

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

Saipin Khumsab<sup>1\*</sup> Anuruk Trakanrungsee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

\*Corresponding author, E-mail address: khsaipin@yahoo.com

## 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. The *M. gallisepticum* and *M. synoviae* contaminated in allantoic fluid for the production of Newcastle disease live attenuated vaccine were detected by real-time polymerase chain reaction. The primers specific to 16S ribosomal DNA (16S rDNA) of *M. gallisepticum*, *M. synoviae* were designed for the polymerase chain reaction and performed with Light Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Maste, *M. hyorhina* was use as a positive control. The result of DNA amount and detection time as R<sup>2</sup> of *M. gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. hyorhina* showed high correlation score (0.99831, 0.99794 and 0.99563, respectively). The lowest limit of detection for genomic DNA of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* were 100 fg/μl and 10 fg/μl, respectively. These designed primers show highly specific, accuracy and precision and did not interfered by contamination of *M. hyorhina* and others such as *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* subsp. *enteridis* and *S. enterica* subsp. *typhimurium*. From the result, this real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) system could be a method of choice to detect *M. gallisepticum* and *M. synoviae* and then use to monitor and confirm the mycoplasma contamination in egg allantoic fluid of vaccine production

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

# การตรวจสอบปฏิกิริยาลูกโซ่เอ็นไซม์โพลีเมอเรสแบบ real-time สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* ใน allantoic fluid ที่ใช้เพื่อการผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า

สายพิณ ขุมทรัพย์\* อนุรักษ์ ตระการรังสี<sup>1</sup>

<sup>1</sup>สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

\*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: khsaipin@yahoo.com

## บทคัดย่อ

เชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และเยื่อภายในข้อต่ออักเสบในสัตว์ปีก การตรวจหาเชื้อทำได้หลายวิธีแตกต่างกันรวมถึงวิธีการตรวจด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล การตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid ที่ใช้ผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นโดยวิธี real-time PCR ด้วยชุดปฏิกิริยา LightCycler® 480 SYBR Green I Master ร่วมกับ primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S ribosomal DNA (16S rDNA) มีเชื้อ *Mycoplasma hyorhinis* เป็นเชื้อควบคุมบวก จากการทดลองพบว่าค่า R<sup>2</sup> ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* เท่ากับ 0.99831 0.99794 และ 0.99563 สามารถตรวจ genomic DNA ของเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. hyorhinis* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 100 fg/μl ส่วน *M. synoviae* สามารถตรวจพบได้แม้จะมี genomic DNA เพียง 10 fg/μl และ primer ที่ใช้ในการทดลองมีความจำเพาะต่อเชื้อ ความถูกต้อง และความเที่ยงสูง สามารถตรวจพบเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ได้แม้จะมีแบคทีเรีย *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* subsp. *enteridis* และ *S. enterica* subsp. *typhimurium* หรือแม้แต่เชื้อมัยโคพลาสมาชนิด *M. hyorhinis* ปนเปื้อนร่วมอยู่ด้วย จากผลการทดลองแสดงว่าการตรวจโดยวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* เพื่อเฝ้าระวังและตรวจยืนยันการปนเปื้อนของเชื้อใน allantoic fluid ในกระบวนการผลิตวัคซีน

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

## บทนำ

ในการผลิตวัคซีนทุกชนิดจะต้องมีการตรวจการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ในกระบวนการผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักจะต้องไม่มีการปนเปื้อนเชื้อมัคโคพลาสมา (mycoplasma) โดยเฉพาะ *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) และ *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และเยื่อภายในข้อต่ออักเสบในสัตว์ปีก สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ ทำให้น้ำหนักลด การวางไข่ลดลง และอัตราการตายของตัวอ่อนสูงขึ้น หากมีการติดเชื้อร่วมกับโรคนิวคาสเซิล หรือโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จะทำให้ความรุนแรงของโรคมากขึ้น เชื้อมัคโคพลาสมาสามารถมีชีวิตอยู่ภายนอก host ได้ 1-14 วัน แพร่กระจายโดยการติดต่อทางน้ำเชื้อ และติดต่อได้จากแม่ไก่สู่ไข่ หรือแม้แต่การปนเปื้อนในวัคซีนที่ไม่ได้ผลิตจากไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogen free; SPF egg) การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธีที่แตกต่างกันเช่นการเพาะแยกเชื้อ การตรวจทางชีวเคมี การตรวจทางซีรัมวิทยา (Stipkovits and Kempf 1996)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อมัคโคพลาสมาในวัคซีนโดยใช้การตรวจเอนไซม์ที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อมัคโคพลาสมา ซึ่งเป็นวิธีตรวจปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Lonza 2011) และตรวจยืนยันเชื้อมัคโคพลาสมาด้วยการแยกเชื้อและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อมัคโคพลาสมาจากสิ่งส่งตรวจ (OIE 2008) แต่อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อต้องใช้เวลานานถึง 3 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตช้าและหากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดอื่นร่วมด้วย จะไม่สามารถเพาะเชื้อมัคโคพลาสมาได้ (Kleven 2008) ในการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อโดยการแยกเชื้อต้องเพิ่มปริมาณเชื้อมีชีวิต จึงมีโอกาที่เชื้อจะแพร่กระจายสู่สภาพแวดล้อม ปัจจุบันมีเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีเมอเรสแบบ real-time (real-time polymerase

chain reaction; real-time PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำให้ที่สามารถตรวจและจำแนกเชื้อโดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเชื้อมีชีวิตก่อน

เทคนิค real-time PCR พัฒนามาจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีเมอเรสแบบดั้งเดิม (conventional PCR) แต่สามารถวัดปริมาณ DNA ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลาตั้งแต่ปฏิกิริยาเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุด โดยการตรวจวัดการเรืองแสงของ Fluorescent reporter ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของปริมาณ DNA ได้แม้มีปริมาณ DNA แตกต่างกันเพียง 2 เท่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะและมีความแม่นยำสูง ใช้ระยะเวลาสั้น และไม่จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเชื้อ ทำให้มีความปลอดภัยแก่ผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม (กนกวรรณ และคณะ 2006; วีระพงศ์ 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 allantoinic fluid จะช่วยให้การตรวจมีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และสามารถบอกชนิดของเชื้อมัคโคพลาสมาที่ปนเปื้อนใน allantoinic fluid ได้โดยไม่ต้องเพิ่มปริมาณเชื้อ ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีน และยังเป็น การลดความเสี่ยงต่อการกระจายเชื้อสู่สภาพแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

มัคโคพลาสมาเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ ทำให้มีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาด 0.3 ถึง 0.8 ไมครอน โคโลนีรูปไข่ดาว จัดอยู่ใน class Mollicutes Order Mycoplasmatales มีจีโนม ขนาด 0.6 -1.35 ล้านเบส (Mb) ประกอบด้วยยีนประมาณ 300 ยีน พบได้ทั่วไปทั้งในคน สัตว์ และดิน มัคโคพลาสมาเป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และในการปศุสัตว์ (Willey et al., 2011) การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ นิยมศึกษาจากยีน 16S

ribosomal DNA (16S rDNA) ซึ่งเป็นยีนที่มีความคงตัวสูง (Janda and Abbott 2007; Jill and Claridge 2004; Mangala et al., 2002) รวมทั้งเชื้อมัคโคพลาสมาด้วย (สุกัลยาณี และ สุภาพร 2551; Garcia et al., 1996; Lauerman et al., 1993; Liu et al., 2012)

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้วิธี real-time PCR เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลที่ผลิตโดย สทช.

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมัคโคพลาสมาชนิด modified Frey's ประกอบด้วย PPLO broth w/o cv (Difco, USA) 14.7 กรัม glucose (JDP, UK) 10 กรัม 1% phenol red (Sigma, USA) 2.5 มล. Noble agar (Difco, USA) 1% ในน้ำกลั่น 710 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ภายหลังการนิ่งฆ่าเชื้ออุ่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 56°C ก่อนเติม 25% yeast extract (Lab M, United Kingdom) 100 มล. Inactivated swine serum (JRS, USA) 150 มล. 1% nicotinamide adenine dinucleotide (NAD (Calbiochem, Germany)) 10 มล. 1% cysteine hydrochloride (Merck, Germany) 10 มล. และ 10% thallium acetate (Sigma, USA) 2.5 มล. ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันก่อนนำมาเทลงจานเพาะเลี้ยงขนาด 60 มม. ปริมาตร 10 มล./จานเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารเหลวเตรียมเหมือนอาหารแข็งแต่ไม่ใส่ Noble agar แบ่งใส่หลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 มล./หลอด เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมัคโคพลาสมาชนิด Hayflick เตรียมเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด modified Frey's แต่ในสูตรอาหารประกอบด้วย PPLO broth (Difco, USA) 15.8 กรัม

1% phenol red 1.5 มล. Noble agar 1% ในน้ำกลั่น 750 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ภายหลังการนิ่งฆ่าเชื้อ อุ่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 56°C ก่อนเติม 25% yeast extract 100 มล. inactivated horse serum (Gibco, USA) 150 มล. 0.2% deoxyribonucleic acid (DNA (Sigma, USA)) 12 มล. 200,000 unit Penicillin G (MP Biomedicals, USA) 5 มล. 10% thallium acetate 2.0 มล. และ 10% glucose 100 มล. ตามลำดับ ปรับ pH ให้ได้ 7.6-7.8 ด้วย 1N NaOH (Mallinckrodt, Sweden)

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด tryptose broth (TB) ประกอบด้วย tryptose broth (Difco, USA) 26 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล. แบ่งใส่หลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มล./หลอด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ภายหลังการนิ่งฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C

#### เชื้อแบคทีเรีย และจีโนมิกดีเอ็นเอ (gDNA) มาตรฐาน

เชื้อมัคโคพลาสมามาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ *M. gallisepticum* (S6) *M. synoviae* (ATCC 25204) และ *M. hyorhinis* (BTS7) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เพิ่มจำนวนเชื้อมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดในอาหารแข็งและเหลว เพื่อใช้ในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (DNeasy® blood & tissue kit (QIAGEN, USA)) 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 เลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดในอาหารเหลวเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะของ primer ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

จีโนมิคดีเอ็นเอมาตรฐานของเชื้อมัยโคพลาสมา 3 ชนิด ได้แก่ *M. gallisepticum* (NCTC 010115) *M. synoviae* (NCTC 10124) และ *M. hyorhinis* (NCTC 10130) แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.1 ng/μl สั่งซื้อจากบริษัท Minerva Biolabs GmbH (Minerva Biolabs GmbH, Germany) ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนีเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของจีโนมิคดีเอ็นเอที่สามารถตรวจพบ (limit of detection; LOD)

#### การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยง *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด modified Frey's และเพาะเลี้ยง *M. hyorhinis* ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Hayflick บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5-10% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 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 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำเชื้อมัยโคพลาสมา และเชื้อแบคทีเรียไปสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดหาปริมาณด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman, USA)) เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา real-time PCR ต่อไป

#### Allantoic fluid

นำ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะอายุ 10 วัน ที่ฉีดเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนาไลโซต้า (NDVL) แล้วฟักไข่ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แช่ไข่ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนเก็บ allantoic fluid การทดลองนี้ใช้ allantoic fluid ชุดการผลิตที่ NDL 15/57 ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ ความจำเพาะ ความถูกต้อง และความเที่ยง และ allantoic fluid จำนวน 17 ชุดการผลิต ใช้ในการทดสอบหาเชื้อมัยโคพลาสมาใน allantoic fluid ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

#### การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ (limit of detection; LOD)

นำจีโนมิคดีเอ็นเอมาตรฐานของเชื้อมัยโคพลาสมา 3 ชนิด (*M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*) ความเข้มข้น 0.1 ng/μl ไปเจือจางให้มีความเข้มข้น 1-10<sup>-8</sup> ด้วยเทคนิค 10 fold dilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบด้วยวิธี real-time PCR ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เมื่อปฏิกิริยาคำเนินไปจนครบ 45 รอบ จะได้ค่า Crossing point (Ct) นำผลที่ได้มาหาค่า Ct เฉลี่ย เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอทั้งสามชนิดและค่า Ct เฉลี่ย

#### ปฏิกิริยา real-time PCR

ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยชุดปฏิกิริยา LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Germany) ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 μl ประกอบด้วย 2x SYBR Green I master 10 μl forward primer 0.25 μl reverse primer 0.25 μl ตามตารางที่ 1 (OIE 2008) nuclease free H<sub>2</sub>O 7.5 μl และ DNA template 2 μl ผสมและนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง real-time thermocycler (Rotor-Gene™ 6000

(Corbett Research, Australia) ตั้งโปรแกรมการทำปฏิกิริยา first denaturation ที่ 95°C 10 นาที และทำปฏิกิริยาที่ 95°C 20 วินาที 60°C 30 วินาที 72°C 30 วินาที เป็นจำนวน 45 รอบ

#### การเตรียม 1.5% อะกาโรสเจล

ซึ่งอะกาโรส (agarose) (SeaKem, USA) 1.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (1XTAE) ปริมาตร 100 มล. ทำให้อะกาโรสละลายโดยแช่พลาสติกบรรจุอะกาโรสในน้ำเดือด นำออกมาวางให้เย็นลงอุณหภูมิประมาณ 60°C เติมสีย้อมดีเอ็นเอ (GelStar (Lonza, USA)) ความเข้มข้น 2X ปริมาตร 10 µl ผสมให้เข้ากัน เทลงในถาดรองเจลที่วางบนพื้นราบ รอให้เจลแข็งตัวจึงนำไปใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอ ผลผลิต

#### การตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตโดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา real-time PCR ปริมาตร 2 µl ผสมกับ 6X DNA loading dye (Lonza, USA) ปริมาตร 1 µl นำไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ด้วยเครื่อง horizontal gel electrophoresis (Mupid-EXu (Advance, Japan)) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตภายใต้แสงอัลตรา

ไวโอเล็ตด้วยเครื่อง G-box (Syngene, UK) เปรียบเทียบกับ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder (Lonza, USA))

#### การทดสอบความจำเพาะ

การหาค่าความจำเพาะ (specificity) เพื่อแสดงถึงความสามารถของ primer ว่าความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการทดสอบเท่านั้น (Vaerman et al., 2004) หากความจำเพาะของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัยโคพลาสมาแต่ละชนิด โดยนำเชื้อมัยโคพลาสมาผสมใน allantoic fluid โดยใช้ allantoic fluid 900 µl และเชื้อมัยโคพลาสมา 100 µl ในหลอดที่ 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 หลอดไปสกัดจีโนมดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้น และทำการเจือจางจีโนมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 5 ng/µl แล้วนำไปตรวจหาเชื้อด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัยโคพลาสมาแต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 30 รอบ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความจำเพาะของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัยโคพลาสมาแต่ละชนิด

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

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

ที่มา: OIE, 2008

หาความจำเพาะของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัคโคพลาสมาแบคทีเรียชนิดต่างๆโดยนำเชื้อแบคทีเรียผสมใน allantoic fluid ใช้ allantoic fluid 900  $\mu$ l เชื้อแบคทีเรีย 100  $\mu$ l 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 หลอดไปสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้น และทำการเจือจางจีโนมิคดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 5 ng/ $\mu$ l แล้วนำไปตรวจหาเชื้อด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัคโคพลาสมาแต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 5 รอบ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา ความจำเพาะของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัคโคพลาสมาแบคทีเรียชนิดต่างๆ

#### การทดสอบความถูกต้อง

การทดสอบหาความถูกต้อง (accuracy) เพื่อแสดงความสามารถของ primer ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ถูกต้องต่อดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการทดสอบ (Vaerman et al., 2004) หาค่าความถูกต้องโดยนำเชื้อมัคโคพลาสมาผสมใน allantoic fluid ใช้ allantoic fluid 900  $\mu$ l เชื้อมัคโคพลาสมา 100  $\mu$ l 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 หลอดไปสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้น และทำการเจือจางจีโนมิคดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 5 ng/ $\mu$ l แล้วนำไปตรวจหาเชื้อด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัคโคพลาสมาแต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 30 รอบ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความถูกต้องของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัคโคพลาสมาแต่ละชนิด

#### การทดสอบหาความเที่ยง

การหาความเที่ยง (precision) เพื่อแสดงความแม่นยำที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาซ้ำๆในสถานะเดียวกัน โดยวิธีเดียวกัน (Vaerman et al., 2004) หาค่าความเที่ยงโดยนำจีโนมิคดีเอ็นเอมาตรฐาน 3 ชนิด (*M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*) ความเข้มข้น 0.1 ng/ $\mu$ l ไปเจือจางให้มีความเข้มข้น  $1-10^{-8}$  ด้วยเทคนิค 10-fold dilution นำไปทดสอบด้วยปฏิกิริยา real-time PCR เมื่อปฏิกิริยาคำเนินไปจนครบ 45 รอบ จะได้ค่า Ct ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 3 ครั้ง นำค่า Ct แต่ละความเข้มข้นมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variance; %CoV)

ค่า %CoV คำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

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

#### การทดสอบหาเชื้อมัคโคพลาสมาใน allantoic fluid

เพื่อตรวจหาเชื้อมัคโคพลาสมาในตัวอย่าง allantoic fluid นำเชื้อมัคโคพลาสมาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงผสมใน allantoic fluid NDL 15/57 ในสัดส่วน allantoic fluid 1,800  $\mu$ l ผสมกับเชื้อมัคโคพลาสมา 200  $\mu$ l ในหลอดที่ 1 ผสมเชื้อ *M. gallisepticum* หลอดที่ 2 ผสมเชื้อ *M. synoviae* หลอดที่ 3 ผสมเชื้อ *M. hyorhinis* เป็นชุดควบคุม หลอดที่ 4-20 เป็นตัวอย่างในการทดสอบใช้ allantoic fluid หลอดละ 2,000  $\mu$ l แบ่งเชื้อทั้ง 20 หลอดออกเป็น 2 ส่วนๆละ 1,000  $\mu$ l ส่วนที่ 1 นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อมัคโคพลาสมาในอาหารเหลว ส่วนที่ 2 นำไปสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดหาปริมาณดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมัคโคพลาสมาแต่ละชนิดตามตารางที่ 1

## ผลการทดลอง

### การสร้าง standard curve และ limit of detection (LOD)

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 ng/ul ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* จากบริษัท Minerva Biolabs GmbH ไปทำปฏิกิริยาเพื่อสร้าง 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 และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* เป็น  $10^{-3}$   $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  หรือเทียบเท่า 100 10 และ 100 fg/ul ตามลำดับ อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอผลผลิต (melting temperature) ที่สังเคราะห์ได้ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* ประมาณ 84.2°C 84.5°C และ 86.8°C ตามลำดับดังแสดงผลในรูปที่ 1 และตารางที่ 2

### การตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตโดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

เมื่อนำดีเอ็นเอผลผลิตไปตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 base pair DNA ladder) พบว่าแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส (bp) และ *M. hyorhinis* มีขนาดประมาณ 300 bp ดังแสดงผลในรูปที่ 2

### การทดสอบความจำเพาะ

เมื่อทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ primer MG MS และ MHR ที่มีต่อเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* พบว่า primer ทั้ง 3 ชนิดมีความจำเพาะเท่ากับ 100% สามารถทำปฏิกิริยาได้จำเพาะต่อเชื้อมัคโคพลาสมา และไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดอื่นได้ดังแสดงผลในตารางที่ 3

### การทดสอบความถูกต้อง

เมื่อทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของ primer MG MS และ MHR ที่มีต่อเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* พบว่า primer ทั้ง 3 ชนิดมีความถูกต้องเท่ากับ 100% สามารถทำปฏิกิริยาได้ถูกต้องต่อเชื้อมัคโคพลาสมา แต่ละชนิด แม้จะมีมัคโคพลาสมาชนิดอื่นปนเปื้อนร่วมอยู่ด้วย ดังแสดงผลในตารางที่ 4

### การทดสอบหาความเที่ยง

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตรฐาน 3 ชนิด (*M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ( $1-10^{-8}$ ) ไปทดสอบหาความเที่ยง (precision) โดยทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 3 ครั้ง นำค่า Ct ทั้ง 3 ครั้งของแต่ละความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอมาคำนวณหาความเที่ยง หรือ %CoV พบว่าการทดลองมีความแปรปรวนน้อย มีความเที่ยงสูงดังแสดงผลในตารางที่ 5

### การทดสอบหาเชื้อมัคโคพลาสมาใน allantoic fluid

เมื่อนำตัวอย่าง allantoic fluid จำนวน 17 ตัวอย่าง มาทดสอบการปนเปื้อนเชื้อมัคโคพลาสมาด้วยปฏิกิริยา real-time PCR และการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีเชื้อ *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

## วิจารณ์

การใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* (OIE 2008) มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นยีนสำหรับการตรวจหาเชื้อทั้ง 3 ชนิด ในการทำปฏิกิริยา PCR ทุกชนิดจำเป็นต้องตรวจยีนยีนดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ได้ การตรวจสอบดีเอ็นเอ

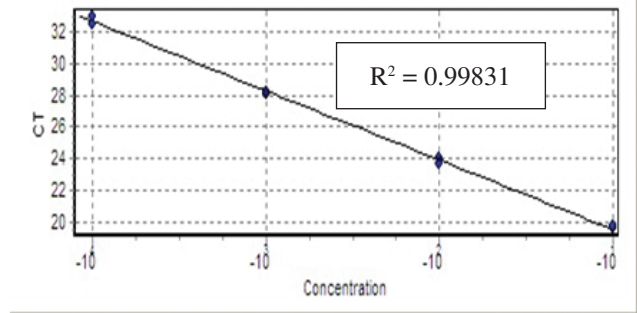
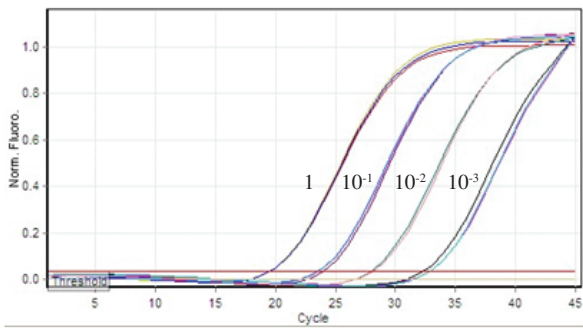
ผลผลิตจากปฏิกิริยา real-time PCR ในการทดลองใช้ SYBR green เป็นสารเรืองแสง (fluorophore) ในการตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลผลิต สี SYBR green เมื่ออยู่ในสารละลายจะมีการเรืองแสงในปริมาณต่างๆ แต่ถ้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) และจะคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ที่เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถติดตามการเกิดดีเอ็นเอผลผลิตได้ทุกรอบของปฏิกิริยา (อโณทัย 2549) และจากคุณสมบัติของสี SYBR green ทำให้สามารถทำ melting curve analysis โดยวิเคราะห์จากค่า melting temperature ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกตัวออกจากกัน โดยมีสภาพเป็นเกลียวคู่ครึ่งหนึ่งและสายเดี่ยวครึ่งหนึ่ง (สุรินทร์ 2543) การแยกตัวของดีเอ็นเอสายคู่จะทำให้ปริมาณของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างฉับพลัน ทำให้ทราบค่า melting temperature ของดีเอ็นเอสายคู่ต่างๆ ได้ โดยดีเอ็นเอสายคู่แต่ละเส้นจะมีค่า melting temperature ที่แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับขนาด และลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ จากผลการทดลองตามตารางที่ 2 ค่า melting temperature ของดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* มีค่าใกล้เคียงกันจึงนำดีเอ็นเอผลผลิตไปตรวจสอบยืนยันอีกครั้งด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* มีขนาดแตกต่างกัน แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. gallisepticum* มีขนาดเล็กกว่า 200 bp และที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *M. synoviae* มีขนาดใหญ่กว่า 200 bp (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับขนาดดีเอ็นเอผลผลิตตามตารางที่ 2 แสดงว่าดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ได้เป็นดีเอ็นเอผลผลิตจากตำแหน่งบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* นอกจากนี้ในปฏิกิริยา real-time PCR ควรพิจารณาค่า  $R^2$  เป็นค่าความเป็นเส้นตรงของ standard curve แสดงประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาว่าเกิดขึ้นดีหรือไม่ จะมีค่าระหว่าง 0-1 (0 หมายถึงไม่เกิดปฏิกิริยา 1 หมายถึงปฏิกิริยาเกิดขึ้นดี) และ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของจีโนมดีเอ็นเอที่สามารถตรวจพบได้ในปฏิกิริยา (Vaerman et al., 2004) จากผลการทดลองพบว่าค่า  $R^2$  ของจีโนมดีเอ็นเอมาตรฐานของเชื้อมัคโคพลาสมาทั้ง 3 ชนิดมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นดี ชุดข้อมูลมีความน่าเชื่อถือ การทดลองใช้จีโนมดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 0.1 ng/ $\mu$ l หรือคิดเป็นประมาณ 100,000 เซลล์ (Zhao and Yamato 1993) จากผลการทดลองพบสามารถตรวจพบจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. hyorhinis* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 100 fg/ $\mu$ l ส่วน *M. synoviae* สามารถตรวจพบได้แม้จะมีจีโนมดีเอ็นเอเพียง 10 fg/ $\mu$ l

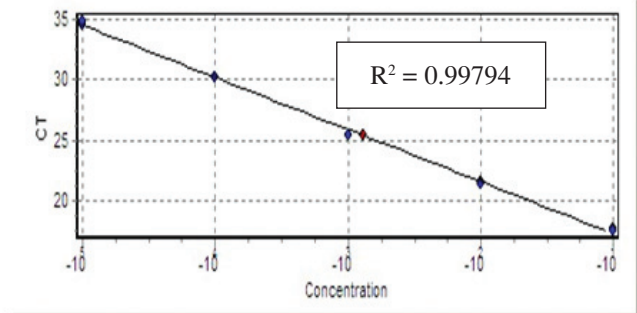
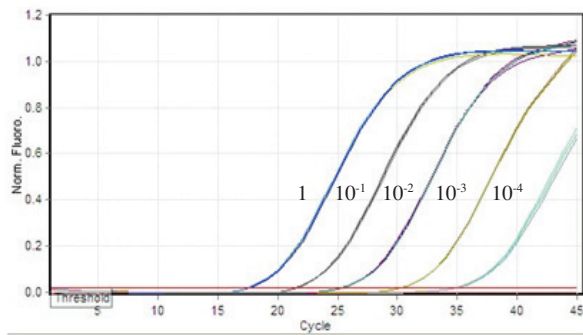
การหาความจำเพาะ ความถูกต้อง และความเที่ยง จากผลการทดลองตามตารางที่ 3 และ 4 จากการทำซ้ำหลายๆ ครั้ง พบว่า primer สามารถทำปฏิกิริยาได้แบบจำเพาะ และถูกต้อง 100% ต่อเชื้อมัคโคพลาสมาแต่ละชนิด แม้จะมีเชื้อมัคโคพลาสมา และแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่ แสดงว่า primer ที่ใช้ในการทดลองสามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* แม้จะมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* subsp. *enteridis* และ *S. enterica* subsp. *typhimurium* หรือเชื้อมัคโคพลาสมาชนิด *M. hyorhinis* ร่วมอยู่ด้วย การทดสอบความเที่ยงของปฏิกิริยาพิจารณาจากค่า %CoV เป็นค่าแสดงความแปรปรวนของชุดข้อมูลซึ่งแปรผกผันกับค่าความเที่ยง จากผลการทดลองตามตารางที่ 5 ค่า % CoV ของแต่ละความเข้มข้นมีค่าน้อยแสดงว่าการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งมีความแปรปรวนน้อย มีความเที่ยงสูง

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

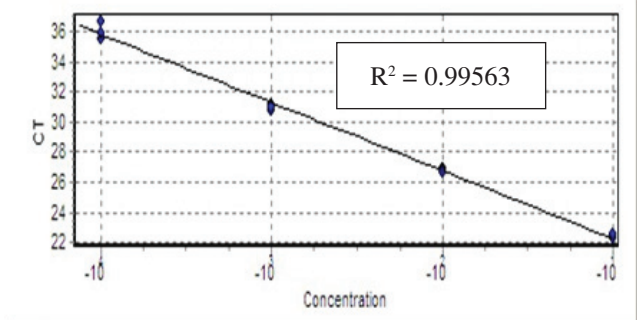
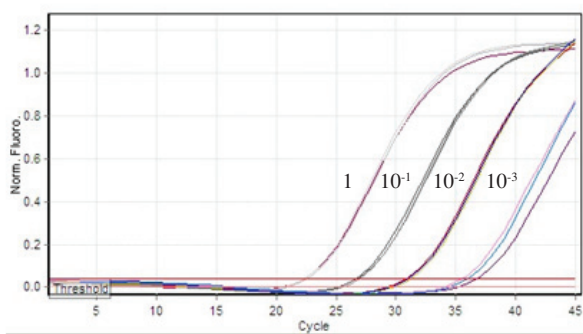
(a) *M. gallisepticum*



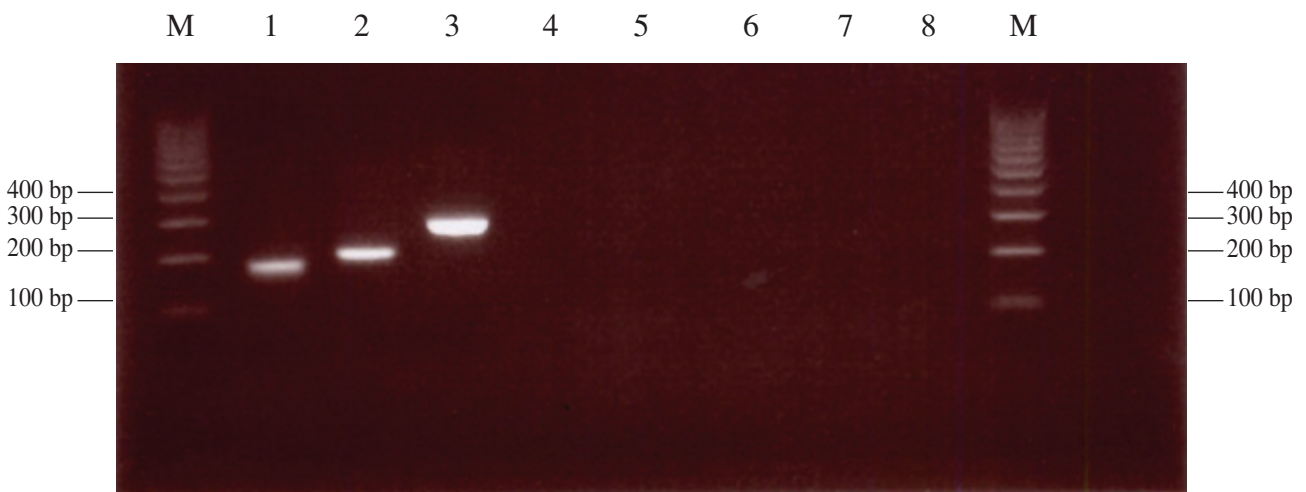
(b) *M. synoviae*



(c) *M. hyorhinis*



รูปที่ 1 กราฟการเพิ่มปริมาณ DNA และกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ผลผลิต และค่า Ct เฉลี่ย (a) *M. gallisepticum* (b) *M. synoviae* และ (c) *M. hyorhinis*



**รูปที่ 2** การตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 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) และแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (lane M)

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

Primer	amplicon size (bp)	$R^2$	LOD (fg/ $\mu$ l)	melting temperature ( $^{\circ}$ 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: พัชรีย์ ทองคำคุณ, สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer ต่อเชื้อมััย โคลพลาสมา และเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)

Pathogens	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</i> subsp. <i>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</i> subsp. <i>enteridis</i>	(0/30)	(0/30)	(0/30)
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhimurium</i>	(0/30)	(0/30)	(0/30)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความถูกต้องของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมััย โคลพลาสมา (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)

Mycoplasma	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 ค่าความเที่ยง (% CoV) ที่ความเข้มข้นต่างๆของ *M. gallisepticum*, *M. synoviae* และ *M. hyorhinis*

Mycoplasma	ความเข้มข้น				
	undilute	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
<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	-

### สรุป

การตรวจหาเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ real-time PCR ใน allantoic fluid จากไข่ไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ใช้ในการผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนลาโซดำ พบว่าวิธีตรวจมีความเที่ยงสูง มีความจำเพาะ และความถูกต้อง 100% สามารถตรวจจิจโนมิกดีเอ็นเอของ *M. gallisepticum* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 100 fg/μl ส่วน *M. synoviae* สามารถตรวจพบได้แม้จะมีจิจโนมิกดีเอ็นเอเพียง 10 fg/μl เหมาะสมต่อการนำไปใช้เพื่อเฝ้าระวัง และตรวจยืนยันการปนเปื้อนเชื้อ *M. gallisepticum* และ *M. synoviae* ใน allantoic fluid

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.พัชรี ทองคำคุณ สพ.ญ.สาริศา เวียงชนก คุณพัฒน์ สุนามะ จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ นสพ.สุรพัฒน์ เลาหวนิช จากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ เชื้ออ้างอิง อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ และ allantoic fluid ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณคณะกรรมการพัฒนาวิชาการ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ

### เอกสารอ้างอิง

- กนกวรรณ จารุกัจจร, สุกัญญา ภัทรจินดา, ณัฐยา เทียงธรรม. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบดั้งเดิม และแบบเวลาจริง (Conventional and real-time polymerase chain reaction). Thai Pharm Health Sci. 2549; J 1(3): 254-62.
- วีระพงศ์ ลูติตานนท์. พื้นฐาน real-time PCR. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2551; [2 พฤศจิกายน 2555]. แหล่งที่มา [http://microbio.md.kku.ac.th/site\\_data/mykku\\_microbio/17/Real\\_Time\\_PCR.pdf](http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Real_Time_PCR.pdf).
- สุกานดา บุญฟู, สุกัญญา อธิโรจน์, ทรงศักดิ์ รักษาสุข, วิไลรัตน์ ลีวงศ์สถาพร, บุญพร้อม อิงคเวชชากุล. การแยกเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* โดย real-time polymerase chain reaction. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์. 2550; 33: 157-8.
- สุกัลยาณี เทพภูธร, สุภาพร ภูมิอมร. การประเมินความถูกต้องของวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาในเซลล์เพาะเลี้ยง. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2551; 50(2): 87-102.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. โครงสร้างและหน้าที่ของดีเอ็นเอ ในสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล บรรณาธิการ พันธวิศวรรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 2543; หน้า 10-2.

- อโนทัย โกคากิกรณ์. Introduction to real-time PCR and its applications. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2549; [3 เมษายน 2555]. แหล่งที่มา <http://gotoknow.org/blog/moleculartechnology/129105>.
- Algire MA, Lartigue C, Thomas DW, Garcia NA, Glass JI, Merryman C. New selectable marker for manipulating the simple genomes of mycoplasma species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(10): 4429-32.
- Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, Perlis, and Pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2761-4.
- Jill E, Clarridge III. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 840-62.
- Garcia M, Jackwood MW, Head M, Levisohn S, Kleven SH. Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplification products. *J Vet Diagn Invest.* 1996; 8: 56-63.
- Kleven SH. Mycoplasmosis. In: Saif YM. editor. *Diseases of poultry.* 12<sup>th</sup> ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2008. p.805-7.
- Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, Santen VL. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian diseases.* 1993; 37(3): 829-34.
- Liu CM, Aziz M, Kachur S, Hsueh PR, Huang YT, Keim P, et al. BactQuant: an enhanced broad-coverage bacterial quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiology.* 2012; 12: 56.
- Lonza. MycoAlert™ mycoplasma detection kit. Bioresearch catalog. 2011; 2011-2.
- Mangala A, Nadkarni F, Martin E, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology.* 2002; 148: 257-66.
- Office International des Epizooties. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*) [Internet]. OIE terrestrial manual. 2008 [cited 2012 May 16]. Available from: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.05\\_2.03.05%20AVIAN\\_MYCO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_2.03.05%20AVIAN_MYCO.pdf).
- Raviv Z, Kleven SH. The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian diseases.* 2009; 53: 103-7.
- Stipkovits L, Kempf I. Mycoplasmoses in poultry. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1996; 15 (4): 1495-525.
- Vaerman JL, Sauaiaoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2004; 18: 212-4.
- Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Bacterial: the low G+C gram positives. In: McGraw-Hill editors. *Prescott's microbiology.* 8<sup>th</sup> ed. Singapore. 2011. p.551-5.
- Zhao S, Yamamoto R. Detection of *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. *Avian Pathology.* 1993; 22: 533-42.