จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงาน

การพัฒนาชุดทดสอบอีไลซาสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดี ต่อโรคหวัดหน้าบวม

โดย

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
วิษณุ วรรณแสวง
ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย

ธันวาคม ๒๕๕๙

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยในครั้งนี้ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยสุขภาพสัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์ ในการอำนวยความสะดวกการทำงานวิจัย สพ.ญ.พัณชิตา หงส์ประเสริฐกุล นิสิตปริญญาโท สาขาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ในการช่วยปฏิบัติงานวิจัย และขอขอบคุณ บริษัท สหฟาร์ม จำกัด ในการอำนวยความสะดวกทางด้านห้องปฏิบัติการ ตลอดจนทุกๆ ท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือจนทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาชุดทดสอบ indirect ELISA สำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A, B และ C ซึ่งแยกเพลททดสอบสำหรับแต่ละซีโรวาร์ การคำนวณค่าความไวรับและความจำเพาะของชุดทดสอบอีไลซาชนิดอินไดเร็กที่พัฒนาขึ้นใหม่พิจารณาจากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบที่ได้จากไก่กลุ่มควบคุมที่ 1-5 โดยเก็บตัวอย่างที่ 2 สัปดาห์หลังการทำวัคซีนครั้งที่สอง ค่า cut-off ของชุดทดสอบอีไลซ่าชนิดอินไดเร็กของแต่ละซีโรวาร์วิเคราะห์จากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบที่เก็บก่อนการทำวัคซีนจำนวน 40 ตัวอย่าง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ค่า cut-off ของซีโรวาร์ A, B และ C ซึ่งคำนวณจากค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง (OD) ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบทั้งหมดบวกสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ 0.334, 0.484 และ 0.678 ตามลำดับ ชุดทดสอบอีไลซ่าชนิดอินไดเร็กที่พัฒนาขึ้นทั้ง 3 ซีโรวาร์ มีประสิทธิภาพในด้านความไวรับเท่ากับ 100% แต่มีความจำเพาะต่ำเท่ากับ 30% เนื่องจากมีการตอบสนองข้ามซีโรวาร์ อย่างไรก็ตามชุดทดสอบอีไลซ่าชนิดอินไดเร็กสำหรับซีโรวาร์ A มีการตอบสนองต่อแอนติบอดีของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกซีโรวาร์ A (homologous serovar) มากกว่าอีก 2 ซีโรวาร์ (heterologous serovar) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทางตรงข้ามชุดทดสอบอีไลซ่าชนิดอินไดเร็กสำหรับซีโรวาร์ B และ C ไม่พบความแตกต่างของการตอบสนองต่อแอนติบอดีของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกซีโรวาร์ A, B และ C สรุปผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบอีไลซ่าชนิดอินไดเร็กที่พัฒนาขึ้นใหม่สามารถเป็นวิธีทางเลือกของการทดสอบทางซีรัมวิทยาเพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างฝูงไก่สุขภาพดีที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อ *A. paragallinarum* และฝูงไก่ที่เคยได้รับวัคซีนและ/หรือติดเชื้อทางธรรมชาติ

เลขหมู่ดัชนี QY356 2988
เลขทะเบียน 017356
วัน, เดือน, ปี 1 มิ.ย. 60

Abstract

The aim of this experiment was to develop indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) test kit for antibody detection against *A. paragallinarum* serovars A, B and C in separated plates. The positive and negative control sera from chickens in Groups 1–5 at 2 weeks after the second vaccination were used to calculate the sensitivity and specificity of the newly developed I-ELISA. Forty negative control sera (taken before vaccination) were used to evaluate the cut-off value of the I-ELISA against each serovar of *A. paragallinarum* under optimal conditions. The cut-off values of serovars A, B and C, calculated by the mean optical density of all the negative sera plus three standard deviations were 0.334, 0.484 and 0.678, respectively. The efficacy of the developed I-ELISA showed 100% sensitivity for all 3 serovars of coating antigen but with a low specificity of 30% for all 3 serovars because of the high cross reactivity among serovars. Nevertheless, the serovar A I-ELISA gave a higher response to serovar A antiserum than to the other two heterologous serovars ($p < 0.05$). In contrast, the I-ELISA results for B and C did not show any significant difference between the homologous and heterologous serovars. This newly developed I-ELISA could be an alternative method for differentiating between *A. paragallinarum*-free chickens and those that have received either a vaccination and/or a challenge exposure.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	8
บทนำ	10
วัตถุประสงค์	12
วิธีดำเนินการวิจัย	13
ผลการทดลอง	26
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	44
บรรณานุกรม	46

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่1 การทดสอบคุณสมบัติของ *Avibacterium paragallinarum*	14
ตารางที่ 2 แผนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่ทดลอง	22
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 3 ซีโรวาร์ สำหรับเตรียมวัคซีนเชื้อตาย	29
ตารางที่ 4 แสดงค่าโปรตีนที่วัดค่าได้สำหรับการเคลือบเพลทอิไลซ่า	30
ตารางที่ 5 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน และ ซีรัม ที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท อิไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (211) เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:100	32
ตารางที่ 6 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสมในการ เคลือบเพลทอิไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (211) (คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000 และ 1:2000)	33
ตารางที่ 7 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน และ ซีรัมที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท อิไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B (0222) เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:100	33
ตารางที่ 8 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และ ซีรัมที่เหมาะสมในการ เคลือบเพลทอิไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B (0222) (คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000 และ 1:2000)	34
ตารางที่ 9 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน และ ซีรัมที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท อิไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Modesto) เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:100	34
ตารางที่ 10 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และ ซีรัมที่เหมาะสม ในการเคลือบเพลทอิไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Modesto) (คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000 และ 1:2000)	35
ตารางที่ 11 แสดงค่า OD ของซีรัมควบคุมผลลบ เมื่อตรวจด้วยชุดทดสอบอิไลซ่า ที่เตรียมเองจากเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 3 ซีโรวาร์	36
ตารางที่ 12 ค่าสัมประสิทธิของความผันแปร (CV) จากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ	36

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 13 ค่า OD ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ MG, MS, PM, IBV และ IBD 37
เมื่อทดสอบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบเพลทด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A

ตารางที่ 14 ค่า OD ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ MG, MS, PM, IBV และ IBD 38
เมื่อทดสอบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบเพลทด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B

ตารางที่ 15 ค่า OD ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ MG, MS, PM, IBV และ IBD 38
เมื่อทดสอบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA เคลือบเพลทด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C

ตารางที่ 16 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย 39
A. paragallinarum ซีโรวาร์ A (221)

ตารางที่ 17 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย 39
A. paragallinarum ซีโรวาร์ B (0222)

ตารางที่ 18 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย 40
A. paragallinarum ซีโรวาร์ C (Modesto)

ตารางที่ 19 ค่าความสอดคล้อง (agreement rate) ระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA 40
ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (221) และ HI

ตารางที่ 20 ค่าความสอดคล้อง (agreement rate) ระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA 40
ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B (0222) และ HI

ตารางที่ 21 ค่าความสอดคล้อง (agreement rate) ระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA 41
ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Modesto) และ HI

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA 41
และHI จากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบซึ่งได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวม

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 แสดงเชื้อ *A. paragallinarum* ที่มีลักษณะ satellite colonies บนอาหารวุ้นเลือดแกะ ที่คาดด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus*	26
รูปที่ 2 แสดงเชื้อ *A. paragallinarum* เมื่อเพาะบน อาหารวุ้นช็อกโกแลต (GC agar base)	27
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้อ *A. paragallinarum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 100×	27
รูปที่ 4 แสดงการยืนยันเชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธีการตรวจสารพันธุกรรม ดยใช้ไพร์เมอร์ HPG-2	28
รูปที่ 5 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. paragallinarum*	29
รูปที่ 6 แสดงวิธีการวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้วิธี Qubit® Protein Assay Kits (Qubit® 2.0 Fluorometer)	30
รูปที่ 7 แสดงรูปแบบโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ของเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A 221 (Lane 1) และ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Lane 2)	31
รูปที่ 8 ความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูปอีไลซ่าชนิด indirect ทั้ง 3 ซีโรวาร์ ที่เตรียมขึ้นเองจากการเคลือบเพลทด้วยแอนติเจน *A. paragallinarium* ซีโรวาร์ A, B และ C เมื่อทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกของเชื้อ IBD, IB, PM, MG และ MS และทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ *A. paragallinarium* ซีโรวาร์ต่างๆ	37
รูปที่ 9 (a, c, e) แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) และ (b, d, f) แสดงระดับ HI ไตเตอร์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี HI test ต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ (a, b) A, (c, d) B และ (e, f) C ตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ ถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ ให้วัคซีนเชื้อตายทางการค้า, กลุ่มที่ 2 คือ ให้วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตเองซีโรวาร์ A, กลุ่มที่ 3 คือ ให้วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตเองซีโรวาร์ B, กลุ่มที่ 4 คือ ให้วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตเองซีโรวาร์ C, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มซีรัมควบคุมผลลบ	42-43

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การพัฒนาชุดทดสอบอีไลซาสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม

(ภาษาอังกฤษ) Development of ELISA test kit for antibody detection against infectious coryza

ผู้รับผิดชอบโครงการ

1. รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย หัวหน้าโครงการวิจัย
   (Assoc. Prof. Dr. Niwat Chansiripornchai) email: cniwat@chula.ac.th
   ภาควิชาอายุรศาสตร์
   คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 02 218 9412 โทรสาร 02 252 9575
2. ผศ.น.สพ.ดร.วิษณุ วรรณแสวง
   (Asst.Prof.Dr.Wisanu Wanasawaeng) email: wwisanu@mut.ac.th
3. รศ.สพ.ญ.ดร.ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย
   (Assoc. Prof. Dr. Piyarat Chansiripornchai) email: spiyarat@hotmail.com
   ภาควิชาเภสัชวิทยา
   คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 02 218 9412 โทรสาร 02 252 9575

บทนำ

โรคหวัดหน้าบวมเป็นโรคระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันในไก่ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โรคนี้มีการระบาดอย่างรวดเร็วและรุนแรง โดยอัตราการติดเชื้อสูง แต่อัตราการตายต่ำ ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ โดยพบอัตราการคัดทิ้งที่สูงขึ้นในไก่เนื้อและผลผลิตไข่ที่ลดลง 10-40% ในไก่ไข่ ไก่พันธุ์ (Blackall, 1999) โรคนี้มีรายงานการระบาดครั้งสำคัญใน 2 มลรัฐของประเทศสหรัฐอเมริกาที่ส่งผลต่ออุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ (Droual et al., 1990) และมีการศึกษารายงานการระบาดโรคหวัดหน้าบวม 10 ครั้งในประเทศโมร็อกโกที่ส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตไข่ 14-41% และอัตราการตาย 0.7-10% (Mouahid et al., 1989) ทั้งนี้โรคหวัดหน้าบวมมีสาเหตุจากเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* อยู่ในจีนัส *Avibacterium* แฟมิลี Pasteurellaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เจริญได้ทั้งแบบมีและไม่มีออกซิเจน รูปร่างเป็นท่อน ไม่เคลื่อนที่ แบ่งเป็น 3 antigenic type คือ A, B และ C ต้องการ V factor ในการเติบโต อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบสายพันธุ์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ที่ไม่ต้องการ V factor ในการเจริญเติบโตครั้งแรกที่แอฟริกาใต้ (Mouahid et al., 1992) และต่อมาที่เม็กซิโก (Garcia et al., 2004) ในประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อในไก่ไข่และไก่พันธุ์ที่ประกอบด้วยซีโรวาร์ A, B และ C (Chukiatsiri and Chansiripornchai, 2007; Chukiatsiri et al., 2010) และพบอุบัติการณ์ของโรคหวัดหน้าบวมได้เสมอ Thitisak และคณะ (1988) รายงานโรคหวัดหน้าบวมครั้งแรกในประเทศไทยว่าเป็นโรคที่พบได้บ่อย และเป็นสาเหตุให้เกิดการตายในไก่บ้าน อายุน้อยกว่า 2 เดือน หรือมากกว่า 6 เดือน และมีรายงานว่าเชื้อ *A. paragallinarum* สามารถก่อโรคได้เฉพาะซีโรวาร์ A และ C เท่านั้น (Neramitmansuk et al., 1995) ต่อมา Chukiatsiri และคณะ (2010) รายงานการพบเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B และสามารถยืนยันการก่อโรคครั้งแรกในประเทศไทย เชื้อนี้แยกได้จากตัวอย่างของไก่ไข่ที่แสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจ มีน้ำมูก และพบอาการหน้าบวม ร่วมกับผลผลิตไข่ที่ลดลง

การตรวจติดตามระดับภูมิคุ้มกันเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการประเมินประสิทธิภาพการให้วัคซีน เพื่อการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้วัคซีน และการประเมินความชุกของโรคติดเชื้อ (Noormohammadi et al., 2002) นอกจากนี้ยังช่วยในการวินิจฉัยโรค ซึ่งเป็นประโยชน์ในการคัดไก่ติดเชื้อออกจากฝูง ลดโอกาสในการแพร่เชื้อของไก่ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการซึ่งเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ ดังนั้นการตรวจติดตามระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวม ช่วยลดความสูญเสียและช่วยวางแผนในการป้องกันและควบคุมโรคได้ ปัจจุบันการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม นิยมใช้วิธี hemagglutination inhibition (HI) (Chukiatsiri and Chansiripornchai, 2007) อย่างไรก็ตามวิธี HI มีขั้นตอนมาก โดยเฉพาะการ

จัดเตรียมเม็ดเลือดแดงที่มีความสำคัญต่อการประเมินผล พบมีความยุ่งยากต้องใช้แรงงานในการเก็บเลือด และการจัดการเลือดให้มีสภาวะปลอดเชื้อ นอกจากนี้ความแน่นอนของผลการประเมินอาจเป็นผลมาจากปริมาณเม็ดเลือดแดงและความชำนาญของแต่ละบุคคล ในปัจจุบันวิธี HI ยังไม่สามารถเตรียมในรูปแบบผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปหรือเชิงพาณิชย์ได้ อย่างไรก็ตามมีการพัฒนาการทดสอบทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี blocking ELISA โดยใช้ monoclonal antibody ซึ่งเป็นการทดสอบที่มีความจำเพาะสูงมาก และมีความไวในระดับที่ยอมรับได้ (Zhang et al., 1999) แต่ทั้งนี้วิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในหลายประการ ได้แก่ (1) มี monoclonal antibody เฉพาะสำหรับซีโรวาร์ A และ C ตาม Page scheme ดังนั้นวิธีนี้สามารถทดสอบระดับภูมิคุ้มกันต่อ 2 ซีโรวาร์นี้ได้เท่านั้น (2) monoclonal antibody ซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของวิธีนี้ไม่สามารถหาซื้อได้ทั่วไป (3) เชื้อ *A. paragallinarum* ที่แยกได้บางเชื้อไม่ทำปฏิกิริยากับ monoclonal antibody ดังนั้นการติดเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถถูกตรวจด้วยวิธี blocking ELISA ได้ (Blackall, 1999) จากข้อจำกัดที่กล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA เพื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A, B และ C รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติและความสามารถใช้งานได้ของชุดทดสอบ ได้แก่ การทดสอบความสามารถในการตรวจซ้ำ (repeatability test) การทดสอบความไวรับ (sensitivity test) และการทดสอบความจำเพาะ (specificity test) เพื่อพิสูจน์ว่าชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA มีคุณสมบัติความไวรับและความจำเพาะที่สูงกว่าหรือเทียบเท่ากับวิธี HI ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ทั่วไปสำหรับการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวมหรือไม่ ทั้งนี้วิธีการดังกล่าวยังสามารถเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและการเฝ้าระวังโรคจากการตรวจติดตามระดับแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม นอกจากนี้วิธีอีไลซายังมีประโยชน์ในการทดสอบจำนวนตัวอย่างมากๆได้พร้อมกันในเวลาเดียวกัน โดยใช้แอนติเจนปริมาณน้อยซึ่งเอื้ออำนวยต่อการทดสอบแบบอัตโนมัติ รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยคอมพิวเตอร์ สามารถประหยัดเวลา และแรงงานลงได้มาก นอกจากนี้ยังสามารถลดปัจจัยแปรปรวนของผลการทดสอบ เนื่องจากคุณภาพของเม็ดเลือดแดงไก่และความไม่ชำนาญของผู้ทดสอบอีกด้วย

อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในประเทศไทย มีการใช้วัคซีนป้องกันโรคหวัดหน้าบวมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในไก่พันธุ์และไก่ไข่ แต่โรคหวัดหน้าบวมเป็นโรคเดียวที่ยังไม่มีชุดทดสอบเชิงพาณิชย์สำหรับการตรวจระดับแอนติบอดีของไก่ เพื่อติดตามสุขภาพของไก่ภายหลังการให้วัคซีน รวมถึงการประเมินสถานภาพโรคระบาดในพื้นที่สำหรับการพิจารณายกเลิกการใช้วัคซีน หากไม่มีการระบาดของโรคในพื้นที่ ดังนั้นการพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนเป็นเซลล์แบคทีเรียที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน และต้นทุนการผลิตไม่สูงมาก จึงเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกภายในประเทศเป็นอย่างมากในการจัดการปัญหาสุขภาพสัตว์ปีกในฟาร์ม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA สำหรับตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A, B และ C
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ในด้านความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของชุดทดสอบ
3. เพื่อศึกษาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวมเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี HI และวิเคราะห์ผลความสอดคล้องระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA และวิธี HI

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มี 5 ระยะ ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 การเพาะเชื้อและเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้เตรียมแอนติเจนสำหรับการพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA

ระยะที่ 2 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ

ระยะที่ 3 การเตรียมแอนติเจน

ระยะที่ 4 การพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA

ระยะที่ 5 การตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวมด้วยวิธี Hemagglutination inhibition (วิธีมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA)

ระยะที่ 1: การเพาะเชื้อและเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้เตรียมแอนติเจนสำหรับการพัฒนาชุดทดสอบ

1.1 การเพาะเชื้อและเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

1.1.1 นำเชื้อแบคทีเรีย *A. paragallinarum* มาตรฐาน ซีโรวาร์ A (221), B (0222) และ C (Modesto) ที่ได้มาจาก หน่วยปฏิบัติการวิจัยสุขภาพสัตว์ปีก (Avian Health Research Unit; AHRU) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มา streak ลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะ (blood agar) จนเต็ม plate จากนั้นขีดคาดทับด้วย *Staphylococcus aureus* เป็นรูปสามเหลี่ยม เพื่อเป็นแหล่งของ V-factor ซึ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตของ *A. paragallinarum*

1.1.2 นำอาหารวุ้นเลือดแกะ ที่ผ่านการเพาะเชื้อแล้วบ่มในโถเทียน (candle jar) หรือตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 3-5% จากนั้นนำทั้งโถเทียนไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.1.3 โคโลนีของ *A. paragallinarum* มีลักษณะใส นูน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ เมื่ออยู่ไกลจาก *S. aureus* จนไม่พบเชื้อเลย ซึ่งเป็นลักษณะที่เรียกว่า satellite colonies เลือก *A. paragallinarum* ที่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยว มา streak ลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะอีกครั้งและคาดทับด้วย *S. aureus* จากนั้นบ่มในโถเทียนและบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.1.4 นำ *A. paragallinarum* ที่ผ่านการลงอาหารวุ้นเลือดแกะ ครั้งที่ 2 ที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว มาขีดลงบนอาหารวุ้นช็อกโกแลต (GC agar base) เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อให้มากขึ้น

1.1.5 นำอาหารวุ้นช็อกโกแลต (GC agar base) ไปบ่มในโถเทียนและในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นป้ายเชื้อลงในอาหารเหลว TMB broth (Blackall and Reid, 1982) เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อให้มีปริมาณมากพอสำหรับการนำเชื้อไปเข้าสู่กระบวนการเตรียมแอนติเจน

1.2 การจำแนกเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* โดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี

ตารางที่1 การทดสอบคุณสมบัติของ *Avibacterium paragallinarum* (Chukiatsiri and Chansiripornchai, 2007)

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
Colony hemolysis	-
Morphology	gram negative rod
Nitrate reduced	+
Indole	-
Catalase	-
CO_2 requirement	+
X-factor requirement	-
V-factor requirement	+
Delta-ALA utilization	+

1.2.1 สังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนีแบบ satellite colonies ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Avibacterium* ที่ต้องการ V-factor จาก *S. aureus* และลักษณะโดยรอบของโคโลนีที่ไม่เกิด hemolysis แล้วทำการย้อม Gram's stains โดยป้ายเชื้อที่ต้องการย้อมลงบนแผ่นสไลด์แล้วทำให้แห้งโดยการอังสไลด์เหนือเปลวไฟ หยดสี crystal violet ลงบนสไลด์ในบริเวณที่มีเชื้ออยู่ ย้อมนาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา แล้วหยดสารละลาย Gram's iodine ลงย้อมนาน 1 นาทีล้างออกด้วยน้ำประปา และล้างสี ด้วยสารละลาย 95% alcohol นาน 5-10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา แล้วย้อมทับด้วย safranin นาน 30 วินาทีล้างออกด้วยน้ำประปาแล้ว ปล่อยให้แห้งหรือซับให้แห้งนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรีย

1.2.2 นำแบคทีเรียที่ได้มาทำการทดสอบ catalase test โดยป้ายเชื้อบนแผ่นสไลด์แล้วหยดสารละลาย 3% hydrogen peroxide ลงบนเชื้อถ้าเป็น *A. paragallinarum* จะไม่เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย hydrogen peroxide (catalase -) ส่วน *A. avium* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคในไก่จะให้ผล catalase +

1.2.3 นำแบคทีเรียที่ได้มาทดสอบ porphyrin test โดยเตรียมสารละลาย ALA (gamma-aminolevulinic acid hydrochloride) 0.5 ml. ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml. จากนั้นป้ายเชื้อจากอาหารวุ้นช็อกโกแลตใส่ลงไป แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent 1-2 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น ซึ่งหากเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู แสดงว่าให้ผลบวกกับ porphyrin test ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ *A. paragallinarum* จะให้ผลบวกกับ porphyrin test

1.3 การจำแนกเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* โดยการตรวจสอบสารพันธุกรรม

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาตรวจสอบสารพันธุกรรมโดยทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยไพร์เมอร์ HPG-2 ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

1.3.1 การสกัด DNA จากตัวอย่างเชื้อที่ขึ้นบน GC agar base โดยใช้ loop เก็บเชื้อที่ขึ้นบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่เชื้อลงใน microcentrifuge tube ที่มี sterile PBS 200 µl จากนั้นนำไป vortex และให้ความร้อนโดยใช้ heat block ที่ 98 องศาเซลเซียส 5 นาที ปั่นแยกเชื้อด้วย benchtop microcentrifuge ที่ 17,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสสำหรับเป็น DNA template เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทดลอง

1.3.2 การทำปฏิกิริยา PCR เตรียมสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ดัดแปลงจาก Chen และคณะ (1996) (N1 5' TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3'; R1 5' CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3') เพื่อบ่งชี้ *A. paragallinarum* ซึ่งให้ผลผลิตในขนาดประมาณ 500 base pairs

1.3.3 ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่องเทอร์โมไซเคลอร์รุ่น MJ Mini Thermal Cycler (Biorad, USA) มีขั้นตอนของปฏิกิริยา ดังนี้ Pre denature step 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที หลังจากนั้นใช้ Denature step 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing step 65 องศาเซลเซียส 1 นาที และ Extension step 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ทั้งหมด 25 รอบ สุดท้ายเป็น Final extension 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

1.3.4 ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาโดยการทำ gel electrophoresis โดยใช้ PCR product 5 µl ผสมกับสี 6× loading buffer 2 µl ผ่าน 1.4% agarose gel ใน 0.5× TBE buffer กระแสไฟ 100 โวลต์ เวลา 40 นาที นำเจลที่ผ่านขั้นตอน electrophoresis แช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 20 นาที แล้วล้างเจลด้วย 0.5× TBE buffer ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาจากแผ่น gel ภายใต้แสง UV ของเครื่อง Gel documentation

ระยะที่ 2: การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ

นำโคโลนีของเชื้อ *A. paragallinarum* ที่โตบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ GC agar base มาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ supplemented test medium (TMB broth) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อใน TMB broth ปริมาณ 100 µl มาเพาะลง TMB broth อีกครั้ง เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. paragallinarum* ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยนับจำนวนเชื้อชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36 และ 48 ของการบ่มเชื้อ เก็บข้อมูลสร้าง growth curve ของเชื้อ *A. paragallinarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TMB broth และเลือกระยะเวลาที่ดีที่สุดในการเก็บเกี่ยวเชื้อสำหรับนำเชื้อไปเข้าสู่กระบวนการเตรียมแอนติเจนเพื่อพัฒนาชุดทดสอบอีไลซ่า หรือเตรียมเชื้อสำหรับการทำวัคซีนเชื้อตาย

ระยะที่ 3: การเตรียมแอนติเจน

3.1 การเตรียมแอนติเจน

การเตรียมแอนติเจนสำหรับใช้ในกระบวนการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา หรือวัดการตอบสนองของระดับแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม มีวิธีการเตรียม 2 แบบ คือ

(1) การเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการบำบัดด้วยโพแทสเซียมไทโอไซยาเนต (Potassium Thiocyanate; KSCN) แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) โดยมีวิธีการเตรียม ดังนี้ คือ

- เพาะเชื้อใน TMB broth และ GC agar 24-48 ชั่วโมง
- กรณีเพาะเชื้อในอาหารแข็งให้ขูดเชื้อจากจานเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่มี PBS ปั่นล้างเชื้อที่ 3000 -4000 rpm 30 นาที ด้วย PBS ก่อน 1 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง
- กรณีเพาะเชื้อในอาหารเหลวให้ปั่นเชื้อที่ 3000 - 4000 rpm 30 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างด้วย PBS ก่อน 1 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง
- นำเชื้อที่ปั่นล้างแล้วมาบำบัดด้วย KSCN โดยการเติมสารละลายของ 0.5 M KSCN + 0.425 M NaCl ที่ pH 6.3 ลงในเชื้อที่ล้างแล้ว ให้มีระดับความขุ่นอยู่ที่ 5 McFarland turbidity และปั่นแกว่งเชื้อด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- นำแบคทีเรียในสารละลาย KSCN ไป sonicated เป็นเวลา 4 นาที 40 วินาที จำนวน 2 ครั้ง (ตั้งโปรแกรมที่ : pulse on 40 off 10, กระแสไฟฟ้า 40%) ระหว่าง sonicated ต้องใช้น้ำแข็งหล่อเย็น
- นำ sonicated bacteria ปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง

- ละลายเชื้อในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วย 0.01% (v/v) thimerosal
- เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 4 วันก่อนนำไปใช้งาน
- ตรวจสอบระดับไตเตอร์ของเชื้อ ถ้าไตเตอร์ต่ำๆ (2^1- 2^3) ให้ fix ในสารละลาย thimerosal ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1-2 สัปดาห์ แล้วจึงตรวจวัดระดับไตเตอร์ใหม่อีกครั้ง กรณีที่เก็บไว้ 1-2 เดือน แล้วไตเตอร์ยังคงต่ำให้เตรียมเชื้อใหม่

(2) การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเพื่อเป็นแอนติเจนโดยไม่ได้ผ่านการ sonicated

- Subculture เชื้อใน blood agar หรือ chocolate agar
- เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะ single colony ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose phosphate broth 100 ml ในขวดทดลองปริมาตร 500 ml
- บ่มเชื้อใน shaking incubator ให้เชื้อถูกเขย่าแรงๆ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง
- ล้างเชื้อด้วยสารละลาย PBS 2-3 ครั้ง
- นำตะกอนก้นหลอดมาเติมสารละลาย PBS+0.01% (v/v) thimerosal 20-25 ml
- ตรวจระดับไตเตอร์ โดยใช้วิธี HA (haemagglutination) test ว่าระดับไตเตอร์ใช้ได้หรือไม่ (2^4 ขึ้นไป) ถ้า ไตเตอร์ใช้ได้ให้เก็บในอุณหภูมิที่ 4 °C

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นโปรตีน

นำสารละลายแอนติเจน วัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้เครื่องฟลูออโรมิเตอร์ (Qubit® Protein Assay Kits,Qubit® 2.0 Fluorometer) ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ในช่วง 12.5 µg/ml ถึง 5 mg/ml เพื่อเตรียมความเข้มข้นของโปรตีนให้เหมาะสำหรับการการเคลือบเพลทอีไลซา ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนมีดังนี้

3.2.1 เตรียม working solution จากสาร reagent และ buffer ในอัตราส่วน 1:200 (ดูด reagent 1 µl ใน buffer 199 µl)

3.2.2 การเตรียมสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ สาร A, B และ C โดยเติม 10 µl ของสารมาตรฐาน ใน working solution 190 µl

3.2.3 การเตรียมตัวอย่างโดยเติม 1-20 µl ของตัวอย่าง ใน working solution 180-199 µl เขย่า 2-3 วินาที และบ่มสารมาตรฐานที่เตรียมและสารตัวอย่างเป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (สำหรับการวัดค่าความเข้มข้นโปรตีน ควรบ่มเป็นระยะเวลา 15 นาที)

3.2.4 จากนั้นเปิดเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ แล้วสอบเทียบ สารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด แล้วจึงวัดค่าความเข้มข้นโปรตีนของสารตัวอย่าง

3.3 การวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

เพื่อยืนยันว่า ขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนสำหรับการเคลือบเพลต ELISA ปราศจากสิ่งปนเปื้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จำเป็นต้องวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ด้วย โดยการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของแอนติเจน ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยนำโปรตีนที่ได้ และสารละลายโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูงมาทดสอบใน SDS-PAGE โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 เริ่มจากประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เซนติเมตรเข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติกหนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล MiniPROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.3.2 เทสารละลายผสมของ Separating gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และ Ammonium persulfate 10% ปริมาตร 50 µl ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันแล้วรีบเทสารผสมลงในช่องระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตรทันที เนื่องจาก TEMED และAmmonium persulfate ทำให้เจลแข็งตัวเร็ว หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที ซับน้ำออก

3.3.3 เทสารละลายผสม Stacking gel ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% ปริมาตร25 ไมโครลิตร ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันแล้วรีบเทสารผสมให้ท่วมช่องว่างที่เหลือ วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึงแผ่นพลาสติกออก

3.3.4 ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ แล้วนำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิสจนเต็ม

3.3.5 นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 5 ไมโครกรัมและผสมกับ 2X Laemmli buffer ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1× นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

3.3.6 หยอดตัวอย่าง 45 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง และหยอดโปรตีนมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง

3.3.7 ผ่านกระแสไฟฟ้าลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ 200 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งสีของ Bromphenol blue เคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล

3.3.8 นำแผ่นเจลออกจากแผ่นแก้ว ย้อมสีโปรตีนด้วยสี Coomassie blue โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลายสำหรับล้างสี จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน โดยในระหว่างการย้อมและการล้างสีมีการเขย่าเบาๆตลอดเวลาด้วย

3.3.9 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของแอนติเจน โดยเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

ระยะที่ 4: การพัฒนาชุดทดสอบ indirect ELISA

4.1 การทดสอบค่าความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสม (checkerboard titration)

การทดสอบค่าความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสม โดยวิธีการปรับระดับความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลทอีไลซ่า ระดับความเจือจางของซีรัม และความเข้มข้นของคอนจูเกต (Goat anti-chicken IgG (H+L) horseradish peroxidase, Synbiotics corporation, U.S.A.) ที่ใช้

4.1.1 เจือจางแอนติเจนที่ใช้เคลือบเพลทแต่ละซีโรวาร์ด้วยวิธีการเจือจางแบบ 2 เท่า จากความเข้มข้น 25 จนกระทั่งถึงความเข้มข้น 0.78 µg/ml

4.1.2 เจือจางตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบด้วยวิธีการเจือจางแบบ 2 เท่า จากความเข้มข้น 1:50 จนกระทั่งถึงความเข้มข้น 1:800 ในเพลทเดียวกัน แต่ละเพลทสำหรับหนึ่งซีโรวาร์

4.1.3 เจือจางคอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000 และ 1:500 ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

4.1.4 นำเพลทไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Biotek Instruments, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 405 nm ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 2 รอบ

4.1.5 ทดสอบหาความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับการเคลือบเพลท หาความเจือจางของคอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสมที่สุด โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนระหว่างค่า OD จากซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบที่มากที่สุด (Positive to negative ratio, P/N)

4.2 การเตรียม และทดสอบเพลทอีไลซา

ทำการเคลือบเพลทอีไลซาชนิด 96-well microplate โดยใช้แอนติเจนผสมกับ 0.05M carbonates-bicarbonate ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดสอบ checkerboard titration แล้วเติมสารละลายแอนติเจนปริมาตร 100 µl ต่อหลุมลงใน high binding capacity ELISA plate (SPL Lifescience, Korea) บ่มทิ้งไว้ทั้งคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วันถัดมาล้างเพลทด้วย washing buffer 300 µl ต่อหลุมตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งเติม blocking solution ลงในเพลทปริมาตร 300 µl ต่อหลุมทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย washing buffer 300 µl ต่อหลุมตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง เตรียมตัวอย่างซีรัมให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสมจากการทดสอบ checkerboard titration เติมซีรัมที่เจือจางไว้ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 300 µl ต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง เติมคอนจูเกต ที่ความเจือจางที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดสอบ checkerboard titration ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 300 µl ต่อหลุมตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง เติมสับสเตรตชนิด ABTS-Hydrogen peroxidase (Synbiotics Corporation, U.S.A.) 100 µl ต่อหลุม แล้วตั้งที่อุณหภูมิห้อง 7 นาที เติม Stop solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 100µl ต่อหลุมแล้วนำเพลทไปอ่านค่า OD ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

4.3.1 ตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบถูกใช้เพื่อประเมินค่า cut-off ของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นต่อเชื้อ *A. paragallinarum* แต่ละซีโรวาร์ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ค่า cut-off พิจารณาจากค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมควบคุมผลลบทั้งหมดบวกสามเท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การพิจาณาผลเป็นบวกหรือลบจากชุดทดสอบ โดยการเทียบกับค่า cut-off กรณีที่ค่า OD มากกว่า cut-off พิจารณาเป็นผลบวก

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการตรวจซ้ำได้ (repeatability test) โดยการเคลือบเพลทอีไลซ่าด้วยแอนติเจนที่ผลิตจากล็อตเดียวกันและต่างล็อต นำมาทดสอบกับตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกจำนวน 3 ตัวอย่าง (n=3) และซีรัมควบคุมผลลบจำนวน 3 ตัวอย่าง (n=3) ทดสอบจำนวน 3 ครั้ง แล้ววิเคราะห์ผลโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิของความผันแปร (Coefficient of variation; CVs)

4.3.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) โดยนำเพลทอีไลซ่าที่เตรียมเองมาทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกของเชื้อ *A. paragallinarum* ต่างซีโรวาร *Pasteurella multocida* (PM) , *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), infectious bronchitis virus (IBV), infectious bursal disease virus (IBDV)

4.3.4 ผลการทดสอบจากซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบที่ 4 สัปดาห์หลังกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก นำมาใช้ในการคำนวณความไวรับและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นใหม่ ซีรัมควบคุมจากกลุ่มที่ 1 ระบุให้เป็นบวกต่อเชื้อ *A. paragallinarum* 3 ซีโรวาร์ สำหรับซีรัมควบคุมจากกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ระบุให้เป็นบวกต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A, B และ C ตามลำดับ และซีรัมควบคุมจากกลุ่มที่ 5 เป็นซีรัมควบคุมผลลบต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ทุกซีโรวาร์

4.3.5 ความสอดคล้องระหว่างชุดทดสอบ I-ELISA และ HI พิจารณาโดยคำนวณจากอัตราค่าการยอมรับ (agreement rate : ผลบวกที่สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี + ผลลบที่สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี/ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)

4.4 การเตรียมซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ

ไก่ไข่เพศเมียพันธุ์ Babcock 308 จำนวน 100 ตัว นำมาเลี้ยงในกรงจนถึงอายุ 12 สัปดาห์ ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ให้อาหารและน้ำตลอดการเลี้ยง และเมื่ออายุ 13 สัปดาห์เริ่มทำการแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว แต่ละกลุ่มเลี้ยงแยกอย่างชัดเจนโดยกลุ่มที่ 1 เป็นไก่ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนเชื้อตายทางการค้าชนิด trivalent mineral oil vaccine (Coryza Oil-3®, Zoetis, Animal Health, Campinas) กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นไก่ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมเองของเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (221), B (0222) และ C (Modesto) ตามลำดับ กลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มควบคุมใช้ Phosphate buffered saline (PBS) แทนสารละลายของเชื้อนำมาผสมกับแอดจูแวนท์ แล้วฉีดด้วยวิธีการเดียวกัน ก่อนฉีดวัคซีนให้เก็บตัวอย่างเลือดของไก่ทดลองทั้งหมดเพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวม เพื่อเป็นการยืนยันว่าไก่ไม่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวม

การเก็บซีรัมไก่ตั้งแต่ก่อนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และที่ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ภายหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก ตัวอย่างซีรัมที่ 4 สัปดาห์ภายหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกนำมาใช้เป็นซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ สำหรับการพิสูจน์ความถูกต้องของชุดทดสอบตลอดการทดลองนี้ สำหรับตัวอย่างที่เก็บที่สัปดาห์อื่นๆ นำมาใช้ในการวิเคราะห์แนวโน้มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของโรคหวัดหน้าบวม

4.5 การเตรียมแอนติเจนสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

แอนติเจนสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต่อโรคหวัดหน้าบวมในกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เตรียมจากเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (221), B (0222) และ C (Modesto) ตามลำดับ กระบวนการและวิธีการเตรียมแอนติเจนสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีขั้นตอนดังนี้

4.5.1 เพาะเชื้อ *A. paragallinarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TMB broth ให้เจริญเติบโตทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเก็บเชื้อโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 4000 rpm เป็นระยะเวลา 30 นาที ล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) จำนวน 3 รอบ

4.5.2 เติม PBS ในเชื้อแบคทีเรีย โดยปรับความเข้มข้นสารละลายให้ประกอบด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ประมาณ 10^9 cfu/ml (650 nm, 1 x10^{10} cfu/ml, ค่า OD เท่ากับ 0.386) (Sun et al., 2007) นอกจากนี้ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียถูกนับจำนวนด้วยวิธีการนับเชื้อ (bacterial cell count) และ ตรวจด้วยวิธี HI ก่อนนำไปใช้เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อเชิงปริมาณสัมพัทธ์

4.5.3 การทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ด้วยฟอร์มาลิน 0.2% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาผสมกับ Freud's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหน้าอก และกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำ 2 สัปดาห์ถัดมา โดยใช้เชื้อปริมาณเท่ากัน แต่ใช้ Freud's incomplete adjuvant (FIA) แต่ละครั้งมีระยะเวลาห่างกัน 2 สัปดาห์

ตารางที่ 2 แผนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่ทดลอง

กลุ่ม	แผนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
1	กลุ่มควบคุมผลบวก : วัคซีนเชื้อตายทางการค้าชนิด trivalent mineral oil (Coryza Oil-3®, Zoetis, Animal Health, Campinas)
2	กลุ่มควบคุมผลบวก : วัคซีนเชื้อตายที่เตรียมเองต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A
3	กลุ่มควบคุมผลบวก : วัคซีนเชื้อตายที่เตรียมเองต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B
4	กลุ่มควบคุมผลบวก : วัคซีนเชื้อตายที่เตรียมเองต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C
5	กลุ่มควบคุมผลลบ : PBS

ระยะที่ 5 การตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวมด้วยวิธี Hemagglutination inhibition

การแปลผลการทดสอบด้วยวิธี HI คิดจากตัวอย่างซีรัมซึ่งแสดงค่าระดับแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวมที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1:5 ถูกพิจารณาเป็นค่าบวกของการทดสอบ (Sawata et al., 1982)

5.1 การเตรียมซีรัม

การเตรียมซีรัมที่ตรวจต้องนำมา fix ด้วย 10% chicken red blood cell (CRBC) เริ่มต้นโดยนำเลือดที่ได้ปั่นแยกซีรัม จากนั้น fixed serum ด้วยการเติม 10% (v/v) glutaraldehyde (GA)-fixed chicken red blood cell โดยใช้ซีรัม 1 ส่วน และเม็ดเลือดแดง 4 ส่วน (1:5) เพื่อกำจัด non-specific epitope (ใช้ซีรัมตัวอย่าง 50 µl fixed ด้วย 10% CRBC 200 µl) ผสมทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง หรือทั้งคืนที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้น

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 5 นาที เอาเฉพาะส่วนใสไว้แล้วนำซีรัมส่วนใสที่เจือจาง 1:5 มาตรวจ HI

5.2 การเตรียมเม็ดเลือดแดง

การเตรียมเม็ดเลือดแดงสำหรับใช้ในการตรวจ HI สามารถทำได้ 2 วิธี คือ (1) Fixed chicken erythrocyte 10% (ด้วย glutaraldehyde) และ (2) Formalinized chicken red blood cells โดยแต่ละวิธีมีขั้นตอนการเตรียมดังต่อนี้

Fixed chicken erythrocyte 10% (ด้วย glutaraldehyde)

1. เตรียมเลือดจากไก่ SPF (Specific pathogen free) ผสมกับ Alsever' solution ในอัตราส่วน 1:1
2. ปั่นตกตะกอนสารละลายผสมที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 5-10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
3. ทิ้งส่วนใสและดูดส่วน buffy coat ด้านบนออก
4. ล้างเม็ดเลือดแดง 3 รอบ ด้วย sterile PBS
5. คำนวณ pack cell volume และเติม PBS เพื่อให้เป็น 10% ความเข้มข้นสุดท้ายของเม็ดเลือดแดง
6. ผสม 4% cold glutaraldehyde ใน PBS ที่สัดส่วน 1:1
7. ปั่น stirred เม็ดเลือดแดงที่ fixed กับ glutaraldehyde ด้วย magnetic bar ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืน
8. จากนั้นปั่นส่วนผสมที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 5-10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
9. ล้างเม็ดเลือดแดง 3 รอบ ด้วย sterile PBS
10. เจือจาง glutaraldehyde fixed erythrocyte ด้วย PBS ที่ 10% final concentration เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งใช้งาน

Formalinized chicken red blood cells

1. เตรียมเลือดจากไก่ SPF ผสมกับ Alsever' solution ในอัตราส่วน 1:1
2. จากนั้นปั่นล้าง 2 รอบด้วย PBS โดยปั่นล้าง 4,000 rpm เป็นเวลา 5-10 นาที
3. ทิ้งส่วนใส และดูดส่วน buffy coat ด้านบนออก
4. เติม PBS ให้ได้ 80% ของปริมาณที่เตรียมเริ่มต้น
5. เติม 8% formalin ใน final concentration
6. Fixed ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ทิ้งไว้ข้ามคืน)

7. ล้าง 1 ครั้งด้วย PBS แล้วเทส่วนใสทิ้ง
8. เติม PBS ปริมาณเท่ากับ RBC (1:1) เก็บไว้ใช้ 2-8 °C
9. เจือจางด้วย PBS อัตราส่วน 1:9 เป็น 10% CRBC สำหรับตรวจ HI

5.3 การตรวจด้วยวิธี Hemagglutination inhibition (HI)

วิธีการตรวจ HI มีขั้นดังนี้ คือ

1. เตรียม microtiter plate V-shape แบบ 96 well ทดสอบตามแนวนอน
2. เจือจางซีรัมโดยใช้สารละลาย BSA-PBS (0.1% bovine serum albumin ใน PBS) ใส่ลงในแถวที่ 2 จนถึงแถว 12 หลุมละ 50 µl จนครบทุกหลุม (เว้นแถวที่ 1 ไว้) จากนั้นนำซีรัมที่ fixed แล้วใส่ในหลุมที่ 1 และ 2 หลุมละ 50 µl
3. ผสมซีรัมตัวอย่าง จากแถวที่ 2 แล้วดูดไปแถวที่ 3 จำนวน 50 µl ทำการผสมแล้วดูดจ่ายไปจนถึงแถวที่ 10 ให้ดูดทิ้ง 50 µl แถวที่ 11 และ 12 สำหรับเป็นหลุมควบคุมแอนติเจน และหลุมควบคุม CRBC ตามลำดับ (เจือจาง 2-fold dilution ให้ได้ 1/5-1/640)
4. เติมแอนติเจน 4 HA unit ที่เจือจางแล้วใส่ในทุกหลุม หลุมละ 50 µl จนถึงหลุม 11 แล้วเขย่าให้เข้ากันนาน 15 นาที
5. เตรียม 1%CRBC (ใช้ 10% CRBC 1 ml ต่อ diluent 9 ml)
6. เมื่อครบ 15 นาที ให้นำ 1%CRBC ใส่ในทุกหลุมๆละ 50 µl ตั้งทิ้งไว้นาน 1-2 ชั่วโมง

หมายเหตุ ถ้าตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวก ซีรัมควบคุมผลลบ และแอนติเจน เมื่อทดสอบไปแล้วไม่ได้ผลให้นำทั้งหมดไป inactivate ใน water bath ที่อุณหภูมิที่ 56 °C นาน 30 นาที

5.4 การตรวจ Hemagglutination assay (HA)

วิธีการตรวจ HA โดยละเอียดแสดงดังนี้ คือ

1. เตรียม microtiter plate V-shape แบบ 96 well ทำในแนวนอน
2. เจือจางแอนติเจนโดยใช้สารละลาย BSA-PBS (0.1% bovine serum albumin ใน PBS) ใส่ลงในแถวที่ 2 จนถึงแถว 12 หลุมละ 50 µl จนครบทุกหลุม (เว้นแถวที่ 1 ไว้)
3. นำแอนติเจนใส่ในแถวที่ 1 และ 2 แถวละ 50 µl
4. ทำการเจือจางแอนติเจน จากแถวที่ 2 ไป 3 จำนวน 50 µl แล้วทำการเจือจางไปเรื่อยจนครบแถวที่ 11 พอถึงแถวที่ 11 ให้ดูดทิ้งไป 50 µl สำหรับหลุมที่ 12 เป็นควบคุมCRBC มีสารละลาย BSA-PBS อย่างเดียว
5. เตรียม 1%CRBC (ใช้ 10% CRBC 1 ml ต่อ diluent 9 ml)

6. นำ 1%CRBC ใส่ในทุกหลุมๆละ 50 µl ตั้งทิ้งไว้นาน 1-2 ชั่วโมง
7. ส่องดูจะเห็นเม็ดเลือดแดงตกลงที่ก้นหลุมเป็นแบบร่างแห (agglutinate) ถ้ายังเห็นผลไม่ชัด ให้ทิ้งไว้แบบข้ามคืน
8. ให้ดูหลุมสุดท้ายที่เป็นร่างแห (หลุมถัดไปเป็นเม็ดกระดุม) จะนับเป็น 1 HA unit เช่น หลุมสุดท้ายที่เป็นร่างแห คือ 8 เพราะฉะนั้น 1 HA unit ของ Ag = 1:128

2 HA unit ของ Ag = 1:64

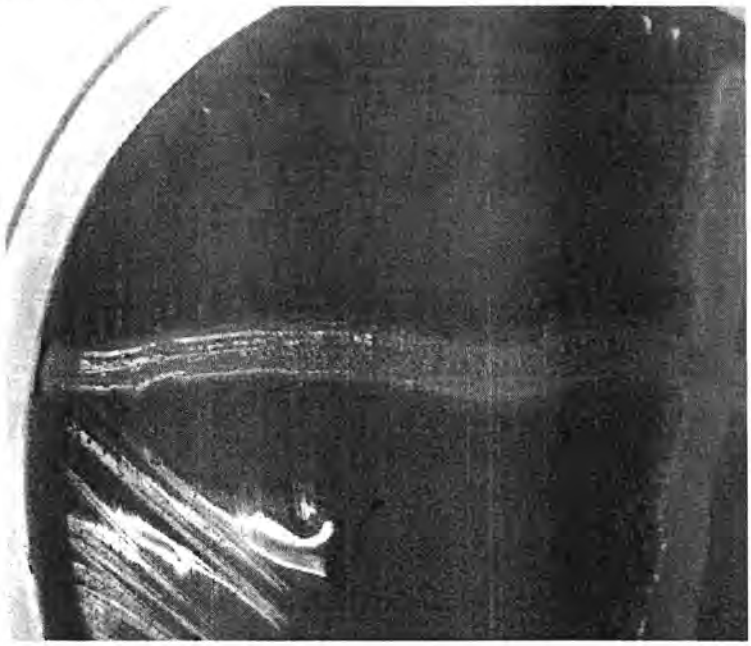
4 HA unit ของ Ag = 1:32

ดังนั้น เวลาใช้งานแอนติเจน ในการทดสอบ HI ให้ใช้ 4 HA unit ของแอนติเจน

ผลงานวิจัย

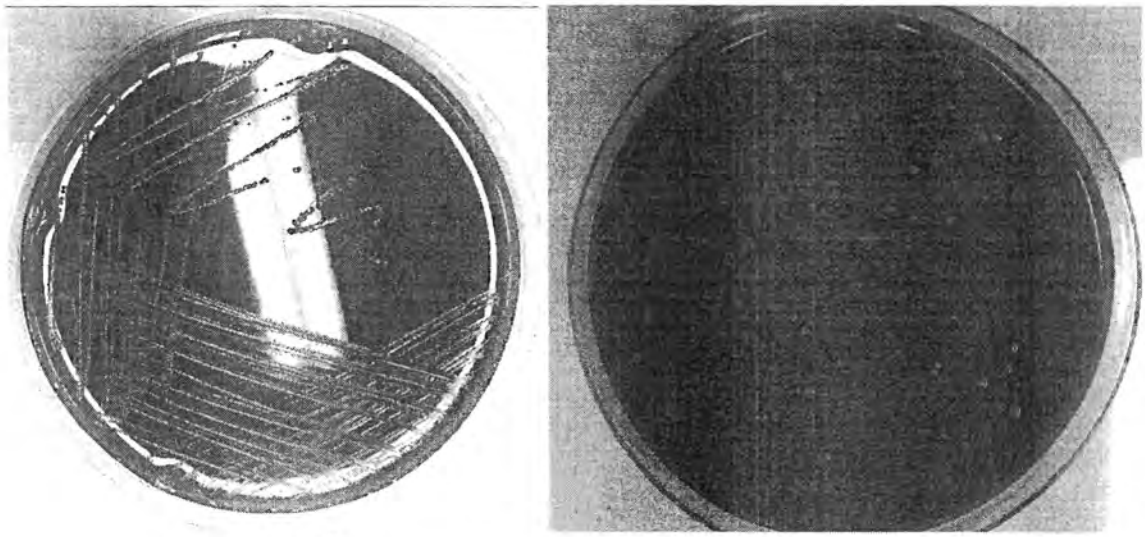
ระยะที่ 1: การเพาะเชื้อและเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

1.1 นำเชื้อมาตรฐาน ซีโรวาร์ A (221), B (0222) และ C (Modesto) ที่ได้มาจาก หน่วยปฏิบัติการวิจัยสุขภาพสัตว์ปีก (Avian Health Research Unit; AHRU) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาขีดลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะ (blood agar) ขีดคาดทับด้วย *Staphylococcus aureus* ที่บ่มในโถเทียนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนได้โคโลนีของ *A. paragallinarum* มีลักษณะนูน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ เมื่ออยู่ไกลจาก *S. aureus* จนไม่พบเชื้อเลย ซึ่งเป็นลักษณะที่เรียกว่า satellite colonies (รูปที่ 1)



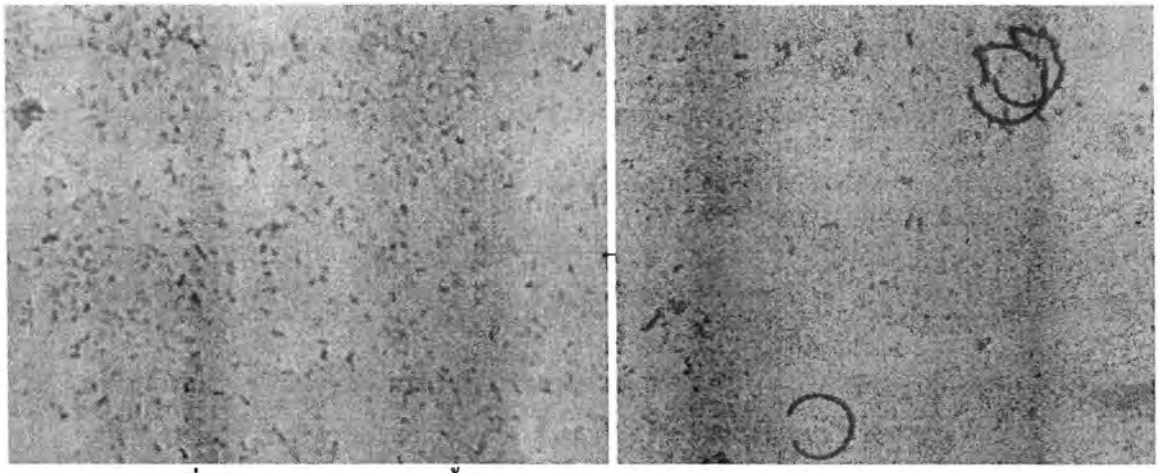
รูปที่ 1 แสดงเชื้อ *A. paragallinarum* ที่มีลักษณะ satellite colonies บนอาหารวุ้นเลือดแกะที่คาดด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus*

1.2 จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาขีดลงบนอาหารวุ้นช็อกโกแลต (GC agar base) ที่มีส่วนผสมของสาร NADH 0.0025% บ่มในโถเทียนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้โคโลนีขาวขุ่น ขนาดเล็ก สีเทา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร (รูปที่ 2)



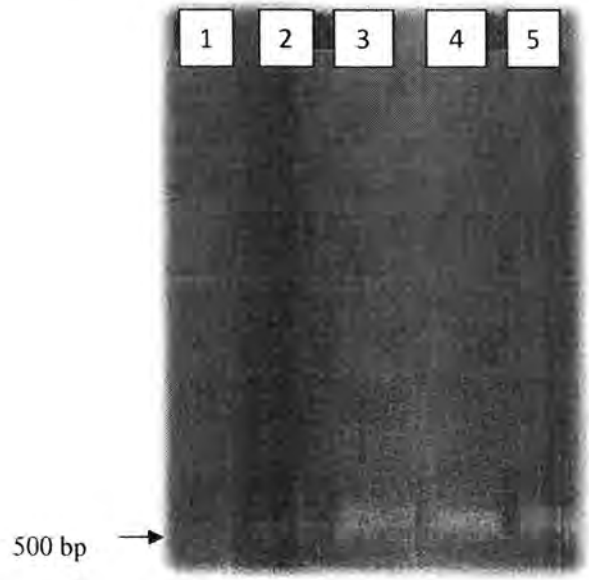
รูปที่ 2 แสดงเชื้อ *A. paragallinarum* เมื่อเพาะบน อาหารวุ้นช็อกโกแลต (GC agar base)

1.3 นำเชื้อที่เพาะได้มายืนยันด้วยการย้อม Gram's stains พบลักษณะเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม-แท่ง ไม่เคลื่อนที่ กรณีเพาะเลี้ยงเชื้อนานมากกว่า 24 ชั่วโมง สามารถพบเชื้อที่มีลักษณะไม่แน่นอน รูปร่างแท่ง รูปร่างเป็นเส้นสาย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้อ *A. paragallinarum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 100×

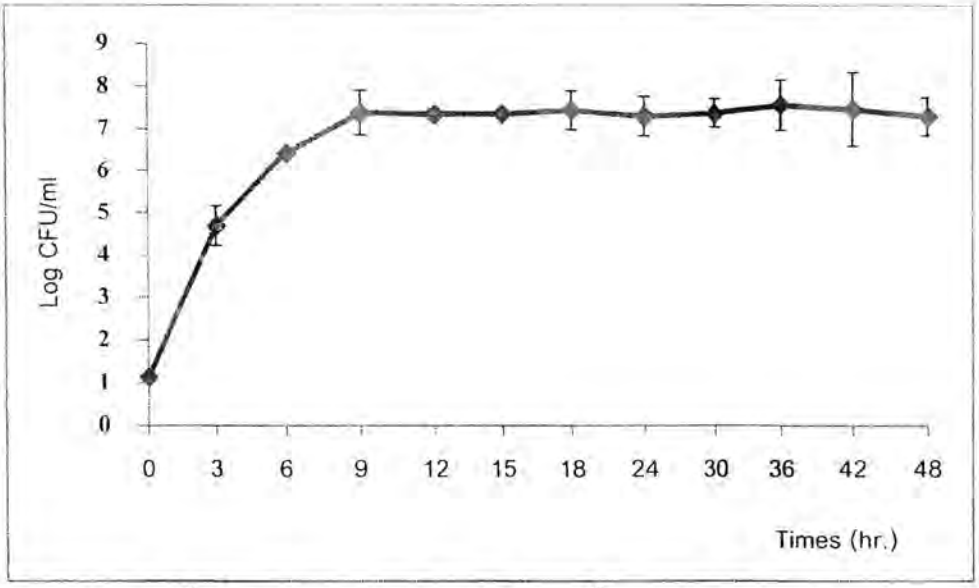
1.4 ยืนยันเชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธีตรวจสอบสารพันธุกรรมโดยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อโดยใช้ไพร์เมอร์ HPG-2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมผลบวกจากวัคซีนเชื้อตายทางการค้า Volvac® AC Gold Emul Bacterin (Boehringer Ingelhelm Vetmedica, Inc., USA) สามารถยืนยันบ่งชี้ *A. paragallinarum* ซึ่งให้ผลผลิตในขนาดประมาณ 500 base pairs (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงการยืนยันเชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธีการตรวจสารพันธุกรรม โดยใช้ไพร์เมอร์ HPG-2 ; Lane1: 100-bp marker, Lane 2: ตัวอย่างควบคุมผลบวก, Lane 3: *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A 221, Lane 4: *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B 0222, Lane 5: *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C Modesto

ระยะที่ 2 : การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TMB broth เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. paragallinarum* ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยนับจำนวนเชื้อชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36 และ 48 ของการบ่มเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่นับได้ 3 ครั้งในแต่ละช่วงเวลาแล้วนำค่าที่ได้สร้าง growth curve วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. paragallinarum* (รูปที่ 5).



รูปที่ 5 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. paragallinarum*

ระยะที่ 3: การเตรียมแอนติเจน

3.1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *A. paragallinarum* เพื่อใช้เตรียมแอนติเจนสำหรับชุดทดสอบ

เก็บเชื้อบนอาหารวุ้นช็อกโกแลต (GC agar base) ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml จากนั้นล้างเชื้อด้วย PBS 2-3 ครั้ง เมื่อได้เชื้อแล้วจึงเตรียมแอนติเจนสำหรับการเคลือบเพลทอีไลซ่าดัดแปลงจาก Sun และคณะ (2007) จากนั้นตรวจเชื้อด้วยวิธี Hemagglutination test ให้ได้ค่า HA ไตเตอร์ที่ประมาณ 2^7-2^9 เพื่อนำเชื้อเก็บเป็น stock ไว้ใช้งาน Hemagglutination inhibition test

3.2. เตรียมเชื้อสำหรับเตรียมวัคซีนเชื้อตาย เพื่อการเตรียมซีรัมควบคุมผลบวก

ดึงเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหารวุ้นช็อกโกแลต (GC agar base) ป้ายเชื้อลงในอาหารเหลว TMB broth (Blackall and Reid, 1982) เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อให้มีปริมาณมากพอสำหรับการเตรียมแอนติเจนทำวัคซีนเชื้อตาย โดยบ่มเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ได้ปริมาณเชื้อแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 3 ซีโรวาร์ สำหรับเตรียมวัคซีนเชื้อตาย

ซีโรวาร์	ค่า HA		ปริมาณเชื้อ (cfu/ml)	
	วัคซีน ครั้งที่ 1	วัคซีน ครั้งที่ 2	วัคซีน ครั้งที่ 1	วัคซีน ครั้งที่ 2
A 221	2^6	2^9	5.7×10^9	5.9×10^9
B 0222	2^9	2^9	4.9×10^9	5.0×10^9
C Modesto	2^9	2^9	4.5×10^9	5.6×10^9

3.3. การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นโปรตีน เพื่อใช้เตรียมแอนติเจนสำหรับชุดทดสอบ

นำสารละลายแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 มาวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้วิธี Qubit® Protein Assay Kits (Qubit® 2.0 Fluorometer) (รูปที่ 6) โดยทำการสอบเทียบเครื่องวัดโปรตีนด้วยตัวอย่างมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด เรียงตามลำดับดังนี้ คือ สาร A, สาร B และ สาร C เมื่อสามารถวัดค่ามาตรฐานได้ครบถ้วน จึงนำตัวอย่างสารละลายแอนติเจนที่เตรียมมาวัดค่าโปรตีน โดยค่าโปรตีนที่วัดได้สำหรับการเคลือบเพลทอิไลซ่าครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 แสดงดังตารางที่ 4

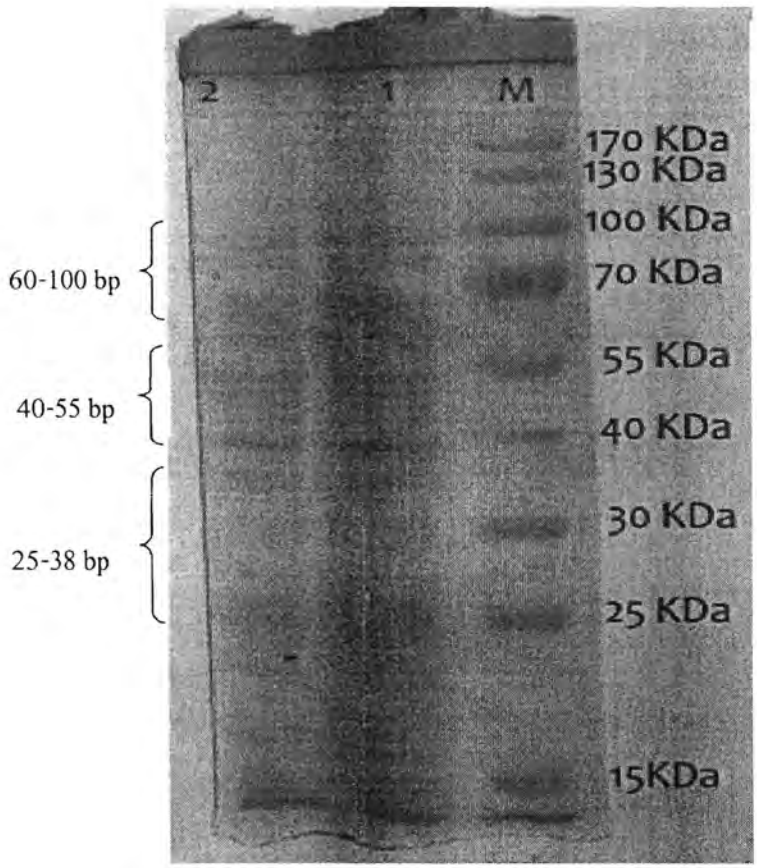
ตารางที่ 4 แสดงค่าโปรตีนที่วัดค่าได้สำหรับการเคลือบเพลทอิไลซ่า

ซีโรวาร์	ปริมาณโปรตีน ครั้งที่ 1 (µg/ml)	ปริมาณโปรตีน ครั้งที่ 2 (µg/ml)
A 221	498	500
B 0222	455	500
C Modesto	498	495

รูปที่ 6 แสดงวิธีการวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้วิธี Qubit® Protein Assay Kits (Qubit® 2.0 Fluorometer)

3.4 การวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เพื่อใช้เตรียมแอนติเจนสำหรับชุดทดสอบ

ผลการวิเคราะห์โปรตีนเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *A. paragallinarum* พบว่า รูปแบบโปรตีนของเชื้อทั้ง 3 ซีโรวาร์มีความคล้ายคลึงกัน และมีแถบโปรตีนหลัก 7 แถบที่เด่นชัด (รูปที่ 7) โดยสามารถเห็นแถบโปรตีนที่ชัดเจนใน 3 กลุ่มหลักๆ คือ ช่วงระหว่าง 60-100 KDa, 40-55 KDa และ 25-38 KDa ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัย Amal et al., (2012)



รูปที่ 7 แสดงรูปแบบโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ของเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A 221 (Lane 1) และ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Lane 2)

ระยะที่ 4: การพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA

4.1 การทดสอบค่าความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสม (checkerboard titration)

ชุดทดสอบอีไลซ่าที่เคลือบเพลทด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A มีค่าความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสมอยู่ที่ 25 µg/ml, 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ 6) ในขณะที่ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B และ C มีค่าความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสมอยู่ที่ 25 µg/ml, 1:1000 และ 1:400 ตามลำดับ (ตารางที่ 7, 8, 9 และ 10) ผลการทดสอบโดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนระหว่างค่า O.D.จากซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบที่มากที่สุด (Positive to negative ratio, P/N)

ตารางที่ 5 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน และ ซีรัม ที่เหมาะสมในการเคลือบเพลทอีไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (211) เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:100

ระดับความเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ	ความเข้มข้นของแอนติเจน (µg/ml)					
	25	**12.5**	**6.25**	**3.125**	**1.56**	**0.78**
1 : 50	1.118	1.119	1.192	1.227	1.4	1.206
1 : 100	1.584	1.437	1.437	1.469	1.501	1.446
1 : 200	2.323	1.962	1.741	1.56	1.679	1.445
1 : 400	**2.899**	2.293	1.916	1.605	1.805	1.465
1 : 800	**2.898**	**3.667**	2.597	1.786	1.56	1.549

ตารางที่ 6 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และซีรัมที่เหมาะสมในการเคลือบเพลทอีไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (211) (คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000 และ 1:2000)

ระดับความเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ	ความเข้มข้นของแอนติเจน (µg/ml)								
	25	12.5	6.25	25	12.5	6.25	25	12.5	6.25
P (1:400)	2.475	2.371	2.121	1.812	1.423	1.61	1.426	0.925	0.773
N (1:400)	0.293	0.292	0.278	0.188	0.163	0.183	0.137	0.143	0.157
P/N (1:400)	8.447	8.120	7.629	9.638	8.73	8.798	10.409	6.469	4.924
P (1:800)	2.514	2.280	1.893	2.012	1.298	1.169	1.395	0.925	0.596
N (1:800)	0.247	0.207	0.215	0.138	0.145	0.137	0.113	0.117	0.116
P/N (1:800)	10.178	11.014	8.805	**14.58**	8.952	8.533	12.35	7.91	5.138
	คอนจูเกต 1:500			คอนจูเกต 1:1000			คอนจูเกต 1:2000		

ตารางที่ 7 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน และ ซีรัมที่เหมาะสมในการเคลือบเพลทอีไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B (0222) เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:100

ระดับความเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ	ความเข้มข้นของแอนติเจน (µg/ml)					
	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78
1 : 50	1.147	1.188	1.296	1.283	1.347	1.238
1 : 100	1.335	1.757	1.775	1.700	1.688	1.616
1 : 200	1.649	**2.007**	1.594	1.609	1.441	1.337
1 : 400	1.498	**2.030**	1.673	1.416	1.282	1.335
1 : 800	1.519	1.700	**2.078**	1.614	1.441	1.335

ตารางที่ 8 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และ ซีรัมที่เหมาะสมในการเคลือบเพลทอีไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B (0222) (คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000 และ 1:2000)

ระดับความเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ	ความเข้มข้นของแอนติเจน (µg/ml)								
	25	12.5	6.25	25	12.5	6.25	25	12.5	6.25
P (1:400)	2.612	2.154	1.671	2.098	1.172	0.879	1.365	0.606	0.535
N (1:400)	0.279	0.275	0.259	0.177	0.178	0.169	0.16	0.155	0.151
P/N (1:400)	9.362	7.833	6.452	11.853	6.584	5.201	8.531	3.910	3.543
P (1:800)	2.528	2.063	1.56	1.857	0.973	0.981	1.27	0.563	0.538
N (1:800)	0.247	0.287	0.252	0.173	0.171	0.161	0.129	0.115	0.123
P/N (1:800)	10.234	7.188	6.190	10.734	5.690	6.093	9.845	4.896	4.374
	คอนจูเกต 1:500			คอนจูเกต 1:1000			คอนจูเกต 1:2000		

ตารางที่ 9 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน และ ซีรัมที่เหมาะสมในการเคลือบเพลทอีไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Modesto) เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:100

ระดับความเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ	ความเข้มข้นของแอนติเจน (µg/ml)					
	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78
1 : 50	1.408	1.486	1.503	1.482	1.495	1.437
1 : 100	2.045	2.148	2.163	2.144	2.158	1.966
1 : 200	2.910	2.734	2.411	2.455	2.202	2.110
1 : 400	3.434	2.662	1.981	3.035	1.716	2.212
1 : 800	3.320	2.262	1.729	2.841	1.410	2.037

ตารางที่ 10 ค่า P/N ของความเข้มข้นของแอนติเจน คอนจูเกต และ ซีรัมที่เหมาะสมในการเคลือบเพลทอีไลซ่าด้วยเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Modesto) (คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000 และ 1:2000)

ระดับความเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ	ความเข้มข้นของแอนติเจน (µg/ml)								
	25	12.5	6.25	25	12.5	6.25	25	12.5	6.25
P (1:400)	2.388	1.285	1.045	1.457	0.574	0.63	0.883	0.463	0.440
N (1:400)	0.334	0.394	0.363	0.25	0.202	0.199	0.187	0.176	0.167
P/N (1:400)	7.150	3.261	2.879	5.828	2.842	3.166	4.722	2.631	2.635
P (1:800)	2.107	1.061	0.871	1.25	0.531	0.453	0.763	0.334	0.318
N (1:800)	0.368	0.383	0.358	0.306	0.251	0.216	0.2	0.204	0.218
P/N (1:800)	5.726	2.770	2.433	4.085	2.116	2.097	3.815	1.637	1.459
	คอนจูเกต 1:500			คอนจูเกต 1:1000			คอนจูเกต 1:2000		

หมายเหตุ ไม่ใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้น 1:500 เนื่องจากค่า OD ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบให้ค่าสูง

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

4.2.1 ทดสอบเพื่อหาค่า cut-off ที่เหมาะสม

ผลจากการคำนวณตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบจำนวน 20 ตัวอย่าง เมื่อตรวจด้วยชุดทดสอบอีไลซ่าที่เตรียมเอง จากความเข้มข้นแอนติเจน ซีรัม และคอนจูเกตที่เหมาะสม พบค่า OD ที่ได้จากชุดทดสอบอีไลซ่า แสดงดังตารางที่ 11 โดยค่า cut-off ของชุดทดสอบอีไลซ่าแต่ละซีโรวาร์คิดจาก ค่าเฉลี่ยของ OD ตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบ บวกด้วยสามเท่าของค่าเบี่ยงเบน (cutoff = Mean OD + 3 (SD)) (Shen et al., 2015)

I 2767885

ตารางที่ 11 แสดงค่า OD ของซีรัมควบคุมผลลบ เมื่อตรวจด้วยชุดทดสอบอีไลซ่าที่เตรียมเองจากเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 3 ซีโรวาร์

ซีโรวาร์	ช่วง OD	ค่าเฉลี่ย (Mean)	ค่าเบี่ยงเบน (SD)	Cut-off
A (221)	0.111-0.343	0.184	0.050	0.334
B (0222)	0.174-0.423	0.274	0.070	0.484
C (Modesto)	0.213-0.590	0.360	0.106	0.678

4.2.2 ทดสอบความสามารถในการตรวจซ้ำได้ (repeatability test) ของชุดทดสอบอีไลซ่า

ความสามารถในการตรวจซ้ำของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เตรียมขึ้นเองสามารถประเมินได้จาก ค่าสัมประสิทธิของความผันแปร (CV) จากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกจำนวน 3 ตัวอย่าง (n=3) และซีรัมควบคุมผลลบจำนวน 3 ตัวอย่าง (n=3) เมื่อทดสอบกับเพลทอีไลซ่าที่เคลือบด้วยแอนติเจนที่ผลิตจากล็อตเดียวกันและต่างล็อต โดยพบว่าค่า CV ส่วนใหญ่ไม่เกิน 10% เมื่อพิจารณาจากทั้งชุดทดสอบที่เคลือบด้วยแอนติเจนที่ผลิตจากล็อตเดียวกันและต่างล็อต (ตารางที่ 12)

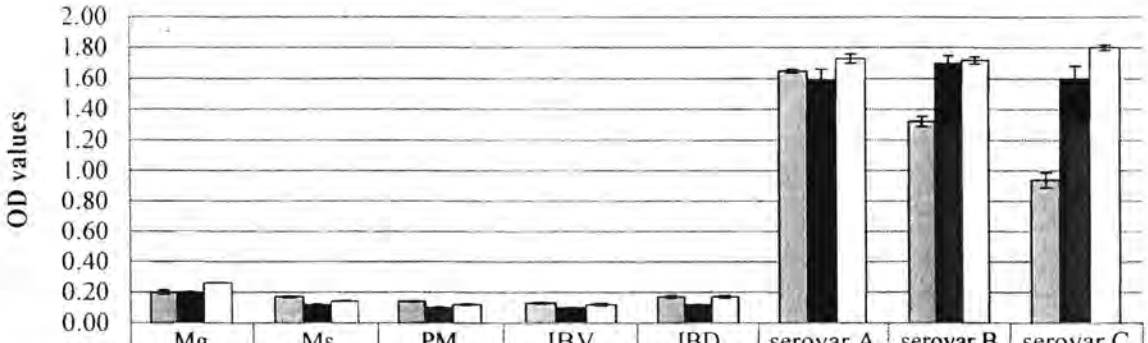
ตารางที่ 12 ค่าสัมประสิทธิของความผันแปร (CV) จากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบ

I-ELISA		ช่วงค่า %CV	ค่าเฉลี่ย (± 1SD) %CV
แอนติเจนที่ผลิตจากล็อตเดียวกัน	ซีโรวาร์ A	1.57–9.78%	5.45 ± 2.77%
	ซีโรวาร์ B	1.11–9.16%	3.67 ± 2.03%
	ซีโรวาร์ C	0.14–7.62%	2.85 ± 1.83%
แอนติเจนที่ผลิตจากต่างล็อตกัน	ซีโรวาร์ A	1.22–8.69%	4.1 ± 2.74%
	ซีโรวาร์ B	3.87–12.92%	6.15 ± 3.48%
	ซีโรวาร์ C	1.42–11.52%	6.28 ± 3.56%

4.2.3 ทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ของชุดทดสอบอีไลซ่าที่เตรียมเอง

ความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้น ประเมินจากชุดทดสอบอีไลซ่าที่เตรียมเองทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกของเชื้อ IBD, IBV, PM, MG และ MS ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13, 14 และ 15 และรูปที่ 8 โดยพบว่าค่า OD จากตัวอย่างควบคุมผลบวกของเชื้อ IBD, IBV, PM, MG และ MS มีค่าน้อยกว่าค่า cut-off สำหรับชุดทดสอบทั้ง 3 ซีโรวาร์ แสดงถึงความจำเพาะของชุดทดสอบที่สามารถ

ตรวจได้ผลบวกเฉพาะต่อเชื้อ *A. paragallinarum* เท่านั้น ในขณะที่ค่า OD จากตัวอย่างควบคุมผลบวกของเชื้อ *A. paragallinarum* มีค่าสูงกว่า cut-off เมื่อตรวจกับชุดทดสอบต่างซีโรวาร์



	Mg	Ms	PM	IBV	IBD	serovar A	serovar B	serovar C
□ Plate A	0.20	0.17	0.14	0.13	0.17	1.65	1.32	0.94
■ Plate B	0.20	0.12	0.10	0.10	0.12	1.59	1.70	1.60
□ Plate C	0.26	0.14	0.12	0.12	0.17	1.73	1.72	1.80

รูปที่ 8 ความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูปอีไลซ่าชนิด indirect ทั้ง 3 ซีโรวาร์ ที่เตรียมขึ้นเองจากการเคลือบเพลทด้วยแอนติเจน *A. paragallinarium* ซีโรวาร์ A, B และ C เมื่อทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกของเชื้อ IBD, IB, PM, MG และ MS, และทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ *A. paragallinarium* ซีโรวาร์ต่างๆ

ตารางที่ 13 ค่า OD ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ MG, MS, PM, IBV และ IBD เมื่อทดสอบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบเพลทด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A

Control serum	OD values
Mg	0.200±0.014
Ms	0.167±0.007
PM	0.136±0.003
IBV	0.129±0.004
IBD	0.168±0.008
ซีโรวาร์ A	1.652±0.012
ซีโรวาร์ B	1.318±0.032
ซีโรวาร์ C	0.943±0.049

ตารางที่ 14 ค่า OD ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ MG, MS, PM, IBV และ IBD เมื่อทดสอบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบเพลทด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B

Control serum	OD values
Mg	0.204±0.004
Ms	0.116±0.004
PM	0.098±.0.005
IBV	0.096±0.002
IBD	0.124±0.001
ซีโรวาร์ A	1.587±0.073
ซีโรวาร์ B	1.698±0.050
ซีโรวาร์ C	1.597±0.083

ตารางที่ 15 ค่า OD ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อ MG, MS, PM, IBV และ IBD เมื่อทดสอบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA เคลือบเพลทด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C

Control serum	OD values
Mg	0.261±0.002
Ms	0.142±0.004
PM	0.120±0.005
IBV	0.115±0.009
IBD	0.169±0.011
ซีโรวาร์ A	1.732±0.029
ซีโรวาร์ B	1.723±0.023
ซีโรวาร์ C	1.798±0.018

4.2.4 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA

ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* มีค่าเท่ากับ 100% และ 36.67% สำหรับซีโรวาร์ A, 100% และ 31.67% สำหรับซีโรวาร์ B และ 100% และ 31.67% สำหรับซีโรวาร์ C (ตารางที่ 15, 16 และ 17) ในขณะที่ค่าความสอดคล้องระหว่างชุดทดสอบ indirect ELISA และ HI มีค่าเท่ากับ 59%, 53% และ 59% สำหรับซีโรวาร์ A, B และ C ตามลำดับ (ตารางที่ 18, 19 และ 20)

ตารางที่ 16 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (221)

In-house ELISA	Control serum		Total
	Positive results	Negative results	
Positive results	40 (a)	38 (b)	78
Negative results	0 (c)	22 (d)	22
Total	40 (a+c)	60 (b+d)	100

%Sensitivity: a / (a+c) x 100 = 100%

%Specificity: d / (b+d) x 100 = 36.67%

%False positive: b / (b+d) x 100 = 63.33%

%False negative: c / (a+c) x 100 = 0%

ตารางที่ 17 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B (0222)

In-house ELISA	Control serum		Total
	Positive results	Negative results	
Positive results	40 (a)	41 (b)	81
Negative results	0 (c)	19 (d)	19
Total	40 (a+c)	60 (b+d)	100

%Sensitivity: a / (a+c) x 100 = 100%

%Specificity: d / (b+d) x 100 = 31.67%

%False positive: b / (b+d) x 100 = 68.33%

%False negative: c / (a+c) x 100 = 0%

ตารางที่ 18 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Modesto)

In-house ELISA	Control serum		Total
	Positive results	Negative results	
Positive results	40 (a)	41 (b)	81
Negative results	0 (c)	19 (d)	19
Total	40 (a+c)	60 (b+d)	100

%Sensitivity: a / (a+c) x 100 = 100%

%Specificity: d / (b+d) x 100 = 31.67%

%False positive: b / (b+d) x 100 = 68.33%

%False negative: c / (a+c) x 100 = 0%

ตารางที่ 19 ค่าความสอดคล้อง (agreement rate) ระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ A (221) และ HI

In-house ELISA	Hemagglutination inhibition test		Total
	Positive results	Negative results	
Positive results	37 (a)	41 (b)	78
Negative results	0 (c)	22 (d)	22
Total	37 (a+c)	63 (b+d)	100

% agreement: (a+d)/(a+b+c+d) x100 = 59%

ตารางที่ 20 ค่าความสอดคล้อง (agreement rate) ระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ B (0222) และ HI

In-house ELISA	Hemagglutination inhibition test		Total
	Positive results	Negative results	
Positive results	34 (a)	47 (b)	81
Negative results	0 (c)	19 (d)	19
Total	34 (a+c)	66 (b+d)	100

% agreement: (a+d)/(a+b+c+d) x100 = 53%

ตารางที่ 21 ค่าความสอดคล้อง (agreement rate) ระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่เคลือบด้วย *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ C (Modesto) และ HI

In-house ELISA	Hemagglutination inhibition test		Total
	Positive results	Negative results	
Positive results	40 (a)	41 (b)	81
Negative results	0 (c)	19 (d)	19
Total	40 (a+c)	60 (b+d)	100

% agreement: (a+d)/(a+b+c+d) x100 = 59%

4.2.5 เปรียบเทียบการตอบสนองภูมิคุ้มกันระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA และHI

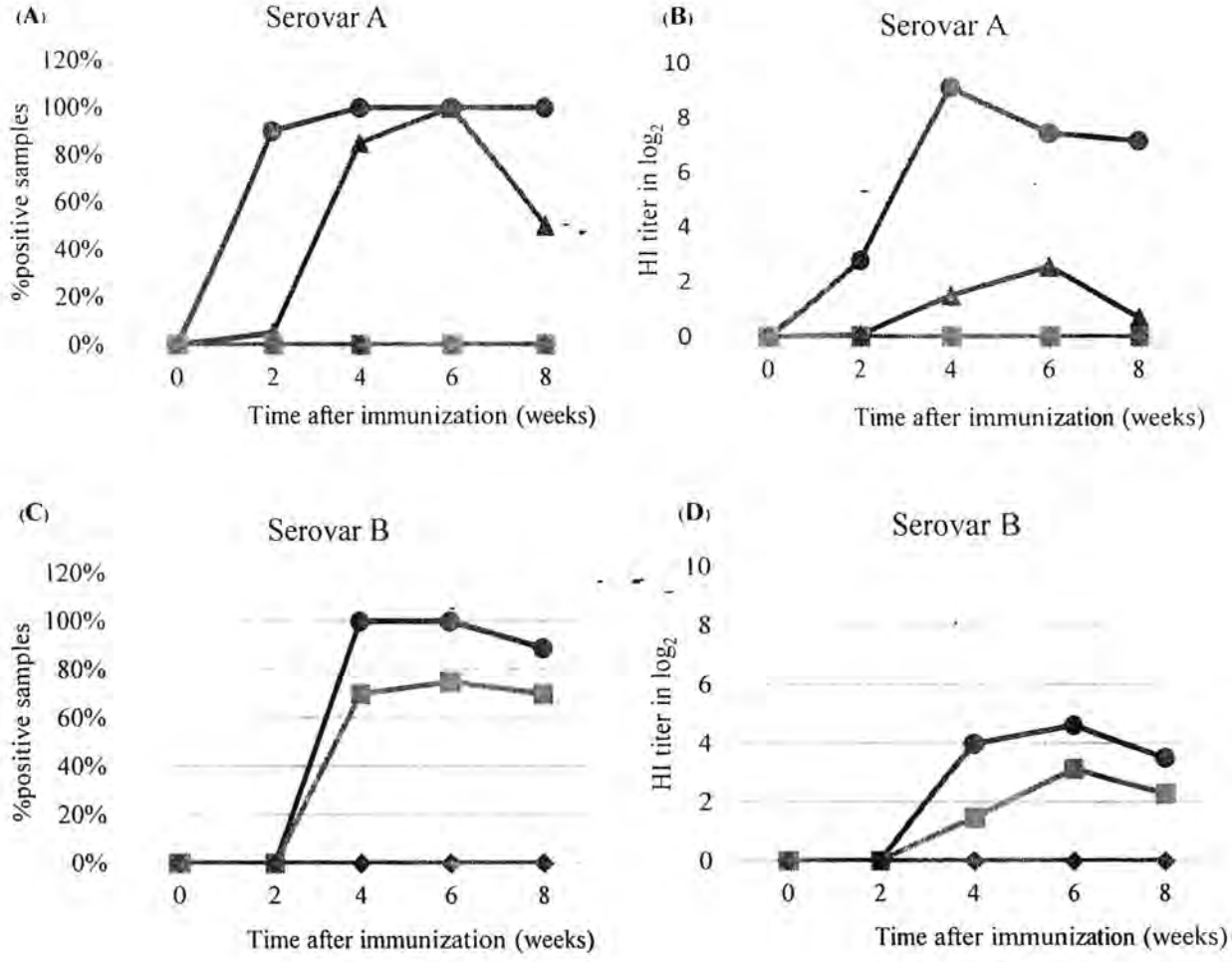
ซีรัมควบคุมผลบวกในทุกกลุ่ม ซึ่งได้จากไก่หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 4 สัปดาห์ แสดงผลบวกเกือบ 100% ต่อชุดทดสอบ indirect ELISA ทั้ง 3 ซีโรวาร์ โดยแอนติซีรัมของแต่ละซีโรวาร์ให้ผลบวกต่อชุดทดสอบที่เคลือบเพลทต่างซีโรวาร์ (heterologous test) ในทางตรงกันข้ามการตรวจด้วย HI ให้ผลบวกเฉพาะกรณีที่ซีโรวาร์ตรงกัน (heterologous test) เปอร์เซ็นต์ผลบวกจากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกซึ่งได้จากไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมเองเมื่อตรวจด้วย HI ได้แก่ 85%, 70% และ 100% สำหรับซีโรวาร์ A, B และ C ตามลำดับ ในขณะที่มีตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบจำนวนหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ซีโรวาร์ B และ C อย่างไรก็ตามทุกตัวอย่างของซีรัมควบคุมผลลบให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจด้วยวิธี HI (ตารางที่ 21)

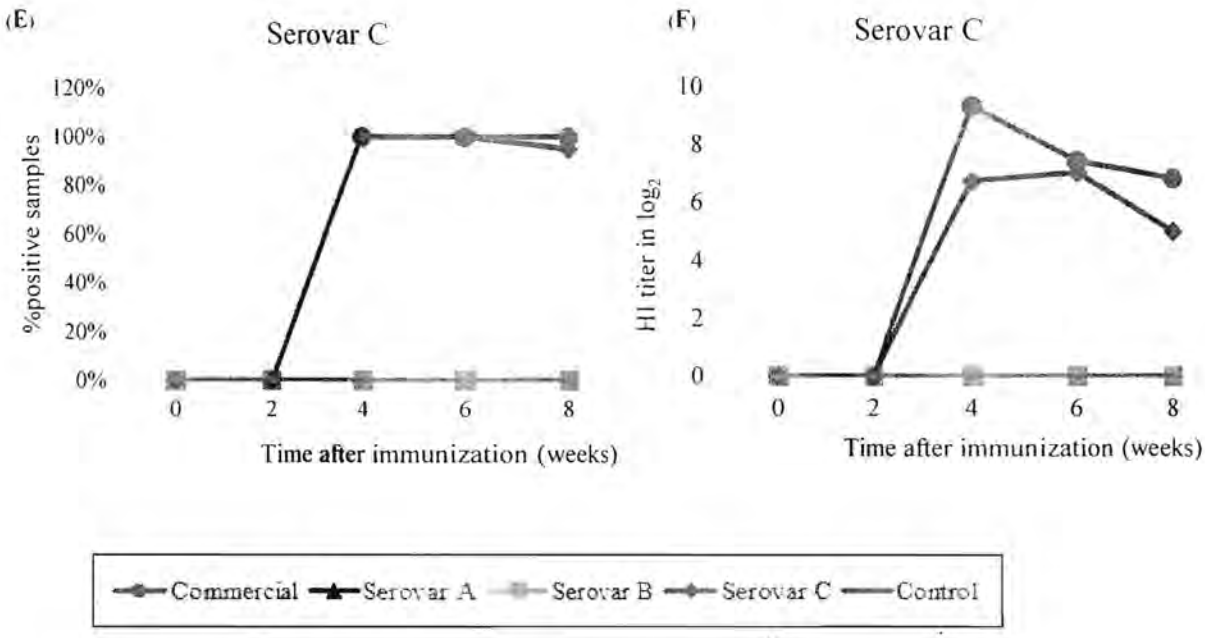
ตารางที่ 22 เปรียบเทียบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันระหว่างชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA และHI จากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบซึ่งได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวม

วิธีทดสอบ	กลุ่มซีรัมควบคุม				
	Coryza Oil-3®	A 221	B 0222	C Modesto	Negative
I-ELISA coated serovar A	100%	100%	100%	90%	0%
HI + serovar A antigen	100%	85%	0%	0%	0%
I-ELISA coated serovar B	100%	100%	100%	100%	5%
HI + serovar B antigen	100%	0%	70%	0%	0%
I-ELISA coated serovar C	100%	100%	100%	100%	5%
HI + serovar C antigen	100%	0%	0%	100%	0%

ระยะที่ 5 การตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวมด้วยวิธี Hemagglutination inhibition

ผลจากการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคหัดหน้าบวมจากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบและตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกที่เตรียมจากการฉีดวัคซีนเชื้อตายทางการค้าและวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตเอง โดยทำการฉีดวัคซีน 2 ครั้ง แต่ละครั้งมีระยะเวลาห่างกัน 2 สัปดาห์ การเก็บตัวอย่างซีรัมไก่ตั้งแต่ก่อนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและที่ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ภายหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 3 ซีโรวาร์ ด้วยวิธี Hemagglutination inhibition แสดงดังรูปที่ 9





รูปที่ 9 (a, c, e) แสดงจำนวน**ตัวอย่าง**ที่ให้ผล**บ**วกคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) และ (b, d, f) แสดงระดับ HI ไตเตอร์ เมื่อทดสอบด้วย**วิธี** HI test ต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรวาร์ (a, b) A, (c, d) B และ (e, f) C ตัวอย่าง**ซีรัม**ควบคุม**ผลบวกและผลลบ**ถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ ให้วัคซีนเชื้อตายทางการค้า, กลุ่มที่ 2 คือ ให้วัคซีนเชื้อตาย**ที่ผลิตเอง**ซีโรวาร์ A, กลุ่มที่ 3 คือ ให้วัคซีนเชื้อตาย**ที่ผลิต**เองซีโรวาร์ B, กลุ่มที่ 4 คือ ให้วัคซีนเชื้อตายที่ผลิต**เองซี**โรวาร์ C, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่ม**ซีรัม**ควบคุมผลลบ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบทางด้านซีรัมวิทยาสำหรับตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวมด้วยวิธี HI และ blocking ELISA มีการศึกษาเป็นระยะเวลาหลายปี (Iritani et al., 1977; Yamaguchi et al., 1988; Zhang et al., 1999) อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจดังกล่าวยังคงมีข้อจำกัดและมีความซับซ้อนของวิธีทำการทดสอบ ร่วมกับการแปรผลที่ยังไม่แน่นอนของวิธี HI หรือ การไม่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขายทั่วไปตามท้องตลาดของวิธี blocking ELISA จากข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้วิธีการทดสอบ HI และ blocking ELISA ไม่ได้ถูกนำมาใช้ตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวมโดยทั่วไปเป็นประจำ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงให้ความสนใจในการพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA โดยใช้เซลล์แบคทีเรีย *A. paragallinarum* ในการเคลือบเพลทแยกซีโรวาร์ สำหรับการตรวจวัดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อโรคหวัดหน้าบวม ชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA เป็นวิธีที่ใช้ง่าย ประหยัดเวลา และใช้แรงงานน้อย เนื่องจากใช้คอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์

จากการศึกษาครั้งนี้ เชื้อแบคทีเรีย *A. paragallinarum* แสดงรูปแบบโปรตีนของเชื้อทั้ง 3 ซีโรวาร์มีความคล้ายคลึงกัน โดยสามารถเห็นแถบโปรตีนที่ชัดเจนใน 3 กลุ่มหลักๆ คือ ช่วงระหว่าง 60-100 KDa, 40-55 KDa และ 25-38 KDa ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัย Amal et al., (2012) จากผลดังกล่าวแสดงว่าเชื้อแบคทีเรีย *A. paragallinarum* ที่เตรียมสำหรับเคลือบเพลท indirect ELISA มีความเหมาะสมและไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนแอนติเจนอื่นๆ

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบพบว่า ค่า cut-off ของชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA สำหรับซีโรวาร์ B และ C มีค่าสูงกว่าซีโรวาร์ A แสดงถึงปฏิกิริยาของชุดทดสอบซีโรวาร์ B และ C มีความแปรผันมากกว่าซีโรวาร์ A ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ เมื่อพิจารณาความจำเพาะของชุดทดสอบพบว่า ไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองของแอนติเจนต่อซีรัมควบคุมผลบวกของเชื้อก่อโรคอื่นๆในสัตว์ปีก ได้แก่ IBDV, IBV, PM, MG และ MS ในขณะที่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างซีโรวาร์ ดังนั้นชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA สามารถใช้เพื่อตรวจแยกการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อ ***A. paragallinarum*** ภายในฝูงไก่แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างซีโรวาร์ ในขณะที่ชุดทดสอบที่เตรียมขึ้นนี้มีความสามารถในการตรวจซ้ำ เนื่องจากค่าสัมประสิทธิของความผันแปร (CV) จากตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบ เมื่อทดสอบกับเพลทอีไลซ่าที่เคลือบด้วยแอนติเจนที่ผลิตจากล็อตเดียวกันและต่างล็อต มีค่าไม่เกิน 10% นอกจากนี้ชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ทั้ง 3

ซีโรวาร์ มีความไวต่อการทดสอบ 100% แต่ความจำเพาะค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 30%) เพราะว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามสูงระหว่าง 3 ซีโรวาร์ของ *A. paragallinarum* ผลดังกล่าวนี้แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าของวิธี blocking ELISA ที่ใช้ monoclonal antibody ซึ่งมีความจำเพาะต่อซีโรวาร์สูง (Zhang et al., 1999; Sun et al., 2007) ผลการทดสอบความถูกต้องของชุดทดสอบนี้บ่งชี้ได้ว่า ชุดทดสอบสำเร็จรูป indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้มีความไวสูงในการตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *A. paragallinarum* จากไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งจากการติดเชื้อโดยธรรมชาติและการได้รับวัคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อ *A. paragallinarum*

การศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเมื่อทดสอบด้วยวิธี HI ต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 3 ซีโรวาร์แสดงอยู่ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ซีรัมควบคุมในกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากวัคซีนเชื้อตายทางการค้ามีรูปแบบของระดับภูมิคุ้มกันต่อซีโรวาร์ A ที่สามารถตรวจพบได้รวดเร็วตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังทำวัคซีนครั้งแรก และภูมิคุ้มกันขึ้นสูงสุดที่ 4 สัปดาห์แล้วจึงลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Yamaguchi et al., (1988) ในขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันต่อซีโรวาร์ C ในกลุ่มที่ 1 ถูกตรวจพบช้ากว่าซีโรวาร์ A ที่ 4 สัปดาห์หลังทำวัคซีนครั้งแรก ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Sun et al., 2007) ยิ่งกว่านั้นรูปแบบของระดับภูมิคุ้มกันต่อซีโรวาร์ B ในกลุ่มที่ 1 คือ เริ่มตรวจพบที่ 4 สัปดาห์หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก ภูมิคุ้มกันขึ้นสูงสุดที่ 6 สัปดาห์แล้วจึงลดลง ระดับภูมิคุ้มกันของซีโรวาร์ B จะต่ำกว่าซีโรวาร์ A และ C ในทุกช่วงเวลา (Yamaguchi et al., 1991) เมื่อพิจารณาระดับภูมิคุ้มกันเมื่อตรวจด้วยวิธี HI ของกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมเองซีโรวาร์ A, B และ C ตามลำดับ พบว่า ให้อัตราการบวกที่จำเพาะต่อซีโรวาร์มากกว่า 70% และระดับไตเตอร์สูงกว่า 1:5 ในสัปดาห์ที่ 4 ทำให้คาดการณ์ได้ว่าวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมเองเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและสามารถป้องกันการติดเชื้อต่อโรคหวัดหน้าบวมได้

เอกสารอ้างอิง

Amal M, Soliman Y and Shafey S. 2012. Molecular characterization of *Avibacterium paragallinarum* strains used in evaluation of coryza vaccine in Egypt. J Am Sci. 8(3): 253-263.

Blackall PJ. 1999. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clin Microbiol Rev. 12(4): 627-632.

Blackall P and Reid G 1982. Further characterization of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium*.Vet. Microbiol.7(4): 359-367.

Chen X, Miflin J, Zhang P and Blackall P 1996. Developmemt and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 40(2):398-407.

Chukiatsiri K and Chansiripornchai N 2007. Case report: an outbreak of infectious coryza in a layer farm.J.Thai Vet. Med. Assoc. 58(3): 98-107.

Chukiatsiri K, Chotinun S and Chunsiripornchai N 2010. An outbreak of *Avibacterium paragallinarum* serovar B in a Thai layer farm. Thai J. Vet. Med. 40(4): 441-444.

Droual R, Bickford A, Charlton B, Cooper G and Channing S 1990. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. Avian Dis. 34: 1009-1016.

Garcia A, Angulo E, Blackall P and Ortiz A 2004. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. Avian Dis. 48(2): 425-429.

Iritani Y, Sugimori G and Katagiri K. 1977. Serologic response to *Haemophilus gallinarum* in artificially infected and vaccinated chickens. Avian Dis. 21(1): 1-8.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Mouahid M, Bisgaard M, Morley A, Mutters R and Mannheim W 1992. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Vet. Microbiol. 31(4): 363-368.

Mouahid M, Bouzoubaa K and Zouagui Z 1989. Chicken infectious coryza in Morocco: Epidemiological study and pathogenicity trials. ActesInst. Agron. Vet. (Maroc) 9:11-16.

Neramitmansuk W, Neramitmansuk P, Tantichareunyod T and Trongwongsa L 1995. The study of local strain infectious coryza vaccine in chicken. Thai Vet. Med. Assoc. 46: 53-60.

Noormohammadi A, Jones J, Underwood G and Whithear K 2002. Poor systemic antibody response after vaccination of commercial broiler breeders with Mycoplasma gallisepticum vaccine ts-11 not associated with susceptibility to challenge. Avian Dis. 46(3): 623-628.

Sawata A, Kume K and Nakase Y 1982. Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 2 organisms: occurrence and immunologic properties of hemagglutinin. Am. J. Vet. Res. 43(7): 1311-1314.

Shen Y, Cheng A, Wang M, Chen S, Jia R, Zhu D, Liu M, Sun K, Yang Q and Chen X. 2015. Development of an indirect ELISA method based on the VP3 protein of duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) for dual detection of DHAV-1 and DHAV-3 antibodies. J. Virol. Methods. 225: 30-34.

Sun H, Miao D, Zhang P, Gong Y and Blackall P 2007. A comparison of a blocking ELISA and a haemahhlutination inhibition assay for the detection of antibodies to *Avibacterium* (*Haemophilus*) *paragallinarumin* sera from artificially infected chicken. Biologicals 35 (4):317-320

Thitisak W, Janviriyasopak O, Morris R, Srihakim S and van Kruedener R 1988. Causes of death found in an epidemiological study of native chickens in Thai villages. Acta Vet. Scand. Suppl. 84: 200.

Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y and Hayashi Y. 1991. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* Serovar B Strains. Avian Dis. 35(4): 965-968.

Yamaguchi T, Iritani Y and Hayashi Y. 1988. Serological response of chickens either vaccinated or artificially infected with *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 308-312.

Zhang P, Blackall P, Yamaguchi T and Iritani Y 1999. A monoclonal antibody-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serovar- specific antibodies to *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 43: 75-82.