2.5%, 5%, 7.5% และ 10% เปรียบเทียบกับ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ในการเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ชนิดแขวนลอย ที่อุณหภูมิ -196 °C มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสาร cryoprotectant ชนิดอื่นมาใช้ทดแทน DMSO โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร cryoprotectant หลังผสมกันนาน 30 นาทีและ 1 ชั่วโมง หาค่าการมีชีวิต อัตราการรอดชีวิตและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังเก็บแช่แข็งนาน 1 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ของ 10% DMSO ไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ และมีความเป็นพิษสูงกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง และเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็งนาน 1 สัปดาห์ของ 10% G มีค่าต่ำกว่าทุกๆ กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่ 5% G, 5% EG และ 10% EG มีค่าสูงกว่า 10% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สำหรับค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตพบว่า เซลล์ที่เก็บในสาร cryoprotectant ทุกกลุ่ม ยกเว้นใน 10% G มีค่าสูงกว่าใน 10% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การศึกษานี้สรุปได้ว่าการเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ชนิดแขวนลอย ที่อุณหภูมิ -196 °C สามารถใช้ G ที่ความเข้มข้น 2.5-7.5% โดยปริมาตร และ EG ที่ความเข้มข้น 2.5-10% โดยปริมาตร ทดแทนการใช้ DMSO ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร นอกจากนี้สารที่เหมาะสมและช่วยลดต้นทุนการเก็บรักษาเซลล์ได้ดีที่สุด คือ EG ที่ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร

คำสำคัญ: สาร cryoprotectant, Dimethyl sulfoxide, Glycerol, Ethylene glycol การเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ใช้เซลล์ BHK₂₁C₁₃ ชนิดแขวนลอย ในการเพาะเลี้ยงไวรัส และมีการเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -196 °C เพื่อการใช้ในระยะเวลา โดยเก็บรักษาใน Growth medium for suspension cell (GMS) ที่มี Fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 20% โดยปริมาตร และใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร เป็นสาร cryoprotectant

สาร cryoprotectant แบ่งเป็น 2 ประเภทตามคุณสมบัติการทำงาน ได้แก่ 1) ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สามารถซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง และการฉีกขาดของเซลล์จากภายใน เช่น DMSO, Glycerol (G) และ Ethylene glycol (EG) เป็นต้น 2) ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ แต่จะช่วยป้องกันการทำลายเซลล์จากผลึกน้ำแข็งที่เกิดจากกระบวนการแช่แข็ง และมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการเปลี่ยนความดันออสโมซิส (Osmotic pressure) อย่างฉับพลันระหว่างการแช่แข็ง และละลายน้ำแข็งได้ เช่น ซูโครส ทรีฮาโลส และเดกโตรส เป็นต้น ซึ่งสารประเภทนี้ ถ้าใช้เดี่ยวๆ จะทำให้เซลล์มีชีวิตหลังละลายน้อย (Janz *et al.*, 2012) ทั้งนี้ ในการเก็บรักษาเซลล์ สำหรับเป็น seed และ stock นิยมใช้สาร cryoprotectant ที่จัดอยู่ในประเภทที่ 1 คือ DMSO, G และ EG (Pegg, 2007; Matsumura *et al.*, 2009; Francis *et al.*, 2002; Critser and Woods, 2001; Kato *et al.*, 2009) แต่ DMSO มีคุณสมบัติซึมผ่านผิวหนัง ลูกมือยางและเป็นตัวทำละลายสารต่างๆ ได้ การปฏิบัติงานจึงต้องทำด้วยความระมัดระวังและรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสารที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็ง หรือสารพิษต่างๆ (กล่าวขวัญ, 2556; Freshney, 2000) นอกจากนี้ DMSO ยังมีกลิ่นเหม็น ระคายเคืองจมูกและตา มีราคาแพงเมื่อเทียบกับสาร cryoprotectant อื่นๆ และ Katkov *et al.* (2011) รายงานว่า DMSO มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Induced pluripotent stem cells (iPSCs) และ Human embryonic stem cells (hESC) สูงกว่า EG, Propylene glycol และ G โดย G มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่สุด ดังนั้นหากมีสาร cryoprotectant ที่สามารถทดแทนและลดปัญหาเหล่านี้ได้โดยที่ยังสามารถเก็บรักษาเซลล์ได้เทียบเท่าหรือดีกว่าวิธีเดิม จะทำให้ลดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน และลดต้นทุนในการเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำยิ่งยวดได้

การเลือกชนิดหรือความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่จะนำมาใช้ในเซลล์แต่ละชนิดจำเป็นต้องมีการทดสอบก่อนนำมาใช้งานเพื่อให้ได้สารที่เหมาะสมที่สุด Kato *et al.* (2009) ใช้ G และ EG ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ในการแช่แข็งเซลล์ myeloma P3U1 เช่นเดียวกับ Katkov *et al.* (2011) ที่ใช้แช่แข็งเซลล์ hESC ส่วน Janz *et al.* (2012) ใช้ G ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร แช่แข็ง Amniotic fluid mesenchymal stem cells (AFSCs) และ Akuta *et al.* (2013) ใช้ EG ความเข้มข้น 2-10% โดยปริมาตร แช่แข็ง stem cell การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant 2 ชนิด คือ G และ EG ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ DMSO ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ในการเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃

มีวัตถุประสงค์เพื่อนำมาใช้ทดแทน DMSO หากสาร cryoprotectant 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือสูงกว่า DMSO

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์

เซลล์ BHK₂₁C₁₃ ชนิดแขวนลอย passage ที่ 20

มีเดียม

มีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย GMS ที่มี 5% FCS

ซีรัม

FCS¹

สาร cryoprotectant

DMSO², G³ และ EG⁴

เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์ (cryogenic freezer)⁵

เป็นเครื่องควบคุมการทำความเย็นด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ทำให้สามารถลดอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็ว โดยลดอุณหภูมิจนถึงอัตรา 2 °C/นาที จนถึงอุณหภูมิ -40 °C และลดลงในอัตรา 5 °C/นาที จนถึงอุณหภูมิ -80 °C

การทดสอบความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ต่อเซลล์ BHK₂₁C₁₃

นำเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ชนิดแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 2 ลิตร แบบเดิมอากาศ มาแบ่งใส่ขวด ขนาด 30 มิลลิลิตร ขวดละ 2x10⁷ เซลล์ เติมน้ำ GMS และ สาร cryoprotectant ปริมาตรต่างๆ เพื่อให้มีความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่างๆ กัน ตามตารางที่ 1 จำนวน 2 ขวด/กลุ่ม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C แบ่งเซลล์กลุ่มละ 1 ขวดนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ตาย ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง

การเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃

เพาะเลี้ยงเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ในขวดเพาะเลี้ยงแบบ 3 คอ ขนาด 2 ลิตรแบบเดิมอากาศ ในมีเดียม สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C กวนด้วยแท่งแม่เหล็กด้วยความเร็ว

¹ JR Scientific cat no. 43640, United States

² Sigma Aldrich cat no. D2650, United States

³ MP biomedical cat no. 800687, France

⁴ Merck Milipore batch no. K45905921, Belgium

⁵ Nicool plus PC Air Liquid^{lm}, France

400 รอบ/นาที่ นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบคุณภาพของเซลล์และต้องมีจำนวนเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับ 2.4×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2555) นำเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ที่ได้ ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์⁶ ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที่ (290 xg) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำเซลล์จำนวน 24×10^7 เซลล์ มาเจือจางด้วย GMS เติม FCS 20% และสาร cryoprotectant เปอร์เซนต์ต่างๆ กัน ดังตารางที่ 2 ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 24 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) เก็บตัวอย่างไปตรวจสอบคุณภาพของเซลล์ ได้แก่ นับจำนวนเซลล์ ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต แล้วแบ่งเซลล์ใส่หลอดเก็บเซลล์ (ขนาดบรรจุ 4.5 มิลลิลิตร) หลอดละ 3 มิลลิลิตร กลุ่มละ 5 หลอด จากนั้นนำไปเข้าเครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์จนได้อุณหภูมิ -80 °C แล้วย้ายไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว ที่อุณหภูมิ -196 °C ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง

การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หลังการเก็บรักษา

หลังจากเก็บเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ที่อุณหภูมิ -196 °C นาน 1 สัปดาห์ นำเซลล์ที่เก็บไว้มาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C จนละลายหมด นาน 3 นาที เจือจางด้วย GMS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร/กลุ่ม เก็บตัวอย่างมานับจำนวนเซลล์ ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง หลังจากนั้นทดสอบหาอัตราการเจริญเติบโตโดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์⁷ ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที่ (180 xg) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บตะกอนเซลล์ผสมกับมีเดีย (GMS+10% FCS) pH 7.2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีชีวิตในแต่ละขวดจำนวนเท่ากับ 0.5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ในขวดเพาะเซลล์ ขนาดจุ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ควบคุมด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็วรอบ 400 รอบ/นาที่ นาน 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์จำนวน 2 มิลลิลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์ ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง

การตรวจคุณภาพเซลล์

1) การนับจำนวนเซลล์

นำตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร นำเซลล์มาใส่สไลด์สำหรับนับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ชนิด Spencer bright line ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า นับจำนวนเซลล์ที่อยู่บริเวณช่องขอบทั้งสี่มุมของสไลด์ทั้งหมด ซึ่งมีปริมาตร ช่องละ 1×10^{-4} มิลลิลิตร นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์/มิลลิลิตร (Cell concentration) (Bird and Forrester, 1981) โดยใช้สูตร $C = \frac{ny}{4} \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร

C คือ ความเข้มข้นของเซลล์/มิลลิลิตร y คือ dilution factor ของตัวอย่าง

n คือ จำนวนเซลล์ที่อยู่บริเวณช่องขอบทั้งสี่มุมของสไลด์ทั้งหมด

⁶ Jouan KR 4-22 P60, France

⁷ Tomy Seiko model RB-18TS, Japan

2) การตรวจดูลักษณะของเซลล์

หลังจากย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue และนำเซลล์มาใส่สไลด์สำหรับนับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ชนิด Spencer bright line ตรวจดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20 เท่า เซลล์มีชีวิต มีลักษณะกลมใส พนักเซลล์เรียบ ส่วนเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน พนักเซลล์ไม่เรียบ

3) เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) (ดัดแปลงจาก Katkov *et al.*, 2011)

$$= \frac{(\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตของกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนเซลล์มีชีวิตของกลุ่มทดสอบ}) \times 100}{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตของกลุ่มควบคุม}}$$

กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ใส่สาร cryoprotectant

กลุ่มทดสอบ คือ กลุ่มที่ใส่สาร cryoprotectant ทั้ง 9 กลุ่ม

4) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (%Viability) (Bird and Forrester, 1981)

$$= \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต} + \text{จำนวนเซลล์ตาย}} \times 100$$

5) เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง (%Survival rate) (Kato *et al.*, 2009)

$$= \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตหลังเก็บแช่แข็ง}}{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตก่อนเก็บแช่แข็ง}} \times 100$$

6) อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง (Growth rate of cells) (Oliver and Ellington, 2003)

$$= \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตหลังเพาะเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตก่อนเพาะเลี้ยง}}$$

7) การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ทุกขั้นตอนโดยเก็บตัวอย่างจำนวน 2 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงใน Tryptic soy agar และจำนวน 3 มิลลิลิตร ใน Thioglycollate broth เพื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ ยีสต์ รา aerobic และ anaerobic bacteria (Izadyar *et al.*, 2014) นาน 7 วัน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2555ก)

การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง โดยใช้ One-way ANOVA (multiple comparison แบบ Scheffe) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11.5⁸

⁸ SPSS Inc., United States

ผล

การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์ รา และแบคทีเรีย ในทุกขั้นตอน
เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity)

พบว่า %Cytotoxicity ที่เวลา 30 นาที 10% DMSO มีความเป็นพิษสูงกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (รูปที่ 1) และ %Cytotoxicity ที่เวลา 1 ชั่วโมง 10% DMSO มีความเป็นพิษสูงกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (รูปที่ 1)

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง (%Viability)

ผลการใช้ G และ EG เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ DMSO พบว่า %Viability ของกลุ่ม 5% G, 5% EG และ 10% EG มีค่าสูงกว่า 10% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง G และ EG พบว่า 2.5% G มีค่าต่ำกว่า 5% G, 5% EG และ 10% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) 7.5% G มีค่าต่ำกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) 10% G มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ 2.5% EG มีค่าต่ำกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (รูปที่ 2)

เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง (%Survival rate)

ผลการใช้ G และ EG เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ DMSO พบว่า %Survival rate ของกลุ่ม 5% G, 5% EG และ 10% EG มีค่าสูงกว่า 10% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง G และ EG พบว่า 2.5% G มีค่าต่ำกว่า 5% G, 5% EG และ 10% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) 7.5% G มีค่าต่ำกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) 10% G มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ 2.5% EG มีค่าต่ำกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (รูปที่ 3)

อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง (Growth rate of cells)

พบว่า 10% DMSO และ 10% G มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (รูปที่ 4)

วิจารณ์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นการเปรียบเทียบความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ที่ทำลายผนังเซลล์และทำให้เซลล์ตาย ซึ่งค่าต่ำแปลว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ค่าสูงแปลว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง จากการทดลองพบว่า ที่เวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ 10% DMSO มีความเป็นพิษสูงกว่า 5% EG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ถึงแม้

10% DMSO จะมีความเป็นพิษสูงที่สุดแต่มีค่าเพียง 3.87% และ 5.34% ตามลำดับ เท่านั้น ซึ่งแตกต่างจาก Katkov *et al.* (2011) ที่ 10% DMSO มีความเป็นพิษต่อเซลล์ iPSCs และ hESC สูงถึง 30% ทั้งนี้อาจเพราะ ชนิดของเซลล์ที่ต่างกัน และเนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดเป็นสารประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ระยะเวลาในการสัมผัสสารจึงมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ (Szurek and Eroglu, 2011) สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ ซึ่งมีแนวโน้มที่ความเป็นพิษต่อเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่สัมผัสสาร นอกจากนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์นาน 24 ชั่วโมง พบว่าสารทุกกลุ่มทำให้เซลล์มีชีวิตลดลง โดยเฉพาะ DMSO ที่ทำให้เซลล์ตายทั้งหมด แต่ในขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์เวลาที่สารสัมผัสกับเซลล์ก่อนนำไปแช่แข็งไม่เกิน 30 นาที ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีผลเพียงเล็กน้อย

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง และเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ หลังเก็บแช่แข็ง ให้ผลเหมือนกัน คือ 5% G, 5% EG และ 10% EG มีค่าสูงกว่า 10% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) 10% G มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนั้นมีค่าแตกต่างจาก 10% DMSO อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ให้ผลเช่นเดียวกับ Akuta *et al.* (2013) ที่สามารถใช้ 2-10% EG แช่แข็ง stem cell ได้ แต่แตกต่างจาก Janz *et al.* (2012) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ AFSCs หลังเก็บแช่แข็งด้วย 10% DMSO สูงกว่า 5% G และแตกต่างจาก Kato *et al.* (2009) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ myeloma P3U1 หลังเก็บแช่แข็งด้วย 10% G มีค่าใกล้เคียงกับ 10% DMSO ส่วน 10% EG มีค่าต่ำกว่า 10% DMSO ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใช้เซลล์ต่างชนิดกัน นอกจากนี้การที่กลุ่ม 10% G มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มนั้น อาจเนื่องจาก G ความเข้มข้นสูง ซึ่ง G ทำให้เกิดปัญหากับความดันออสโมซิสของเซลล์ โดยเฉพาะหลังการละลาย ทำให้เซลล์มีชีวิตลดลง (Ryan, 2011)

ส่วนอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเก็บแช่แข็ง พบว่า 10% DMSO และ 10% G มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การที่ 10% DMSO มีค่าต่ำนั้น อาจเกิดจาก DMSO สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ BHK₂₁C₁₃ ชนิดแขวนลอย ได้ดีกว่า G และ EG จึงทำให้เซลล์อ่อนแอมากกว่า แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 1-2 passage เซลล์จะสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ ส่วน 10% G น่าจะเกิดจากจำนวนเซลล์มีชีวิต หลังละลายน้อยเพียง 51.99% ทำให้เซลล์อ่อนแอ ส่วนกลุ่มอื่นๆ เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งแตกต่างจาก Rahman *et al.* (2007) ที่พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ adherent BHK-21 cell หลังเก็บแช่แข็งใน 10% DMSO ดีกว่า glycerol ทุกความเข้มข้น อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของชนิดเซลล์ และขั้นตอนการทดลอง

อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้ตรวจสอบและเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK₂₁C₁₃ หลังจากเก็บรักษาเซลล์ ที่อุณหภูมิ -196 °C นาน 1 สัปดาห์ ซึ่งเป็นการเก็บรักษาระยะสั้น จึงควรมีการทดลองการเก็บรักษาเซลล์ ในระยะยาวเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant ชนิดต่างๆ สำหรับใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนต่อไป เนื่องจาก Freshney (2000) กล่าวว่า การเก็บรักษาเซลล์ ด้วย G เป็นระยะเวลานานอาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้

สรุป

การเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ที่อุณหภูมิ -196 °C สามารถใช้ G ที่ความเข้มข้น 2.5-7.5% โดยปริมาตร และ EG ที่ความเข้มข้น 2.5-10% โดยปริมาตรทดแทนการใช้ DMSO ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร นอกจากนี้สารที่เหมาะสมและช่วยลดต้นทุนการเก็บรักษาเซลล์ได้ดีที่สุดคือ EG ที่ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พนักงานหน่วยผลิตเซลล์ 1 ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาครั้งนี้ และคณะกรรมการพัฒนาวิชาการ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

กล่าวขวัญ ศรีสุข 2556 การแช่แข็งเซลล์และการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของเซลล์ไลน์ ใน ประสาร สันติพัฒนา บรรณาธิการ หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ พิมพ์ครั้งที่ 2 โอ.เอส.พรินติ้ง เฮาส์ กรุงเทพฯ หน้า 107-114

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2555ก เรื่องมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานการตรวจสอบการปนเปื้อนจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK₂₁C₁₃ (SOP-FCSC-014) หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2555ข เรื่องมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ชนิดแขวนลอยในถังเฟอร์เมนเตอร์ ขนาด 50 ลิตร (SOP-FCSM-030) หน้า 3

Akuta, T., Imaizumi, K. and Nishikawa, S. I. 2013. Stem cell preservation medium, stem cell preservation method, and stem cell preservation system. Japan Patent No.WO2013187077A1, December 2013.

Bird, B. R. and Forrester, F. T. 1981. General Procedures: Cell Quantitation. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control Bureau of Laboratories Laboratory Training and Consultation Division. pp. 43-48.

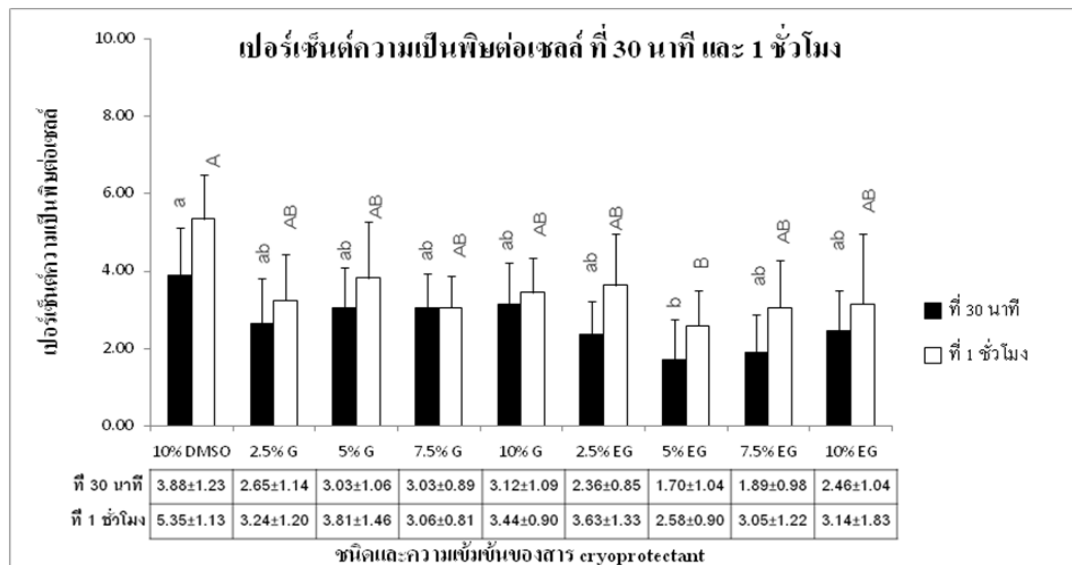
- Critser, J. K. and Woods, E. J. 2001. Sorbent method for removal of cryoprotectants from cryopreserved animal cells. United States Patent No. US6235463B1, May 2001.
- Francis, V., Yves-Jacques, S., Philippe, T., Ghislain, B. and Agathos, S. 2002. Cryoprotective solutions. European Patent No. EP1181865A1, February 2002.
- Freshney, R. I. 2000. Safety. Culture of animal cells: A manual of basic technique, 4th ed. Wiley-Liss, Inc. Canada. pp. 71, 299.
- Izadyar, F., Pacchiarotti, J., Olmstead, M., Howerton, K. and Ramos, T. 2014. Cryopreservation of cells and tissue for clinical application. United States Patent No. US20140220551A1, August 2014.
- Janz, F. L., Debes, A. A., Cavaglieri, R. C., Duarte, S. A., Romão, C. M., Morón, A. F., Zugaib, M. and Bydlowski, S. P. 2012. Evaluation of Distinct Freezing Methods and Cryoprotectants for Human Amniotic Fluid Stem Cells Cryopreservation. *J. Biomed. Biotech.* 2012: 1-10.
- Katkov, I. I., Kan, N. G., Cimadamore, F., Nelson, B., Snyder, E. Y. and Terskikh, A. V. 2011. DMSO-Free Programmed Cryopreservation of Fully Dissociated and Adherent Human Induced Pluripotent Stem Cells. *SAGE-Hindawi Acc. Res. Stem. Cells. Inter.* 2011: 1-8.
- Kato, Y., Sasaki, M. and Yamada, H. 2009. Compositions for cryopreservation of cells. United States Patent No. US20090197331A1, August 2009.
- Matsumura, K., Sugai, H. and Hyon, S. 2009. Cryopreservative composition for cell and tissue. Japan Patent No. WO2009157209A1, December 2009.
- Oliver, S. A. and Ellington, J. E. 2003. Cryopreserving somatic cells with an arabinogalactan containing cryopreservation medium. United States Patent No. US6593138B1, July 2003.
- Pegg, D. E. 2007. Principles of Cryopreservation. In Day J. G. and Stacey G. N. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, 2nd ed. Humana Press Inc., New Jersey, USA. p. 41.
- Rahman, S. U., Rabbani, M., Sahidullah, Muhammad, K. and Iqbal, Z. 2007. Studies on *in Vitro* Culture Characteristics of Adherent Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21) Cell Line. *Int. J. Agri. Biol.* 9(6): 821-826.
- Ryan, J. 2011. Cryopreservation of Animal Cells. Technical Information. Cell Culture Manual 2011-2014. Sigma[®] Life Science. p. 315.
- Szurek, E. A. and Eroglu, A. 2011. Comparison and Avoidance of Toxicity of Penetrating Cryoprotectants. *PLoS ONE.* 6(11): 1-9.

ตารางที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ต่อเซลล์ BHK₂₁C₁₃

กลุ่มที่	ปริมาตร GMS+เซลล์ (มิลลิลิตร)	ชนิดสาร cryoprotectant	ปริมาตรสาร cryoprotectant (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ สาร cryoprotectant (%)
1	18	DMSO	2	10
2	19.5	G	0.5	2.5
3	19	G	1	5
4	18.5	G	1.5	7.5
5	18	G	2	10
6	19.5	EG	0.5	2.5
7	19	EG	1	5
8	18.5	EG	1.5	7.5
9	18	EG	2	10
10	20			

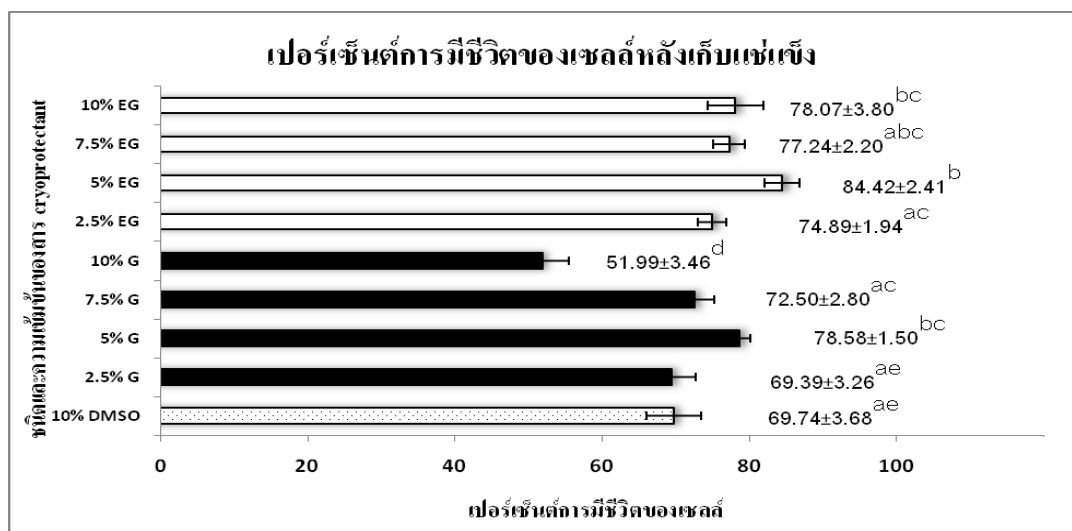
ตารางที่ 2 ปริมาณสาร cryoprotectant ที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃

กลุ่มที่	สาร cryoprotectant	
	ชนิดของสาร	ปริมาณที่ใช้ (%)
1	DMSO	10
2	G	2.5
3	G	5
4	G	7.5
5	G	10
6	EG	2.5
7	EG	5
8	EG	7.5
9	EG	10



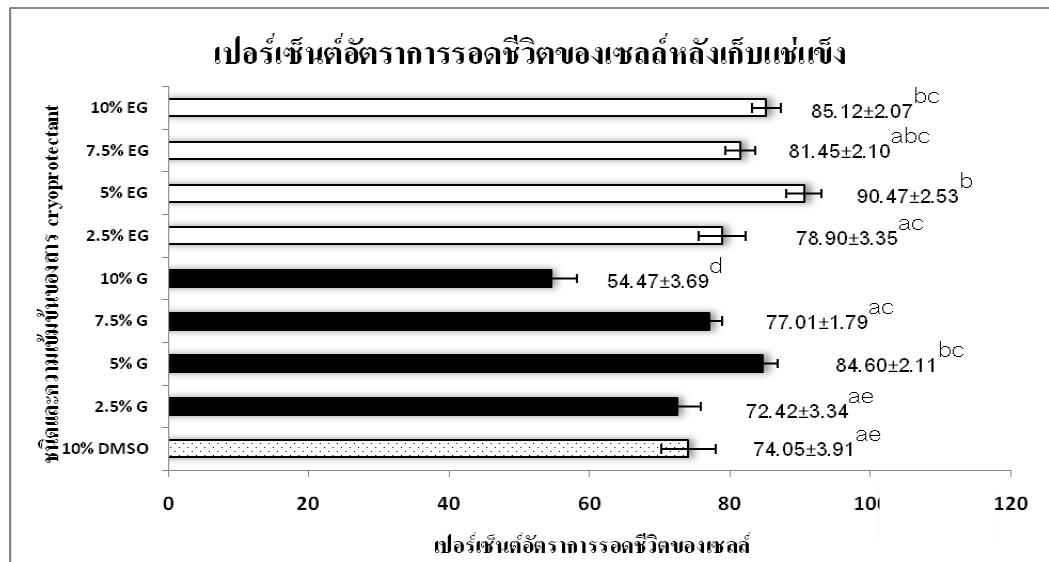
รูปที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ของ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Glycerol (G) และ Ethylene glycol (EG) ที่เวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ตัวอักษร ab ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ 30 นาที
ตัวอักษร AB ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ 1 ชั่วโมง



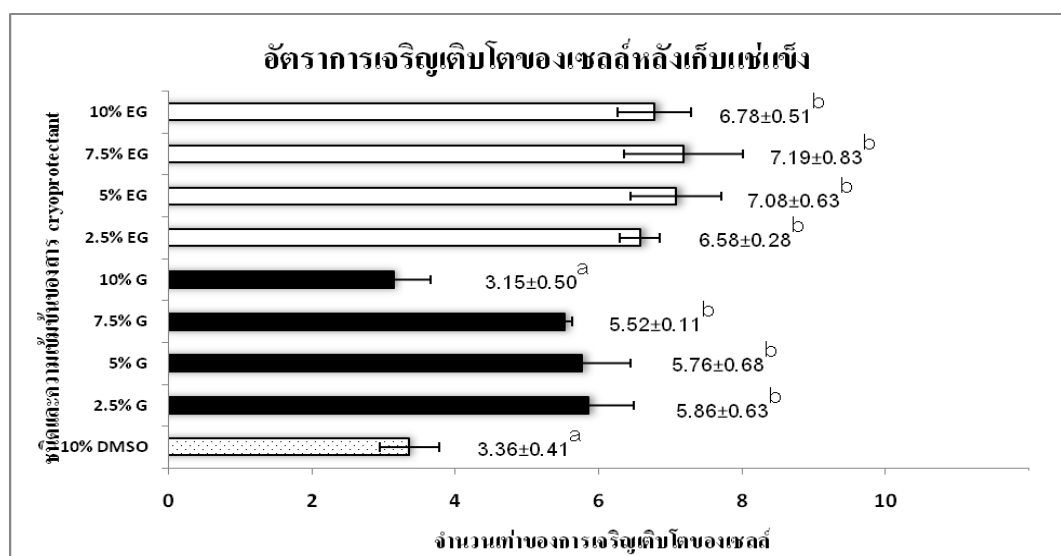
รูปที่ 2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ BHK₂₁C₁₃ หลังเก็บแช่แข็งนาน 1 สัปดาห์ ของ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Glycerol (G) และ Ethylene glycol (EG)

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcde ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 3 เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ BHK₂₁C₁₃ หลังเก็บแช่แข็งนาน 1 สัปดาห์ ของ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Glycerol (G) และ Ethylene glycol (EG)

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcde ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ BHK₂₁C₁₃ หลังเก็บแช่แข็งนาน 1 สัปดาห์ ของ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Glycerol (G) และ Ethylene glycol (EG)

หมายเหตุ : ตัวอักษร ab ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Comparison of the efficacy of different cryoprotectants in BHK₂₁C₁₃ cells storage

Sukit Prathumchai¹

Thanarat Janukit¹

Abstract

The efficacy of two cryoprotectants : Glycerol (G) and Ethylene glycol (EG) at concentrations of 2.5%, 5%, 7.5% and 10% v/v, in comparison with 10% concentration of Dimethyl sulfoxide (DMSO) in BHK₂₁C₁₃ suspension cells storage at -196 °C were studied. The objective of this study was to find an alternative cryoprotectant to replace DMSO. The cryoprotectants toxicity were assayed after mixing with cells for 30 minutes and 1 hour. The viability, survival rate and growth rate of the frozen cells were determined at one week post storage. The results showed that the mean toxicity of 10% DMSO was not different from other groups but was significantly higher than 5% EG ($p<0.05$). For mean viability and survival rate, cells stored in 10% G showed significantly less percentage than the other cryoprotectants ($p<0.05$) whereas cells stored in 5% G, 5% EG and 10% EG showed significantly higher percentage than 10% DMSO ($p<0.05$). For growth or recovery rate, all cryoprotectants except 10% G showed significantly higher recovery rate than 10% DMSO ($p<0.05$). This study concluded that using either G at concentration ranging from 2.5% to 7.5% v/v or EG at concentration ranging from 2.5% to 10% v/v can replace 10% DMSO in BHK₂₁C₁₃ suspension cells storage at -196 °C. Moreover, the storage with 5% EG is more cost-effective and suitable than the others.

Key words: cryoprotectant agents, Dimethyl sulfoxide, Glycerol, Ethylene glycol, BHK₂₁C₁₃ cells storage

¹ Bureau of Veterinary Biologic Pakchong Nakornratchasima 30130

Serosurveillance of foot and mouth disease virus in elephants in Thailand

Dilok Ounpomma¹ Wilai Linchongsubongkoch² Kananut Bunmungmeepapha³
Patara Charoenphan⁴ Weerasak Pintawong⁴ Terdsak Yano⁵

Abstract

Serosurveillance of foot and mouth disease virus (FMDV) in elephants in Thailand during 2010-2012 was studied, totally 689 serum samples were collected from various parts of Thailand where elephant camps were located and the elephants were used for working or tourist riding. In this study, elephant blood samples were collected from 13 provinces as follows: Chon Buri, Surin, Chiang Mai, Chiang Rai, Mae Hong Son, Kanchanaburi, Prachuap Khiri Khan, Surat Thani, Krabi, Nakon Si Thammarat, Phang-nga, Trang and Phatthalung provinces. The liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) was used to determine antibody to the structural protein of FMDV type O, A and Asia1 in parallel with the detection of antibody to 3ABC non structural protein of FMD (3ABC-NSP) by blocking ELISA and the detection of antibody to virus infection associated antigen (VIAA) by agar gel immunodiffusion (AGID), both tests were useful in differentiating between vaccinated and infected animals. The result of LP ELISA indicated that no antibody titer to FMDV type O, A and Asia1 in all elephant serum samples were detected or 100% sero-negative. Similarly results were found as 100% negative by 3ABC-NSP and 100% negative by VIAA-AGID in the same samples. In conclusion, those elephants had not been infected with FMDV and had never been vaccinated with FMD vaccine before. Interestingly, during the period of this study, there was an accidental case of FMD infected in one elephant at an elephant camp in Chiang-Mai province by the end of October 2010. The specimen from the trunk was submitted to the laboratory for FMD diagnosis, the result was type O positive. An outbreak investigation was taken place for tracing back to the source of infection, it was summarized that the transmission of FMDV was by oral route from the congestion of contaminated feed from infected cattle excretion. Hence, the follow up FMD surveillance in contacted elephants and cattle in the outbreak area were investigated, 25 elephant sera and 11 cattle sera were taken at 14 days post infection. All elephant sera were 100% sero-negative (<1:40) by LP ELISA in 3 serotypes, 100% negative by 3ABC NSP and VIAA-AGID. Whereas the cattle sera was found 100%

sero-positive ($>1:40$) to 3 serotypes, 2 of 11 (18.2%) of cattle sera were positive by 3ABC NSP and 5/11 (45.5%) were positive by VIAA-AGID. This investigation demonstrated that the elephant was not considered as susceptible to FMD in natural condition. However, this information would be useful in supporting the control and eradication of FMD in Thailand.

Keywords: Foot and mouth disease virus, Elephant, LP ELISA, non structural protein

¹ Veterinary Research and Development Center, Department of Livestock Development, Khon Kaen

² FMD Expert and Consultant of Department of Livestock Development, National Institute of Animal Health, Bangkok

³ National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Bangkok

⁴ National Institute of Elephant Research and Health, Bureau of Disease Control, Department of Livestock Development, Surin

⁵ Faculty of Veterinary Medicine, Chiang-Mai University, Chiang-Mai

Introduction

Foot and mouth disease (FMD) is highly contagious viral disease in cloven-hoofed livestock and wildlife, each species varies in its susceptibility to infection and clinical disease. Livestock susceptible to FMD include cattle, buffalo, pigs, sheep, goats and wild animals. FMD can be destructive of wildlife as occurred in South Africa, infection of wildlife with FMD results in relatively mild disease. Some wild ruminants also have the potential to become carriers of the infection (Salt, 1993). Infections have been reported in South African (Thomson *et al.*, 2003) and Rahman *et al.* (1988) reported the infection of FMD type Asia1 in Asian elephants in zoological gardens, similar report of Pyakural *et al.* (1976) described an outbreak of type O virus in elephant in Nepal. In Thailand, a single report of FMD in elephants (Sirivan and Pemayothin, 1993) in which four of twenty elephants in the zoo developed lesions and FMD virus type O was isolated. The infection spread from the neighboring pig farm and there was no evidence of the transmission from elephant to elephant and it was not considered susceptible to FMD under natural condition. Currently, FMD serotypes O and A are considered endemic in Thailand, causing significant economic losses primarily due to lower production of affected animals and subsequent constrain of international trading. FMD had reported in the most parts of the country in cattle, buffaloes, pigs and also the vaccination campaign have been done in those animals twice a year. The Department of Livestock Development (DLD) has national strategic plan to control and eradicate FMD for the establishment of FMD free country with vaccination under the Southeast Asia and China FMD Control Campaign (SEACFMD). Hence, the disease surveillance and monitoring of susceptible animals including elephants were investigated. At present, many elephant camps are located in tourist attraction places over the country and the elephants are mostly used for working or tourist riding, this activities might be a risk in receiving FMD virus from other susceptible animals nearby. Therefore, the objective of this study was to investigate the FMD serosurveillance in elephants in Thailand, due to no information was reported and studied.

Materials and methods

Samples

Elephant bloods were collected from elephant camps in 13 provinces located in various parts of Thailand during 2010-2012 (table 1).

Serological assays

Serological assays were carried out by liquid phase blocking ELISA (LP ELISA), 3ABC non structural protein of FMDV by blocking ELISA (3ABC-NSP) and virus infection associated antigen agar gel immunodiffusion (VIAA-AGID) as following:-

Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)

Elephant serum samples were used to determine antibody to structural protein of FMD by LP ELISA, a quantified test of FMDV antibodies to serotype O, A and Asia1. Serum was diluted into two fold dilution series and then reacted with a fixed concentration of reference antigen. The antibody titer was determined at the highest dilution of serum which give 50% end point of Optical Density (OD) mean value of control antigen (Ca) where the OD reading at range 1.0-1.5. The interpretation of serum was calculated as percent inhibition (%PI) as described by Hamblin *et al.* (1986), Linchongsubongkoch and Janukit (1994).

3ABC non structural protein of FMDV assay

A commercial NS kit, PrioCHECK[®], was used to detect antibody to 3ABC- NSP of FMDV by indirect blocking ELISA method for differentiating infected from vaccinated animal, the test procedure was described in the instruction manual of the manufacturer.

Virus infection associated antigen-agar gel immunodiffusion (VIAA-AGID)

The test was used to detect antibody to virus infection associated antigen (VIAA) by agar gel immunodiffusion (AGID) test for differentiating infected from vaccinated animal as the method described by Pinto and Garland (1979), Linchongsubonkoch *et al.* (1993).

Result

A total of 689 elephant sera were used to determine antibodies to FMDV type O, A and Asia1 by LP ELISA. The results indicated that all sera gave sero-negative (LP titer<1:40) to all 3 serotypes. Similar

results were found 100% negative when tested by 3ABC NSP and VIAA-AGID (table 2). Interestingly, there was an accidental case of FMD type O infected in one elephant at the elephant camp in Chiang Mai province by the end of October 2010 during the period of study. When tracing back to the source of infection, it was by ingesting the contaminated feed from excretion of infected cattle in that area. The FMD surveillance of those elephants and infected cattle in the outbreak area were followed up and investigated, 25 elephant and 11 cattle sera were taken at 14 days post infection. Serosurveillance were carried out by LP ELISA, 3ABC NSP and VIAA-AGID, the results were shown in table 3 and figure 2.

Conclusion and discussion

Serosurveillance of FMDV in elephants in Thailand during 2010-2012 were studied, totally 689 serum samples were used to determine antibody to structural protein of FMDV type O, A and Asia1 by LP ELISA. The results in table 2 and figure 1 demonstrated no antibody obtained in all elephant sera (LP titer < 1:40) or 100% sero-negative to all serotypes. The detection of antibody to non structural protein of FMDV to differentiate between vaccinated and infected animals indicated 100% negative to 3ABC NSP of FMDV and 100% negative to VIAA-AGID. It was summarized that those elephants had not been infected with FMDV and also had not been vaccinated with FMD vaccine before. Currently, the elephant riding for tourist becomes a business in some tourist attraction places in various parts of Thailand as listed in table1, meanwhile elephants movements within or across provinces have been taken place regularly, this incident might be a risk to receive FMD virus from other susceptible animals in the field. According to no information on FMD surveillance in elephant has been documented or reported in Thailand, mostly FMD was reported in cattle, buffaloes and pigs. However there was a single report of FMD type O infected in Thai elephants around twenty years ago by Sirivan and Pemayothin (1993), it was found that four of twenty elephants in a zoo in Nakhon Pathom province developed lesions. Infection had spread from the neighbouring pig farm by oral route from contaminated or infected feed and there was no evidence of FMD transmission from elephant to elephant or to other animals in that area. Similar report by Pyakural *et al.* (1976) found FMD outbreak in Indian elephants (*Elephas maximus*) in Nepal, it was FMD type O by virus isolation from the outbreak area. Interestingly, during the period of study, there was an accidental case of FMD type O infection in one elephant at the elephant camp in Chiang Mai province by the end of October 2010. The infected tissue from trunk was submitted to Regional Reference Laboratory at

Pakchong, Nakhonratchasima for FMD diagnosis by antigen typing ELISA test and RT-PCR, the diagnostic result was type O positive. An outbreak investigation of this incident was taken place for tracing back to the source of infection, it was summarized that the transmission of FMDV was by ingestion of contaminated feed from infected cattle excretion. There was no report of the dose of FMD virus required to infect wildlife, but there were publication papers which were studied by Burrows *et al.* (1981) and Seller (1971) reported that the minimum dose required for oral route infection in cattle and sheep was about 1×10^6 to 2.5×10^6 TCID₅₀/ml. However, a follow up of FMD surveillance in those elephants and infected cattle in the outbreak area were conducted, blood samples from 25 elephants and 11 cattle were taken at 14 days post infection. In table 3 and figure 2 demonstrated all elephants were sero-negative by LP ELISA in 3 serotype, negative by 3ABC NSP and VIAA-AGID, whereas all cattle were sero-positive by LP ELISA ($>1:40$) to 3 serotype, 2 of 11 or 18.2% was positive by 3ABC NSP and 5 of 11 or 45.5% was positive by VIAA-AGID. Regarding to the history of vaccination in those animals, FMD trivalent vaccine of O, A and Asia1 were vaccinated in cattle only but not in elephants. Hence, high antibody titers were obtained in cattle sera as shown in table 2. The positive result of 3ABC NSP and VIAA-AGID indicated that the cattle had been infected with FMDV. In addition, the VIAA-AGID positive was found in other 3 cattle, which might be false positive resulting from receiving multi-vaccination with inactivated vaccine using binary ethyleneimine (BEI) as an inactivant, (Pinto and Garland, 1979; Linchongsunbongkoch *et al.*, 2004). In conclusion, this investigation demonstrated that elephant was not considered as susceptible to FMD under the natural condition. However, the information from this study would be useful in supporting the control and eradication of FMD in Thailand.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Ard-ong Onwan, Miss Sopha Singlebut, Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia for their helps in preparing buffers and assisting in serology assays. Also special thanks to staffs of National Institute of Elephant Research and Health, Bureau of Disease Control, Surin Province for their kind contributions in collecting elephant blood samples and participations in the successful implementation of this study.

References

- Burrows, R., Mann, J. A., Garland, A. J. Greig, A. and Goodridge, D. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot and mouth disease infection in cattle. *J. Comp. Path.* 91:599-609.
- Hamblin, C., Barnett, I. T. R. and Hedger, R. S. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Methods.* 93: 115-121.
- Linchongsubongkoch, W. and Janukit, T. 1994. Detection of antibody to FMDV by liquid phase blocking ELISA. Proceedings of the 1st Veterinary Biologics Annual Conference, Dusit Resort and Polo Club, Petchaburi province. pp. 62-72.
- Linchongsubongkoch, W., Nilchawee, S. and Sinsuwongwat, W. 1993. Foot and mouth disease diagnosis in infected serum. *J. Vet. Biol.* 4(2): 1-11.
- Linchongsubongkoch, W., Ounpomma, D. and Thongtha, P. 2004. The use of various non structural protein kits to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 55(2): 21-30.
- McVicar, J. W. and Suttmoller, P. 1970. Foot and mouth disease: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection associated (VIA) antigen as a tool for epidemiological Surveys. *Am. J. Epidemiol.* 94(4): 273-278.
- Pinto, A. A. and Garland, A. J. M. 1979. Immune response to virus infection associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot and mouth disease virus activated by formalin or acethylenimine. *J. Hyg.* 82: 41-50.
- Pyakural, S., Singh, U. and Singh, N. B. 1976. An outbreak of foot and mouth disease in Indian elephants (*Elephas maximus*). *Vet. Rec.* 99(2): 28-29.
- Rahman, H., Dutta, P. K. and Dewan, J. N. 1988. Foot and mouth disease in elephant (*Elephas maximus*). *J. Vet. Med.* 35(1): 70-71.
- Salt, J. S. 1993. The carrier state of foot and mouth disease. *Am immunological review. Br. Vet. J.* 149:207-223.
- Seller, R. F. 1971. Quantitative aspects of the spread of foot and mouth disease. *Vet. Bul.* 41: 431-439.
- Sirivan, C. and Pemayothin, P. 1993. Foot and mouth disease type O in Thai elephants. Proceeding in the 12th Annual Livestock Seminar. pp. 237-241.
- Thomson, G. R., Vosloo, W. and Bastos, A. D. 2003. Foot and mouth disease in wildlife. *Virus. Res.* 91: 145-161.

Table 1. Detail of serum samples collecting from 13 provinces in various parts of Thailand where elephant camps were located.

Region	Map no/ province	Total sample
2	(13) Chon Buri	199
3	(26) Surin	80
5	(39) Chiang Mai	42
5	(40) Chiang Rai	28
5	(44) Mae Hong Son	15
7	(57) Kanchanaburi	64
7	(58) Prachuap Khiri Khan	42
8	(63) Surat Thani	31
8	(64) Krabi	9
8	(65) Nakhon Si Thammarat	45
8	(67) Phang nga	73
9	(71) Trang	49
9	(74) Patthalung	12

Table 2. Result of LP ELISA, 3ABC NSP and VIAA-ADIG test of 689 elephant sera from each elephant camp in 13 provinces in Thailand.

Province	No. of sample	O	LP ELISA A	Asia1	3ABC NSP		AGID	
					Positive	Negative	Positive	Negative
Chon Buri	199	<1:40	<1:40	<1:40	-	199	-	199
Surin	80	<1:40	<1:40	<1:40	-	80	-	80
Chiang Mai	42	<1:40	<1:40	<1:40	-	42	-	42
Chiang Rai	28	<1:40	<1:40	<1:40	-	28	-	28
Mae Hong Son	15	<1:40	<1:40	<1:40	-	15	-	15
Kanchanaburi	64	<1:40	<1:40	<1:40	-	64	-	64
Prachuap Khiri Khan	42	<1:40	<1:40	<1:40	-	42	-	42
Surat Thani	31	<1:40	<1:40	<1:40	-	31	-	31
Krabi	9	<1:40	<1:40	<1:40	-	9	-	9
Nakhon Si Thammarat	45	<1:40	<1:40	<1:40	-	45	-	45
Phang nga	73	<1:40	<1:40	<1:40	-	73	-	73
Trang	49	<1:40	<1:40	<1:40	-	49	-	49
Patthalung	12	<1:40	<1:40	<1:40	-	12	-	12
Total	689				0%	100%	0%	100%

Table 3. Result of FMD surveillance in contacted elephants and cattle in outbreak by LP ELISA, 3ABC NSP and VIAA-AGID, serum samples were taken at 14 days post infection.

Species	Total sample	LP ELISA titer to FMDV O, A, Asia1		3ABC NSP	VIAA_AGID
		<1:40	>1:40	Positive /Total	Positive /Total
Elephant	25	25	0	0/25 (0%)	0/25 (0%)
Cattle	11	0	25	2/11 (18.2%)	5/11 (45.5%)

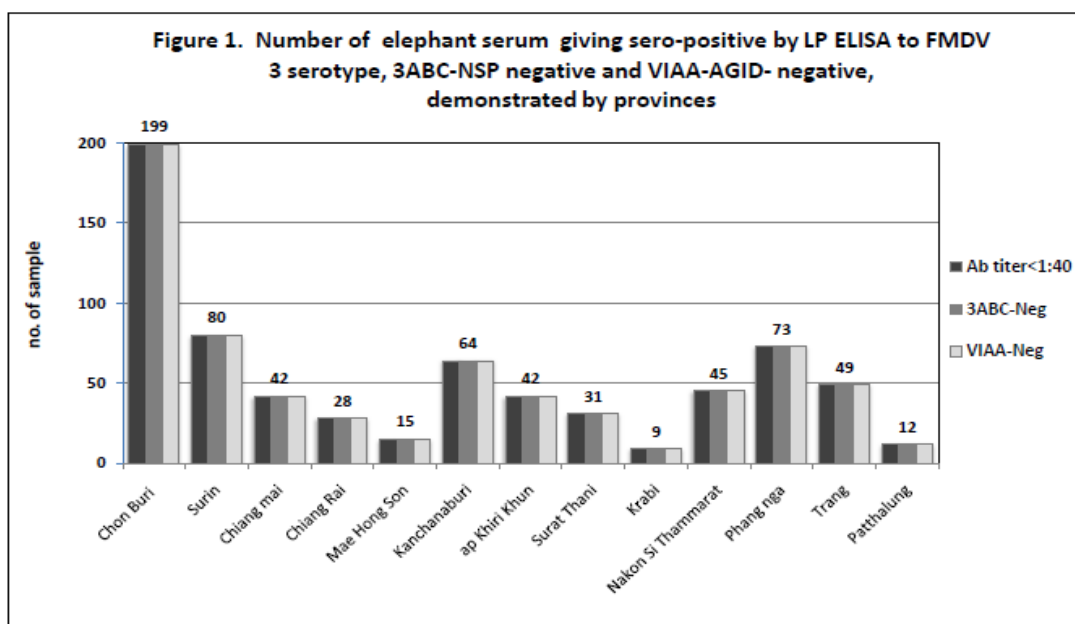


Figure 1. Result of sero-negative by LP ELISA to FMDV type O, A and Asia1, 3ABC NSP negative and VIAA-AGID negative in elephant sera from 13 provinces.

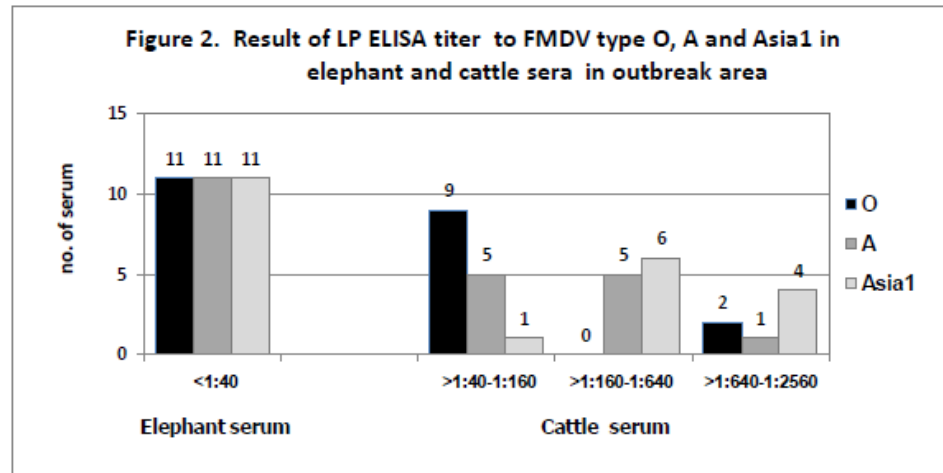


Figure 2. Result of LP ELISA titer of elephants and cattle sera in the FMDV outbreak area, serum samples were collected at 14 days post infection.

การสำรวจทางซีรัมวิทยาของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในช้างในประเทศไทย

ดิลก อ้วนพรมมา¹ วิไล ลิ้นจตุรภักข² กณณัฐณ์ บุญมั่งมีปภา³

ภัทร เจริญพันธ์⁴ วีรศักดิ์ ปิ่นดาวงศ์⁴ เทิดศักดิ์ ญาโน⁵

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาซีรัมวิทยาโรคปากและเท้าเปื่อยในช้างในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553-2555 โดยการเก็บตัวอย่างซีรัมช้างจำนวนทั้งสิ้น 689 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นช้างที่อยู่ตามแคมป์และแหล่งท่องเที่ยวภายในประเทศจาก 13 จังหวัด ได้แก่ ชลบุรี สุรินทร์ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี กระบี่ นครศรีธรรมราช พังงา ตรัง และพัทลุง ทำการตรวจสอบตัวอย่างซีรัมช้างเพื่อหาระดับแอนติบอดี ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ต่อไทป์ โอ เอ และเอเซียวัน โดยวิธี LP ELISA และทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC นอนสตรัคเจอร์โปรตีนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยวิธี blocking ELISA (3ABC NSP) และตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน virus infectious associated antigen (VIAA) ด้วยวิธี Agar gel immunodiffusion (AGID) ซึ่งทั้งสองวิธีนี้จะใช้ประโยชน์ในการแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ผลการตรวจสอบ LP ELISA พบว่าให้ผลลบต่อ ไทป์ โอ เอ และเอเซียวันทั้งหมดหรือให้ผล sero-negative เท่ากับ 100% เช่นเดียวกับผลการตรวจสอบ 3ABC NSP และ VIAA-AGID ได้ผลลบเท่ากับ 100% เช่นกัน สรุปผลได้ว่าช้างทั้งหมดนี้ไม่เคยได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยและไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน เป็นที่สนใจอย่างยิ่งในช่วงการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่ามีการเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยในช้างที่จังหวัดเชียงใหม่ในช่วงปลายเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ซึ่งผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่าเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ จากการสอบสวนโรคพบว่าเกิดจากการกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัสอย่างสูง ซึ่งติดต่อมาจากสารคัดหลั่งจากโคที่กำลังป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อยที่อยู่ใกล้เคียงบริเวณนั้น ได้ทำการตรวจติดตามโดยการเก็บตัวอย่างซีรัมโคจำนวน 11 ตัวอย่าง และช้างจำนวน 25 ตัวอย่างที่อยู่ในพื้นที่บริเวณเกิดโรค โดยเก็บตัวอย่างซีรัมที่ระยะ 14 วันภายหลังการติดเชื้อ ทำการตรวจสอบทางซีรัมวิทยา พบว่าตัวอย่างซีรัมช้างให้ผล sero-negative (<1:40) ทั้ง 3 ไทป์เท่ากับ 100% โดยวิธี LP ELISA ส่วนผล 3ABC NSP และ VIAA-AGID ให้ผลลบเท่ากับ 100% เช่นกัน ในขณะที่ซีรัมโคพบว่า LP ELISA ให้ผลเป็น sero-positive (>1:40) ทั้ง 3 ไทป์เท่ากับ 100% ผลบวกต่อ 3ABC NSP เท่ากับ 2/18 (18.2%) และผลบวกต่อ VIA-AGID เท่ากับ 5/11 (45.5%) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าช้างไม่ได้เป็นสัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยโดยสภาวะ

ธรรมชาติ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการสนับสนุนด้านการควบคุมและการกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทย

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ช้าง แอลพีอีไลซ่า นอนสตรัคเจอร์โปรตีน

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์ ขอนแก่น

² ผู้เชี่ยวชาญโรคปากและเท้าเปื่อยและที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ

³ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ

⁴ สถาบันวิจัยและบริการสุขภาพช้างแห่งชาติ สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ สุรินทร์

⁵ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

การตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* ใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ real-time

สายพิน ขุมทรัพย์¹ อนุรักษ ตระการรังสี¹

บทคัดย่อ

เชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และเยื่อภายในข้อต่ออักเสบในสัตว์ปีก การตรวจหาเชื้อทำได้หลายวิธีแตกต่างกันรวมถึงวิธีการตรวจด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล การตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid ที่ใช้ผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น โดยวิธี real-time PCR ด้วยชุดปฏิกิริยา LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master ร่วมกับ primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S ribosomal DNA (16S rDNA) มีเชื้อ *Mycoplasma hyorhinis* เป็นเชื้อควบคุม จากการทดลองพบว่าค่า R^2 ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* เท่ากับ 0.99831, 0.99794 และ 0.99563 ตามลำดับ สามารถตรวจ gDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. hyorhinis* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 100 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร ส่วน *M. synoviae* สามารถตรวจพบได้แม้จะมี gDNA เพียง 10 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร และ primer ที่ใช้ในการทดลองมีความจำเพาะต่อเชื้อ ความถูกต้องและความเที่ยงสูง สามารถตรวจพบเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ได้แม้จะมีแบคทีเรีย *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* subsp. *enteridis* และ *S. enterica* subsp. *typhimurium* หรือแม้แต่เชื้อ mycoplasma ชนิด *M. hyorhinis* ปนเปื้อนร่วมอยู่ด้วย จากผลการทดลองแสดงว่าการตรวจโดยวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* เพื่อเฝ้าระวังและตรวจยืนยันการปนเปื้อนของเชื้อใน allantoic fluid

คำสำคัญ: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, real-time PCR, allantoic fluid

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ในการผลิตวัคซีนทุกชนิดจะต้องมีการตรวจการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ในกระบวนการผลิตวัคซีนสัตว์ปีกที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักจะต้องไม่มีการปนเปื้อนเชื้อมัคโคพลาสมา (mycoplasma) โดยเฉพาะ *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) และ *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และเยื่อภายในข้อต่ออักเสบในสัตว์ปีก สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ ทำให้น้ำหนักลด การวางไข่ลดลง และอัตราการตายของตัวอ่อนสูงขึ้น หากมีการติดเชื้อร่วมกับโรคนิวคาสเซิล หรือโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จะทำให้ความรุนแรงของโรคมากขึ้น เชื้อ mycoplasma สามารถมีชีวิตอยู่ได้ 1-14 วัน ภายนอก host แพร่กระจายโดยการสัมผัส ทางน้ำเชื้อของเพศผู้ และจากแม่ไก่สู่ไข่ หรือแม่ไก่ในวัคซีนที่ไม่ได้ผลิตจากไข่ปลอดเชื้อ โดยเฉพาะ การตรวจวินิจฉัยต้องทำในห้องปฏิบัติการซึ่งมีหลายวิธีที่แตกต่างกัน (Stipkovits and Kempf, 1996)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ตรวจการปนเปื้อนเชื้อ mycoplasma ของวัคซีนโดยใช้วิธีตรวจปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งเป็นการตรวจเอ็นไซม์ที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อ mycoplasma (Lonza, 2011) และตรวจยืนยันเชื้อ mycoplasma ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีมาตรฐานในการตรวจการปนเปื้อนหรือการติดเชื้อ mycoplasma จากสิ่งส่งตรวจ (OIE, 2008) แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลานานถึง 3 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตช้าและหากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดอื่นร่วมด้วย จะไม่สามารถเพาะเชื้อ mycoplasma ได้ (Kleven, 2008) ในการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อต้องเพิ่มปริมาณเชื้อ จึงมีโอกาสที่เชื้อจะแพร่กระจายสู่สภาพแวดล้อม ปัจจุบันมีเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ real-time (real-time polymerase chain reaction; real-time PCR) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจและจำแนกเชื้อโดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเชื้อก่อน

real-time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR แบบดั้งเดิม แต่สามารถวัดปริมาณ DNA ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลาตั้งแต่ปฏิกิริยาเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา โดยการตรวจวัดการเรืองแสงของ Fluorescent reporter ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของปริมาณ DNA ได้แม้มีปริมาณ DNA แตกต่างกันเพียง 2 เท่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะและมีความแม่นยำสูง ใช้ระยะเวลาสั้น และไม่จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเชื้อ ทำให้มีความปลอดภัยแก่ผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม (กนกวรรณ และคณะ, 2006; วีระพงษ์, 2551) ในปัจจุบันมีการนำเทคนิค PCR (สุกัลยาณี และสุภาพร, 2551; Algire *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 1996; Zhao and Yamamoto, 1993) และ real-time PCR (สุกานดา และคณะ, 2550; Raviv and Kleven, 2009) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic

fluid จะช่วยให้การตรวจมีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และสามารถบอกชนิดของเชื้อ mycoplasma ที่ปนเปื้อนใน allantoic fluid ได้โดยไม่ต้องเพิ่มปริมาณเชื้อ ซึ่งเป็นการลดความสูญเสียก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีน และยังเป็นทางเลือกในการลดความเสี่ยงต่อการกระจายเชื้อสู่สภาพแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิล ที่ผลิตโดย สทช. ด้วยวิธี real-time PCR

อุปกรณ์และวิธีการ

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ mycoplasma ชนิด modified Frey's ประกอบด้วย PPLO broth w/o cv¹ 14.7 กรัม glucose² 10 กรัม 1% phenol red³ 2.5 มิลลิลิตร Noble agar⁴ 1% ในน้ำกลั่น 710 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 56 °C ก่อนเติม 25% yeast extract⁵ 100 มิลลิลิตร swine serum (inactivated)⁶ 150 มิลลิลิตร 1% nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)⁷ 10 มิลลิลิตร 1% cysteine hydrochloride⁸ 10 มิลลิลิตร และ 10% thallium acetate⁹ 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันก่อนนำมาเทลงจานเพาะเลี้ยงขนาด 60 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร/จานเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารเหลวเตรียมเหมือนอาหารแข็งแต่ไม่ใส่ Noble agar แบ่งใส่หลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร/หลอด เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ mycoplasma ชนิด Hayflick เตรียมเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด modified Frey's แต่ในสูตรอาหารประกอบด้วย PPLO broth¹⁰ 15.8 กรัม 1% phenol red 1.5 มิลลิลิตร Noble agar 1% ในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 56 °C ก่อนเติม 25% yeast extract 100 มิลลิลิตร horse serum (inactivated)¹¹ 150 มิลลิลิตร 0.2% deoxyribonucleic acid (DNA)¹² 12 มิลลิลิตร Penicillin G (200,000 unit)¹³ 5 มิลลิลิตร 10% thallium acetate 2.0 มิลลิลิตร และ 10% glucose 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับ pH ให้ได้ 7.6-7.8 ด้วย 1N NaOH¹⁴

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด tryptose broth (TB) ประกอบด้วย tryptose broth¹⁵ 26 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร/หลอด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่ง

¹ Difco, USA² JDP, UK³ Sigma, USA⁴ Difco, USA⁵ Lab M, United Kingdom⁶ JRS, USA⁷ Calbiochem, Germany⁸ Merck, Germany⁹ Sigma, USA¹⁰ Difco, USA¹¹ Gibco, USA¹² Sigma, USA¹³ MP Biomedicals, USA¹⁴ Mallinckrodt, Sweden¹⁵ Difco, USA

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ภายหลังนี้ฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C เชื้อแบคทีเรีย และจีโนมิคดีเอ็นเอ (gDNA) มาตรฐาน

เชื้อ mycoplasma มาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ *M. gallisepticum* (S6), *M. synoviae* (ATCC 25204) และ *M. hyorhinis* (BTS7) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เพิ่มจำนวนเชื้อ มาตรฐานทั้ง 3 ชนิดในอาหารแข็งและเหลว เพื่อใช้ในการสกัด gDNA และเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้ในการหาความจำเพาะ (specificity) ความถูกต้อง (accuracy) และความเที่ยง (precision)

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (*B. subtilis* subsp. *spizizenii*; ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*; ATCC 9027), *Salmonella enterica* subsp. *enteridis* (*S. enterica* subsp. *enteridis*; ATCC 13076) และ *Salmonella enterica* subsp. *typhimurium* (*S. enterica* subsp. *typhimurium*; ATCC 14028) ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ กรมปศุสัตว์ เพิ่มจำนวนเชื้อมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดในอาหารเหลว เพื่อใช้ในการหาความจำเพาะของ primer ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

gDNA มาตรฐานของเชื้อ mycoplasma 3 ชนิด ได้แก่ *M. gallisepticum* (NCTC 010115), *M. synoviae* (NCTC 10124) และ *M. hyorhinis* (NCTC 10130) แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สั่งซื้อจากบริษัท Minerva Biolabs GmbH¹⁶ ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ gDNA ที่สามารถตรวจพบ (Limit of Detection; LOD)

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และการสกัด gDNA

เพาะเลี้ยง *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด modified Frey's และเพาะเลี้ยง *M. hyorhinis* ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Hayflick บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 5-10% CO₂ นาน 7-10 วัน

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* subsp. *enteridis* และ *S. enterica* subsp. *typhimurium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

นำเชื้อ mycoplasma และเชื้อแบคทีเรียไปสกัด gDNA ด้วยชุดสกัด DNeasy[®] blood & tissue kit¹⁷ ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ นำ gDNA ที่สกัดได้ไปวัดหาปริมาณ gDNA ด้วยเครื่อง Life Science UV/Vis Spectrophotometer¹⁸ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา real-time PCR ต่อไป

Allantoic fluid

allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (SPF) อายุ 10 วันที่ฉีดเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลเชื้อเป็น

¹⁶ Minerva Biolabs GmbH, Germany

¹⁷ QIAGEN, USA

¹⁸ Beckman, USA

สเตรนลาโซต้า (NDVL) แล้วฟอกไข่ที่อุณหภูมิ 37 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 70% นาน 72 ชั่วโมง แช่ไข่ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนเก็บ allantoic fluid การทดลองนี้ใช้ allantoic fluid ชุดการผลิตที่ NDL 15/57 ใช้ในการสร้าง standard curve หาค่า LOD, specificity, accuracy และ precision และ allantoic fluid จำนวน 17 ชุดการผลิต ใช้ในการทดสอบหาเชื้อ mycoplasma ใน allantoic fluid ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

การสร้าง Standard curve และหาค่า LOD

นำ gDNA 3 ชนิด (*M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*) ไปเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันด้วยวิธี 10 fold serial dilution technique ($1-10^{-8}$) เพื่อหาค่า LOD ด้วยเครื่อง real-time PCR เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 45 รอบ จะได้ค่า Crossing point (Ct) ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาหาค่า Ct เฉลี่ย เพื่อสร้าง standard curve ของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ gDNA ทั้งสามชนิดและค่า Ct เฉลี่ย

ปฏิกิริยา real-time PCR

ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยชุดปฏิกิริยา LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master¹⁹ ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x SYBR Green I master 10 ไมโครลิตร forward primer ตามตารางที่ 1 (OIE, 2008) 0.25 ไมโครลิตร reverse primer ตามตารางที่ 1 (OIE, 2008) 0.25 ไมโครลิตร H₂O PCR grade 7.5 ไมโครลิตร และ DNA template 2 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Rotor-Gene[™] 6000²⁰ ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา Hold 95 °C นาน 10 นาที cycling on green 95 °C นาน 20 วินาที 60 °C นาน 30 วินาที 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 45 รอบ melting 75-95 °C

การเตรียม 1.5% อะกาโรสเจล

ชั่งอะกาโรส (agarose)²¹ 1.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (1XTAE) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำให้ agarose ละลายโดยแช่ฟลasks ในน้ำเดือด นำออกมาวางให้เย็นลงอุณหภูมิประมาณ 60 °C เติม GelStar²² ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงในถาดรองเจลที่วางบนพื้นราบ รอให้เจลแข็งตัวจึงนำไปตรวจสอบ complementary DNA (cDNA)

การตรวจสอบ cDNA โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา real-time PCR ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X DNA loading dye²³ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบด้วย 1.5% อะกาโรสเจล ในบัฟเฟอร์ 1XTAE ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ด้วยเครื่อง Mupid-EXu²⁴ และตรวจดูแถบ cDNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง G-box²⁵ เปรียบเทียบกับ cDNA มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder²⁶

¹⁹ Roche, Germany

²⁰ Corbett Research, Australia

²¹ SeaKem, USA

²² Lonza, USA

²³ Lonza, USA

²⁴ Advance, Japan

²⁵ Syngene, UK

²⁶ Lonza, USA

การทดสอบ specificity

specificity เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของ primer ว่ามีความจำเพาะต่อ DNA ที่ต้องการทดสอบเท่านั้น (Vaerman *et al.*, 2004) หา specificity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิดโดยนำเชื้อ mycoplasma ผสมใน allantoic fluid ใช้ allantoic fluid 900 ไมโครลิตร เชื้อ mycoplasma 100 ไมโครลิตร โดยหลอดที่ 1 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* หลอดที่ 2 ผสมเชื้อ *M. synoviae* หลอดที่ 3 ผสมเชื้อ *M. hyorhinis* หลอดที่ 4 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* + *M. synoviae* หลอดที่ 5 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* + *M. hyorhinis* หลอดที่ 6 ผสมเชื้อ *M. synoviae* + *M. hyorhinis* และหลอดที่ 7 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* + *M. synoviae* + *M. hyorhinis* นำเชื้อทั้ง 7 หลอดไปสกัด gDNA วัดความเข้มข้นและทำการเจือจาง gDNA ให้มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจหาเชื้อด้วยเครื่อง real-time PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ทำซ้ำ 30 ครั้ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา specificity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิด

หา specificity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma กับแบคทีเรียชนิดต่างๆโดยนำเชื้อแบคทีเรียผสมใน allantoic fluid ใช้ allantoic fluid 900 ไมโครลิตร เชื้อแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร โดยหลอดที่ 8 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* หลอดที่ 9 ผสมเชื้อ *M. synoviae* หลอดที่ 10 ผสมเชื้อ *M. hyorhinis* หลอดที่ 11 ผสมเชื้อ *B. subtilis* subsp. *spizizenii* หลอดที่ 12 ผสมเชื้อ *S. aureus* หลอดที่ 13 ผสมเชื้อ *P. aeruginosa* หลอดที่ 14 ผสมเชื้อ *S. enterica* subsp. *enteridis* หลอดที่ 15 ผสมเชื้อ *S. enterica* subsp. *typhimurium* นำเชื้อทั้ง 8 หลอดไปสกัด gDNA วัดความเข้มข้นและทำการเจือจาง gDNA ให้มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจหาเชื้อด้วยเครื่อง real-time PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ทำซ้ำ 5 ครั้ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา specificity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ

การทดสอบ accuracy

accuracy เป็นค่าที่แสดงความสามารถของ primer ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ถูกต้องต่อ DNA ที่ต้องการทดสอบ (Vaerman *et al.*, 2004) หาค่า accuracy โดยนำเชื้อ mycoplasma ผสมใน allantoic fluid ใช้ allantoic fluid 900 ไมโครลิตร เชื้อ mycoplasma 100 ไมโครลิตร โดยหลอดที่ 1 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* หลอดที่ 2 ผสมเชื้อ *M. synoviae* หลอดที่ 3 ผสมเชื้อ *M. hyorhinis* หลอดที่ 4 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* + *M. synoviae* หลอดที่ 5 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* + *M. hyorhinis* หลอดที่ 6 ผสมเชื้อ *M. synoviae* + *M. hyorhinis* และหลอดที่ 7 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* + *M. synoviae* + *M. hyorhinis* นำเชื้อทั้ง 7 หลอดไปสกัด gDNA วัดความเข้มข้นและทำการเจือจาง gDNA ให้มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจหาเชื้อด้วยเครื่อง real-time PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ทำซ้ำ 30 ครั้ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา accuracy ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิด

การทดสอบหา precision

precision เป็นค่าความเที่ยง หรือความแม่นยำเกิดจากการทำปฏิกิริยาซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกัน โดยวิธีเดียวกัน (Vaerman *et al.*, 2004) หาค่า precision โดยนำ gDNA มาตรฐาน 3 ชนิด (*M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*) ไปเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันด้วยวิธี 10 fold serial dilution technique ($1-10^{-8}$) นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง real-time PCR เมื่อปฏิกิริยาคำนึงไปจนครบ 45 รอบ จะได้ค่า Ct ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำค่า Ct แต่ละความเข้มข้นมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CoV) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%CoV = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) x 100\%}{\text{ค่าเฉลี่ย (Mean)}}$$

การทดสอบหาเชื้อ mycoplasma ใน allantoic fluid

นำเชื้อ mycoplasma ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงผสมใน allantoic fluid NDL 15/57 ใช้ allantoic fluid 1,800 ไมโครลิตร เชื้อ mycoplasma 200 ไมโครลิตร โดยหลอดที่ 1 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* หลอดที่ 2 ผสมเชื้อ *M. synoviae* หลอดที่ 3 ผสมเชื้อ *M. hyorhinis* เป็นชุดควบคุม หลอดที่ 4-20 เป็นตัวอย่างในการทดสอบ โดยใช้ allantoic fluid ชุดการผลิตที่ 1-17 หลอดละ 2,000 ไมโครลิตร แบ่งเชื้อทั้ง 20 หลอดออกเป็น 2 ส่วนๆ ละ 1,000 ไมโครลิตร ส่วนที่ 1 นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ mycoplasma ในอาหารเหลว ส่วนที่ 2 นำไปสกัด gDNA นำ gDNA ที่สกัดได้ไปวัดหาปริมาณ DNA และทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิดตามตารางที่ 1 เพื่อตรวจหาเชื้อ mycoplasma ในตัวอย่าง allantoic fluid

ผล

Standard curve และ LOD

เมื่อนำ gDNA จากบริษัท Minerva Biolabs GmbH ไปทำปฏิกิริยา เพื่อสร้าง standard curve และใช้โปรแกรมจากเครื่อง real-time PCR คำนวณหาค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (R^2) พบว่า R^2 ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* เป็น 0.99831, 0.99794 และ 0.99563 ตามลำดับ และค่า LOD ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* เป็น 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-3} หรือเทียบเท่า 100, 10 และ 100 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสาย cDNA (melting temperature) ที่สังเคราะห์ได้ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* ประมาณ 84.2 °C, 84.5 °C และ 86.8 °C ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 1 และตารางที่ 2

การตรวจสอบ cDNA โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เมื่อนำ cDNA ไปตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ cDNA มาตรฐาน พบว่าแถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส (bp) และ *M. hyorhinis* มีขนาดประมาณ 300 bp ดังแสดงผลในรูปที่ 2

การทดสอบ specificity

เมื่อทดสอบ specificity ของ primer MG, MS และ MHR ที่มีต่อเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* พบว่า primer ทั้ง 3 ชนิดมี specificity 100% สามารถทำปฏิกิริยาได้จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma และไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 3

การทดสอบ accuracy

เมื่อทดสอบ accuracy ของ primer MG, MS และ MHR ที่มีต่อเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* พบว่า primer ทั้ง 3 ชนิดมี accuracy 100% สามารถทำปฏิกิริยาได้ถูกต้องต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิด แม้จะมี mycoplasma ชนิดอื่นปนเปื้อนร่วมอยู่ด้วย ดังแสดงผลในตารางที่ 4

การทดสอบหา precision

เมื่อนำ gDNA 3 ชนิด (*M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ($1-10^{-8}$) ไปทดสอบ precision โดยทำปฏิกิริยาซ้ำ 3 ครั้ง นำค่า Ct ทั้ง 3 ครั้งของแต่ละความเข้มข้น gDNA มาคำนวณหา precision หรือ %CoV พบว่าการทดลองมีความแปรปรวนน้อย มี precision สูง ดังแสดงผลในตารางที่ 5

การทดสอบหาเชื้อ mycoplasma ใน allantoic fluid

เมื่อนำตัวอย่าง allantoic fluid จำนวน 17 ตัวอย่าง มาทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ mycoplasma ด้วยปฏิกิริยา real-time PCR และการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* เป็นชุดควบคุม ไม่พบการปนเปื้อน *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* ใน allantoic fluid ทั้ง 17 ตัวอย่าง ที่ผลิตโดยฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ดังแสดงผลในตารางที่ 6

วิจารณ์

mycoplasma เป็นแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ ทำให้มีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาด 0.3 ถึง 0.8 ไมโครเมตร โคโลนีรูปไข่ดาว จัดอยู่ใน class Mollicutes Order Mycoplasmatales มีจีโนม ขนาด 0.6-1.35 ล้านเบส (Mb) ประกอบด้วยยีนประมาณ 300 ยีน พบได้ทั่วไปทั้งในคน สัตว์ และดิน mycoplasma เป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และในการปศุสัตว์ (Willey *et al.*, 2011) การศึกษา

ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ นิยมศึกษาจากยีน 16S ribosomal DNA (16S rDNA) ซึ่งเป็นยีนที่มีความคงตัวสูง (Janda and Abbott, 2007; Jill and Clarridge, 2004; Mangala *et al.*, 2002) รวมทั้งเชื้อ mycoplasma ด้วย (สุกัลยาณี และสุภาพร, 2551; Garcia *et al.*, 1996; Lauerman *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2012) การใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinitis* (OIE, 2008) จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นยีนสำหรับการตรวจหาเชื้อทั้งสามชนิด รายละเอียดลำดับเบสของ primer ดังแสดงในตารางที่ 1 ในการทำปฏิกิริยา PCR ทุกชนิดจำเป็นต้องตรวจยืนยัน cDNA ที่สังเคราะห์ได้ การตรวจสอบ cDNA จากปฏิกิริยา real-time PCR ในการทดลองใช้ SYBR green เป็นสารเรืองแสง (fluorophore) ในการตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ cDNA สี SYBR green เมื่ออยู่ในสารละลายจะมีการเรืองแสงในปริมาณต่ำๆ แต่ถ้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) และจะคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้นตามจำนวน dsDNA ที่เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถติดตามการเกิด cDNA ได้ถูกรอบของปฏิกิริยา (อินทชัย, 2549) และจากคุณสมบัติของสี SYBR green ทำให้สามารถทำ melting curve analysis โดยวิเคราะห์จากค่า melting temperature ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ทำให้ cDNA แยกตัวออกจากกัน โดยมีสภาพเป็นเกลียวคู่ครึ่งหนึ่งและสายเดี่ยวครึ่งหนึ่ง (สุรินทร์, 2543) การแยกตัวของ dsDNA จะทำให้ปริมาณของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างฉับพลัน ทำให้ทราบค่า melting temperature ของ dsDNA นั้นๆ ได้ โดย dsDNA แต่ละเส้นจะมีค่า melting temperature ที่แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับขนาดและลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ จากผลการทดลองตามตารางที่ 2 ค่า melting temperature ของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinitis* เป็น 84.2, 84.5 และ 86.8 °C ตามลำดับ ค่า melting temperature ของเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* มีค่าใกล้เคียงกันจึงนำ cDNA ไปตรวจสอบยืนยันอีกครั้งด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* มีขนาดแตกต่างกัน แถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. gallisepticum* มีขนาดเล็กกว่า 200 bp และที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. synoviae* มีขนาดใหญ่กว่า 200 bp (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับขนาด cDNA ตามตารางที่ 2 แสดงว่า cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็น cDNA จากตำแหน่งบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinitis* นอกจากนี้ในปฏิกิริยา real-time PCR ควรพิจารณาค่า R^2 เป็นค่าความเป็นเส้นตรงของ standard curve แสดงประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาว่าเกิดขึ้นหรือไม่ จะมีค่าระหว่าง 0-1 (0 หมายถึงไม่เกิดปฏิกิริยา 1 หมายถึงปฏิกิริยาเกิดขึ้นดี) และค่า LOD แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ gDNA ที่สามารถตรวจพบได้ในปฏิกิริยา (Vaerman *et al.*, 2004) จากผลการทดลองตามรูปที่ 1 และตารางที่ 2 พบว่าค่า R^2 ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinitis เท่ากับ 0.99831, 0.99794 และ 0.99563 ตามลำดับ ชุดข้อมูลมีค่า R^2 เข้าใกล้ 1 แสดงว่าการปฏิกิริยาเกิดขึ้นดี ชุดข้อมูลมีความน่าเชื่อถือ การทดลองใช้ gDNA มาตรฐาน เริ่มต้นที่ 0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร หรือคิดเป็นประมาณ 100,000 เซลล์ (Zhao and Yamato, 1993) จากผลการทดลองพบว่า gDNA ของ *M. gallisepticum**

และ *M. hyorhinis* มีค่า LOD 100 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร หรือคิดเป็นประมาณ 100 เซลล์ ส่วน *M. synoviae* สามารถตรวจพบได้แม้จะมี gDNA เพียง 10 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร หรือคิดเป็นประมาณ 10 เซลล์

การหา specificity, accuracy และ precision จากผลการทดลองตามตารางที่ 3 และ 4 จากการทำซ้ำหลายๆครั้ง พบว่า primer สามารถทำปฏิกิริยาได้แบบจำเพาะ และถูกต้อง 100% ต่อเชื้อ mycoplasma แต่ละชนิด แม้จะมีเชื้อ mycoplasma และแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่ แสดงว่า primer ที่ใช้ในการทดลองสามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* แม้จะมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* subsp. *enteridis* และ *S. enterica* subsp. *typhimurium* หรือเชื้อ mycoplasma ชนิด *M. hyorhinis* ร่วมอยู่ด้วย การหา precision ของปฏิกิริยาพิจารณาจากค่า %CoV เป็นค่าแสดงความแปรปรวนของชุดข้อมูล ซึ่งแปรผกผันกับค่า precision จากผลการทดลองตามตารางที่ 5 ค่า %CoV ของแต่ละความเข้มข้นมีค่าน้อย แสดงว่าการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งมีความแปรปรวนน้อย และมี precision สูง

การตรวจการปนเปื้อนเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid โดยปฏิกิริยา real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจเดิมคือการเพาะเลี้ยงเชื้อ ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid ทั้ง 17 ตัวอย่างที่ใช้ในการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์ปีก

สรุป

การตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ real-time PCR ใน allantoic fluid จากไข่ SPF ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนาไลซ์ได้ พบว่าวิธีตรวจมี precision สูง มี specificity และ accuracy 100% สามารถตรวจ gDNA ของ *M. gallisepticum* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 100 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร หรือเท่ากับ 100 เซลล์ ส่วน *M. synoviae* สามารถตรวจพบได้แม้จะมี gDNA เพียง 10 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร หรือเท่ากับ 10 เซลล์ เหมาะสมต่อการนำไปใช้เพื่อเฝ้าระวังและตรวจยืนยันการปนเปื้อนเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.พัชรี ทองคำคุณ สพ.ญ.สาริสา เวียงชนก คุณพัฒน์ สุนามะ จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ น.สพ.สุรพัฒน์ เลาหวนิช จากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้ออ้างอิง อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ และ allantoic fluid ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่

ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณคณะกรรมการพัฒนาวิชาการ
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

- กนกวรรณ จารุกัจฉา สุกัญญา ภัทรจินดา และณัฐยา เทียงธรรม 2549 ปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอร์แบบดั้งเดิม
และแบบเวลาจริง วารสารไทยเกษตรศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 1(3): 254-262
- วีระพงศ์ ลูกลิตานนท์ 2551 พื้นฐาน real-time PCR คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แหล่งที่มา
http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Real_Time_PCR.pdf 2 พฤศจิกายน
2555
- สุกัญญาณี เทพภูธร และสุภาพร ภูมิอมร 2551 การประเมินความถูกต้องของวิธีปฏิบัติลูกโซ่พอลิเมอร์ในการ
การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาในเซลล์เพาะเลี้ยง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 50(2):
87-102
- สุกัญญา นนุฟู สุกัญญา อธิโรจน์ ทรงศักดิ์ รักษาสุข วิไลรัตน์ ลีวงศ์สถาพร และบุญพร้อม อิงคเวชชากุล
2550 การแยกเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* โดย real-time polymerase chain reaction ประมวล
เรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 33 หน้า 157-158
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล 2543 โครงสร้างและหน้าที่ของดีเอ็นเอ ใน สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล บรรณาธิการ
พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น พิมพ์ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ หน้า 10-12
- อโนทัย โภคาธิกรณ 2549 Introduction to real-time PCR and it's applications คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แหล่งที่มา <http://gotoknow.org/blog/moleculartechonology/129105>
3 เมษายน 2555
- Algire, M. A., Lartigue, C., Thomas, D. W., Garcia, N. A., Glass, J. I. and Merryman, C. 2009. New
selectable marker for manipulating the simple genomes of mycoplasma species. Antimicrob.
Agents Chemother. 53(10): 4429-4432.
- Garcia, M., Jackwood, M. W., Head, M., Levisohn, S. and Kleven, S. H. 1996. Use of species-specific
oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. iowae* PCR
amplification products. J. Vet. Diagn. Invest. 8: 56-63.
- Janda, J. M. and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the
diagnostic laboratory :Pluses, Perlis and Pitfalls. J. Clin. Microbiol. 45: 2761-2764.

- Jill, E. and Clarridge, III. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 17(4): 840-862.
- Kleven, S. H. 2008. Mycoplasmosis Introduction. In Diseases of poultry, 12th ed. Y. M. Saif, Blackwell publishing. Iowa, USA . pp. 805-807.
- Lauerman, L. H., Hoerr, F. J., Sharpton, A. R., Shah, S. M. and van Santen, V. L. 1993. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. Avian dis. 37(3): 829-834.
- Liu, C. M., Aziz, M., Kachur, S., Hsueh, P. R., Huang, Y. T., Keim, P. and Price, L. B. 2012. BactQuant: an enhanced broad-coverage bacterial quantitative real-time PCR assay. BMC Microbiol. 12: 1-13.
- Lonza. 2011. MycoAlert™ mycoplasma detection kit, Bioresearch catalog 2011-2012.
- Mangala, A., Nadkarni, F., Martin, E., Jacques, N. A. and Hunter, N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology. 148(1): 257-266.
- Office International des Epizooties. 2008. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). In Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6th ed. OIE. Paris, France. pp. 482-496.
- Raviv, Z. and Kleven, S. H. 2009. The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. Avian dis. 53(1): 103-107.
- Stipkovits, L. and Kempf, I. 1996. Mycoplasmoses in poultry. Rev. Sci. Tech. 15(4): 1495-1525.
- Vaerman, J. L., Sauaiaoy, P. and Ingargiola, I. 2004. Evaluation of real-time PCR data. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 18(2): 212-214.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J. 2011. Bacterial: the low G+C gram positives. In Prescott's microbiology, 8th ed. McGraw-Hill. Singapore. pp. 551-555.
- Zhao, S. and Yamamoto, R. 1993. Detection of *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. Avian Pathology. 22: 533-542.

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) และ *M. hyorhinis* (MHR)

primer	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
MG	GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC
MS	GAGAAGCAAAATAGTGATATCA	CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA
MHR	TGAGTAATAGAAAGGAGCTTCAC	CGTCAAGATAAAATCATTTCCTATTCT

ที่มา: OIE, 2008

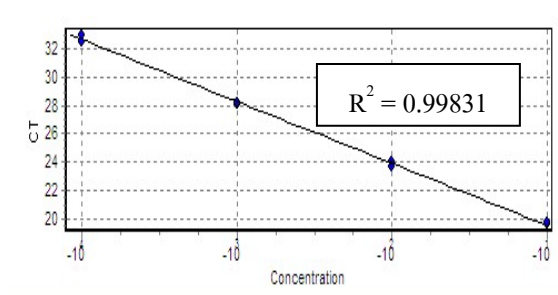
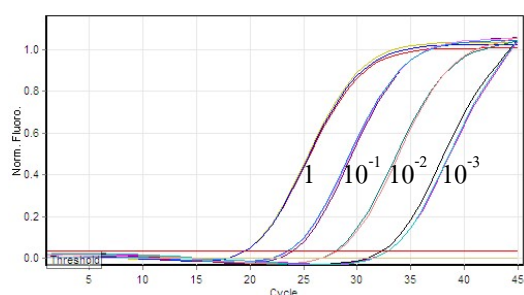
ตารางที่ 2 ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (R^2) และความเข้มข้นต่ำสุด (LOD) และอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสาย cDNA (melting temperature) ของ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* ที่สามารถตรวจพบ

primer	amplicon size (bp)	R^2	LOD (เฟมโตกรัม/ ไมโครลิตร)	melting temperature (°C)
<i>M. gallisepticum</i>	185*	0.99831	100	84.2
<i>M. synoviae</i>	207**	0.99794	10	84.5
<i>M. hyorhinis</i>	294**	0.99563	100	86.8

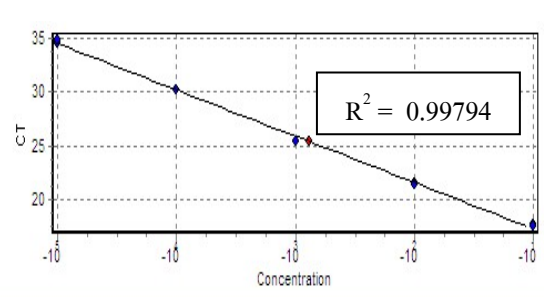
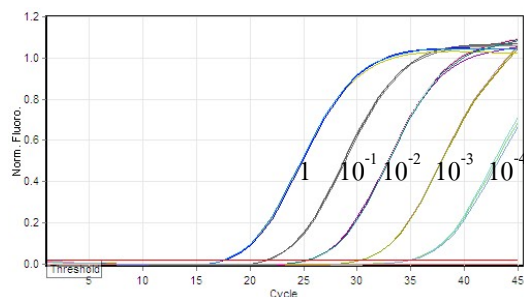
* ที่มา: OIE, 2008

** ที่มา: พัชร ทงคำคุณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์)

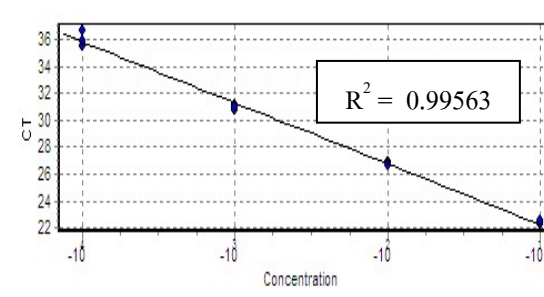
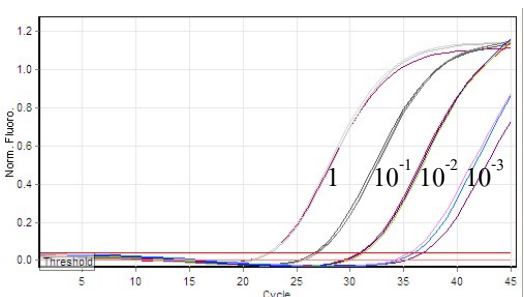
(a) *M. gallisepticum*



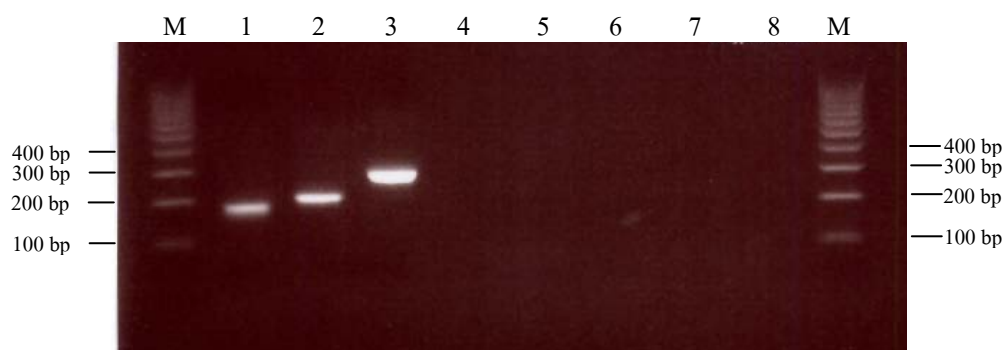
(b) *M. synoviae*



(c) *M. hyorhinis*



รูปที่ 1 กราฟการเพิ่มปริมาณ DNA และกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ gDNA และค่า Ct เฉลี่ย (a) *M. gallisepticum*, (b) *M. synoviae* และ (c) *M. hyorhinis*



รูปที่ 2 การตรวจสอบ cDNA โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ของเชื้อ *M. gallisepticum* (lane 1), *M. synoviae* (lane 2), *M. hyorhinis* (lane 3), *B. subtilis subsp. spizizenii* (lane 4), *S. enterica subsp. enteridis* (lane 5), *S. aureus* (lane 6), *P. aeruginosa* (lane 7), *S. enteric subsp. typhimurium* (lane 8) และ cDNA มาตรฐาน 100 bp (lane M)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ specificity ของ primer ต่อเชื้อ mycoplasma และเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)

Mycoplasma species	primer		
	MG	MS	MHr
<i>M. gallisepticum</i>	(30/30)	(0/30)	(0/30)
<i>M. synoviae</i>	(0/30)	(30/30)	(0/30)
<i>M. hyorhinis</i>	(0/30)	(0/30)	(30/30)
<i>M. gallisepticum</i> + <i>M. synoviae</i>	(30/30)	(30/30)	(0/30)
<i>M. gallisepticum</i> + <i>M. hyorhinis</i>	(30/30)	(0/30)	(30/30)
<i>M. synoviae</i> + <i>M. hyorhinis</i>	(0/30)	(30/30)	(30/30)
<i>M. gallisepticum</i> + <i>M. synoviae</i> + <i>M. hyorhinis</i>	(30/30)	(30/30)	(30/30)
<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	(0/30)	(0/30)	(0/30)
<i>S. aureus</i>	(0/30)	(0/30)	(0/30)
<i>P. aeruginosa</i>	(0/30)	(0/30)	(0/30)
<i>S. enterica subsp. enteridis</i>	(0/30)	(0/30)	(0/30)
<i>S. enterica subsp. typhimurium</i>	(0/30)	(0/30)	(0/30)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ accuracy ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ mycoplasma (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)

Mycoplasma species	primer		
	MG	MS	MHr
<i>M. gallisepticum</i>	(30/30)	(0/30)	(0/30)
<i>M. synoviae</i>	(0/30)	(30/30)	(0/30)
<i>M. hyorhinis</i>	(0/30)	(0/30)	(30/30)
<i>M. gallisepticum</i> + <i>M. synoviae</i>	(30/30)	(30/30)	(0/30)
<i>M. gallisepticum</i> + <i>M. hyorhinis</i>	(30/30)	(0/30)	(30/30)
<i>M. synoviae</i> + <i>M. hyorhinis</i>	(0/30)	(30/30)	(30/30)
<i>M. gallisepticum</i> + <i>M. synoviae</i> + <i>M. hyorhinis</i>	(30/30)	(30/30)	(30/30)

ตารางที่ 5 ค่า precision (%CoV) ที่ความเข้มข้นต่างๆของ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*

Mycoplasma species	ความเข้มข้น				
	undilute	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
<i>M. gallisepticum</i>	0.1788	0.9465	1.1390	0.8832	-
<i>M. synoviae</i>	0.5070	0.3171	0.1637	0.0689	0.3801
<i>M. hyorhinis</i>	0.6216	0.6731	0.6452	1.6689	-

ตารางที่ 6 การทดสอบหาเชื้อ mycoplasma ใน allantoic fluid จำนวน 17 ชุด ด้วยวิธี real-time PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

allantoic fluid	real-time PCR			การเพาะเลี้ยงเชื้อ
	MG	MS	MHr	
allantoic fluid NDL 15/57 + <i>M. gallisepticum</i>	+	-	-	+
allantoic fluid NDL 15/57 + <i>M. synoviae</i>	-	+	-	+
allantoic fluid NDL 15/57 + <i>M. hyorhinis</i>	-	-	+	+
allantoic fluid 1	-	-	-	-
allantoic fluid 2	-	-	-	-
allantoic fluid 3	-	-	-	-
allantoic fluid 4	-	-	-	-
allantoic fluid 5	-	-	-	-
allantoic fluid 6	-	-	-	-
allantoic fluid 7	-	-	-	-
allantoic fluid 8	-	-	-	-
allantoic fluid 9	-	-	-	-
allantoic fluid 10	-	-	-	-
allantoic fluid 11	-	-	-	-
allantoic fluid 12	-	-	-	-
allantoic fluid 13	-	-	-	-
allantoic fluid 14	-	-	-	-
allantoic fluid 15	-	-	-	-
allantoic fluid 16	-	-	-	-
allantoic fluid 17	-	-	-	-

Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in allantoic fluid using for live Newcastle disease, La Sota strain, vaccine production by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

Saipin Khumsab¹ Anuruk Trakanrungsee¹

Abstract

Mycoplasma gallisepticum and *Mycoplasma synoviae* are commonly recognized as poultry pathogens. The avian mycoplasmas are associated with respiratory disease and synovitis. Many approaches are used for the diagnosis of avian mycoplasmosis including molecular detection technique. *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in allantoic fluid for the production of Newcastle disease vaccine were detected by real-time polymerase chain reaction. The specific primers for 16S ribosomal DNA (16S rDNA) of *M. gallisepticum*, *M. synoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* as control were designed and the polymerase chain reaction performed with LightCycler 480 SYBR Green I Master. The result showed high correlation of DNA amount and detection time as R^2 of *M. gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. hyorhinis* (0.99831, 0.99794 and 0.99563, respectively). The lowest amount of detection of genomic DNA for *M. gallisepticum* and *M. synoviae* were 100 fg/ μ l and 10 fg/ μ l, respectively. The characteristics of designed primers were highly specific, accuracy and precision. The detection was not interfered by *M. hyorhinis* and other bacterial contaminations such as *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* subsp. *enteridis* and *S. enterica* subsp. *typhimurium*. From the result, real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) could be a method of choice to detect *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in order to monitor and confirm contamination test in allantoic fluid of chicken egg.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, real-time PCR, allantoic fluid

¹Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การพัฒนาวิธี indirect ELISA สำหรับตรวจแอนติบอดีต่อ ไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ

อารีรัตน์ แพงเพ็ง¹ สายพิน ขุมทรัพย์¹

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ (Specific Pathogen-Free, SPF, chicken) ด้วยวิธี indirect ELISA (NDV-ELISA) โดยเตรียมแอนติเจนจากน้ำไวรัสที่ได้จากกระบวนการผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation พบว่าแอนติเจนความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับซีรัมไก่เจือจาง 1:400 ภายใต้สภาวะของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถให้ผลการทดสอบซ้ำทั้งภายในเพลตเดียวกัน (intra-assay) และต่างเพลตกัน (inter-assay) โดยค่า %CV น้อยกว่า 12.30 และ 13.63 ตามลำดับ การประเมินประสิทธิภาพของวิธี NDV-ELISA ใช้เกณฑ์ตัดสิน (cutoff) ผลการทดสอบจากค่า mean OD₆₅₀ + 3SD ของซีรัมผลลบ โดยตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลจากซีรัมไก่ จำนวน 1,015 ตัวอย่าง ด้วยวิธี NDV-ELISA เปรียบเทียบกับชุดตรวจสำเร็จรูป พบว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องในระดับสำคัญ (Kappa value=0.97; p value<0.05) โดยค่าร้อยละความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100 และ 98.6 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบมีประสิทธิภาพที่ดีเทียบเคียงกับชุดทดสอบสำเร็จรูป และเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะได้

คำสำคัญ: ไวรัสนิวคาสเซิล ELISA แอนติบอดี ไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคนิวคาสเซิลเป็นโรคระบาดที่องค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organization for Animal Health หรือ Office International des Epizooties, OIE) ได้กำหนดไว้ในบัญชีโรคสัตว์ปีกและการติดเชื้อ (Avian diseases and infections) ที่แพร่กระจายโรคอย่างรวดเร็ว เชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคนี้คือ ไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus, NDV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไวรัส Avian paramyxovirus (APMV) ที่ถูกแยกได้จากสัตว์ปีก โดยจำแนกออกเป็น 12 ซีโรไทป์ (APMV-1 ถึง 12) ไวรัสนิวคาสเซิลทุกสายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม APMV-1 ที่อนุภาคมีเยื่อหุ้มและภายในบรรจุสารพันธุกรรมชนิด single-stranded RNA ซึ่งจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 6 ชนิด ได้แก่ hemagglutinin-neuraminidase (HN), fusion protein (F), matrix or membrane protein (M), nucleocapsid protein (NP), nucleocapsid associated protein หรือ phosphoprotein (NAP or P) และ large polymerase protein (L) (Das and Kumar, 2015) สัตว์ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลอาจแสดงอาการเฉียบพลันและรุนแรงจนทำให้สัตว์ตายได้ทั้งฝูงภายใน 3-4 วัน หรืออาจไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น และต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยยืนยันทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลทางห้องปฏิบัติการทำได้โดยการตรวจเพาะแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะที่มีรอยโรคในไขไก่ปลอดเชื้อเฉพาะหรือในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน และการตรวจทางซีรัมวิทยา เช่น วิธี Hemagglutination inhibition test (HI) ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องอาศัยความชำนาญในการแปลผล และมีโอกาสเกิดผลบวกดลวง (false positive) ได้สูง (Czifra *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997) ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีตรวจทางซีรัมวิทยาด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ขึ้นเพื่อใช้ทดแทนวิธี HI ซึ่งหลายงานวิจัยได้พิสูจน์ให้เห็นว่า ELISA มีความไวและความจำเพาะเทียบเคียงกับวิธี HI นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถอ่านผลด้วยเครื่องอัตโนมัติ จึงเป็นที่ยอมรับและนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทุกรูปแบบที่พัฒนาขึ้นใช้เองหรือชุดทดสอบสำเร็จรูป (Das and Kumar, 2015; Sahle and Burgess, 2002; Greiner and Gardner, 2000; Koch *et al.*, 1998; Srinivasan *et al.*, 1992) เช่นเดียวกับการตรวจวินิจฉัยและเฝ้าระวังการเกิดโรคนิวคาสเซิลในฟาร์มไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogen-free, SPF, chicken) ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่นำเข้าจากต่างประเทศ แม้ว่าจะสะดวกต่อการใช้งานแต่มีราคาค่อนข้างสูง ในขณะที่ สทช. ผลิตไวรัสนิวคาสเซิลเพื่อใช้ผลิตวัคซีน หากนำไวรัสดังกล่าวมาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิลขึ้นใช้เองได้จะเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูป ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้แอนติเจน whole virus จากกระบวนการผลิตวัคซีนมาพัฒนาวิธีทดสอบสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในฝูงไก่ปลอดเชื้อเฉพาะด้วยเทคนิค indirect ELISA

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัสนิวคาสเซิล

เชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สายพันธุ์ลาโซต้า ใน allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะอายุ 9-10 วัน โดยฉีดเชื้อไวรัสปริมาณ 10^4 fifty percent embryo infective dose (EID_{50}) เข้าทาง allantoic cavity ฟองละ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 55-60% นาน 72 ชั่วโมง

ตัวอย่างซีรัม

ซีรัมไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ไม่เคยได้รับเชื้อหรือวัคซีนมาก่อน จำนวน 200 ตัวอย่าง ได้รับจากฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สทช. เพื่อใช้สำหรับคำนวณหาค่าจุดตัด (cutoff)

ซีรัมไก่สำหรับทดสอบประเมินประสิทธิภาพ จำนวน 1,015 ตัวอย่าง แบ่งเป็นซีรัมจากฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สทช. จำนวน 699 ตัวอย่าง กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จำนวน 101 ตัวอย่าง และห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก จำนวน 215 ตัวอย่าง

การเตรียมแอนติเจนไวรัสนิวคาสเซิล

นำไวรัสนิวคาสเซิลใน allantoic fluid ไปปั่นเหวี่ยง $7,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที เก็บส่วนใสไปปั่นเหวี่ยง $98,000 \times g$ ด้วยเครื่อง ultracentrifuge¹ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย TNE buffer (50 มิลลิโมลาร์ Tris, 100 มิลลิโมลาร์ NaCl, 1 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 7.4) และเติมในสารละลาย 20-60% (w/v) sucrose gradient ปั่นเหวี่ยงที่ $98,000 \times g$ อุณหภูมิ 4°C นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างไวรัสในช่วงความเข้มข้น 40-50% sucrose มาเจือจางด้วย TNE buffer และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ $98,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 20% glycerol ใน TNE buffer และนำแอนติเจนที่ได้มาตรวจความบริสุทธิ์และความจำเพาะของแอนติเจนกับซีรัมไก่ที่ให้ผลบวกต่อไวรัสนิวคาสเซิลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting assay จากนั้นตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วย bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit² และเก็บรักษาแอนติเจนที่ -20°C

การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ NDV-ELISA ด้วยวิธี checkerboard titration

เจือจางแอนติเจนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน coating buffer (0.05 โมลาร์ carbonate bicarbonate buffer, pH 9.5) และเติมลงใน ELISA plate³ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน ล้างเพลตด้วย PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% tween 20, pH 7.2-7.4) 5 ครั้ง เติม blocking buffer (1% skim milk ใน PBST) ทุกหลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร

¹ Beckman coulter XL-100, USA

² Thermo Scientific Pierce, USA

³ Costar 3560™ 96 well, USA

และเติมซีรัมควบคุมที่เจือจางแบบ two-fold dilution ด้วย blocking buffer ตั้งแต่ 1:50 ถึง 1:1,600 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลตด้วย PBST 5 ครั้ง จากนั้นเติม conjugate (rabbit anti-chicken Ig-HRPconjugate)⁴ เจือจาง 1:6,000 ใน blocking buffer ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลตด้วย PBST 7 ครั้ง จากนั้นเติม TMB peroxidase substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine peroxidase substrate)⁵ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มืด นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย TMB stop solution⁶ ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader⁷

การหาร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%coefficient variation, CV)

สุ่มตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกและผลลบจากชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek[®] จำนวนอย่างละ 5 ตัวอย่าง ทดสอบด้วยวิธี NDV-ELISA โดยทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 8 ครั้งภายในเพลตเดียวกัน (intra-assay) และทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกันแต่ต่างเพลต (inter-assay) จำนวน 5 เพลต นำค่า OD ของการทดสอบมาวิเคราะห์เพื่อหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%CV) (Reed *et al.*, 2002)

การหาค่าจุดตัด (cutoff)

ทดสอบตัวอย่างซีรัมไป่ปลอดเชื้อเฉพาะจำนวน 200 ตัวอย่าง ด้วยวิธี NDV-ELISA และนำผล OD ที่ 650 นาโนเมตร มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อวิเคราะห์ค่า cutoff ของวิธี NDV-ELISA

การประเมินประสิทธิภาพของวิธี

1) ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไป่ด้วยวิธี NDV-ELISA

ทำการเคลือบเพลตด้วยแอนติเจนความเข้มข้นที่ได้จากการทำ checkerboard titration ใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน ล้างเพลตด้วย PBST 5 ครั้ง เติม blocking buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร และเติมซีรัมไป่ทดสอบ (n=1,015) ที่ความเจือจางเหมาะสม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลตด้วย PBST 5 ครั้ง จากนั้นเติม conjugate เจือจาง 1:6,000 ใน blocking buffer หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลตด้วย PBST 7 ครั้ง จากนั้นเติม TMB substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มืด นาน 15 นาที และเติม TMB stop solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอ่านผลค่า OD ที่ 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader

⁴ Sigma, USA

⁵ KPL[®], USA

⁶ KPL[®], USA

⁷ Tecan, USA

2) ตรวจซีรัมทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek® (ตามวิธีแนะนำของผู้ผลิต)

เจือจางตัวอย่างซีรัม (n=1,015) 1:500 ด้วย sample diluent reagent ลงใน ELISA plate สำเร็จรูป บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash buffer 4 ครั้ง และเติม conjugate (anti-chicken IgG alkaline phosphatase) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash buffer 4 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (p-nitrophenyl phosphate, pNPP) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution และอ่านผลค่า OD ที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader และนำผลที่วัดได้มาคำนวณหาค่า S/P ratio และตัดสินผลที่ S/P ratio ≥ 0.35 เป็นบวก

$$\text{S/P ratio} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ตัวอย่างทดสอบ} - \text{OD}_{405} \text{ ของควบคุมลบ}}{\text{OD}_{405} \text{ ของควบคุมบวก} - \text{OD}_{405} \text{ ของควบคุมลบ}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี NDV-ELISA และชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek® โดยคำนวณหาความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value, PPV) ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value, NPV) และค่าการยอมรับทางสถิติ (Kappa value)

ผล

พบว่า แอนติเจนไวรัสนิวคาสเซิล ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น จากการทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นด้วยวิธี western blot พบแถบปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนแอนติเจนกับซีรัมไก่ติดเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลได้อย่างชัดเจน เมื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี NDV-ELISA จากการทำ checkerboard titration พบว่า ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และความเจือจางซีรัม 1:400 เป็นปริมาณที่เหมาะสมสามารถแยกความแตกต่างระหว่างซีรัมควบคุมบวกและควบคุมลบได้ชัดเจนโดยลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะด้วย 1% skim milk

ในการหาร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของวิธี NDV-ELISA พบว่า %CV ของ intra-assay ที่เกิดขึ้นภายในเพลตเดียวกันของซีรัมบวก (n=5) อยู่ระหว่าง 2.88-11.42 และซีรัมลบ (n=5) อยู่ระหว่าง 3.00-12.30 สำหรับ %CV ของวิธี inter-assay ที่เกิดขึ้นต่างเพลต (n=10, R=5) อยู่ระหว่าง 0.37-13.63 ซึ่ง %CV ของทั้ง intra-assay และ inter-assay อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Jacobson, 1998) ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการตรวจซีรัมควบคุมลบจากไก่ปลอดเชื้อเฉพาะจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ค่า mean OD₆₅₀ เท่ากับ 0.125 และค่า SD เท่ากับ 0.06 เมื่อคำนวณหาจุดตัดของวิธี NDV-ELISA พบว่าที่ mean OD₆₅₀ + 2SD เท่ากับ 0.25 และที่ mean OD₆₅₀ + 3SD เท่ากับ 0.32

ผลการทดสอบซีรัมจำนวน 1,015 ตัวอย่าง ด้วยวิธี NDV-ELISA เทียบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek[®] พบว่าที่จุดตัด $OD_{650} \geq 0.25$ มีซีรัมที่ให้ผลบวกตรงกันจำนวน 316 ตัวอย่าง ผลลบตรงกัน จำนวน 662 ตัวอย่าง และซีรัมที่ให้ผลบวกต่อวิธี NDV-ELISA แต่ให้ผลลบต่อชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek[®] จำนวน 37 ตัวอย่าง โดยค่าความไวเท่ากับ 100% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 94.7% ขณะที่จุดตัด $OD_{650} \geq 0.32$ มีซีรัมที่ให้ผลบวกตรงกันจำนวน 316 ตัวอย่าง และผลลบตรงกันจำนวน 687 ตัวอย่าง โดยซีรัมที่ให้ผลบวกต่อวิธี NDV-ELISA แต่ให้ผลลบต่อชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek[®] มีจำนวน 12 ตัวอย่าง ค่าความไวเท่ากับ 100% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 94.7% และผลการยอมรับในทางสถิติ (Kappa value) ของทั้งสองจุดตัดเท่ากับ 0.918 และ 0.97 ($p \text{ value} < 0.05$) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

วิจารณ์และสรุปผล

การศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมแอนติเจนจาก whole virus โดยทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นด้วยวิธี ultracentrifugation ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Miers *et al.* (1983) แยกและทำบริสุทธิ์ไวรัสจาก allantoic fluid โดยการตกตะกอนด้วยสารเคมี พบว่าให้ผลดีกว่าการใช้ crude antigen ขณะที่ Sahle และ Burgess (2002) แยกไวรัสด้วยวิธี ultrafiltration พบว่าแอนติเจนที่ได้มีความจำเพาะสูงกว่าแอนติเจนที่แยกได้ด้วยวิธี ultracentrifugation อย่างไรก็ตามแอนติเจนที่เตรียมใช้สำหรับวิธี NDV-ELISA นี้มีความบริสุทธิ์และเข้มข้นเพียงพอซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างซีรัมบวกและลบได้อย่างชัดเจน

การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะจำเป็นต้องได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ การเลือกใช้วิธีในการตรวจวินิจฉัยโรคควรคำนึงค่าความไวและความจำเพาะเป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามไม่มีวิธีตรวจวินิจฉัยใดที่ให้ความไวและความจำเพาะ 100% อาจเกิดผลบวกหลวง (false positive) และผลลบหลวง (false negative) ได้ จากการทดลองนี้ผู้วิจัยเห็นควรเลือกเกณฑ์ในการตัดสินผลบวกและลบของวิธี NDV-ELISA เพื่อให้ได้ผลลบหลวงน้อยที่สุด เนื่องจากต้องใช้ตรวจฝูงไก่ที่ปลอดจากโรคนิวคาสเซิลทั้งฝูง จึงเลือกจุดตัดที่ $OD_{650} + 3SD$ โดยค่า OD_{650} มากกว่าหรือเท่ากับ 0.32 จะแปลผลเป็นบวกหรือตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิล และค่า OD_{650} น้อยกว่า 0.32 จะแปลผลเป็นลบหรือตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิล (รูปที่ 1) นอกจากนี้การประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek[®] พบว่าค่าความไวของจุดตัดที่ $OD_{650} + 2SD$ และ $OD_{650} + 3SD$ เท่ากับ 100% สามารถจำแนกไก่ทดสอบที่มีแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลได้ทั้งหมด ส่วนค่าความจำเพาะของจุดตัดที่ $OD_{650} + 3SD$ (98.3%) ซึ่งสูงกว่า $OD_{650} + 2SD$ (94.7%) และค่าการยอมรับทางสถิติ (kappa value=0.97, $p \text{ value} < 0.05$) อยู่ในเกณฑ์

ยอมรับในช่วงค่า 0.8-0.99 (Viera and Garrett, 2005) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek® จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีกได้

การควบคุมระบบฟาร์มไก่ปลอดเชื้อเฉพาะของสห.ให้เป็นไปตามมาตรฐานจะต้องมีการตรวจโรค นิวคาสเซิล เพื่อยืนยันการปลอดโรคในฝูง วิธี NDV-ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) หากผลการตรวจซีรัมไก่ปลอดเชื้อเฉพาะเป็นบวก จะต้องทำการตรวจซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีต่างๆ เช่น วิธี HI และวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัส เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นจะมุ่งเน้นทดสอบไก่ปลอดเชื้อเฉพาะเป็นหลักเพื่อลดการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปจากต่างประเทศ แต่ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ท้องถิ่น หรือพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปที่เหมาะสมกับการใช้งานในลักษณะอื่นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนหมุนเวียน เพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมจากฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก และตัวอย่างไวรัสจากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- Czifra, G., Nilsson, M. Alexander, D. J., Manvell, R., Kecskemeti, S. and Engstrom, B. E. 1996. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathol.* 25: 691-703.
- Das, M. and Kumar, S. 2015. Recombinant phosphoprotein based single serum dilution ELISA for rapid serological detection of Newcastle disease virus. *J. Virol. Methods.* 225: 64-69.
- Greiner, M. and Gardner, I. A. 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 45: 43-59.
- Jacobson, R. H. 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech.* 17: 469-526.

- Koch, G., Czifra, G. and Engstrom, B. E. 1998. Detection of Newcastle disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. Vet. Rec. 143: 10-12.
- Miers, L. A., Bankowski, R. A. and Zee, Y. C. 1983. Optimizing the enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. Avian. Dis. 27: 1112-1125.
- Reed, G. F., Lynn, F. and Meade, B. D. 2002. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9: 1235-1239.
- Sahle, M. and Burgess, G. W. 2002. Development of solid phase antigen for indirect ELISA for the detection of specific antibody responses to infection with Newcastle disease virus. J. Vet. Res. 69: 237-242.
- Srinivasan, V. A., Reddy, G. S. and Kalanidhi, A. P. 1992. Use of enzyme linked immunosorbent assay for estimation of antibody to Newcastle disease virus. Microbiologica. 15: 319-321.
- Viera, A. J. and Garrett, J. M., 2005. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Fam. Med. 37: 360-363.
- Williams, R., Boshoff, C. H., Verwoerd, D., Schoeman, M., Wyk, V. A., Gerdes, T. H., and Roos, K. 1997. Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA. Avian. Dis. 41: 864-869.
- Xu, H., Lohr, J. and Greiner, M. 1997. The selection of ELISA cutoff points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. J. Immunol. Methods. 208: 61-64.

ตารางที่ 1 แสดงค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการทดสอบซ้ำตัวอย่างซีรัมทั้งภายในเฟลต (intra-assay) และระหว่างเฟลต (inter-assay)

	Intra-assay		Inter-assay (R=5)	
	Mean OD±SD	%CV	Mean OD±SD	%CV
ซีรัมบวก (n=5)	1.76±0.110	6.30	1.38±0.03	2.17
	1.260±0.144	11.42	1.40±0.12	0.85
	1.83±0.164	8.96	1.40±0.09	6.42
	1.72±0.131	7.61	1.35±0.05	0.37
	1.99±0.057	2.88	1.37±0.04	2.91
ซีรัมลบ (n=5)	0.10±0.003	3.00	0.09±0.007	7.7
	0.13±0.011	8.46	0.11±0.015	13.63
	0.15±0.009	6.00	0.14±0.009	6.42
	0.13±0.016	12.30	0.08±0.001	1.25
	0.12±0.008	6.66	0.12±0.008	6.66

% CV = (SD/Mean OD)x100

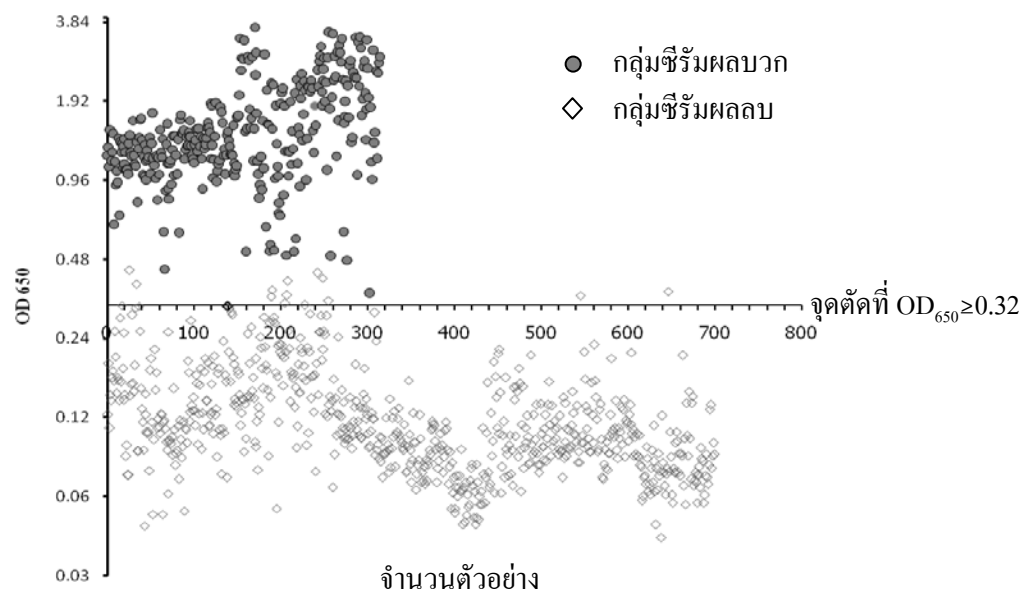
n คือ จำนวนตัวอย่าง

R คือ จำนวนเฟลต

ตารางที่ 2 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี NDV-ELISA กับชุดทดสอบสำเร็จรูป BioChek® ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ จำนวน 1,015 ตัวอย่าง โดยคำนวณที่จุดตัด $OD_{650} \geq 0.25$ และ $OD_{650} \geq 0.32$

BioChek®	NDV-ELISA					
	จุดตัด mean $OD_{650} + 2SD$			จุดตัด mean $OD_{650} + 3SD$		
	$(OD_{650} \geq 0.25)$			$(OD_{650} \geq 0.32)$		
	ซีรัมบวก	ซีรัมลบ	รวม	ซีรัมบวก	ซีรัมลบ	รวม
ซีรัมบวก	316	0	316	316	0	316
ซีรัมลบ	37	662	699	12	687	699
รวม	353	662	1,015	328	687	1,015

% ค่าความไว (Sensitivity)	100	100
% ค่าความจำเพาะ (Specificity)	94.7	98.3
% ค่าพยากรณ์ผลบวก (% Positive predictive value; PPV)	89.5	96.3
% ค่าพยากรณ์ผลลบ (% Negative predictive value; NPV)	100	100
Kappa value (p value < 0.05)	0.918	0.97



รูปที่ 1 แสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างซีรัมไก่จำนวน 1,015 ตัวอย่างที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี NDV-ELISA โดยใช้เกณฑ์ตัดสิน cutoff ที่ $OD_{650} \geq 0.32$

Development of indirect ELISA for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in specific pathogen-free (SPF) chicken

Areerat Pangpeng¹ Saipin Khumsap¹

Abstract

The Newcastle disease virus indirect enzyme linked immunosorbent assay (NDV-ELISA) was developed to detect antibodies against Newcastle disease virus in specific pathogen-free (SPF) chicken. The antigen was prepared from Newcastle disease virus infected allantoic fluid which obtained from the vaccine production process. The whole virus was separated and purified by sucrose density gradient ultracentrifugation. The optimal concentration of the antigen was found to be 2 µg/ml when reacted with a 1:400 dilution of serum. The method was consistent according to the assessment of intra-assay and inter-assay coefficient of variation (CV) which were less than 12.30 and 13.63%, respectively. For an evaluation of the NDV-ELISA, the cutoff value between positive and negative was determined based on the mean absorbance of negative controls plus 3 standard deviations (mean OD₆₅₀+3SD). A total of 1,015 sera were tested by the in-house and the commercial kit in parallel. The results revealed that both tests showed close agreement with each other (K=0.97; p value<0.05) and gave relatively high sensitivity and specificity at 100 and 98.6%, respectively. Therefore, the NDV-ELISA can be used as a screening test for the detection of Newcastle disease virus titer in SPF chicken.

Key Words: Newcastle disease virus, ELISA, antibody, specific pathogen-free (SPF) chicken

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130