

การพัฒนาชุดตรวจอินโดเร็คอีไลซ่าสำหรับตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ  
เชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกร

DEVELOPMENT OF INDIRECT ELISA TEST KIT FOR DETECTION OF  
ANTIBODY AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 IN SWINE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2565

KMITL-2022-AG-M-031-357

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DEVELOPMENT OF INDIRECT ELISA TEST KIT FOR DETECTION OF  
ANTIBODY AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 IN SWINE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE  
SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2022

KMITL-2022-AG-M-031-357

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2022

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดตรวจอินโดเร็คอีไลซ่าสำหรับตรวจหา
นักศึกษา	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกร
รหัสประจำตัว	นางสาวสวรรรยา อัมพนพิศลย์
ปริญญา	62604027
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
พ.ศ.	สัตวศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.น.สพ. ชนาธิป ธรรมการ รศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์

### บทคัดย่อ

เชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกร (Porcine circovirus type 2; PCV2) จัดเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากเป็นสาเหตุหลักของหลากหลายกลุ่มอาการที่เรียกโดยรวมว่า Porcine circovirus type 2 associated disease (PCVAD) ซึ่งกลุ่มอาการลูกสุกรทรุดโทรมหลังหย่านม (Postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) ถือเป็นกลุ่มอาการที่ส่งผลกระทบต่อระบบการเลี้ยงสุกรมากที่สุด การศึกษาครั้งนี้จึงได้การพัฒนาชุดตรวจอินโดเร็คอีไลซ่า (I-ELISA) ขึ้นเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 อันจะเป็นประโยชน์ในการช่วยประเมินสถานการณ์ของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีราคาถูก โดยใช้แอนติเจนที่ได้จากการสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกรชนิดซบยูนิตด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันโดยใช้อุปกรณ์ Microsep 3K เพื่อใช้สำหรับเคลือบลงบนโพลีไทเฟส แล้วจึงหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของการทดสอบด้วยวิธี Checkerboard titration ผลที่ได้พบว่าการใช้แอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ร่วมกับการเจือจางซีรัมที่ 1:200 และคอนจูเกตที่ระดับการเจือจาง 1:60,000 มีความเหมาะสมมากที่สุดเมื่อตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 450 nm โดยมีค่า Cut-off ที่เหมาะสมอยู่ที่ 0.36 ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่า Sensitivity เท่ากับ 81.67% และมีค่า Specificity เท่ากับ 90% เมื่อทำการตรวจตัวอย่างทั้งสิ้น 120 ตัวอย่างเทียบกับชุดตรวจที่ผลิตเป็นการค้า (SK105; BioChek; UK) ค่ามัธยฐานของค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนจากการทดสอบตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวก 6 ตัวอย่างและซีรัมควบคุมผลลบ 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Intra-assay อยู่ที่ 3.296% และ 4.385% ส่วนวิธี Inter-assay อยู่ที่ 4.678% และ 5.718% สำหรับค่าความสอดคล้อง (Agreement) หรือค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) เมื่อเปรียบเทียบกับผลจากชุดตรวจทางการค้าอยู่ที่ 79% เมื่อทดสอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างซีรัมทั้งหมดจำนวน 800 ตัวอย่าง ดังนั้นจากผลการวิจัยจึงพบว่าชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเซอริโคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis</b>	Development of Indirect ELISA Test Kit for Detection of Antibody Against Porcine Circovirus Type 2 in Swine
<b>Student</b>	Miss Sawanya Umphonphison
<b>Student ID.</b>	62604027
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Animal Science
<b>Year</b>	2022
<b>Thesis Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Chanathip Thammakarn
<b>Thesis Co-advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Kanokrat Srikitkasemwat

## ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is one of the most important causes of infectious diseases in swine leading to considerable economic losses in the swine industry worldwide, including in Thailand. PCV2 is the causative agent of several different diseases summarized as porcine circovirus type 2 associated disease (PCVAD), which postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is the most impact on the swine production system. In this study, indirect ELISA (I-ELISA) was developed as a tool for detecting the level of immunity against PCV2, which will be useful in assessing the disease situation efficiently with low price. The open reading frame 2 (ORF2) protein was extracted from subunit vaccine against PCV2 infection by ultrafiltration method using Microsep 3K, then used as an antigen for coating on solid phase. Finally, the reaction was optimized by checkerboard titration. As a result, the optimal condition was obtained when ORF2 protein antigen concentration was 0.5 µg/ml, with serum dilution at 1:200, and conjugate dilution at 1:60,000 while 450 nm of wavelength was measured. The cut-off value for developed I-ELISA was found at 0.36, while 81.67% and 90% of sensitivity and specificity, respectively were illustrated when measured with 120 serum samples, comparable with commercial ELISA kit (SK105; BioChek; UK). The median value of %CV for Intra-assay were 3.296 and 4.385 and for Inter-assay were 4.678 and 5.718, when 6 positive and 6 negative control serum were examined, respectively. The observed correlation was 79% when 800

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตัดยี่อย่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

serum samples were tested, comparable with commercial ELISA kit. The obtained results indicated that the developed I-ELISA kit can be used efficiently for measurement the antibodies against porcine circovirus type 2 in swine.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตั้ง IV อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.น.สพ. ชนาธิป ธรรมการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรศ.ดร. กนกกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความรู้ คำชี้แนะ คำสอน และให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนให้โอกาส ให้ความรู้ และให้ประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ไพฑูล แก้วหอม รศ.ดร. รณชัย สิทธิไกรพงษ์ และ ผศ.ดร.น.สพ.จำลอง มิตรชาวไทย ประธานและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่า ที่ให้ความรู้เพิ่มเติม ให้คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนข้อชี้แนะอันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทั้งในเรื่องของความต้องการและความสมบูรณ์ของเนื้อหาทางวิชาการอย่างครบถ้วน

ขอขอบพระคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับการสนับสนุนให้ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาแก่ข้าพเจ้า ทำให้ได้รับโอกาสในการศึกษาต่อในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณความกรุณาจากบริษัท ยูเนี่ยน อกริฟาร์ จำกัด ที่มอบทุนในการสนับสนุนงานวิจัย ทั้งในส่วนของสารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณคุณณชนก ไวยสุตรา พี่นักศึกษาปริญญาโทที่ช่วยสอนวิธีการทำแลป การใช้ห้องแลป และอุปกรณ์ต่าง ๆ อีกทั้งยังให้การช่วยเหลือและให้คำแนะนำ ตลอดจนการแลกเปลี่ยนความรู้ และขอขอบคุณเพื่อนและน้องนักศึกษาปริญญาโท น้องนักศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาสัตวศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้การช่วยเหลือในการทำวิจัย ช่วยให้คำปรึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีให้เสมอมา

ขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ตลอดจนครูบาอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้าจึงขอมอบคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้แก่ทุกท่านซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง อีกทั้งคุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ทุกท่านที่สามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป

สรวรยา อำนพพิศลย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตัดย้ออ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์.....	3
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	3
1.4 ขั้นตอนการศึกษา.....	3
1.5 ระยะเวลาการศึกษา.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โรคเซอรัโคไวรัสในสุกร (Porcine circovirus disease; PCVD).....	4
2.1.1 Porcine circovirus type 1 (PCV1).....	5
2.1.2 Porcine circovirus type 2 (PCV2).....	6
2.1.3 Porcine circovirus type 3 (PCV3).....	8
2.2 โรคและกลุ่มอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ PCV2.....	9
2.3 วิทยาภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของโรค PCV2.....	11
2.4 การติดต่อของเชื้อ PCV2.....	14
2.5 การควบคุมและป้องกันโรค.....	15
2.6 การยืนยันผลการตรวจวินิจฉัย.....	17
2.7 วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA.....	18
2.7.1 หลักการของ Enzyme immunoassay.....	18
2.7.2 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อวิธีอิลไลซ่า.....	23
2.7.3 ชุดตรวจอิลไลซ่าทางการค้าสำหรับตรวจโรคติดเชื้อ PCV2.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตี VI อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	30
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....	30
3.2.1 วัคซีนที่ใช้ในการสกัดแยกโปรตีน ORF2.....	30
3.2.2 การสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีน.....	31
3.2.3 การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford.....	31
3.2.4 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Native PAGE.....	32
3.2.5 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	32
3.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot.....	33
3.2.7 การตรวจอีไลซ่าด้วยชุดตรวจทางการค้า (SK105; BioChek; UK).....	33
3.2.8 การพัฒนาชุดตรวจอินไตรีคอีไลซ่า (I-ELISA).....	34
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	35
3.3.1 การเตรียมแอนติเจน.....	35
3.3.2 การทดสอบความบริสุทธิ์และการหามวลโมเลกุลของโปรตีนแอนติเจน.....	37
3.3.3 การเตรียมชุดตรวจอินไตรีคอีไลซ่า.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	47
4.1 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนรวมในวัคซีน.....	47
4.2 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Native PAGE.....	49
4.3 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	51
4.4 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot.....	53
4.5 การเตรียมชุดตรวจอินไตรีคอีไลซ่า.....	56
4.5.1 การทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยวิธี Checkerboard titration.....	56
4.5.2 การประเมินค่า Cut-off ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น.....	59
4.5.3 การประเมินค่าความไวและความจำเพาะของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น.....	60
4.5.4 การประเมินความคลาดเคลื่อนโดยวิธีการทดสอบซ้ำ (Repeatability test).....	62
4.5.5 การเปรียบเทียบชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK).....	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตี VII อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	69
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	69
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	70
บรรณานุกรม.....	71
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก.....	85
ภาคผนวก ข.....	87
ประวัติผู้วิจัย.....	94



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ VIII อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 การเตรียมสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐาน.....	36
3.2 ส่วนประกอบและปริมาณในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการรัน Native PAGE.....	37
3.3 ส่วนประกอบและปริมาณในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการรัน SDS-PAGE.....	38
4.1 แสดงปริมาณโปรตีนรวมในวัคซีนก่อนและหลังการสกัดแยกด้วย Microsep 3K.....	48
4.2 แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับความเข้มข้นของแอนติเจนเปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวก.....	57
4.3 แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับความเข้มข้นของแอนติเจนเปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลลบ.....	57
4.4 แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกเปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของคอนจูเกต.....	58
4.5 แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลลบเปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของคอนจูเกต.....	58
4.6 แสดงค่า P/N ของระดับความเข้มข้นของแอนติเจนและระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบ.....	59
4.7 แสดงค่า Sensitivity และ Specificity ของชุดตรวจ I-ELISA.....	61
4.8 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Intra-assay ของซีรัมควบคุมผลบวก.....	63
4.9 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Intra-assay ของซีรัมควบคุมผลลบ.....	63
4.10 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Inter-assay ของซีรัมควบคุมผลบวก.....	64
4.11 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Inter-assay ของซีรัมควบคุมผลลบ.....	64
4.12 สรุปผลการทดสอบความคลาดเคลื่อนของชุดตรวจ I-ELISA.....	64
4.13 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 จากชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK).....	66
4.14 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ และค่าสหสัมพันธ์ของชุดตรวจ I-ELISA และชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK).....	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตัด IX อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างอนุภาคของเชื้อ PCV1.....	6
2.2 รูปร่างลักษณะของเชื้อ PCV2.....	8
2.3 ตุ่มหรือปื้นแดงที่เกิดจากกลุ่มอาการ PDNS.....	10
2.4 สุกอร์ที่มีลักษณะพอมทรุดโทรมจากกลุ่มอาการ PMWS.....	11
2.5 เชื้อ PCV2 ที่แฝงตัวอยู่ในเซลล์แมคโครฟาจ.....	14
2.6 หลักการของ Competitive ELISA.....	20
2.7 หลักการของ Direct ELISA.....	21
2.8 หลักการของ Indirect ELISA.....	22
2.9 ความแตกต่างของวิธี ELISA แต่ละชนิด.....	22
4.1 กราฟมาตรฐานจากค่า OD ของสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น.....	47
4.2 แสดงแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนจากวัคซีนที่แยกได้ด้วยวิธี Native PAGE.....	50
4.3 แสดงแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนจากวัคซีนที่แยกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	52
4.4 ผลการทำ Dot blot โดยการใส่โปรตีนที่ถูกสกัดแยกออกจากด้วย Microsep 3K.....	54
4.5 กราฟแสดงการวิเคราะห์สมการถดถอย (Regression) ของค่า S/P ratio ระหว่าง ชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK).....	67
4.6 กราฟแสดงการวิเคราะห์สมการถดถอย (Regression) ของค่า Titer ระหว่าง ชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK).....	68
<b>ภาพผนวกที่</b>	
ข 1 Microsep 3K สำหรับใช้ในการกรองแยกเกล็ดและสีออกจากวัคซีนเพื่อเตรียม แอนติเจนบริสุทธิ์.....	88
ข 2 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนของแอนติเจนด้วยวิธี Bradford .....	88
ข 3 การหามวลโมเลกุลของแอนติเจนด้วยวิธี Native PAGE.....	89
ข 4 การหามวลโมเลกุลของแอนติเจนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	90
ข 5 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot.....	91
ข 6 การตรวจตัวอย่างซีรัมสุกรด้วยชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK).....	92
ข 7 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันของแอนติเจน ซีรัม และคอนจูเกต.....	92
ข 8 การตรวจตัวอย่างซีรัมสุกรด้วยชุดตรวจอินโดเร็คโอไลซ่าที่พัฒนาขึ้น (I-ELISA).....	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตัด X อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการผลิตสุกรจัดเป็นอุตสาหกรรมทางด้านปศุสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ และมีความสำคัญของโลก เนื่องจากแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นของความต้องการบริโภคเนื้อสุกรในประเทศต่าง ๆ โดยในปี 2564 การบริโภคเนื้อสุกรของโลกมีปริมาณรวม 105.25 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2563 ซึ่งมีปริมาณ 95.06 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 10.71 สำหรับในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศผู้บริโภคสุกรรายใหญ่ มีปริมาณการบริโภคเนื้อสุกรเพิ่มขึ้น โดยในปี 2564 จีนบริโภคเนื้อสุกร 50.40 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจาก 41.52 ล้านตัน ของปี 2563 ร้อยละ 21.38 และประเทศอื่นๆ ที่มีการบริโภคเพิ่มขึ้น ได้แก่ ฟิลิปปินส์ เม็กซิโก เวียดนาม และสหภาพยุโรป มีการบริโภคเพิ่มขึ้นร้อยละ 17.02 ร้อยละ 8.19 ร้อยละ 7.33 และร้อยละ 3.10 ตามลำดับ (สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ, 2564) ดังนั้นการเลี้ยงสุกรเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดและคุ้มค่าในการลงทุนที่สุดจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสุกร ซึ่งประกอบไปด้วยปัจจัยต่าง ๆ ทั้งด้านพันธุสัตว์ อาหาร การจัดการ และที่มีความจำเป็นและสำคัญที่สุดคือในด้านสุขภาพของสัตว์ เพราะอย่างไรก็ตามเรื่องของโรคระบาดก็ยังคงเป็นปัญหาหลักที่ทำให้ความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงสุกร แม้ว่าการจัดการฟาร์มสุกรในปัจจุบันจะมีประสิทธิภาพและสามารถควบคุมโรคระบาดได้ดีขึ้นแต่ก็ยังคงมีปัจจัยเสี่ยงที่จะเกิดโรคระบาดในสุกรได้ และส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น

โรคเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 (Porcine circovirus type 2; PCV2) จัดเป็นโรคประจำฟาร์มสุกรที่พบอยู่เสมอโรคหนึ่ง เนื่องจากเป็นหนึ่งในสามอันดับแรกของโรคสุกรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ รองจาก โรคติดเชื้อ Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) และ *Mycoplasma pneumoniae* (Gillespie *et al.* 2009) ซึ่งมีการพบครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ.2534 ในฝูงสุกรที่เลี้ยงแบบปลอดโรคในประเทศแคนาดา (Harding and Clark, 1997) และพบเรื่อยมาทั่วโลกจนถึงในปัจจุบัน โดยโรคนี้อาจทำให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ ในสุกร ได้แก่ เป็นสาเหตุหลักของกลุ่มอาการ ลูกสุกรทรุดโทรมหลังหย่านม (Postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) ปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจในสุกรหลังหย่านมและสุกรขุน ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกร (Reproductive disorders) กลุ่มอาการผิวหนังอักเสบและไตเสื่อม (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome; PDNS) รวมทั้งอาการสั่น (Congenital tremors) ในลูกสุกรอีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถติดเชื้อร่วมกับเชื้อจากโรคอื่น ๆ เช่น PRRSV, Porcine parvovirus (PPV) และ Pseudorabies disease ซึ่งจะเพิ่มความรุนแรงของโรค และทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนได้ง่าย เกิดเป็นโรคระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อนในสุกร (Porcine respiratory disease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

complex; PRDC) ในลูกสุกรอนุบาลจนถึงสุกรขุน ทำให้เพิ่มอัตราการตายของลูกสุกรหลังหย่านม และยังมีผลในการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของสุกรอีกด้วย โดยในประเทศไทยเองก็มีการพบโรคเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 มาตั้งแต่ปี พ.ศ.2536 ซึ่งก็ได้สร้างความเสียหายและมีการแพร่กระจายของโรคเพิ่มมากขึ้นจนถึงในปัจจุบัน (รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช และคณะ. 2548) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอาการจากโรคนี้อาจก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย แม้ว่าบางอาการหรือการระบาดอาจจะดูไม่มีความรุนแรงมากแต่ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลงไม่ได้ปริมาณสูงสุดตามที่ต้องการ อีกทั้งยังไปเพิ่มต้นทุนในด้านการรักษาอีกด้วย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการวินิจฉัยอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อคัดแยกสุกรที่ป่วยออกจากฝูง

การศึกษาทางด้านไวรัสวิทยา ซีรัมวิทยาของโรคเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 รวมไปถึงการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยจึงนับเป็นสิ่งที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อนำมาใช้ในการประเมินสถานการณ์ ซึ่งมีความสำคัญที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันและการควบคุมโรคในระดับฝูงได้ โดยเทคนิคที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในปัจจุบัน ได้แก่ วิธีอินซิติวไฮบริไดเซชัน (*In situ* hybridization; ISH) การย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry; IHC) การตรวจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) และการทำ Indirect immunofluorescence (IFA) ซึ่งวิธีการเหล่านี้ให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ แต่พบว่าเป็นเทคนิคที่มีราคาสูง ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ และต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะที่มีราคาแพงอีกด้วย (กฤษฎาภรณ์ พริ้งเพระ และ สมพร เตชะงามสุวรรณ. 2550) แต่ยังมีวิธีการอีกวิธีที่น่าสนใจในทางซีรัมวิทยานั่นคือวิธีอีไลซ่า (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) ซึ่งเป็นวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยเป็นเทคนิคที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อย มีความจำเพาะและแม่นยำสูง และค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้งต่ำกว่าวิธีอื่นดังที่ได้กล่าวไป เนื่องจากไม่ใช่เครื่องมือที่ซับซ้อน อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก ทำให้เป็นวิธีการตรวจที่สะดวกที่สุดวิธีหนึ่งก็ว่าได้ (Weilin and Smith. 2002) แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของราคาของชุดตรวจอีไลซ่าที่มีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องมีการสั่งซื้อนำเข้ามาจากต่างประเทศ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาชุดตรวจอีไลซ่าสำหรับการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกรขึ้น เพื่อให้สามารถช่วยลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก และสามารถนำมาใช้ทดแทนชุดตรวจทางการค้าซึ่งมีราคาสูงได้

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาชุดตรวจอินโดเรคอีไลซ่าสำหรับใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเซอริโคไวรัสชนิดที่ 2 ในซีรัมสุกร
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจหาระดับแอนติบอดีของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจทางการค้า

## 1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพระดับเซลล์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 1.4 ขั้นตอนการศึกษา

1. รวบรวมตัวอย่างซีรัมสุกรและนำมาตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ด้วยชุดตรวจทางการค้าเพื่อเก็บผลที่ได้ไว้ใช้เป็นค่าอ้างอิง (Reference method)
2. เตรียมสกัดแยกแอนติเจนให้บริสุทธิ์และนำมาทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันของแอนติเจน ซีรัม และคอนจูเกต และตรวจตัวอย่างซีรัมสุกรด้วยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นด้วยค่าที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแล้ว
3. ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น
4. เปรียบเทียบชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจทางการค้าในการตรวจสอบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2

## 1.5 ระยะเวลาการศึกษา

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ.2563 จนเสร็จสิ้นการทดลองที่เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 รวมใช้ระยะเวลาในการศึกษาทั้งสิ้น 2 ปี

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาชุดตรวจอินโดเรคอีไลซ่าสำหรับใช้ในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเซอริโคไวรัสชนิดที่ 2 ในซีรัมสุกรได้สำเร็จ
2. ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในด้านความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ที่ใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับชุดตรวจทางการค้า
3. ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีคุณภาพ สามารถนำมาใช้ทดแทนชุดตรวจทางการค้าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 โรคเซอร์โคไวรัสในสุกร (Porcine circovirus disease; PCVD)

เชื้อเซอร์โคไวรัส (Porcine circovirus; PCV) จัดเป็นเชื้อไวรัสที่อยู่ใน Family Circoviridae และอยู่ในจีนัส *Circovirus* เป็นดีเอ็นเอไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม และมีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นวงสายเดี่ยว (Nonenveloped single-stranded circular DNA) ตัว Virion โครงสร้างภายนอกมีลักษณะเป็นแบบ Icosahedral nonenveloped (Tischer *et al.* 1982) เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กที่สุดในบรรดาเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ โดยเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดเล็ก 17 นาโนเมตร (ประมาณ 15-24 นาโนเมตร) (กิตติกร บุญศรี และคณะ. 2555) มีการศึกษาองค์ประกอบทางโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อ PCV1 และ PCV2 พบว่า PCV2 มีขนาดของสารพันธุกรรมรวมทั้งสิ้นประมาณ 1,767 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 11 Open reading frame (ORF) ซึ่งพบว่า ORF1 และ ORF2 มีลำดับเบสคิดเป็นร้อยละ 90 ของโครงสร้างทางพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัส และมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสร้อยละ 80 และร้อยละ 75 ตามลำดับ

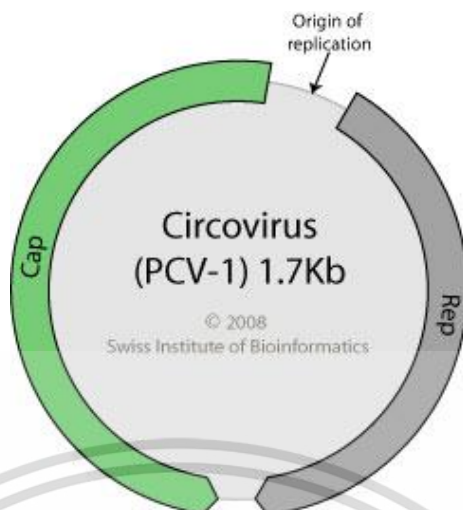
สำหรับไวรัส PCV2 ประกอบด้วย ORF หลักทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ORF1 มีขนาดประมาณ 945 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นส่วนของ Rep gene เป็นบริเวณที่สร้างโปรตีน Replicase ทำให้มีลักษณะเป็น Conserved region มีขนาด 35.7 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับกระบวนการเพิ่มจำนวน (Replication) ของไวรัส (Mankertz *et al.* 2004) ส่วน ORF2 มีขนาดประมาณ 702 นิวคลีโอไทด์ เป็นส่วนของ Cap gene ที่แสดงออกได้เป็น Capsid protein มีน้ำหนักประมาณ 30 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนโครงสร้างเพียงชนิดเดียวที่ห่อหุ้มไวรัสเอาไว้ และเป็นโปรตีนโครงสร้างที่มีเอกลักษณ์เฉพาะของไวรัส (Nawagitgul *et al.* 2000) ซึ่ง Capsid protein ที่ถอดรหัสโดย ORF2 นั้นมีเอพิโทป (Epitope) ที่มีความจำเพาะ (Liu *et al.* 2001; Mahe *et al.* 2000) และมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด Specific immune response เป็นอย่างมาก และเกี่ยวข้องกับ การกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีชนิดลบกลางฤทธิ์ (Neutralizing antibodies) (Pog ranichnyy *et al.* 2000) โดย ORF2 จะไปจับกับ Heparan sulfate จากเซลล์เป้าหมาย (Misinzo *et al.* 2006) ด้วยเหตุนี้ ORF2 จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาอย่างมากต่อซีรัมของสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 และทำหน้าที่เป็น เป้าหมายหลักสำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ติดเชื้อ (Lee *et al.* 2012) จึงทำให้มีวัคซีนป้องกันโรค PCV2 ทางการค้าหลายชนิดที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาดและทั้งหมดใช้แอนติเจนส่วน ที่เป็น ORF2 (Chae. 2012) และสำหรับ ORF3 ซึ่งซ่อนอยู่บน ORF1 มีขนาดประมาณ 315 นิวคลีโอไทด์ แสดงออกได้เป็นโปรตีนที่เชื่อว่ามีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบ Apoptosis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Liu *et al.* 2006) และเมื่อทำการเปรียบเทียบความแปรปรวนของลำดับเบสระหว่าง ORF1 และ ORF2 พบว่า ORF2 มีความแปรปรวนของลำดับเบส (93-100%) มากกว่า ORF1 (97-100%) ซึ่งอาจบ่งบอกได้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนของ Capsid protein กับกระบวนการก่อโรคของเชื้อ PCV2 โดยอาจมีการเปลี่ยนแปลงส่วน Viral capsid protein เพื่อให้สามารถอยู่ในเนื้อเยื่อได้ และเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างเชื้อไวรัสกับโฮสต์ (Virus-host interaction) (Larochelle *et al.* 2002) และในส่วนของ ORF2 ซึ่งเป็นบริเวณที่สร้าง Capsid protein มีความคล้ายคลึงกันน้อยกว่าในระหว่างไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ จึงใช้โปรตีน Capsid ดังกล่าวในการแยกความแตกต่างของ PCV1 และ PCV2 ออกจากกันได้ (Segalés *et al.* 2005) โดยไวรัสในกลุ่มนี้ปัจจุบันพบว่าประกอบไปด้วย 3 สายพันธุ์ ดังนี้

### 2.1.1 Porcine circovirus type 1 (PCV1)

พบครั้งแรกโดย Tischer *et al.* (1974) ซึ่งพบว่ามีโครงสร้างอนุภาคคล้าย Papovavirus และ Picornavirus ถูกแยกเชื้อได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากไตของสุกร (PK-15) (ATCC-CCL33) โดยเชื้อ PCV1 ไม่ทำให้ก่อโรคในสุกร (Avirulent หรือ Non-pathogenic strain) และสัมพันธ์กับเชื้อเซอร์โคไวรัสในพืช (Lukert *et al.* 1995) มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบวงสายเดี่ยว (Single-stranded circular DNA) ซึ่งเป็นที่มาของชื่อว่า Circovirus มีรายงานการติดเชื้อ PCV อย่างกว้างขวางในฝูงสุกรทั่วโลก เช่น ในปี ค.ศ.1986 สุกรมีการติดเชื้อประมาณ 77–95% ในเมืองเบอร์ลิน ประเทศเยอรมนี เป็นต้น แต่เชื้อ PCV ที่ได้จากเซลล์ PK-15 ไม่ได้ทำให้เกิดโรคในสุกร โดยไม่มีโรคหรือรอยโรคทางพยาธิวิทยาปรากฏในลูกสุกร (Tischer *et al.* 1982) ในสุกรที่ขาดน้ำนมเหลือง (Colostrum-deprived pigs) (Allan *et al.* 1995) ในสุกรทดลองที่มีเชื้อ PCV ในระบบทางเดินอาหาร (Krakowka *et al.* 2000) และในสุกรทดลองที่ปราศจากการติดเชื้ออื่นแต่มีการรับเชื้อจาก DNA โคลนนิ่งของ PCV ที่ได้จากเซลล์ PK-15 (Fenaux *et al.* 2002)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างอนุภาคของเชื้อ PCV1  
ที่มา : Swiss Institute of Bioinformatics (2008)

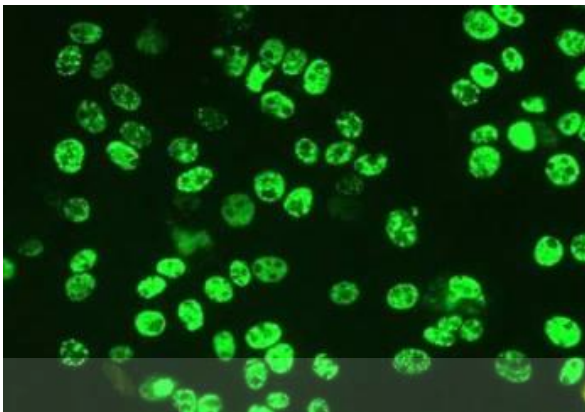
### 2.1.2 Porcine circovirus type 2 (PCV2)

มีการตรวจพบเชื้อนี้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1991 ในฟาร์มสุกรปลอดโรค (Specific pathogen free; SPF) ทางตะวันตกของประเทศแคนาดา (Harding and Clark. 1997) ต่อมาในปี ค.ศ.1998 มีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ PCV2 ในลูกสุกรที่มีอาการทรุดโทรมและผอมแห้ง และเรียกกลุ่มอาการนี้ว่ากลุ่มอาการสุกรทรุดโทรมหลังหย่านม (PMWS) (Ellis *et al.* 1998) ซึ่งรู้จักกันในนามว่า Porcine circovirus associated diseases (PCVAD) (Opriessnig *et al.* 2007) ทำให้ต่อมาเชื้อ PCV ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่ได้มาจากเซลล์ PK-15 จึงได้รับการจัดให้เป็นชนิด PCV1 และเชื้อในกลุ่มอาการ PCVAD ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในสุกรได้ถูกกำหนดให้จัดเป็นชนิด PCV2 (Meng. 2012) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า PCV2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงประมาณ 68% ที่เหมือนกันกับเชื้อ PCV1 (Ellis *et al.* 1998) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อเชื้อ PCV1 ไม่สามารถจับกับเชื้อ PCV2 ได้ (Allan *et al.* 1994) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันของแอนติเจนและพีโนไทป์ และ PCV2 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคในสุกรได้ (Virulent porcine pathogen) โดยหากจะแบ่งย่อยจีโนไทป์ของเชื้อ PCV2 เพิ่มเติมโดยขึ้นอยู่กับเอกลักษณ์ของลำดับในโปรตีน ORF2 ในปัจจุบันสามารถแบ่งได้ถึง 8 จีโนไทป์ (PCV2a-PCV2h) (Franzo and Segalés. 2018) ซึ่งความหลากหลายของโมเลกุลภายในของเชื้อ PCV2 มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างต่อเนื่อง โดยช่วงแรกที่พบว่าการติดเชื้อ PCV2 ได้รับการระบุว่าเป็น PCV2a และต่อมาได้รับการระบุว่าการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์หลักอีก 2 จีโนไทป์ ส่งผลให้เกิด Genotype shift ของไวรัสที่แพร่กระจายไปทั่วจาก PCV2a เป็น PCV2b และเปลี่ยนไปเป็น PCV2d ในภายหลังในหลายพื้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั่วโลก สำหรับ PCV2c, PCV2e-PCV2h มีการตรวจพบไม่บ่อยนัก และในส่วนของ PCV2g และ PCV2h ถูกระบุเมื่อไม่นานมานี้ว่ามีกลุ่มพันธุกรรมลูกผสมส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มของยีนจาก PCV2a, b และ d โดยจีโนไทป์ a, b และ d พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการทางคลินิกของเชื้อ PCV2 ซึ่งจีโนไทป์ใหม่ของไวรัสรวมถึง Recombinant ถูกจัดลำดับอย่างต่อเนื่องโดยมีการเปลี่ยนแปลงที่เน้นไปที่ลำดับพันธุกรรมของส่วน Capsid (ORF2) เป็นหลัก (Bandrick *et al.* 2022)

สำหรับวัคซีนต่อเชื้อ PCV2 นั้น ในส่วนของวัคซีนที่มีจีโนไทป์ PCV2a มีการใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจาก PCV2a เป็นสายพันธุ์หลักที่พบในประชากรสุกรทั่วโลกมาอย่างยาวนาน และเป็นพื้นฐานของวัคซีน PCV2 ส่วนใหญ่ทั้งหมดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2543-2548 มีการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์ไปสู่ PCV2b และในปัจจุบันสายพันธุ์ PCV2b ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (Opriessnig *et al.* 2014) ซึ่งมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าวัคซีน PCV2a สามารถให้การป้องกันแบบ Cross-protection ต่อสายพันธุ์ PCV2b ได้ โดยช่วยลดการเกิดภาวะการติดเชื้อไวรัสในกระแสเลือด (Viremia) มีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี และมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily gain; ADG) สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (Li *et al.* 2017) อีกทั้งยังช่วยลดความชุกและความรุนแรงของการติดเชื้อ PCV2 ได้ สามารถลดอาการทางคลินิกที่เกิดจากเชื้อ PCV2 ได้หลากหลายสายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่มาจากเอพิโทป (Epitope) ทั่วไปที่ใช้ร่วมกันระหว่างจีโนไทป์ที่มีในภาคสนามจำนวนมาก และวัคซีน PCV2a สามารถกระตุ้นให้เกิดการป้องกันแบบ Cross-protection ไปยังจีโนไทป์ที่แตกต่างกันได้ในระดับหนึ่ง (Bandrick *et al.* 2022) รวมถึง Cross-protection กับสายพันธุ์ PCV2d ซึ่งพบว่าเป็นจีโนไทป์ที่ได้รับการรายงานบ่อยที่สุดในทวีปเอเชีย (Franzo and Segalés. 2018) รวมถึงประเทศไทยที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงจากสายพันธุ์ PCV2b เป็น PCV2d อย่างชัดเจนในช่วงปี พ.ศ. 2556-2557 (Thangthamniyom *et al.* 2017) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในลำดับของ Capsid ที่เพิ่มมากขึ้น เอพิโทปที่ใช้ร่วมกันระหว่างวัคซีนที่ใช้จีโนไทป์ PCV2a และสายพันธุ์ในภาคสนามก็จะยิ่งลดลง หรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในลำดับกรดอะมิโนของ Capsid ก็สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอพิโทปได้ ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลต่อการก่อโรคและการสร้างความแตกต่างของภูมิคุ้มกัน รวมถึงการจับของ Neutralizing antibodies ของเชื้อ PCV2 ได้ (Bandrick *et al.* 2022)



ภาพที่ 2.2 รูปร่างลักษณะของเชื้อ PCV2

ที่มา : Segalés (2021)

สำหรับประเทศไทยมีการพบปัญหาจากโรคเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกรครั้งแรกจากรายงานต่าง ๆ ในปี พ.ศ.2542 (ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ และคณะ. 2542) ซึ่งยืนยันโดยการตรวจทางอาการป่วยพยาธิสภาพ จุลพยาธิวิทยา การตรวจทางอิเล็กตรอนไมโครสโคป และการตรวจวินิจฉัยซึ่งพบ Intracytoplasmic inclusion bodies และอนุภาคของไวรัสที่มีขนาด 17 นาโนเมตร (รชภู ตันติเลิศเจริญ และคณะ. 2542) ทำให้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR เพื่อเทียบลำดับเบสของสายพันธุ์ในประเทศไทยกับฐานข้อมูล Genbank เพื่อยืนยันการพบเชื้อ PCV2 ในประเทศ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธี ISH และวิธี Peroxidase-antiperoxidase เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ PCV2 ที่อยู่ในเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินและที่ฝังในพาราฟินได้ (วรวิทย์ วัชชวัลคุ และคณะ. 2542ก) และต่อมาได้มีการรายงานการเพาะแยกเชื้อ PCV2 จากเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (Sirinarumitr *et al.* 2000) รวมถึงการตรวจพบด้วยวิธี PCR จากลูกสุกรที่ป่วยด้วยอาการ PMWS (Kiatipattanasakul *et al.* 2002) และวิธี IHC จากเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน (Bunlunara *et al.* 2002)

### 2.1.3 Porcine circovirus type 3 (PCV3)

ในปี ค.ศ.2016 ได้มีการรายงานว่าพบเชื้อ PCV3 ครั้งแรกในประชากรสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกา (Phan *et al.* 2016) ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเชื้อเซอร์โคไวรัสที่พบก่อนหน้านี้ โดยเกิดจากการกลายพันธุ์ในกรดอะมิโนลำดับที่ 24 และ 27 ของ Cap protein ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นสามจีโนไทป์ ได้แก่ PCV3a, PCV3b และ PCV3c โดย PCV3a สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น PCV3a1, PCV3a2 และ PCV3a3 ตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและคุณสมบัติทางโมเลกุลอื่น ๆ ของ Cap protein ตามรายงานเบื้องต้นที่รายงานเกี่ยวกับเชื้อ PCV3 ถูกตรวจพบในฝูงที่มีอาการทางคลินิก ได้แก่ ปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ อาการไข้มองอึกเสบและกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบในลูกสุกร กลุ่มอาการอึกเสบในไตและผิวหนังของสุกร (PDNS) อาการท้องร่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามรายงานที่พบไม่ได้มีการยืนยันที่ชัดเจนว่าเชื้อ PCV3 เกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิกดังกล่าว เนื่องจากรายงานของข้อมูลที่มีจำกัดเกี่ยวกับการตรวจสอบเชื้อ PCV3 และเชื้อจากโรคอื่น ๆ ในสุกร อีกทั้งยังขาดการประเมินทางด้านพยาธิสภาพหรือการตรวจไม่พบเชื้อ PCV3 ในแผลที่เกิดขึ้น ทำให้ผู้คนจำนวนมากต่างถกเถียงถึงความเกี่ยวข้องทางคลินิกของเชื้อ PCV3 เฉพาะถิ่นทั้งในสหรัฐอเมริกาและทั่วโลก (Arruda *et al.* 2019) และต่อมาก็มีการแสดงให้เห็นว่าเชื้อ PCV3 สามารถพบแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางไปยังประเทศต่าง ๆ ทำให้เป็นที่สนใจของผู้ผลิตสุกรทั่วโลก ซึ่งเชื้อ PCV3 นี้ อาจไม่ได้เป็นปัญหาต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรโดยตรงแต่ก็อาจเป็นส่วนหนึ่งที่เป็นอุปสรรคในการจัดการด้านสุขภาพของสุกรได้ (รุ่งธรรม เกษโกวิท. 2554)

## 2.2 โรคและกลุ่มอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ PCV2

โรคและกลุ่มอาการที่คาดว่าเกิดจากการติดเชื้อ PCV2 นั้นมีอยู่มากมาย โดยลักษณะอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ PCV2 จะมีความเกี่ยวข้องกับช่วงเวลาที่ได้รับเชื้อ โดยช่วงแรกจะพบว่ามีปัญหาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ (มีการแท้งหรือตายคลอด) (Park *et al.* 2005) หลังจากนั้นจะพบกลุ่มอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อน (PRDC) กลุ่มอาการผิวหนังอักเสบและไตเสื่อม (PDNS) (มีรอยโรคที่ผิวหนังเป็นสีแดงถึงม่วง) ซึ่งพบได้มากกว่ากลุ่มอาการสุกรทรุดโทรมหลังหย่านม (PMWS) นอกจากนี้เชื้อ PCV2 ยังทำให้เกิดอาการลำไส้อักเสบแบบแกรนูโลมา (Granulomatous enteritis) ต่อม้ำเหลืองอักเสบแบบมีเนื้อตาย (Necrotizing lymphadenitis) และผิวหนังอักเสบแบบมีหนอง (Exudative epidermitis) โดยในปัจจุบันเรียกกลุ่มอาการทั้งหมดนี้ว่า Porcine circovirus type 2 associated disease (PCVAD) ซึ่งส่วนใหญ่จะส่งผลกระทบต่อลูกสุกรที่มีอายุ 7-16 สัปดาห์ เนื่องจากในลูกสุกรที่มีอายุน้อยกว่านี้ยังได้รับการป้องกันจากแอนติบอดีที่ถ่ายทอดมาจากแม่สุกร (McKeown *et al.* 2005) อย่างไรก็ตามในบรรดาความผิดปกติทั้งหมดนี้ PMWS และ PRDC เป็นกลุ่มอาการที่ส่งผลกระทบต่อระบบการเลี้ยงสุกรมากที่สุด (กิตติกร บุญศรี และคณะ. 2555)



ภาพที่ 2.3 ตุ่มหรือปื้นแดงที่เกิดจากกลุ่มอาการ PDNS

ที่มา : Segalés (2021)

สำหรับกลุ่มอาการทรูโตโรรมหลังหย่านม (PMWS) นั้นมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อ PCV2 แต่เนื่องจากกลุ่มอาการนี้ต้องประกอบไปด้วยหลายปัจจัยร่วมกัน ดังนั้นสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 จึงอาจไม่แสดงภาวะของ PMWS ก็ได้ ซึ่งได้มีการนิยามว่ากลุ่มอาการของ PMWS จะประกอบด้วยลักษณะ 3 ประการ ได้แก่ 1) สุกรหลังหย่านมที่ป่วยต้องแสดงอาการป่วยอย่างชัดเจน คือ มีลักษณะผอม ทรูโตโรรม แคระแกร็น เนื่องจากมักพบภาวะการสูญเสียน้ำหนักอย่างรุนแรง ขนหยาบ มีอาการป่วยด้วยโรกระบบทางเดินอาหาร (ท้องเสีย) หรือป่วยด้วยโรคทางระบบหายใจ ผิวหนังมีสีซีดจากภาวะเลือดจางหรือสีเหลืองจากภาวะดีซ่านจากตับอักเสบ และมีการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลือง โดยเฉพาะบริเวณขาหนีบ เป็นต้น 2) มีลักษณะที่บ่งชี้ทางพยาธิสภาพของโรคในการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา เช่น มีการลดลงของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Lymphoid depletion) การพบก้อน Intracytoplasmic inclusion body การอักเสบแบบ Granulomatous inflammation ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ และการเกิดปอดอักเสบแบบ Interstitial pneumonia เป็นต้น และ 3) ตรวจพบแอนติเจนหรือ DNA ของเชื้อ PCV2 ในเนื้อเยื่อของสุกรที่มีการแสดงอาการป่วย (Harms. 2002) โดยความผิดปกติเหล่านี้โดยมากจะพบในสุกรช่วงอายุประมาณ 60-80 วัน รอยโรคทางมหาพยาธิวิทยาของกลุ่มอาการ PMWS นั้นจะยังคงไม่มีความจำเพาะเช่นเดียวกับอาการทางคลินิก กล่าวคือรอยโรคที่พบอาจมีทั้งการอักเสบของปอด ซึ่งทำให้ปอดมีลักษณะแน่น ไม่ยุบตัว การอักเสบของลำไส้ และการบวมโตของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณโคนขาหนีบ (กฤษฎาภรณ์ พริ้งเพระ และสมพร เตชะงามสุวรรณ. 2550)



ภาพที่ 2.4 สุกรที่มีลักษณะผอมทรุดโทรมจากกลุ่มอาการ PMWS  
ที่มา : Segalés (2021)

Mukherjee *et al.* (2018) ได้กล่าวว่าภายใต้เงื่อนไขและปัจจัยภายในฟาร์ม การแสดงออกของอาการทางคลินิกของ PCVAD ได้รับอิทธิพลจากภูมิหลังทางพันธุศาสตร์ของสุกรในฟาร์ม ดังนั้นพันธุศาสตร์ของโฮสต์จึงมีบทบาทในการก่อโรคของเชื้อ PCV2 ซึ่งการอธิบายกลไกของการต้านทานทางพันธุศาสตร์หรือความอ่อนแอต่อการติดเชื้อ PCV2 จะช่วยควบคุมการติดเชื้อ PCV2 และ PCVAD และยังอาจนำไปสู่การพัฒนาสุกรที่มีความต้านทานต่อเชื้อ PCV2 ในอนาคต

### 2.3 วิทยาภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของโรค PCV2

หลังจากที่ได้รับเชื้อ PCV2 สุกรจะเกิดอาการป่วยและทรุดโทรมหลังหย่านม โดยพบการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (Generalized lymphadenopathy) ซึ่งเมื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาแล้วจะพบว่าการลดลงของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง โดยอาจเกิดจากการติดเชื้อโดยตรงเข้าไปในเซลล์ของเชื้อไวรัส หรืออาจเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย (Apoptosis) ของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี (Shibahara *et al.* 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าการลดลงของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีร่วมด้วย เป็นผลให้เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppression) ขึ้น โดยมีสัดส่วนแปรผันตรงในสุกรที่มีปริมาณของเชื้อ PCV2 มาก และมักพบว่ามีการลดลงของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองมากตามไปด้วย เป็นผลให้เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดลดลง (Thrombocytopenia) และมีเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม Monocytic cell เข้ามาในเลือดสูงขึ้น (Monocytosis) (Pogranichny *et al.* 2002) โดยภาวะการลดลงของเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Leucopenia) สามารถตรวจพบได้ในสุกรที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ ทั้งนี้พบได้ในช่วง 7-10 วัน หลังการติดเชื้อ แล้วจึงมีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มอาการ PMWS (Nieisen *et al.* 2003) หรือบางครั้งเชื้อ PCV2 จะแฝงตัวอยู่ในเซลล์แมคโครฟาจ

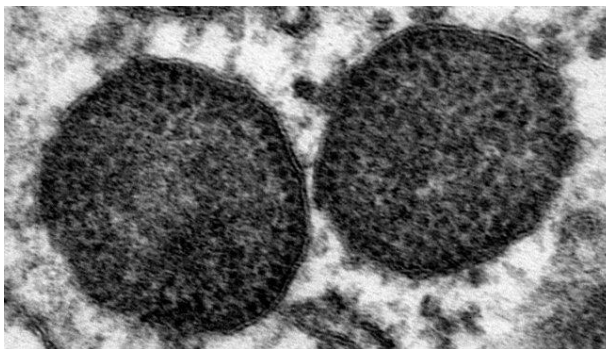
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเซลล์เดนไดรติก โดยทำการสร้างกลไกบางอย่างทำให้สามารถอาศัยอยู่ในเซลล์ของสุกรได้เป็นเวลานานโดยที่เชื้อไวรัสอาจไม่มีการแบ่งตัวเพิ่ม ซึ่งถือเป็นการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันอย่างหนึ่งของไวรัสได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ในสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันด้อยประสิทธิภาพลง และส่งผลต่อเนื้อทำให้สุกรไวต่อการติดเชื้อต่าง ๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น (กิตติกร บุญศรี และคณะ. 2555) เช่นเดียวกับที่ Mukherjee *et al.* (2018) ได้กล่าวว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ PCV2 กับโฮสต์ตามธรรมชาติ (สุกรเลี้ยงและสุกรป่า) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เริ่มต้นด้วยการเกาะติดและการเข้าสู่เซลล์โฮสต์ของไวรัส (Nauwynck *et al.* 2012) ซึ่งชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิว เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด และเซลล์แมคโครฟาจ แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มจำนวนของไวรัสตั้งแต่ระดับต่ำไปจนถึงต่ำมาก (Hamberg *et al.* 2007) โดยเชื้อ PCV2 มีวงจรในการเพิ่มจำนวนที่ยาวนาน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของระยะพักตัวที่ใช้เวลาค่อนข้างมากในการเพิ่มปริมาณไวรัสในซีรัมและเนื้อเยื่อในการเกิดโรค (ประมาณ 18-25 วัน) (Segalés. 2012)

ในส่วนของกลไกในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันนั้น เชื้อ PCV2 ถือว่ามีความสามารถในการดำรงอยู่ในร่างกายของสัตว์ได้เป็นระยะเวลานาน โดยที่สัตว์ไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น เมื่อมีการศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของเชื้อ PCV2 ทำให้พบว่าเชื้อสามารถเข้าไปอยู่อาศัยในเซลล์และแบ่งตัวได้ในหลาย ๆ อวัยวะ โดยเฉพาะในเซลล์ลิ้มโพไซท์ที่พบในต่อมน้ำเหลืองใกล้กับอวัยวะที่ได้รับเชื้อ (Yu *et al.* 2007) นอกจากนี้ยังสามารถเข้าไปอยู่อาศัยได้ในเซลล์แมคโครฟาจและเซลล์เดนไดรติกอีกด้วย ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นกลไกหลักสำคัญในการสังหารระบบภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ในร่างกาย อีกทั้งยังเป็นเซลล์ที่พบในระยะแรกของการติดเชื้อ ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้ในเซลล์เหล่านี้เป็นระยะเวลานานโดยที่เชื้อไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และสุกรไม่มีการแสดงอาการป่วยให้เห็น (Vincent *et al.* 2003) แต่อย่างไรก็ตามในภาวะของการติดเชื้อ PCV2 ที่สามารถตรวจพบแอนติเจนของเชื้อได้ตลอดระยะเวลา แสดงให้เห็นว่าเชื้อ PCV2 น่าจะมีกลไกในการเข้าไปอยู่อาศัยภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เหล่านี้ โดยที่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ไลโซโซม (Lysosome) ภายในเซลล์ (Gilpin *et al.* 2003) และพบว่าการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ อันได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองที่หลอดลมและขาหนีบ ต่อมนทอนซิล ปอด ตับ ไต ม้าม และต่อมไทมัส ซึ่งการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ในตัวสุกรจะเกิดขึ้นมากที่สุดที่ช่วงเวลาประมาณ 14 วันหลังการติดเชื้อ หลังจากนั้นการเพิ่มจำนวนที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ จะลดลง แต่อาจพบมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ยาวนานกว่า 21 วัน (Darwich and Mateu. 2012) ในขณะเดียวกันเมื่อมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายขึ้น ไม่ว่าจะอันเนื่องมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมหรือความเครียดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงหลังการหย่านมของลูกสุกร เชื้อ PCV2 ก็พร้อมที่จะออกมาจากเซลล์เหล่านั้น และแพร่กระจายไปยังเซลล์หรืออวัยวะอื่น ๆ จนก่อให้เกิดกลุ่มอาการ PMWS ได้ในที่สุด (กิตติกร บุญศรี และคณะ. 2555)

Segalés (2011) ได้กล่าวถึงความสำคัญของการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการของโรค PCV2 ว่าร้อยละของสุกรที่มีกลุ่มอาการ PMWS พบได้ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และจากการวิจัยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาช่วยตอกย้ำและบ่งชี้ว่า PMWS เป็นโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งโดยปกติแล้วสุกรที่มีการติดเชื้อ PCV2 จะมีเพียง 4-10% เท่านั้นที่แสดงอาการทางคลินิกของกลุ่มอาการ PMWS ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสัดส่วนของการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการจึงมีมากกว่าสุกรที่แสดงอาการทางคลินิกจากการติดเชื้อออกมา และจากข้อมูลของโรค PCV2 ที่มีก็แทบจะไม่ทราบระยะเวลาที่แน่นอนของการเปลี่ยนแปลงทางระบบภูมิคุ้มกันในการติดเชื้อ ซึ่งการศึกษาทดลองแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการของโรค PCV2 มีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของสุกรด้วย โดยสุกรที่ติดเชื้อจะมีการพัฒนาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะทั้งในด้านการตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (Humoral immune response) และการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immune response) นอกจากนี้สุกรที่ติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการยังมีการเพิ่มขึ้นของ Interferon (IFN) - $\alpha$  ในพลาสมาไม่นานหลังจากเกิดการติดเชื้อ และระดับของ Interleukin (IL) -10 (Cytokine ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน) ในซีรัมที่สัมพันธ์กับระยะเวลาของเชื้อไวรัสที่แพร่กระจายในกระแสเลือดที่นานขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นการตอบสนองต่อ IL-10 แบบชั่วคราวในระหว่างระยะการติดเชื้อก็ตรงกับการผกผันของอัตราส่วนของ IgM/IgG เช่นเดียวกับที่ Mukherjee *et al.* (2018) ได้กล่าวว่าในการติดเชื้อ PCV2 แบบไม่แสดงอาการนั้น ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับโฮสต์ทำให้เกิดการพัฒนาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเพื่อจัดการกับการติดเชื้อแบบเฉียบพลันหรือช่วยให้ไวรัสยังคงอาศัยอยู่ในสัตว์บางชนิด (Segalés. 2012) ในขณะที่ในกรณีของสัตว์ที่มีกลุ่มอาการของโรค PCV2-systemic disease (PCV2-SD) สัตว์จะขาดการตอบสนองของแอนติบอดีที่ลบล้างฤทธิ์ (Neutralizing antibody) ในการติดเชื้อไวรัส (Fort *et al.* 2007) และมีการตอบสนองทางด้านเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป (Kekarainen *et al.* 2010) และจากการศึกษาภายใต้สภาวะในหลอดทดลองพบว่าเชื้อ PCV2 ส่วนใหญ่จะส่งผลกระทบต่อเซลล์เดนไดรติก เซลล์แมคโครฟาจ และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) เนื่องจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดเป็นที่เกี่ยวข้องน้อยกว่า ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ PCV2 ทำให้การรับรู้ของเซลล์เดนไดรติกลดลง และการพัฒนาภูมิคุ้มกันในการป้องกันต่อเชื้ออื่น ๆ ที่ลดลงก็เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้ (McCullough *et al.* 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 เชื้อ PCV2 ที่แฝงตัวอยู่ในเซลล์แมคโครฟาจ  
ที่มา : Marco (2017)

## 2.4 การติดต่อของเชื้อ PCV2

สำหรับการติดต่อของเชื้อ PCV2 นั้นสามารถแพร่กระจายและติดต่อได้ทั้งการติดต่อตามแนวนราบ (Horizontal transmission) (จากสุกรที่อยู่ร่วมกัน) และการติดต่อตามแนวตั้ง (Vertical transmission) (จากแม่สู่ลูก) จากสุกรที่มีการติดเชื้อไปยังสุกรปกติได้ (Mukherjee *et al.* 2018) โดยการติดต่อตามแนวนราบสามารถติดต่อได้โดยตรง (Nose to nose contact) หรือผ่านทางกรกิน (Fecal-oral exposure) และผ่านทางสื่อหรือสารคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น มูล ปัสสาวะ น้ำลาย น้ำมูก น้ำนม และน้ำอสุจิ เป็นต้น ตามที่ Mukherjee *et al.* (2018) ได้กล่าวว่าการติดต่อระหว่างทางช่องปากกับช่องจมูกเป็นช่องทางธรรมชาติในการแพร่เชื้อ โดยเชื้อ PCV2 ที่มีการติดเชื้อในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของสุกร (Opriessnig *et al.* 2007) เชื้อไวรัสจะแพร่ออกมาผ่านสารคัดหลั่งทางระบบทางเดินหายใจ ช่องปาก ปัสสาวะ และอุจจาระของสุกรที่ติดเชื้อ และ Madson *et al.* (2009) ได้พบว่าน้ำอสุจิเป็นแหล่งของการติดเชื้อ PCV2 ได้ เนื่องจากพบการแพร่เชื้อหลังจากการผสมเทียม ซึ่งสื่อหรือสิ่งคัดหลั่งเหล่านี้จะมีอนุภาคของไวรัสซึ่งสามารถแพร่กระจายเชื้อไปสู่สุกรที่อยู่ร่วมกันหรือที่ใกล้ชิดสัมผัสกันได้ (Krakowka *et al.* 2000) โดยจากการทดลองฉีดวัคซีน PCV2 ในสุกรป่าพบว่าสามารถมีการขับเชื้อ PCV2 ออกมาในน้ำอสุจิได้จนถึง 50 วันหลังการฉีดวัคซีน (Madson *et al.* 2009) ตามที่ Patterson *et al.* (2011) ได้พบว่าเชื้อ PCV2 สามารถแพร่กระจายเชื้อได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันทั้งทางจมูก ปาก และมูล ส่วนการติดต่อตามแนวตั้งเป็นการถ่ายทอดผ่านทางรก (Transplacental infection) จากแม่สุกรสู่ลูกสุกรได้ (Pogranichny *et al.* 2002) โดยพบรอยโรคเป็นอาการกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบในลูกสุกรที่แท้งและตายคลอด (West *et al.* 1999) และจากการเก็บตัวอย่างน้ำนมเหลืองและซีรัมจากแม่สุกรและลูกสุกรพบว่าน้ำนมเหลืองมีปริมาณ DNA ของเชื้อ PCV2 สูงเช่นเดียวกับในซีรัมของแม่สุกรและลูกสุกร (Shen *et al.* 2010) และจากการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย้อนหลังในฟาร์มที่มีการติดเชื้อ PWMS จำนวน 7 แห่ง พบว่าจะมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นหากลูกสุกรมีการติดเชื้อก่อนอายุ 7 สัปดาห์ ในขณะที่จะมีความเสี่ยงลดลงหากลูกสุกรหย่านมหลังจาก 21 วัน และเกิดจากแม่สุกรที่มีผลของซีรัมเป็นบวก (Rose *et al.* 2009)

Mukherjee *et al.* (2018) ได้มีการศึกษาทางระบาดวิทยาในหลายประเทศ เช่น เดนมาร์ก สหราชอาณาจักร สเปน และเนเธอร์แลนด์ เพื่อระบุถึงปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้ฝูงสุกรได้รับผลกระทบจากกลุ่มอาการ PWMS เพื่อเปรียบเทียบทางซีรัมวิทยาของฝูงสุกรที่ได้รับผลกระทบกับที่ไม่ได้รับผลกระทบ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่เพิ่มความเสี่ยงของฝูงสุกรที่จะได้รับผลกระทบจากกลุ่มอาการ PWMS ได้แก่ การเก็บน้ำเชื้อในฟาร์มและการผสมเทียม (Artificial insemination; AI) โดยผู้ที่ไม่มีการกักโรคก่อนเป็นเวลา 3 วัน การติดเชื้อหรือการให้วัคซีน PRRS การซื้อสุกรสาวทดแทนจำนวนมาก การมีปริมาณแอนติบอดีของเชื้อ PCV2 ในซีรัมสูง ฝูงอื่น ๆ ที่อยู่ในพื้นที่โดยรอบ และการติดเชื้อ Parvovirus ในแม่สุกรที่ตั้งท้อง เป็นต้น

## 2.5 การควบคุมและป้องกันโรค

สำหรับฟาร์มที่พบปัญหาการติดเชื้อ PCV2 สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือควรมีระบบการจัดการฟาร์มและระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่ดี (Biosecurity) ได้แก่ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อเชื้อ PCV2 ทั้งในโรงเรือนเลี้ยงสุกรและบริเวณที่ยานพาหนะจะเข้ามาภายในฟาร์ม มีการเปลี่ยนเสื้อผ้าและรองเท้านอกก่อนเข้าฟาร์ม เป็นต้น และ Mukherjee *et al.* (2018) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่จะช่วยลดความเสี่ยงของฝูงสุกรที่จะได้รับผลกระทบจากกลุ่มอาการ PWMS ว่าควรรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพภายนอกให้เหมาะสมที่สุดเมื่อมีการซื้อสุกรและสุกรสาวเข้ามา และมีการจัดส่งสุกรขุนในคอกจัดส่งที่แยกเตรียมไว้ ทำการแยกคอกแม่สุกรท้องว่าง มีการป้องกันปรสิตรภายนอก และเพิ่มระยะเวลาหย่านมจากแม่สุกรให้นานขึ้น อีกทั้งการลดความเครียดในการเลี้ยงก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคในตัวสุกรเองได้ นอกจากนี้ยังควรควบคุมปัจจัยที่จะทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนเพื่อควบคุมเชื้อที่จะทำให้เกิดความรุนแรงร่วมกับเชื้อ PCV2 เช่น เชื้อไวรัสจากโรค PRRS โรค PPV โรคไข้หวัดสุกร (Swine influenza virus; SIV) โรคปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบ (Actinobacillus pleuropneumoniae; APP) และโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Pseudorabies หรือ Aujesty's disease; AD) และเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Hemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Lawsonia intracellularis*, *Pasteurella multocida* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น (Yu *et al.* 2007) ซึ่งจะช่วยลดการสูญเสีย และที่สำคัญการทำวัคซีนก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการควบคุมและป้องกันโรคได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้โปรแกรมการฉีดวัคซีนจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนที่ใช้และรูปแบบของปัญหาที่พบในฟาร์ม ซึ่งภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีนจะสามารถลดปริมาณไวรัสในกระแสเลือดและลดโอกาสการเกิดโรค PCV2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ (กิตติกร บุญศรี และคณะ. 2555) ซึ่งวัคซีนที่มีการใช้ในปัจจุบันที่ใช้สายพันธุ์ PCV2a สามารถรับมือกับสายพันธุ์ที่มีการระบาดหมุนเวียนอยู่ทั่วโลกได้ (PCV2a และ PCV2b) รวมถึง mPCV2b (Opriessnig *et al.* 2014) เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างจีโนไทป์ (Fort *et al.* 2008) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีอยู่อย่างจำกัดแสดงให้เห็นว่าวัคซีน PCV2b อาจมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการต่อต้านเชื้อ PCV2 ที่กำลังแพร่ระบาดอยู่ในปัจจุบัน (Opriessnig *et al.* 2013a)

Segalés (2011) ได้กล่าวถึงความสำคัญของการป้องกันการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการของโรค PCV2 ว่าจากกลุ่มวิจัยที่ได้ทำการทดลองในสุกรที่ติดเชื้อทั่วโลกและได้ทำการฉีดวัคซีนป้องกันการโรค PCV2 พบว่าสุกรส่วนใหญ่มีการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ ซึ่งอีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการก็คือการฉีดวัคซีนป้องกันโรค PCV2 ในฟาร์มที่ติดเชื้อที่ปลอดจากกลุ่มอาการ PMWS โดยการฉีดวัคซีนป้องกันโรค PCV2 ได้รับความนิยมน้อยมากในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมา จนกลายเป็นสิ่งจำเป็นที่ฟาร์มสุกรทั่วโลกต้องทำในสัดส่วนที่เพิ่มสูงขึ้น และข้อมูลจากการศึกษาพบว่าการทำวัคซีนให้ประสิทธิภาพที่ชัดเจนว่ามีการเพิ่มขึ้นของอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (Feed conversion rate; FCR) ที่ดีขึ้น สามารถลดอัตราการตาย อัตราการคัดออก และต้นทุนเกี่ยวกับการรักษา ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนที่สุดในการเลี้ยงสุกรอนุบาลถึงสุกรรุ่น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณจีโนมของไวรัสในซีรัมและรอยโรคภายในต่อมน้ำเหลืองที่มีลักษณะคล้ายกับกลุ่มอาการ PMWS จะลดลงในสุกรที่ได้รับวัคซีน ที่สำคัญประโยชน์ที่ได้จากการฉีดวัคซีนไม่เพียงแต่ให้ผลดีในฟาร์มที่ได้รับผลกระทบจากกลุ่มอาการ PMWS เท่านั้น แต่ยังให้ผลดีในฟาร์มที่ไม่มีการวินิจฉัยโรคและฟาร์มที่ไม่เคยพบอาการทางคลินิกของกลุ่มอาการ PMWS อีกด้วย ดังนั้นประโยชน์ของการฉีดวัคซีนจึงไม่ได้มีเป้าหมายเพียงเพื่อเป็นการป้องกันกลุ่มอาการ PMWS เท่านั้น แต่สิ่งสำคัญคือต้องการป้องกันการผลกระทบจากการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการของโรค PCV2

Mukherjee *et al.* (2018) ได้กล่าวว่าในปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรค PCV2 ถือเป็นสิ่งเดียวที่ใช้ในการป้องกันโรค PCV2 ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรที่มีจำหน่ายเป็นจำนวนมากทั่วโลก เนื่องจากวัคซีนมีประสิทธิภาพในการช่วยปรับปรุงพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในด้านการผลิต เช่น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADWG) สภาพร่างกาย (Body condition) และน้ำหนักซาก จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการใช้วัคซีนอย่างกว้างขวางและส่งผลให้มีความต้องการใช้เป็นจำนวนมากขึ้น ในช่วงแรกที่มีการทำวัคซีนส่วนใหญ่เป็นการฉีดวัคซีนในลูกสุกร และต่อมาก็มีการเพิ่มจำนวนการฉีดวัคซีนในแม่สุกรและสุกรสาวเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการฉีดวัคซีนร่วมกันในลูกสุกรและแม่สุกรว่าทำให้ร่างกายของสัตว์สามารถต่อต้านการติดเชื้อ PCV2 ได้ดียิ่งขึ้น (Pejsak *et al.* 2010)

วัคซีน PCV2 เชิงพาณิชย์ตัวแรกมีการเปิดตัวที่ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2549 เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย (Inactivated vaccine) ประกอบด้วยวัคซีน Circovac จากบริษัท Merial ซึ่งผลิตโดยใช้ไวรัสทั้งตัว (Whole virus) โดยเป็นกระบวนการแบบดั้งเดิม และ Foster PCV จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริษัท Zoetis ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดลูกผสม (Inactivated PCV1-2 chimeric virus) และต่อมา จึงมีวัคซีนที่ผลิตจากการตัดต่อโปรตีน (Recombinant vaccine) ที่เป็นชนิด Subunit vaccine โดยใช้ Baculovirus แสดงออกในส่วนโปรตีน Capsid ของเชื้อ PCV2 (Baculovirus expression vector system) ประกอบด้วยวัคซีน Porcilis PCV จากบริษัท Intervet (MSD) วัคซีน Circumvent จากบริษัท Intervet (MSD) วัคซีน Ingelvac CircoFLEX จากบริษัท Boehringer Ingelheim (Afghah *et al.* 2017) นอกจากนี้ก็ยังมีวัคซีนในเชิงพาณิชย์จากบริษัทอื่น ๆ ผลิตออกมาจำหน่ายเพิ่มเติม ได้แก่ วัคซีน SuiShot Circo One จากบริษัท ChoongAng ซึ่งผลิตโดยใช้ไวรัสทั้งตัว (Whole virus) วัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT และวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER จากบริษัท Komipharm ซึ่งผลิตโดย Baculovirus expression vector system โดยจะเห็นว่าวัคซีน PCV2 ในเชิงพาณิชย์โดยส่วนใหญ่ผลิตด้วยกระบวนการ Baculovirus และทั้งหมดมุ่งเป้าไปที่โปรตีน Capsid เนื่องจากเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของไวรัสที่เข้ารหัสโดย ORF2 (Beach and Meng, 2012) ซึ่งวัคซีนชนิด Subunit vaccine จะมีกระบวนการเลียนแบบโครงสร้างโดยรวมของ Virion ดั้งเดิม และสร้างการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูง โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบอาศัยสารน้ำ (Humoral immunity) และภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity) ต่อโรคติดเชื้อ PCV2 โดยทั่วไปแล้วสารที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน (Immunogen) ของ Subunit vaccine จะผลิตด้วยกระบวนการ Baculovirus expression system ซึ่งสามารถหั่นโปรตีนออกมาได้ในระดับสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงจากไตของสุกรที่ใช้ในกระบวนการผลิตวัคซีนชนิด Whole virus (Baek *et al.* 2021)

## 2.6 การยืนยันผลการตรวจวินิจฉัย

สำหรับการวินิจฉัยเพื่อตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีของเชื้อ PCV2 นั้นสามารถทำการตรวจหาได้หลากหลายวิธี ได้แก่ การตรวจด้วยวิธีการย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี (IHC) หรือตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธีอินซิติวไฮบริไดเซชัน (ISH) ในบริเวณเนื้อเยื่อที่มีรอยโรค ซึ่งเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการวินิจฉัยด้วยวิธีนี้ ได้แก่ ต่อมมน้ำเหลือง ม้าม ต่อมทอนซิล ต่อมไทมัส และลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) ส่วนการวินิจฉัยด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) สามารถตรวจได้ทั้งจากซีรัมและเนื้อเยื่อน้ำเหลืองชนิดต่าง ๆ แต่วิธีนี้สามารถบอกได้เพียงว่าในฟาร์มมีเชื้อ PCV2 หรือไม่และเป็นสายพันธุ์ใด แต่บอกไม่ได้ว่าสุกรที่ตรวจเจอนั้นจะป่วยด้วยภาวะทรูคโทรมหลังหย่านมหรือไม่ (Yu *et al.* 2007) นอกจากนี้ยังมีวิธี IFA วิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) การชันสูตรซาก การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา การแยกเชื้อไวรัส และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นต้น (กฤษฎาภรณ์ พริ้งเพระ และ สมพร เตชะงามสุวรรณ. 2550) แต่วิธีการที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่าวไปเหล่านี้ล้วนแต่เป็นวิธีการที่มีความยุ่งยาก ต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจหรือรอผลการวินิจฉัย และต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการปฏิบัติเพื่อความถูกต้องในการแปลผล จึงได้มีการนำวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยามาใช้ นั่นคือวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay หรือที่เรียกสั้น ๆ ว่า “อีไลซ่า (ELISA)” ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและแม่นยำสูง สามารถบอกได้ว่าสุกรเคยมีการสัมผัสเชื้อไวรัสชนิดนี้หรือไม่ นอกจากนี้ยังสามารถลดความผิดพลาดจากการแปลผลของวิธี IFA และ IPMA ได้อีกด้วย (รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช และคณะ. 2548) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคในฟาร์มสุกรนอกจากจะมุ่งเน้นเพื่อการแก้ปัญหาที่พบแล้ว การตรวจหาภาวะของโรค PCV2 ที่แฝงอยู่ก็ยังคงช่วยในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในฟาร์มสุกรได้อย่างยั่งยืน และสามารถใช้เป็นประโยชน์ในด้านการตรวจสอบแนวโน้มการสร้างภูมิคุ้มกันในระดับฝูงได้อีกด้วย เพราะแม้ว่าโรค PCV2 จะไม่ใช่สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดปัญหาในสุกรแต่เมื่อมีการติดเชื้อ PCV2 ร่วมด้วยก็จะทำให้เกิดความสูญเสียมากยิ่งขึ้น (กิตติกร บุญศรี และคณะ. 2555)

## 2.7 วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA

### 2.7.1 หลักการของ Enzyme immunoassay

ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาได้มีผู้คิดค้นและปรับปรุงการทดสอบซึ่งอาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีให้มีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) สูงขึ้นโดยการนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลาก (Label) ไว้ด้วยสารต่าง ๆ เช่น สารเรืองแสง (Fluorescent compound) และสารกัมมันตภาพรังสี (Radioisotope) เป็นต้น มาใช้ในการทดสอบ แต่แม้การทดสอบดังกล่าวจะมีความไวสูงแต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น การใช้สารเรืองแสงเป็นสารติดฉลากจะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescent microscope) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพงในการทดสอบ ส่วนการใช้สารกัมมันตภาพรังสีเป็นสารติดฉลากก็จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงในการทดสอบเช่นกัน นอกจากนี้ยังต้องมีระบบการควบคุมการใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ดีด้วย ด้วยสาเหตุเหล่านี้จึงทำให้มีผู้ที่พยายามคิดค้นหาสารอื่นซึ่งจะสามารถนำมาใช้เป็นสารติดฉลากได้และมีข้อดีกว่าสารที่ใช้อยู่เดิม ซึ่งสารอย่างหนึ่งที่พบว่าสามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดีนั้นคือ เอนไซม์ (Enzyme) (Engvall and Perlmann. 1972) เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุลสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรต (Substrate) ได้หลายโมเลกุล และยังช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความคงทน สามารถเก็บไว้ได้นานในสภาวะต่าง ๆ อีกด้วย (Bullock and Walls. 1977) โดยการทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์กับซับสเตรตนั้นจะทำให้เกิดผลผลิตที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่ายและชัดเจนโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่หากต้องการผลของการทดสอบโดยละเอียดก็สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือสำหรับวัดความเข้มของสี (Yolken *et al.* 1977) ทั้งแบบชนิดธรรมดา

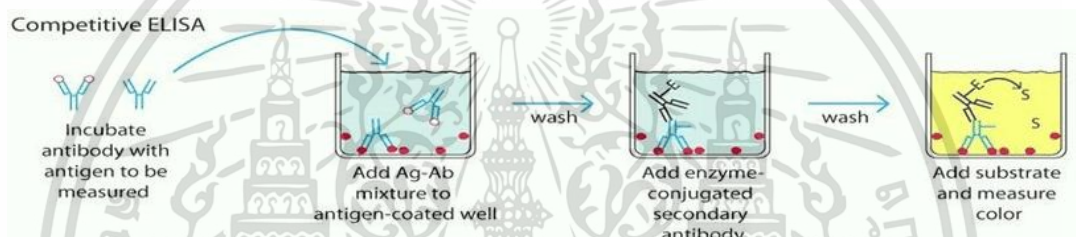
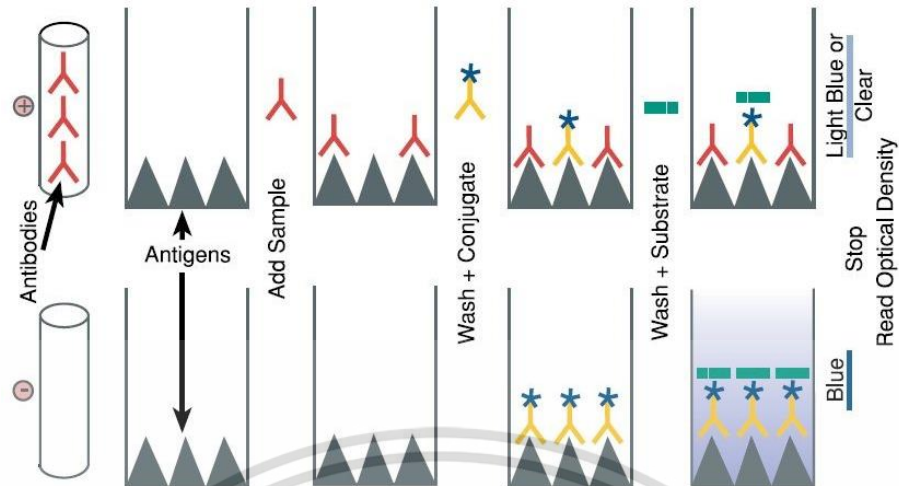
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือแบบอัตโนมัติเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการทำงานก็ได้ สำหรับเวลาที่ต้องใช้ในการทดสอบมีรายงานว่าสามารถลดเวลาที่ใช้ให้เหลือเพียงภายใน 30 นาที โดยที่การทดสอบนั้นยังคงมีความไวเพียงพอที่จะใช้ประโยชน์ในแง่ของการวินิจฉัยโรคได้ (Yolken and Leister. 1981) ทั้งนี้การพัฒนาวิธีอีไลซ่าในรูปแบบต่าง ๆ ขึ้นมาทำให้สามารถใช้ตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ ซึ่งการตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณแล้วมาเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการหา (นันทิกา คงเจริญพร และคณะ. 2555)

วิธีอีไลซ่าจัดอยู่ในกลุ่มการทดสอบแบบ Enzyme immunoassay heterogeneous หรือ Heterogeneous EIA ซึ่งมีหลักการคือเมื่อให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากันแล้วจะแยกแอนติเจนที่จับอยู่กับแอนติบอดี (Antigen-antibody complex) ออกจากแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่อยู่เป็นอิสระ แล้ววัดปริมาณเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่งที่แยกออกจากรวมกันโดยอาศัยคุณลักษณะของเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงซับสเตรต (นภาธร บานชื่น. 2536) ซึ่งมีการแบ่งตามลักษณะของกลไกการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดในการทดสอบได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

#### 2.7.1.1 Competitive ELISA

เป็นวิธีการที่มักใช้ในการตรวจหาแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Avrameas. 1983) โดยอาศัยการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Antigen-enzyme conjugate) หรือใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Antibody-enzyme conjugate) เป็นตัวกระทำ (Reagent) ในการทดสอบก็ได้ ซึ่งมีหลักการคือทำการเคลือบ Solid phase ได้แก่ ผิวด้านในของหลอดทดลองหรือหลุมในภาชนะพลาสติกด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดีปริมาณคงที่ปริมาณหนึ่ง จากนั้นเติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จำเพาะกันและที่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วลงไปเพียงอย่างเดียวหรือเติมพร้อมตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาปริมาณแอนติเจนหรือแอนติบอดี หรือเติมพร้อมแอนติเจนมาตรฐานซึ่งทราบว่าจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นเช่นเดียวกันแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป เมื่อทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจนถึงสภาพคงที่แล้วจึงทำการล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากันออกไป จากนั้นเติมซับสเตรตแล้วดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จะพบว่าในหลุมที่มีแอนติเจนมาตรฐานหรือแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณมีการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตน้อยกว่า เนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวแย่งจับกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ ทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติบอดีนั้นได้น้อยลงเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างหรือแอนติเจนมาตรฐานที่เติมลงไป (นภาธร บานชื่น. 2536)



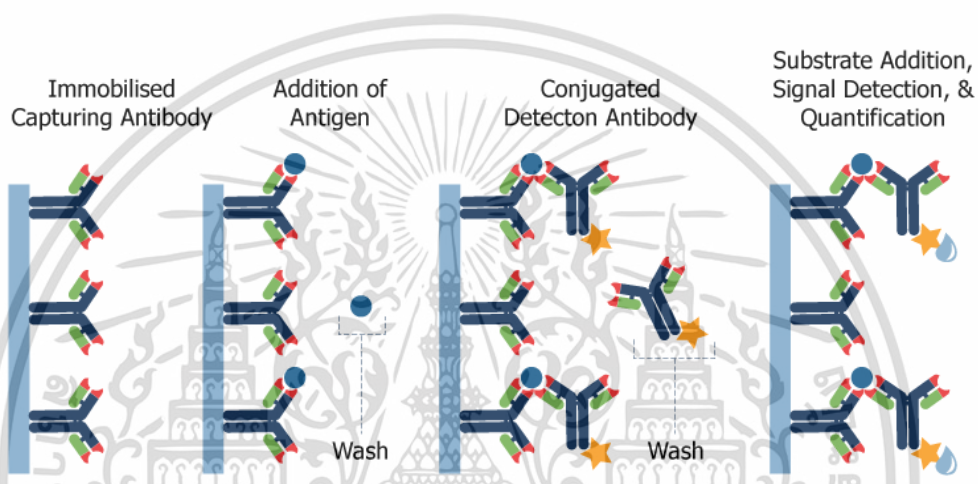
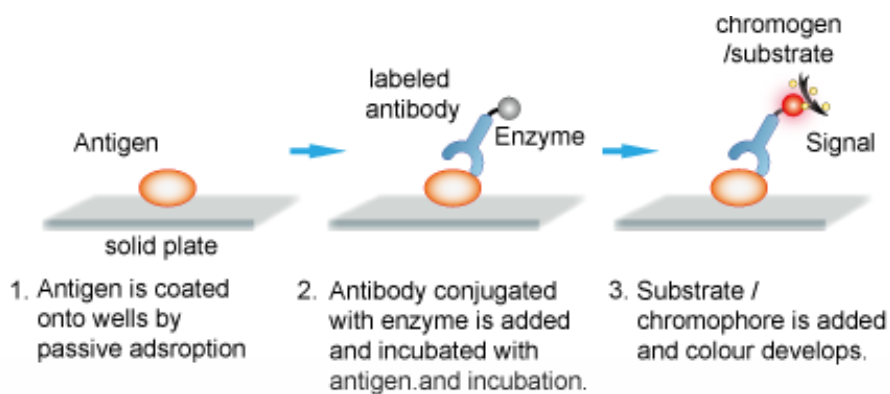
ภาพที่ 2.6 หลักการของ Competitive ELISA

ที่มา : Sino Biological (2021)

2.7.1.2 Non-competitive ELISA เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการตรวจหาได้ทั้ง แอนติเจนและแอนติบอดีในตัวอย่าง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี ได้แก่

(1) Direct ELISA มีหลักการคือทำการเคลือบ Solid phase ด้วย แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่าง เมื่อเติม ตัวอย่างที่มีแอนติเจนหรือแอนติบอดีลงไปจะทำให้เกิดการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี ดังกล่าว จากนั้นทำการล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากันออก แล้วเติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการตรวจในตัวอย่างที่ได้ติดฉากด้วย เอนไซม์ (Conjugate) ลงไป ทำให้คอนจูเกตทำปฏิกิริยากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จับอยู่กับ แอนติเจนหรือแอนติบอดีตัวแรก แล้วล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากันออก จากนั้นทำการเติม ซับสเตรต ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนหรือ แอนติบอดีที่ต้องการหาในตัวอย่าง โดยวิธีนี้อาจเรียกว่า Sandwich assay ก็ได้ (Engvall. 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

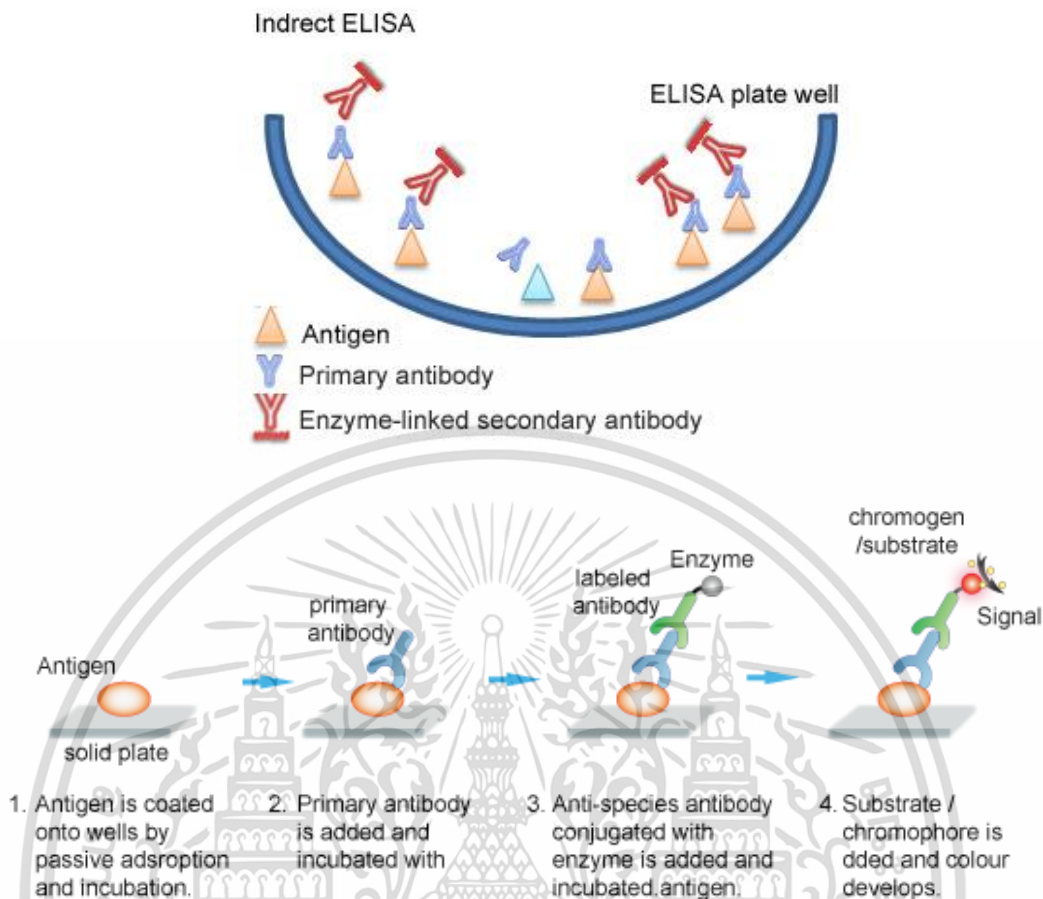


ภาพที่ 2.7 หลักการของ Direct ELISA

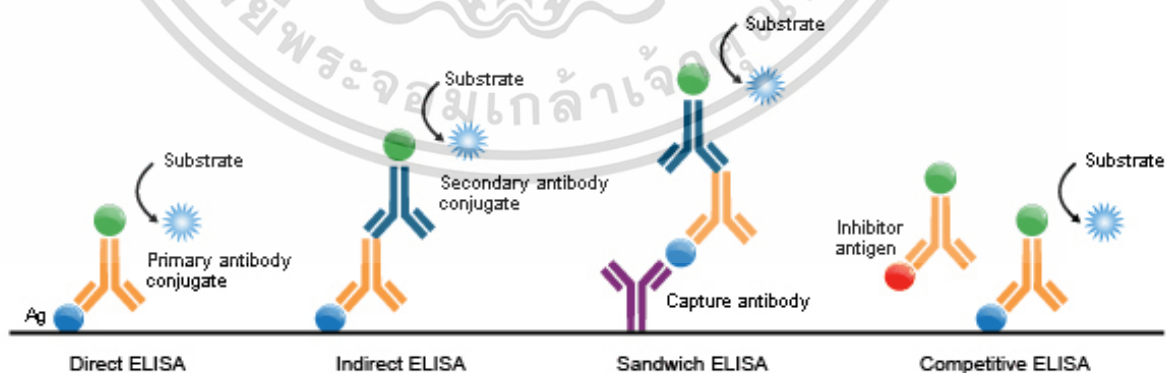
ที่มา : Koirala (2018)

(2) Indirect ELISA เป็นวิธีที่มักใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีในตัวอย่าง โดยมีการดัดแปลงมาจากวิธี Direct ELISA มีหลักการคือทำการเคลือบ Solid phase ด้วยแอนติเจน จากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีลงไป แล้วทำการตรวจดูการทำปฏิกิริยากันของ แอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Conjugate) โดยดูการเปลี่ยนแปลงของซบสเตรตที่เติมในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีที่มีในตัวอย่าง (Engvall. 1980) ส่วนการตรวจหาแอนติเจนมีการเพิ่มเติมโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะตัวที่สองที่ไม่ได้ ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะและติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Conjugate) มาเป็นตัว กระทำเพิ่มเติมเพื่อวัดปริมาณแอนติบอดีตัวที่สองที่จับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่าง ทางอ้อม โดยอาจเรียกอีกอย่างว่า Double antibody sandwich antiglobulin ELISA (Voller *et al.* 1978) ซึ่งโดยปกติแล้ววิธี Indirect ELISA นี้ให้ผลในเรื่องของความไว (Sensitivity) ในการตรวจ มากกว่าวิธี Direct ELISA (Avrameas. 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 หลักการของ Indirect ELISA  
ที่มา : Life Sciences Products (2019)



ภาพที่ 2.9 ความแตกต่างของวิธี ELISA แต่ละชนิด  
ที่มา : Abnova (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7.2 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อวิธีอีไลซ่า (นภาพร บานชื่น. 2536)

### 2.7.2.1 วัสดุสำหรับยึดแอนติเจนหรือแอนติบอดี (Solid phase)

ในวิธีอีไลซ่าวัสดุที่ใช้สำหรับยึดแอนติเจนหรือแอนติบอดีมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อผลของการทดสอบ ถ้าแอนติเจนหรือแอนติบอดีจับกับวัสดุนั้นได้ไม่ดีพอจะมีผลทำให้การทดสอบมีความไวลดลงและเป็นเหตุให้การทดสอบนั้นมี Background สูงขึ้นด้วย ในกรณีที่มีการจับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับวัสดุนั้นเกิดขึ้นอย่างไม่สม่ำเสมอจะส่งผลให้ Reproducibility ของการทดสอบลดลง ซึ่งจะทำให้ความน่าเชื่อถือของการทดสอบนั้นลดลงด้วย

ในปัจจุบันนี้มีวัสดุหลายชนิดที่ใช้สำหรับการยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยไม่ได้ใช้ Covalent bond ในการจับนั้น ได้แก่ Polyvinyl, Polypropylene, Polystyrene, Polycarbonate, แก้ว, Nylon และ Silicone rubber เป็นต้น สำหรับพวกที่เป็นพลาสติกนั้นมีการประดิษฐ์ให้อยู่ในรูปต่าง ๆ เช่น เป็น Tube, Cuvette, Beads และ Microplate เป็นต้น ซึ่งทำให้ง่ายต่อการล้างในระหว่างขั้นตอนของการทดสอบเพราะไม่ต้องปั่นก่อนล้างซึ่งต่างจากวัสดุที่อยู่ในรูปของ Particle (Engvall. 1980)

สำหรับวัสดุบางอย่างการจับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับวัสดุนั้นใช้ Covalent bond เช่น Cellulose, Agarose, Polyacrylamide และ Cyanogen bromide activated paper ซึ่งการใช้วัสดุเหล่านี้ในการทดสอบจะทำให้ได้ผลที่แน่นอนกว่า เพราะการจับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับวัสดุดังกล่าวมันคงและมีความผันแปรน้อย แต่วัสดุเหล่านี้มักจะมีอยู่ในรูปที่เป็น Particle ทำให้มีความยุ่งยากในขั้นตอนของการล้าง (Voller *et al.* 1978)

วัสดุที่ใช้ยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่นิยมใช้กันแพร่หลายคือพวกที่อยู่ในรูป Microplate แต่ก็ยังมีข้อเสียอย่างหนึ่งคือพื้นที่ในหลุมที่ใช้สำหรับการยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีนั้นมีน้อย ทำให้จำเป็นต้องใช้เวลานานสำหรับการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่าง ๆ โดยเฉพาะขั้นตอนของการอบกับสิ่งส่งตรวจเพื่อให้ได้การทดสอบที่มีความไว (Sensitivity) สูง ดังนั้นถ้าต้องการให้การทดสอบได้ผลเร็ว การเลือกใช้วัสดุที่มีพื้นผิวกว้างจะมีข้อได้เปรียบกว่า (Yolken. 1981) ซึ่งการจับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับผิววัสดุที่มีความผันแปรแตกต่างกันไปได้นับตั้งแต่ระหว่างเพลทที่ทำด้วยวัสดุต่างชนิดกัน หรือเพลทที่ทำด้วยวัสดุชนิดเดียวกันแต่ผลิตจากต่างโรงงานกัน หรือเพลทที่ผลิตออกมาจากโรงงานเดียวกันแต่ต่างรุ่นกัน หรือแม้กระทั่งเพลทในรุ่นเดียวกัน หรือภายในเพลทเดียวกันแต่ต่างหลุมกันก็พบความแตกต่างดังกล่าวนี้ได้ (Shekarchi *et al.* 1984) ดังนั้นการจะเลือกใช้เพลทชนิดใดก็แล้วแต่ระบบของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จะทำการทดสอบ แต่ควรจะคงใช้เพลทชนิดเดียวไปตลอดสำหรับระบบนั้น ๆ เพื่อให้การทดสอบนั้นมีมาตรฐานที่ดี

### 2.7.2.2 การยึดติดของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับผิววัสดุที่เป็นพลาสติก

แอนติเจนที่เป็น Polysaccharide จะยึดติดกับ Polystyrene plate ได้ไม่ค่อยดีเท่าโปรตีน มักจะต้องการกรรมวิธีในการปฏิบัติกับพื้นผิวพลาสติกเสียก่อน (Mc Laren *et al.*

1981) เช่น การใช้ Poly-L-lysine (Kelsoe and Ueller. 1978) หรืออาจจะให้แอนติเจนที่เป็น Polysaccharide นั้นทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีซึ่งเป็นโปรตีนเสียก่อน แล้วจึงนำไปยึดติดกับผิวพลาสติกอีกทีหนึ่ง (Barrett *et al.* 1983) ส่วนในกรณีของโปรตีนและกรดอะมิโน (Amino acid) ก็อาจทำให้ประสิทธิภาพในการยึดติดกับ Solid phase เพิ่มขึ้นได้โดยการใช้โปรตีนชนิดอื่น หรือใช้ Glutaraldehyde ช่วยในการนี้

ตามปกติการจับของโปรตีนกับผิวพลาสติกเกิดจากปฏิกิริยา Electrostatic, Electrokinetic และ Hydrophobic ซึ่งส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยา Hydrophobic (Avrameas. 1983) การยึดติดของโปรตีนกับผิวพลาสติกนี้สามารถมีผลทำให้โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลง (Denature) เกิดขึ้นได้ ในการเคลือบผิวพลาสติกด้วยแอนติเจน แอนติเจนจะเคลือบติดพลาสติกนั้นเป็นชั้นเดียว ปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เคลือบผิวพลาสติกและอัตราเร็วของกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับ Diffusion coefficient ของสารนั้น และขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายอย่าง ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวที่ใช้กับปริมาตรของสารที่นำมาเคลือบ ความเข้มข้นของสารที่ใช้เคลือบพื้นผิวนั้น รวมทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้สำหรับกระบวนการนี้ด้วย (Pesce *et al.* 1977)

ถึงแม้ว่าปริมาณของโปรตีนที่ติดกับพื้นผิวพลาสติกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ แต่เมื่อเทียบอัตราส่วนของโปรตีนที่ติดกับโปรตีนที่ใช้ พบว่าเมื่อใช้โปรตีนความเข้มข้นสูง อัตราส่วนของโปรตีนที่ติดกับผิวพลาสติกต่อโปรตีนที่ใช้มีค่าต่ำลง (Herrmann and Colins. 1976) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงมากเกินไป เพราะผลที่ได้จะไม่คุ้มกัน นอกจากนี้หากใช้โปรตีนในความเข้มข้นเกินกว่าจุดอิ่มตัวของการจับกับผิวพลาสติกแล้วยังเป็นการไม่ได้ประโยชน์อะไร (Pesce *et al.* 1977) โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จะนำมาเคลือบผิวพลาสติกอยู่ระหว่าง 1-10 µg/ml การใช้โปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะมีผลทำให้โปรตีนที่ติดกับผิวพลาสติกแล้วนั้นหลุดออกมาในภายหลังได้มากขึ้น (Engvall. 1980)

โดยทั่วไปแล้วการเคลือบผิวพลาสติกด้วยโปรตีนได้ผลดีพอเพียงเมื่อทำที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลานาน 2 ชั่วโมง หรืออาจทิ้งไว้จนถึงข้ามคืน (Hirschl *et al.* 1985) หรืออาจจะใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานข้ามคืน (Shekarchi *et al.* 1984) หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Burt *et al.* 1979) จนถึง 5 ชั่วโมง (Butler *et al.* 1978) หรือสามารถใช้เวลานั้นเพียง 30 นาที โดยการอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก็ทำให้ได้ผลการทดลองที่ดีพอ (Subba Rao *et al.* 1983)

โปรตีนที่ยึดติดกับผิวพลาสติกแล้วนี้สามารถหลุดออกมาได้ในภายหลัง (Desorption หรือ Detachment) ซึ่งการหลุดของโปรตีนนี้เกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอนของการทดสอบ ถึงแม้เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนแล้ว ก็ยังพบว่าแอนติเจนนั้นก็หลุดออกมาจากผิวพลาสติกได้อีก โดยตลอดกระบวนการจะมีแอนติเจนหลุดออกมาคิดเป็นร้อยละ 20-29 ของแอนติเจนทั้งหมดที่ติดกับ

ผิวพลาสติก (Lehtonen and Viljanen. 1980) การใช้ Glutaraldehyde ในการเตรียมผิว Polystyrene ก่อนการเคลือบด้วยแอนติเจนจะช่วยให้แอนติเจนติดได้แน่นขึ้น มีผลทำให้แอนติเจนที่หลุดออกมานั้นลดลงเหลือประมาณร้อยละ 10 (Suter. 1982) และในกรณีที่ใช้เซลล์เป็นแอนติเจนสำหรับเคลือบ Solid phase เพื่อการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์นั้น การทำให้เซลล์ติดกับ Solid phase อาจทำได้โดยใช้ Methanol เป็นสารที่ทำให้เซลล์ติดแน่นอยู่กับ Solid phase หรือปล่อยให้เซลล์แห้งติดกับผิวของ Plastic plate ที่ใช้เป็น Solid phase นั้นก็ได้

### 2.7.2.3 ขั้นตอนของการล้างในระหว่างการทดลอง

ในการทำอิมมูโนอัสซายจำเป็นต้องมีการล้างเอาตัวกระทำส่วนเกินออกในระหว่างการทดลองแต่ละขั้นตอน ตั้งแต่หลังจากเคลือบผิววัสดุด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดี หลังจากอบกับสิ่งส่งตรวจและคอนจูเกต ในการล้างจะต้องระวังอย่าให้มีการปนเปื้อนจากขั้นตอนหนึ่งไปยังอีกขั้นตอนหนึ่ง ถ้าวัสดุที่ใช้อยู่ในรูปเพลทการล้างจะทำได้ง่ายมาก เพียงคว้าเอาตัวกระทำนั้นออกให้หมด เติมน้ำละลายที่ใช้สำหรับล้างลงไปให้เต็มทุก ๆ หลุมในเพลท ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วคว้าเพลทเพื่อเทสารละลายนั้นทิ้งให้หมด แต่ในปัจจุบันนี้การล้างเพลทอาจทำได้สะดวกกว่านี้เนื่องจากมีเครื่องมือสำหรับล้างโดยอัตโนมัติ แต่ถ้า Solid phase ที่ใช้เป็น Particle จะต้องมีการปั่นให้ Particle นั้นนอนกันเสียก่อนจึงจะล้างได้ โดยทั่วไปแล้วการล้าง 3 ครั้ง ในระหว่างแต่ละขั้นตอนจะเพียงพอที่จะทำให้เกิดผลการทดลองที่ดี (Banchuin *et al.* 1984) แต่ในการทดสอบบางระบบจำเป็นต้องล้างหลายครั้งมากกว่านี้ เช่น อาจจะต้องล้าง 6 ครั้ง จึงจะสามารถทำให้การทดลองมี Background ต่ำ และได้ผลการทดสอบที่ดีได้ การล้างผิวพลาสติกที่มีโปรตีนติดอยู่นี้มีผลทำให้โปรตีนนั้นหลุดออกมาได้ ซึ่งถ้าล้างผิวพลาสติกนั้นมากพอเพียงจะทำให้เหลือโปรตีนคงติดอยู่บนผิวพลาสติกนั้นในปริมาณพอ ๆ กัน ไม่ว่าแต่เดิมจะมีโปรตีนติดอยู่มากหรือน้อยก็ตาม (Lehtonen and Viljanen. 1980)

การล้างผิววัสดุที่เคลือบด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดีในวิธีอิมมูโนอัสซายนี้ โดยทั่วไปใช้ Phosphate buffered saline (PBS) ซึ่งมี Tween 20 อยู่ด้วย หรืออาจใช้ Saline ซึ่งมี Tween 20 ผสมก็ได้ (Colwell *et al.* 1982) ความเข้มข้นของ Tween 20 ที่ผสมในสารละลายดังกล่าวอาจใช้ได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) จนถึงร้อยละ 0.5 (Banchuin *et al.* 1984)

Tween 20 เป็น Nonionic detergent ซึ่งไม่รบกวนปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แต่ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยา Hydrophobic ระหว่างโปรตีนที่เติมลงไปใหม่กับผิวพลาสติกที่ใช้ยึดจับกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีอยู่ก่อนแล้ว โดยไม่ทำลายการยึดจับแบบ Hydrophobic ระหว่างแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีอยู่แล้วในปริมาณที่จะมีผลเสียต่อการทดลอง ดังนั้นจึงเป็นการช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการยึดจับของโปรตีนอื่น ๆ กับผิวพลาสติกอย่างไม่จำเพาะในขั้นตอนต่อไปด้วย (Engvall. 1980)

#### 2.7.2.4 แอนติบอดีและสิ่งส่งตรวจ

ในการใช้วิธีอีไลซ่าเพื่อตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจนั้น ขั้นตอนที่สำคัญของการทดลองอย่างหนึ่งก็คือขั้นตอนของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะ

เมื่อใช้ Non-competitive ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจน ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (Antigen-antibody complex) ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง และ Affinity constant ของแอนติบอดีนั้น (Yolken. 1982) ปริมาณของแอนติเจนที่สามารถวัดได้จากการใช้การทดสอบนี้คือส่วนที่จับอยู่กับแอนติบอดีจำเพาะ ดังนั้นโดยส่วนใหญ่แล้วความไวของการทดสอบจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและ Avidity ของแอนติบอดีที่ใช้ โดยเฉพาะใน Non-competitive ELISA ที่จำเป็นต้องมีการล้างหลายขั้นตอน ดังนั้นการเลือกใช้แต่แอนติบอดีที่มี Avidity สูงจะช่วยให้การจับแอนติเจนเป็นไปได้ดีกว่า ซึ่งจะทำให้การทดสอบมีความไวสูง นอกจากนี้แอนติบอดีจำเพาะที่นำมาใช้ควรจะมี ความเข้มข้นพอสมควร และมีความจำเพาะมากพอด้วย เพราะไม่เช่นนั้นจะพบปฏิกิริยาข้าม (Cross-reaction) เกิดกับแอนติเจนชนิดอื่นได้ โดยทั่วไปแล้วแอนติบอดีที่นำมาใช้ในวิธีอีไลซ่าเพื่อการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะนี้ได้มาจากการฉีดสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์มาก ๆ เมื่อในซีรัมของสัตว์ทดลองนั้นมีแอนติบอดีตามต้องการแล้ว สามารถจะนำซีรัมนั้นมาใช้ในการทดสอบได้ที่ความเจือจางสูง ๆ เช่น อาจเจือจางได้ถึง 1:100,000 (Yolken *et al.* 1978)

ในกรณีที่ใช้ Indirect ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติเจน แอนติบอดีที่ใช้สำหรับยึดติดกับ Solid phase ควรจะเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง ส่วนแอนติบอดีตัวที่สองของระบบอาจใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะน้อยกว่าได้ เช่น อาจใช้ซีรัมของสัตว์ป่วยที่มีแอนติบอดีจำเพาะอยู่ในระดับสูงก็ได้ ส่วนใหญ่แล้วสามารถใช้ซีรัมที่มีแอนติบอดีในการยึดติดกับ Solid phase และใช้เป็นแอนติบอดีตัวที่สองของระบบได้เลยโดยไม่ต้องแยกเอาแต่ส่วน Immunoglobulin มาใช้ ซึ่งโดยทั่วไปซีรัมที่มีแอนติบอดีจำเพาะเนื่องจากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองซ้ำ ๆ จะมีความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบอยู่ระหว่าง 1:4,000 ถึง 1:100,000 ในขณะที่ซีรัมที่ได้จากสัตว์ป่วย เช่น สัตว์ป่วยโรคติดเชื้อซึ่งจะมีแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อต้นเหตุของโรคนั้นจะมีความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบอยู่ระหว่าง 1:400 ถึง 1:2,000 (Yolken. 1980) แต่หากใช้แอนติบอดีที่เตรียมขึ้นโดยการฉีดสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนที่ไม่บริสุทธิ์เพียงพอ จะมีผลทำให้การทดสอบเพื่อการตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจนั้นมีความจำเพาะน้อยลง นั่นคือการทดสอบอาจให้ผลบวกเท็จ ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจมีแอนติเจนชนิดอื่นด้วย วิธีแก้ไขคือนำแอนติบอดีนั้นมาดูดซึม (Absorb) ด้วยแอนติเจนชนิดอื่น ๆ ที่สามารถให้ปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีนี้ได้ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ หรืออาจทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ขึ้นด้วยการใช้ Affinity chromatography (Avrameas

*et al.* 1978) และอีกวิธีหนึ่งคือเลือกใช้ Monoclonal antibody สำหรับการทดสอบนั้น ๆ (Yolken. 1980)

#### 2.7.2.5 การป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะสำหรับระบบการทดลอง

ในวิธีอิลไลซันโปรตีนใด ๆ ก็ตามสามารถติดกับผิวพลาสติกที่ใช้เป็น Solid phase ได้ ดังนั้นในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ เช่น ซีรัม น้ำไขสันหลัง น้ำลาย เป็นต้น จะพบว่าปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะสำหรับระบบการทดลองนั้นเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการจับของโปรตีนในสิ่งส่งตรวจเหล่านั้นและของคอนจูเกตกับผิวพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง การเจือจางสิ่งส่งตรวจเหล่านั้นและคอนจูเกตด้วยสารละลายที่มี Tween 20 อยู่ด้วยจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะดังกล่าวได้บ้าง ความเข้มข้นของ Tween 20 ที่ใช้ได้ผลดีจะใช้ได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.05–0.15 (Hirschl *et al.* 1985) ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องเติมสารอื่น ๆ ลงไปในสารละลายที่มี Tween 20 ดังกล่าวแล้วนั้นด้วย เพื่อให้ไปจับกับผิวพลาสติกในตำแหน่งที่ว่างไม่มีแอนติเจนหรือแอนติบอดียึดติดอยู่ เป็นการป้องกันไม่ให้โปรตีนในสิ่งส่งตรวจหรือคอนจูเกตไปจับตรงตำแหน่งนั้น ๆ เช่น Human serum albumin, Ethanolamine, Bovine serum albumin (BSA), Fetal calf serum, Gelatin หรือ Normal animal serum เป็นต้น (Meurman. 1983)

Immunoglobulin สามารถจับกับเอนไซม์ได้หลายชนิดอย่างไม่จำเพาะ เช่น Pepsinogen, Hyaluronidase และ Trypsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเตรียมแอนติเจนบางอย่าง ดังนั้นถ้าในวิธีอิลไลซันใช้แอนติเจนที่เตรียมขึ้นโดยวิธีซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์เหล่านี้ร่วมด้วย ก็อาจพบปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะสำหรับระบบการทดลองนั้นเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการจับของ Immunoglobulin ในสิ่งส่งตรวจกับเอนไซม์ที่ใช้เตรียมแอนติเจน

#### 2.7.2.6 คอนจูเกต (Conjugate)

เอนไซม์ที่ตีเหมาะสำหรับใช้ติดฉลากควรเป็นเอนไซม์ที่มีความคงทนและมีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง (Highly reactive) สามารถนำมาใช้ในการติดฉลากได้โดยที่เอนไซม์นั้นและแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้จะมีการสูญเสียหน้าที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด คอนจูเกตที่เตรียมขึ้นจากเอนไซม์นั้นจะต้องมีความคงทน นอกจากนี้เอนไซม์ที่จะนำมาใช้ควรเป็นชนิดที่ไม่มีอยู่ในสารน้ำต่าง ๆ ของร่างกาย ราคาคง ง่าย การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับซับสเตรตทำได้ง่าย อีกประการหนึ่งก็คือทั้งเอนไซม์ ซับสเตรตของเอนไซม์นั้น รวมทั้ง Cofactor ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพด้วย (O'Sullivan and Marks. 1981) ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน ได้แก่ Alkaline phosphatase, Horseradish peroxidase และ  $\beta$ -D-galactosidase

การจะเลือกเอนไซม์ชนิดใดสำหรับใช้ในการทดสอบระบบไหนต้องคำนึงถึงว่า ในสิ่งส่งตรวจที่นำมาใช้ในระบบไม่ควรมีส่วนซึ่งจะรบกวนปฏิกิริยาของเอนไซม์ หรือการวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้ โดยเฉพาะเมื่อจะทำการทดสอบซึ่งจำเป็นต้องอบคอนจูเกตร่วมกับสิ่งส่งตรวจในกรณีของ Competitive ELISA หรือกรณีของ Homogeneous EIA สำหรับกรณีของ Non-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

competitive ELISA จะมีการแยกเอาสิ่งส่งตรวจออกจากระบบการทดสอบก่อนที่จะเติมคอนจูเกตลงไปนั้น การรบกวนดังกล่าวจะมีผลได้น้อยกว่า (O'Sullivan *et al.* 1979) ซึ่งคอนจูเกตใช้กันแพร่หลายคือ Enzyme-labelled immunoglobulin

วิธีการทำคอนจูเกตที่ถือว่าเป็นวิธีการที่ดีที่สุดคือวิธีที่ต้องไม่ลำบากยุ่งยาก ไม่มีผลเสียต่อการทำปฏิกิริยาของทั้งเอนไซม์และแอนติบอดี สามารถเชื่อมโยงเอนไซม์เข้ากับแอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้การเชื่อมโยงระหว่างเอนไซม์กับเอนไซม์ หรือแอนติบอดีกับแอนติบอดีเกิดขึ้นได้น้อย ไม่ทำให้คอนจูเกตเกิดมี Polymerization เป็นวิธีที่สามารถดัดแปลงได้ตามความเหมาะสม และทำให้ได้คอนจูเกตที่มีส่วนประกอบซึ่งมีลักษณะเหมือน ๆ กัน (O'Sullivan and Marks. 1981) ซึ่งในการเตรียมคอนจูเกตอาจมีแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่เป็นอิสระเหลืออยู่ด้วย เมื่อนำไปใช้ในการทดสอบจะมีผลทำให้ปฏิกิริยาของคอนจูเกตเกิดได้น้อยลง ดังนั้นจึงควรลดปริมาณแอนติบอดีอิสระที่เหลืออยู่โดยการเลือกวิธีที่ดีที่สุดสำหรับเตรียมคอนจูเกตและโดยการทำให้คอนจูเกตบริสุทธิ์ และการมีเอนไซม์อิสระเหลืออยู่เมื่อเตรียมคอนจูเกตก็จะมีผลเสียเช่นกัน โดยจะเพิ่ม Background ให้สูงขึ้นในวิธีอิลูซ่าซึ่งสามารถใช้วิธี Gel filtration ในการแยกเอนไซม์อิสระออกและทำให้คอนจูเกตบริสุทธิ์ (Engvall. 1980)

#### 2.7.2.7 ซับสเตรต (Substrate)

ซับสเตรตซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับนำมาใช้ในวิธีอิลูซ่าคือซับสเตรตที่จะช่วยให้สามารถตรวจเอนไซม์ในคอนจูเกตได้ไว ส่วนใหญ่จะใช้ Chromogenic substrate ซึ่งเดิมไม่มีสี และเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วจะให้สีเข้ม ซับสเตรตที่ดีจะต้องให้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้หมด และมี Extinction coefficient สูง คือแต่ละหน่วยของซับสเตรตที่เปลี่ยนแปลงนั้นจะเกิดสีเข้มชัดเจน นอกจากนี้ควรมีราคาถูก ปลอดภัย และใช้ง่าย (Layton and Smithyman. 1983)

Chromogenic substrate ของเอนไซม์ Alkaline phosphatase คือ P-nitrophenyl-phosphate สามารถนำมาใช้ได้สะดวกเพราะมีลักษณะเป็นเม็ด เมื่อใช้ในการทดสอบก็จะนำมาละลายในบัฟเฟอร์ไม่จำเป็นต้องมีการชั่งวัดปริมาณ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังจากการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วละลายได้หมด การหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับซับสเตรตนี้ใช้ Sodium hydroxide เข้มข้น สีเหลืองที่เกิดขึ้นจะมีความคงที่มากหลังจากหยุดปฏิกิริยาแล้ว โดยสามารถดูความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าได้ หรือใช้วัดความเข้มของสีด้วย Spectrophotometer ก็ได้

ในการใช้เอนไซม์  $\beta$ -D-galactosidase มี Chromogenic substrate คือ O-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์สีเหลือง และการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับซับสเตรตใช้ Sodium carbonate (Porstmann *et al.* 1985)

Chromogenic substrate ที่ใช้กับเอนไซม์ Horseradish peroxidase มีหลายชนิด ได้แก่ Tetramethylbenzidine (TMB) ให้สีฟ้า, O-phenylenediamine (OPD) ให้สีส้ม,

O-tolidine ให้สีน้ำตาล, 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) ให้สีแดง, O-dianisidine ให้สีส้มเหลือง, 5-aminosalicylic acid (5-AS) ให้สีน้ำตาลปนม่วงหรือดำ เป็นต้น

### 2.7.3 ชุดตรวจอีไลซ่าทางการค้าสำหรับตรวจโรคติดเชื้อ PCV2

2.7.3.1 LSY-30007 Porcine Circovirus (PCV2) (GreenSpring; China) ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วยวิธีอินดิเรคทีอีไลซ่า (Indirect ELISA)

2.7.3.2 Pig Circovirus Type 2 Antibody (Anti-PCV2) ELISA Kit (Abbexa; UK) ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วยวิธีอินดิเรคทีอีไลซ่า (Indirect ELISA)

2.7.3.3 Porcine Circovirus Type II (PCV2) Antibody ELISA Kit (NBGen; China) ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วยวิธีอินดิเรคทีอีไลซ่า (Indirect ELISA) โดยใช้ TMB substrate

2.7.3.4 VDPro<sup>®</sup> PCV2 AB ELISA (Median Diagnostics; Korea) ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วยวิธีอินดิเรคทีอีไลซ่า (Indirect ELISA) โดยใช้คอนจูเกต HRPO Anti-swine IgG และ TMB substrate

2.7.3.5 INgezim<sup>®</sup> CIRCO IgG (Eurofins-INGENASA; Spain) ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วยวิธีอินดิเรคทีอีไลซ่า (Indirect ELISA) โดยใช้แอนติเจน VP2 recombinant protein และคอนจูเกตที่เป็น Monoclonal antibody (Mab) ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของสุกร (Peroxidase, AcM-PO) และ TMB substrate

2.7.3.6 Porcine Circovirus type2 Antibody test kit (SK105; BioChek; UK) ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วยวิธีอินดิเรคทีอีไลซ่า (Indirect ELISA) โดยใช้คอนจูเกต Anti-swine/Alkaline phosphatase และซับสเตรต p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP)

2.7.3.7 SERELISA<sup>®</sup> PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics; USA) ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วย Blocking ELISA โดยใช้คอนจูเกต Anti-PCV2 Mab/peroxidase (conj-HRP)

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ทำการรวบรวมตัวอย่างเลือดสุกรจากหลากหลายฟาร์มทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ ที่คาดว่าจะมีหรือไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ซึ่งประกอบไปด้วยสุกรทั้งที่มีการทำวัคซีนและยังไม่ได้รับการทำวัคซีนต่อโรค PCV2 เป็นสุกรที่มีกลุ่มอาการทางคลินิกและที่ไม่มีกลุ่มอาการทางคลินิกของโรค PCV2 และที่หลากหลายช่วงอายุ ได้แก่ สุกรอนุบาล สุกรขุน สุกรสาวทดแทน และแม่สุกร เป็นต้น แล้วนำมาทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge (Combi R515; Hanil; Korea) เพื่อแยกซีรัมด้วยความเร็วประมาณ  $4,434 \times g$  เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสซึ่งเป็นตัวอย่างซีรัมเก็บในหลอด Freeze tube ขนาด 1.8 มล. (Membrane Solutions; China) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส ซึ่งตัวอย่างซีรัมที่ได้นี้เป็นซีรัมจากโครงการวิจัยซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เลขที่หนังสือรับรอง CC-KMITL-/2021/021 ทั้งนี้เพื่อนำตัวอย่างซีรัมดังกล่าวมาใช้ในการตรวจด้วยวิธีอินโดเรคทีโอไลซ่าด้วยชุดตรวจทางการค้า Porcine Circovirus type2 Antibody test kit (SK105; BioChek; UK) เพื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีในแต่ละตัวอย่างและเก็บไว้เป็นค่าอ้างอิง (Reference method) แล้วจึงนำตัวอย่างเดียวกันนั้นมาตรวจด้วยชุดตรวจอินโดเรคทีโอไลซ่าที่พัฒนาขึ้น (I-ELISA) เพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดตรวจทางการค้ากับชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นต่อไป

### 3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

#### 3.2.1 วัคซีนที่ใช้ในการสกัดแยกโปรตีน ORF2

3.2.1.1 วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ชนิดชัษยูนิต (PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT; Komipharm International Co. Ltd.; Korea)

ส่วนประกอบใน 1 มล. ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจนไม่น้อยกว่า 200 ไมโครกรัม และคาร์โบเมอร์ (Carbomer) 4 มก./มล.

3.2.1.2 วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ชนิดชัษยูนิต (PRO-VAC CIRCOMASTER; Komipharm International Co. Ltd.; Korea)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบใน 1 มล. ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจน 100 ไมโครกรัม และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Aluminium hydroxide) 2 มก./มล.

3.2.1.3 วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ชนิดชัษุณิต (IngelvacCircoFLEX; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.; USA)

ส่วนประกอบใน 1 มล. ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจนไม่น้อยกว่า 1 RP. (1.0–3.75) และคาร์โบเมอร์ 1 มก./มล.

3.2.1.4 วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ชนิดชัษุณิต (Circumvent PCV; Intervet Inc.; USA)

ส่วนประกอบใน 2 มล. ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจนไม่น้อยกว่า 1 RP. ในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil in water emulsion; O/W)

### 3.2.2 การสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีน

3.2.2.1 สารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffered Saline; PBS)

3.2.2.2 Microsep Advance Centrifugal Devices with Omega Membrane 3K, gray (100/pkg) (Pall; USA)

3.2.2.3 Micropipette (Scilogex; USA)

3.2.2.4 Pipette tips (Kirgen; China)

3.2.2.5 Refrigerated centrifuge (Combi R515; Hanit; Korea)

### 3.2.3 การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford

3.2.3.1 Bovine serum albumin (BSA) (Albumin standard; Thermo Fisher Scientific; USA)

3.2.3.2 น้ำบริสุทธิ์ Type 1 (Type 1 ultrapure water)

3.2.3.3 Coomassie (Bradford) protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific; USA)

3.2.3.4 Micropipette (Scilogex; USA)

3.2.3.5 Pipette tips

3.2.3.6 Microplate reader (AMR-100; Allsheng; China)

3.2.3.7 Microtube 1.5 ml

3.2.3.8 Sterilin clear microtiter plates (Thermo Fisher Scientific; USA)

3.2.3.9 Biohazard safety cabinet (VS-1400LSN; Vision Scientific; Korea)

3.2.3.10 Vortex mixer (Labnet; USA)

3.2.3.11 Microplate mixer (MX-M; DLAB; China)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.4 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Native Polyacrylamide Gel

#### Electrophoresis (Native PAGE)

- 3.2.4.1 น้ำบริสุทธิ์ Type 1 (Type 1 ultrapure water)
- 3.2.4.2 20X NativePAGE running buffer (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.3 20X NativePAGE cathode additive (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.4 NativePAGE sample buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.5 NativePAGE 5% G-250 sample additive (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.6 NativePAGE 4-16% bis-tris gel (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.7 Mini gel tank (Thermo Fisher Scientific; Israel)
- 3.2.4.8 Mini pro 500V power supply (Mini-500; Major Science; USA)
- 3.2.4.9 Imperial protein stain (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.10 NativeMark unstained protein standard (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.11 Gel knife (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.4.12 Micropipette (Axygen; USA)
- 3.2.4.13 Pipette tips
- 3.2.4.14 Microtube 1.5 ml
- 3.2.4.15 3D shaker (SK-D1807-S; DLAB; China)
- 3.2.4.16 กล่องพลาสติกสำหรับย้อมและล้างสีเจด

### 3.2.5 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

- 3.2.5.1 น้ำบริสุทธิ์ Type 1 (Type 1 ultrapure water)
- 3.2.5.2 20X NuPAGE MES SDS running buffer (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.5.3 NuPAGE LDS sample buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.5.4 NuPAGE reducing agent (10X) (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.5.5 NuPAGE 4-12% bis-tris gel (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.5.6 Mini gel tank (Thermo Fisher Scientific; Israel)
- 3.2.5.7 Mini Pro 500V Power Supply (Mini-500; Major Science; USA)
- 3.2.5.8 Gel knife (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.5.9 Imperial protein stain (Thermo Fisher Scientific; USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.5.10 PageRuler plus prestained protein ladder (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.5.11 Dry bath incubator (MK2000-1; Allsheng; China)
- 3.2.5.12 Micropipette (Axygen; USA)
- 3.2.5.13 Pipette tips
- 3.2.5.14 Microtube 1.5 ml
- 3.2.5.15 3D shaker (SK-D1807-S; DLAB; China)
- 3.2.5.16 กล่องพลาสติกสำหรับย้อมและล้างสีเจล

### 3.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot

- 3.2.6.1 Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane, 0.45  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.6.2 100% Methanol
- 3.2.6.3 น้ำบริสุทธิ์ Type 1 (Type 1 ultrapure water)
- 3.2.6.4 Micropipette (Scilogex; USA)
- 3.2.6.5 Pipette tips
- 3.2.6.6 SM Growth powder (Himedia; India)
- 3.2.6.7 PBS
- 3.2.6.8 Chem-Supply™ Tween 20 (Polysorbate 20) (Chem-Supply; Australia)
- 3.2.6.9 Rabbit anti-pig IgG (H+L) secondary antibody HRP (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.6.10 Pierce™ 1-Step Ultra TMB Blotting Solution (37574; Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.6.11 3D shaker (SK-D1807-S; DLAB; China)
- 3.2.6.12 ถังพลาสติกใส
- 3.2.6.13 กล่องพลาสติก

### 3.2.7 การตรวจอีไลซ่าด้วยชุดตรวจทางการค้า Porcine Circovirus type2 Antibody test kit (SK105; BioChek; UK)

- 3.2.7.1 Coated plates (Inactivated PCV2 antigen)
- 3.2.7.2 Conjugate reagent (Anti swine: Alkaline Phosphatase ใน Tris buffer)
- 3.2.7.3 Substrate tablets (p-Nitrophenyl Phosphate, pNPP)
- 3.2.7.4 Substrate buffer (Diethanolamine buffer)
- 3.2.7.5 Stop solution (Sodium Hydroxide ใน Diethanolamine buffer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.7.6 Sample diluent reagent
- 3.2.7.7 Wash buffer (ผง PBS-Tween)
- 3.2.7.8 Negative control
- 3.2.7.9 Positive control

### 3.2.8 การพัฒนาชุดตรวจอินโดเรคทีไลซ่า (I-ELISA)

- 3.2.8.1 8 channel pipette (Scilogex; USA)
- 3.2.8.2 Pipette tips
- 3.2.8.3 Micropipette (Scilogex; USA)
- 3.2.8.4 น้ำบริสุทธิ์ Type 1 (Type 1 ultrapure water)
- 3.2.8.5 Microplate reader (AMR-100; Allsheng; China)
- 3.2.8.6 Microplate washer (APW-200; Allsheng; China)
- 3.2.8.7 Microplate mixer (MX-M; DLAB; China)
- 3.2.8.8 Immunoplate 96 หลุม (SPL Life Sciences; Korea)
- 3.2.8.9 ตู้ป้อนเชื้อ (MMM Medcenter Incucell V 222 Comfort Incubator; Fisher Scientific; Sweden)
- 3.2.8.10 ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (Meditech Center; Thailand)
- 3.2.8.11 Biohazard safety cabinet (VS-1400LSN; Vision Scientific; Korea)
- 3.2.8.12 Vortex mixer (Labnet; USA)
- 3.2.8.13 Rabbit anti-pig IgG (H+L) secondary antibody HRP (Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.8.14 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (34028; Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.8.15 Stop Solution (N600; Thermo Fisher Scientific; USA)
- 3.2.8.16 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (NFTG-4418; Natural; Thailand)
- 3.2.8.17 Chem-Supply™ Tween 20 (Polysorbate 20) (Chem-Supply; Australia)
- 3.2.8.18 PBS
- 3.2.8.19 SM Growth powder (Himedia; India)
- 3.2.8.20 กรดซัลฟิวริก 95-97% (Merck; Germany)
- 3.2.8.21 Bovine serum albumin (BSA) 96% (Sigma-Aldrich; USA)
- 3.2.8.22 Centrifuge tube 15 ml และ 50 ml
- 3.2.8.23 Microtube 1.5 ml
- 3.2.8.24 ขวดเก็บสารเคมี ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.8.25 พลาสติกแรป

## 3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

การดำเนินการทดลองประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

### 3.3.1 การเตรียมแอนติเจน

3.3.1.1 การสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีนเพื่อเตรียมแอนติเจนบริสุทธิ์ (Pall. 2014)

(1) นำสารละลาย PBS ปริมาณ 4 มล. ใส่ลงใน Microsep 3K แล้วทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วย Refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 6,500 ×g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อชะล้างและเปิดรูกรองของ Microsep 3K ก่อนที่จะทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อสกัดแยกโปรตีน

(2) นำวัคซีนที่จะใช้ในการเตรียมแอนติเจนทั้ง 4 ชนิด ปริมาณชนิดละ 4 มล. ใส่ลงใน Microsep 3K แล้วทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 6,500 ×g เป็นเวลา 30 นาที

(3) เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จนำส่วนที่กรองลงมาด้านล่าง (Filtrate) ซึ่งเป็นส่วนของสารละลายส่วนเกินที่ไม่ต้องการทิ้ง แล้วทำการเติมสารละลาย PBS ลงใน Microsep 3K ด้านบนตัวกรองให้มีปริมาณ 4 มล. เท้าเติม (เติมเท่ากับปริมาณสารละลายที่กรองลงมาในแต่ละครั้ง) เพื่อเป็นการชะล้างสารละลายส่วนเกินและสื่อที่ใช้ในการผลิตวัคซีนออกให้มากที่สุด

(4) ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 6,500 ×g เป็นเวลา 30 นาที และทำตามขั้นตอนที่ 3 อีกทั้งหมด 3 ครั้ง

(5) เมื่อปั่นเหวี่ยงตกตะกอนครบทั้งหมด 4 ครั้ง นำ Microsep 3K มาเก็บสารละลายโปรตีนซึ่งเป็นส่วนของแอนติเจนจากส่วนที่กักอยู่ด้านบนตัวกรอง (Retentate) เพื่อนำไปวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่ได้ และปรับปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายก่อนจะนำไปใช้เคลือบเพลทอีไลซ่าต่อไป

3.3.1.2 การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford (Bradford. 1976)

(1) เตรียมสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐาน โดยนำสารละลาย BSA ที่บรรจุในหลอดแก้วมาเจือจางตามลำดับความเข้มข้นลงในไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. โดยทำการเจือจาง BSA ด้วยน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ตามลำดับความเข้มข้นดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐาน (ช่วงความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่ 100-1,500 µg/ml)

หลอด	ปริมาณของน้ำบริสุทธิ์ Type 1 (µl)	ปริมาณของ BSA (µl)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ BSA (µg/ml)
A	0	30 จากหลอด BSA	2,000
B	12.5	37.5 จากหลอด BSA	1,500
C	32.5	32.5 จากหลอด BSA	1,000
D	17.5	17.5 จากหลอด B	750
E	32.5	32.5 จากหลอด C	500
F	32.5	32.5 จากหลอด E	250
G	32.5	32.5 จากหลอด F	125
H	40	10 จากหลอด G	25
I	40	0	0 = Blank

ที่มา : Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific; USA)

(2) เตรียมสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น และตัวอย่างวัคซีนที่ผ่านการสกัดแยกโปรตีน ORF2 เพื่อให้บริสุทธิ์แล้ว (แอนติเจน) ที่ต้องการวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน มาเติมลงใน Sterilin clear microtiter plates ตัวอย่างหลุมละ ปริมาณ 10 µl

(3) เติม Coomassie (Bradford) protein assay reagent ลงในทุกหลุมที่มีสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐานและตัวอย่างแอนติเจนที่เติมไว้แล้วในข้อ 2 บน Sterilin clear microtiter plates ปริมาณหลุมละ 250 µl และผสมให้เข้ากันด้วย Microplate mixer เป็นเวลา 30 วินาที

(4) บ่มสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐานและตัวอย่างแอนติเจนทั้งหมดที่จะทำการวัดปริมาณโปรตีนในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

(5) นำ Sterilin clear microtiter plates ที่ได้มาเข้าเครื่อง Microplate reader เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 595 nm

(6) เตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยนำค่า OD ของสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นที่ได้มาพล็อตกราฟด้วยโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อนำไปใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณโปรตีนของตัวอย่างแอนติเจนต่อไป

(7) เมื่อได้กราฟมาตรฐานของโปรตีนแล้ว นำค่า OD ของตัวอย่างแอนติเจนที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีนมาแทนค่าลงในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานดังกล่าว เพื่อให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทราบค่าปริมาณโปรตีนของแอนติเจนก่อนนำไปปรับปริมาณความเข้มข้นเพื่อนำไปใช้ในการเคลือบเพลท

### 3.3.2 การทดสอบความบริสุทธิ์และการหามวลโมเลกุลของโปรตีนแอนติเจน

#### 3.3.2.1 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Native PAGE (Invitrogen. 2019)

(1) เตรียม Anode buffer โดยเติม 20X NativePAGE running buffer ปริมาณ 50 มล. ลงในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาณ 950 มล. (เตรียม 1,000 มล.) แล้วผสมให้เข้ากัน

(2) เตรียม Dark blue cathode buffer โดยเติม 20X NativePAGE running buffer ปริมาณ 50 มล. และ 20X NativePAGE cathode additive ปริมาณ 50 มล. ลงในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาณ 900 มล. (เตรียม 1,000 มล.) แล้วผสมให้เข้ากัน

(3) เตรียมตัวอย่างโดยผสมเข้ากับสารที่มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.2 (ไม่ต้องให้ความร้อนกับตัวอย่าง)

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบและปริมาณในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการรัน Native PAGE

ส่วนประกอบ	ปริมาณสำหรับ 10 $\mu$ l	ปริมาณสำหรับ 20 $\mu$ l
NativePAGE sample buffer (4X)	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
NativePAGE 5% G-250 sample additive	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
ตัวอย่างแอนติเจน	6.5 $\mu$ l	16.5 $\mu$ l

ที่มา : NativePAGE Novex Bis-Tris Gels (Thermo Fisher Scientific; USA)

(4) เตรียมเจลโดยนำ NativePAGE 4-16% bis-tris gel ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้คลายความเย็นก่อนสักพัก จากนั้นนำหัวด้านบนเจลออก ล้างเศษเจลออกและล้างช่องสำหรับหยอดตัวอย่างแต่ละช่องด้วย Anode buffer (คอยเติมน้ำให้แต่ละช่องแห้ง)

(5) นำเทปขาวสีชาวด้านล่างเจลออก วางแผ่นเจลลงใน Mini gel tank แล้วล็อกให้แน่นเข้าที่ จากนั้นเติม Dark blue cathode buffer ที่ช่องด้านหน้าเจลในปริมาณที่ยังไม่ท่วมบั้งช่องหยอดตัวอย่าง และเติม Anode buffer ที่ช่องด้านหลังเจลในปริมาณเท่า ๆ กัน

(6) หยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในช่องสำหรับใส่ตัวอย่างปริมาณช่องละ 10-20  $\mu$ l จากนั้นหยอด NativeMark unstained protein standard ปริมาณ 5  $\mu$ l เพื่อเป็นแถบโปรตีนมาตรฐานสำหรับใช้เทียบ

(7) เติม Dark blue cathode buffer และ Anode buffer จนถึงเส้นที่ Mini gel tank กำหนดไว้

(8) ประกอบตัว Mini gel tank ให้เรียบร้อย และต่อเข้ากับ Mini pro 500V power supply ตั้งค่าแรงดันไฟฟ้าที่ 150 V และใช้เวลารันทั้งหมด 90 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(9) เมื่อรันจนครบเวลาเสร็จเรียบร้อย นำเจลออกจาก Mini gel tank แล้วใช้ Gel knife แคะเจลออกจากแม่พิมพ์ลงมาใส่ในภาชนะที่ใส่น้ำบริสุทธิ์ Type 1 ไว้ให้ท่วมเจล จากนั้นทำการเขย่าด้วย 3D shaker เป็นเวลา 5 นาที แล้วเปลี่ยนน้ำ ทำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเศษเจลและสีหลังการรัน และเพื่อเพิ่ม Sensitivity และลดการเกิด Background จากการรัน

(10) ย้อมสีเจลด้วย Imperial protein stain โดยเติมลงในภาชนะให้ท่วมเจล แล้วทำการย้อมทิ้งไว้ข้ามคืน (ประมาณ 8 ชั่วโมง)

(11) เทสีย้อม Imperial protein stain ทิ้ง แล้วเติมน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ให้ท่วมเจลและเขย่าด้วย 3D shaker เพื่อเป็นการล้างสีย้อม เปลี่ยนน้ำทุกชั่วโมง ล้างไปเรื่อย ๆ จนกว่าพื้นหลังจะใสหรือเห็นแถบของโปรตีนได้ชัดเจนตามที่ต้องการ (ประมาณ 8 ชั่วโมง)

(12) เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากการรันตัวอย่างกับแถบโปรตีนมาตรฐาน เพื่อดูมวลโมเลกุลของแอนติเจนว่ามีขนาดประมาณ 30 kDa ตามที่ต้องการหรือไม่และบันทึกภาพ

### 3.3.2.2 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี SDS-PAGE (Invitrogen, 2019)

(1) เตรียม 1X SDS running buffer โดยเติม 20X NuPAGE MES SDS running buffer ปริมาณ 50 มล. ลงในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาณ 950 มล. (เตรียม 1,000 มล.) แล้วผสมให้เข้ากัน

(2) เตรียมตัวอย่างโดยผสมเข้ากับสารที่มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.3

#### ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบและปริมาณในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการรัน SDS-PAGE

ส่วนประกอบ	ปริมาณสำหรับ 10 $\mu$ l	ปริมาณสำหรับ 15 $\mu$ l
NuPAGE LDS sample buffer (4X)	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
NuPAGE reducing agent (10X)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
ตัวอย่างแอนติเจน	6.5 $\mu$ l	11.5 $\mu$ l

ที่มา : NuPAGE Bis-Tris Mini Gels (Thermo Fisher Scientific; USA)

(3) หลังจากเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้วนำไปต้มให้ความร้อนด้วย Dry bath incubator ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) เตรียมเจลโดยนำ NuPAGE 4-12% bis-tris gel ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้คลายความเย็นก่อนสักพัก จากนั้นนำหัวด้านบนเจลออก ล้างเศษเจลออกและล้างช่องสำหรับหยอดตัวอย่างแต่ละช่องด้วย 1X SDS running buffer (คอยเติมอย่าให้แต่ละช่องแห้ง)

(5) นำเทปกาวสีขาวด้านล่างเจลออก วางแผ่นเจลลงใน Mini gel tank แล้วล็อกให้แน่นเข้าที่ จากนั้นเติม 1X SDS running buffer ที่ช่องด้านหน้าเจลในปริมาณที่ยังไม่ท่วมบั้งช่องหยอดตัวอย่าง และที่ช่องด้านหลังเจลในปริมาณเท่า ๆ กัน

(6) หยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในช่องสำหรับใส่ตัวอย่างปริมาณช่องละ 10-15  $\mu$ l จากนั้นหยอด PageRuler plus prestained protein ladder ปริมาณ 5  $\mu$ l เพื่อเป็นแถบโปรตีนมาตรฐานสำหรับใช้เทียบ

(7) เติม 1X SDS running buffer ทั้งในช่องด้านหน้าและช่องด้านหลัง เจลจนถึงเส้นที่ Mini gel tank กำหนดไว้

(8) ประกอบตัว Mini gel tank ให้เรียบร้อย และต่อเข้ากับ Mini pro 500V power supply ตั้งค่าแรงดันไฟฟ้าที่ 200 V และใช้เวลารันทั้งหมด 35 นาที

(9) เมื่อรันจนครบเวลาเสร็จเรียบร้อย นำเจลออกจาก Mini gel tank แล้วใช้ Gel knife แคะเจลออกจากแม่พิมพ์ลงมาใส่ในภาชนะที่ใส่น้ำบริสุทธิ์ Type 1 ไว้ให้ท่วมเจล จากนั้นทำการเขย่าด้วย 3D shaker เป็นเวลา 5 นาที แล้วเปลี่ยนน้ำ ทำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเศษเจลและสีหลังการรัน และเพื่อเพิ่ม Sensitivity และลดการเกิด Background จากการรัน

(10) ย้อมสีเจลด้วย Imperial protein stain โดยเติมลงในภาชนะให้ท่วมเจล และเขย่าด้วย 3D shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(11) เทสีย้อม Imperial protein stain ทิ้ง แล้วเติมน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ให้ท่วมเจลและเขย่าด้วย 3D shaker เพื่อเป็นการล้างสีย้อม เปลี่ยนน้ำทุกชั่วโมง ล้างไปเรื่อย ๆ จนกว่าพื้นหลังจะใสหรือเห็นแถบของโปรตีนได้ชัดเจนตามที่ต้องการ (หรือแช่ในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ทิ้งไว้ประมาณ 8 ชั่วโมง)

(12) เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากการรันตัวอย่างกับแถบโปรตีนมาตรฐานเพื่อดูมวลโมเลกุลของแอนติเจนว่ามีขนาดประมาณ 30 kDa ตามที่ต้องการหรือไม่และบันทึกภาพ

### 3.3.2.2 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot

(1) กำหนดจุดและบริเวณของตัวอย่างบนแผ่น PVDF membrane ให้ชัดเจนช่องละขนาดประมาณ 1x1 ซม.

(2) นำ PVDF membrane แช่ใน 100% methanol เป็นเวลาประมาณ 10-15 วินาที เพื่อกระตุ้นการทำงานของ PVDF membrane จากนั้นแช่ในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 เป็นเวลา 2 นาที และแช่ใน PBS-T เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับสมดุลของ PVDF membrane (ห้ามให้ PVDF membrane แห้ง)

(3) นำแอนติเจนจากวัคซีนชนิดที่ผ่านการทดลองและคัดเลือกมาแล้วว่ามีเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบทางภูมิคุ้มกัน และได้ผ่านการสกัดแยกเพื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเจือจางที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1  $\mu$ g/ml แล้วหยดลงบน PVDF membrane จุดละ 2  $\mu$ l ในบริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแอนติเจนแห้งติดกับ PVDF membrane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) ป้องกันการเกิด Non-specific ของโปรตีนอื่น ๆ ที่จะเข้ามาจับกับ PVDF membrane โดยแช่ใน 5% Skim milk ใน PBS-T และเขย่าบน 3D shaker เป็นเวลา 60 นาที

(5) เท 5% Skim milk ใน PBS-T ออก แล้วบ่มด้วยตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวก (Primary antibody) ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:100, 1:200 และ 1:300 และสารละลาย PBS และน้ำบริสุทธิ์ Type 1 เพื่อใช้เป็น Negative control เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(6) ล้างด้วย PBS-T โดยเขย่าบน 3D shaker ทั้งหมด 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วบ่มด้วย Rabbit anti-pig IgG (H+L) secondary antibody HRP ที่เจือจางใน PBS-T 1:3,000 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(7) ล้างด้วย PBS-T โดยเขย่าบน 3D shaker ทั้งหมด 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วบ่มด้วย TMB Blotting Solution

(8) สังเกตผลบวกจากสีที่เกิดขึ้น ซึ่งจะแสดงว่าเกิดการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทำการทดสอบ

### 3.3.3 การเตรียมชุดตรวจอินไคเร็คอีไลซ่า

#### 3.3.3.1 วิธีการตรวจอินไคเร็คอีไลซ่าด้วยชุดตรวจทางการค้า (BioChek. 1997)

(1) เตรียม Wash buffer โดยนำ ผง PBS-T ที่ให้มากับชุดตรวจ 1 ซอง ใส่ในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาณ 1 ลิตร และผสมให้เข้ากัน

(2) เตรียม Substrate reagent โดยนำเม็ด pNPP ที่ให้มากับชุดตรวจ 1 เม็ด (ห้ามหยิบด้วยมือเปล่า) ละลายใน Substrate buffer ของชุดตรวจ ในปริมาณ 5.5 มล. ผสมกันจนกระทั่งละลายหมด (เก็บไว้ให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อละลายใช้แล้วสามารถเก็บได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์)

(3) นำเพลทของชุดตรวจที่ผ่านการเคลือบแอนติเจนเรียบร้อยแล้วออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(4) ใส่ Negative control และ Positive control หลุมละ 100  $\mu$ l อย่างละ 2 หลุม (โดยไม่ต้องเจือจาง)

(5) ทำการเจือจางตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจในแต่ละหลุมด้วย Sample diluent reagent ที่อัตราส่วน 1:50 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วย Microplate mixer ประมาณ 30-60 วินาที ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรป

(6) เทสารออกจากหลุม แล้วล้างด้วย Wash buffer ปริมาณหลุมละ 350  $\mu$ l ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Microplate washer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(7) เติม Conjugate reagent ปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรปแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

(8) เทสารออกจากหลุม แล้วล้างด้วย Wash buffer ปริมาณหลุมละ 350  $\mu$ l ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Microplate washer

(9) เติม Substrate reagent ปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรปแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

(10) เติม Stop solution ปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l

(11) นำไปอ่านผลภายใน 30 นาที ด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm ซึ่งจะได้ค่าการดูดกลืนแสง (OD)

(12) นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณหาค่า S/P ratio และ Titer เพื่อดูค่าปริมาณแอนติบอดีจากตัวอย่างซีรัม ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

$$S/P \text{ ratio} = \frac{\text{ค่า OD ของตัวอย่าง} - \text{ค่าเฉลี่ยของ Negative control}}{\text{ค่าเฉลี่ยของ Positive control} - \text{ค่าเฉลี่ยของ Negative control}}$$

$$\text{Titer} = \text{Log}_{10}\text{Titer} = 1.1 \times \text{Log}_{10}(S/P \text{ ratio}) + 3.361$$

$$\text{Antilog} = \text{Titer}$$

(13) นำค่า Titer ที่ได้มาดูค่าจุดตัด (Cut-off point) โดยหากมีค่า S/P ratio ที่ 0.49 หรือน้อยกว่า แสดงว่ามีปริมาณแอนติบอดีอยู่ในช่วง Negative และหากมีค่า S/P ratio ที่ 0.50 หรือมากกว่า แสดงว่ามีปริมาณแอนติบอดีอยู่ในช่วง Positive ส่วนหากมีค่า Titer ที่ 1,070 หรือน้อยกว่า แสดงว่ามีปริมาณแอนติบอดีอยู่ในช่วง Negative และหากมีค่า Titer ที่ 1,071 หรือมากกว่า แสดงว่ามีปริมาณแอนติบอดีอยู่ในช่วง Positive

### 3.3.3.2 การทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันของแอนติเจนซีรัม และคอนจูเกต ด้วยวิธี Checkerboard titration

ทำการทดลองเบื้องต้น (Preliminary) เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมของคอนจูเกต (Secondary antibody) ก่อน โดยนำ Rabbit anti-pig IgG (H+L) secondary antibody HRP มาเจือจางด้วยสารละลาย PBS-T ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:50,000-1:100,000 (ตามคำแนะนำของผู้ผลิต) มาทดสอบด้วยวิธีอินไดเร็กต์ไอโซซาร์ร่วมกับความเข้มข้นของแอนติเจนและระดับการเจือจางซีรัม เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วจึงเลือกอัตราส่วนดังกล่าวมาทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติเจนและตัวอย่างซีรัมที่จะใช้ในการพัฒนาชุดตรวจต่อไป

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติเจนจากวัคซีนชนิดที่ผ่านการทดลอง และคัดเลือกมาแล้วว่ามีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบทางภูมิคุ้มกันเพื่อใช้ในการเคลือบเพลท โดยนำแอนติเจนที่ผ่านการสกัดแยกเพื่อทำให้บริสุทธิ์และวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแล้วมาเจือจางด้วยสารละลาย Coating buffer (0.05M bicarbonate-carbonate buffer (pH 9.6)) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบลงบนก้นหลุมของ Immunoplate โดยทดลองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ช่วง 0.05-10 µg/ml แล้วนำมาเคลือบเพลท ปริมาณหลุมละ 100 µl และทดสอบด้วยวิธีอินโดเรคทีโอไลซ่าเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะใช้ในการพัฒนาชุดตรวจ

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวอย่างซีรัม โดยนำตัวอย่างซีรัมควบคุมที่จะใช้เป็นซีรัมควบคุมผลบวกและลบมาเจือจางด้วย 1%BSA ใน 0.05% Tween 20 (Sample diluent) ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:30-1:300 แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธีอินโดเรคทีโอไลซ่าเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะใช้ในการพัฒนาชุดตรวจ

### 3.3.3.3 การตรวจด้วยชุดตรวจอินโดเรคทีโอไลซ่าที่พัฒนาขึ้น (I-ELISA)

(1) ทำการเคลือบเพลทด้วยแอนติเจนในอัตราส่วนการเจือจางกับ Coating buffer ด้วยความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมที่ได้จากการทำ Checkerboard titration ในปริมาณหลุมละ 100 µl จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันด้วย Microplate mixer ประมาณ 30-60 วินาที ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรป นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปบ่มต่อในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตั้งแต่ประมาณ 8 ชั่วโมงขึ้นไป (12-16 ชั่วโมง)

(2) นำเพลทที่เคลือบแอนติเจนออกจากตู้แช่เย็นมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้คลายความเย็นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS-T (0.05% Tween-20 ใน PBS) (Wash buffer) ปริมาณหลุมละ 300 µl ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Microplate washer

(3) ป้องกันการเกิด Non-specific ของโปรตีนอื่น ๆ ที่จะเข้ามาจับในหลุม โดยเติม 5% Skim milk ใน PBS ที่มี 0.1% Tween-20 (Blocking solution) ปริมาณหลุมละ 100 µl ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรปแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

(4) ล้างด้วย Wash buffer ปริมาณหลุมละ 300 µl ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Microplate washer จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวก ซีรัมควบคุมผลบวก และตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันด้วย Sample diluent ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทำ Checkerboard titration และนำไปผสมให้เข้ากันด้วย Microplate mixer ประมาณ 30-60 วินาที ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรป นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

(5) ล้างด้วย Wash buffer ปริมาณหลุมละ 300 µl ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Microplate washer จากนั้นเติมคอนจูเกต (Secondary antibody) โดยใช้ Rabbit anti-

pig IgG (H+L) secondary antibody HRP ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS-T (Wash buffer) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทำ Checkerboard titration ปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรป และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

(6) ล้างด้วย Wash buffer ปริมาณหลุมละ 300  $\mu$ l ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Microplate washer จากนั้นเติม 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (TMB substrate) ปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l ปิดเพลทด้วยพลาสติกแรป และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (บ่มในที่พ่นแสง) เป็นเวลา 15 นาที

(7) เติม Stop solution (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l แล้วนำไปอ่านผลภายใน 30 นาที ด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm และนำค่า OD ที่ได้มาคำนวณหาค่า S/P ratio เพื่อนำไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เป็นค่าอ้างอิง (Reference method)

#### 3.3.3.4 การประเมินค่า Cut-off ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น

ใช้ตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบทั้งหมดจำนวน 60 ตัวอย่าง (ใช้ผลจากชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เป็นค่าอ้างอิง (Reference method)) มาทดสอบด้วยชุดตรวจ I-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นจนได้สถานะที่เหมาะสมของชุดตรวจแล้ว โดยค่า Cut-off พิจารณาจากค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมควบคุมผลลบทั้งหมดบวกสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) (Mean OD + 3SD) (Shen *et al.* 2015) ซึ่งการพิจารณาผลของระดับภูมิคุ้มกันว่าเป็น Positive หรือ Negative จากชุดตรวจ I-ELISA จะทำการเทียบกับค่า Cut-off สำหรับในกรณีที่ค่า S/P ratio น้อยกว่า Cut-off พิจารณาผลเป็น Negative แต่หากค่า S/P ratio มากกว่า Cut-off พิจารณาผลเป็น Positive

#### 3.3.3.5 การประเมินค่าความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น

ใช้ตัวอย่างซีรัมสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 จำนวนทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยซีรัมควบคุมผลลบจำนวน 60 ตัวอย่าง และตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกจำนวน 60 ตัวอย่าง (ใช้ผลจากชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เป็นค่าอ้างอิง (Reference method)) มาทดสอบด้วยชุดตรวจ I-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นจนได้สถานะที่เหมาะสมของชุดตรวจแล้ว จากนั้นคำนวณหาค่า S/P ratio แล้วพิจารณาผลการตรวจตามค่า Cut-off ที่ได้ โดยจะประเมินค่าความจำเพาะ (Specificity) จากซีรัมควบคุมผลลบ และประเมินค่าความไว (Sensitivity) จากซีรัมควบคุมผลบวก ซึ่งมีการประเมินค่าต่าง ๆ ตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\%Sensitivity = [TP/(TP+FN)] \times 100$$

$$\%Specificity = [TN/(FP+TN)] \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{False positive} = [\text{FP}/(\text{FP}+\text{TN})] \times 100$$

$$\% \text{False negative} = [\text{FN}/(\text{TP}+\text{FN})] \times 100$$

เมื่อ	TP	หมายถึง	ผลบวกจริง (True positive)
	TN	หมายถึง	ผลลบจริง (True negative)
	FP	หมายถึง	ผลบวกลวง (False positive)
	FN	หมายถึง	ผลลบลวง (False negative)

### 3.3.3.6 การประเมินความคลาดเคลื่อนของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นโดยวิธีการทดสอบซ้ำ (Repeatability test)

ทำการสุ่มตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบจำนวน 6 ตัวอย่างและตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกจำนวน 6 ตัวอย่าง (ใช้ผลจากชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เป็นค่าอ้างอิง (Reference method)) มาทดสอบด้วยชุดตรวจ I-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นจนได้สภาวะที่เหมาะสมของชุดตรวจแล้ว โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ 1. วิธี Intra-assay คือทดสอบภายในเพลทเดียวกัน ทั้งตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบ (n=6, R=3) และซีรัมควบคุมผลบวก (n=6, R=3) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และ 2. วิธี Inter-assay คือทดสอบโดยใช้ตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบ (n=6, R=3) และซีรัมควบคุมผลบวก (n=6, R=3) บนตำแหน่งเดียวกันแต่ต่างเพลท ทั้งหมด 3 เพลท จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยของค่า OD, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient variation; CV) ( $\%CV = [\text{SD}/\text{Mean OD}] \times 100$ ) ของแต่ละตัวอย่าง ซึ่งการประเมินความคลาดเคลื่อนหรือการหาค่าความแม่นยำของชุดตรวจนั้น ค่าที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 20% (Krotzky *et al.* 1995)

### 3.3.3.7 การเปรียบเทียบชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) ในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2

นำตัวอย่างซีรัมสุกที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ทั้งหมดจำนวน 800 ตัวอย่าง มาทำการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ด้วยชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เพื่อนำผลที่ได้มาใช้เป็นค่าอ้างอิง (Reference method) จากนั้นนำตัวอย่างซีรัมทั้งหมดมาทดสอบด้วยชุดตรวจ I-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้น แล้วนำผลการพิจารณาระดับภูมิคุ้มกันที่ได้จากทั้งสองชุดตรวจ มาคำนวณหาค่าความสอดคล้อง (Agreement) หรือค่าความสัมพันธ์กัน (Correlation) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจ I-ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) ซึ่งเป็นมาตรฐาน โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\% \text{Agreement หรือ } \% \text{Correlation} = [(\text{TP}+\text{TN})/(\text{TP}+\text{FN}+\text{TN}+\text{FP})] \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ	TP	หมายถึง	ผลบวกจริง (True positive)
	TN	หมายถึง	ผลลบจริง (True negative)
	FP	หมายถึง	ผลบวกลวง (False positive)
	FN	หมายถึง	ผลลบลวง (False negative)

หมายเหตุ	0-4%	Level of agreement = None
	4-15%	Level of agreement = Minimal
	15-35%	Level of agreement = Weak
	35-63%	Level of agreement = Moderate
	64-81%	Level of agreement = Strong
	82-100%	Level of agreement = Almost Perfect

นำผลการตรวจระดับแอนติบอดีที่ได้จากทั้งชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) และชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นทั้งหมด (800 ตัวอย่าง) มาคำนวณเพื่อหาค่าการยอมรับทางสถิติ (Kappa value) ว่ามีขนาดความสอดคล้อง (Strangeness of agreement) อยู่ในระดับใดตามสูตรคำนวณดังนี้ (Cohen, 1960)

$$\text{Kappa value} = \frac{nD - \sum t_1 U_1}{n^2 - \sum t_1 U_1}$$

เมื่อ	n	หมายถึง	จำนวนความถี่ทั้งหมดในตาราง
	D	หมายถึง	ผลรวมความถี่ในเส้นทแยงมุมของตาราง
	t <sub>1</sub>	หมายถึง	ผลรวมความถี่ใน Row
	U <sub>1</sub>	หมายถึง	ผลรวมความถี่ใน Column

หมายเหตุ	<0.00	คือ	มีขนาดความสอดคล้อง แย่ (Poor)
	0.00-0.20	คือ	มีขนาดความสอดคล้อง น้อย (Slight)
	0.21-0.40	คือ	มีขนาดความสอดคล้อง พอใช้ (Fair)
	0.41-0.60	คือ	มีขนาดความสอดคล้อง ปานกลาง (Moderate)
	0.61-0.80	คือ	มีขนาดความสอดคล้อง ดี (Substantial)
	0.81-1.00	คือ	มีขนาดความสอดคล้อง ดีมาก/ค่อนข้างสมบูรณ์ (Almost perfected)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อเปรียบเทียบค่า S/P ratio และ Titer ของทั้งสองชุดตรวจว่ามีแนวโน้มในแต่ละระดับของแอนติบอดีที่แตกต่างกันอย่างไร โดยการนำค่า S/P ratio และ Titer ของตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในระดับที่แตกต่างกันทั้งหมดจำนวน 25 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างทั้งสองชุดตรวจ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบว่าในแต่ละระดับแอนติบอดีเมื่อตรวจด้วยชุดตรวจ I-ELISA มีแนวโน้มไปในทิศทางใด มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถนำมาใช้ในการประเมินระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 หรือไม่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK)

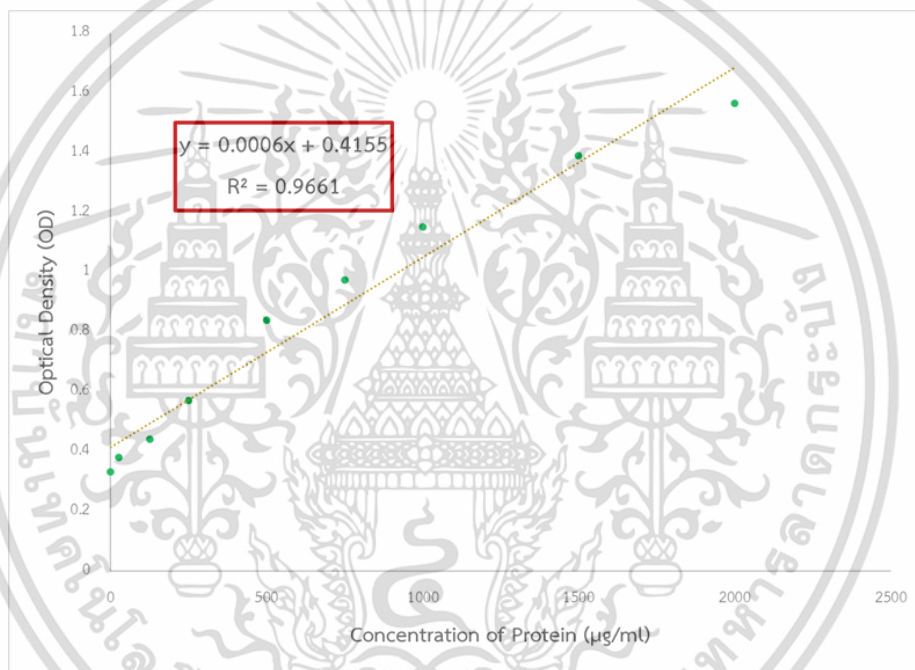
- หมายเหตุ
- $r=0.90-1.00$  คือ มีความสัมพันธ์กันสูงมาก (Very high correlation)
  - $r=0.70-0.90$  คือ มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง (High correlation)
  - $r=0.50-0.70$  คือ มีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง (Moderate correlation)
  - $r=0.30-0.50$  คือ มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ (Low correlation)
  - $r=0.00-0.30$  คือ มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมาก (Negligible correlation)

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนรวมในวัคซีน

เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการสกัดแยกด้วย Microsep 3K ด้วยวิธีของ Bradford (Bradford. 1976) โดยสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนจากค่า OD ของสารละลาย BSA (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานจากค่า OD ของสารละลาย BSA เจือจางมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น

เมื่อทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนทั้ง 4 ชนิดก่อนและหลังการสกัดแยกด้วย Microsep 3K ผลที่ได้พบว่าหลังจากการสกัดแยกปริมาณโปรตีนโดยรวมในวัคซีนวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT ลดลงมากที่สุดโดยลดลง 58.47 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER, Circumvent PCV และ IngelvacCircoFLEX โดยมีปริมาณโปรตีนลดลง 53.99, 9.08 และ 7.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** แสดงปริมาณโปรตีนรวมในวัคซีนก่อนและหลังการสกัดแยกด้วย Microsep 3K

Vaccine	Protein Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )		%Reduction
	Before	After	
PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT	1,077.50	447.50	58.47
PRO-VAC CIRCOMASTER	1,389.17	639.17	53.99
IngelvacCircoFLEX	285.83	264.17	7.58
Circumvent PCV	6,880.83	6,255.83	9.08

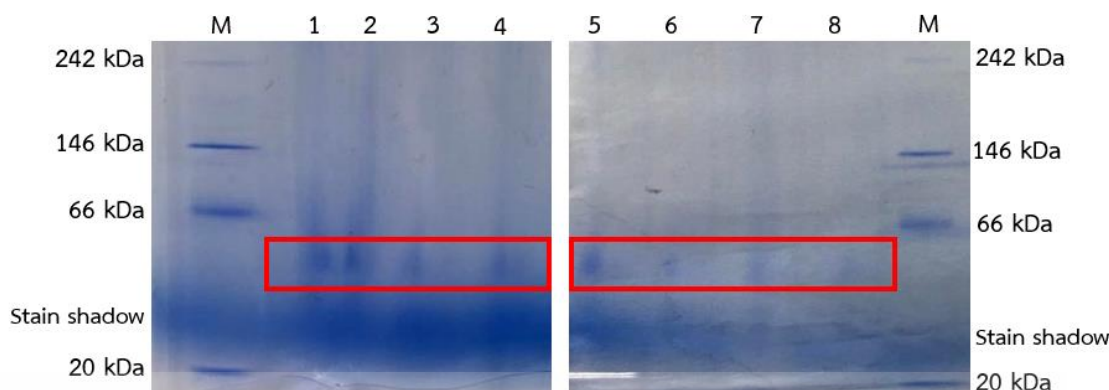
จากผลการวัดปริมาณโปรตีนโดยรวมด้วยวิธี Bradford (ตารางที่ 4.1) พบว่าหลังการสกัดแยก จะมีความเข้มข้นของโปรตีนที่น้อยกว่าก่อนการสกัดแยกในทุกวัคซีน ทั้งที่โดยหลักการแล้วเมื่อมีการปั่นแยกสื่อและของเหลวออกไปบางส่วนแล้วของเหลวที่เหลืออยู่ควรมีความเข้มข้นของโปรตีนมากขึ้น การที่ความเข้มข้นของโปรตีนโดยรวมที่ลดลงนี้เป็นผลมาจากการที่โปรตีนที่มีขนาดเล็กจะถูกกรองผ่านระบบกรองเหลือไว้แต่โปรตีนขนาดใหญ่ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการสกัดแยกอาจมีโปรตีนบางส่วนติดอยู่ที่หลอดและตัวกรองของ Microsep 3K ซึ่งไม่สามารถเก็บโปรตีนที่ปนอยู่กับสื่อที่ติดอยู่กับตัวกรองมาได้ปริมาณครบถ้วนทั้งหมด สื่อของวัคซีนที่มีส่วนผสมของเจลหรือน้ำมันก็มีความสามารถผ่านตัวกรองลงไปได้มากน้อยต่างกันขึ้นกับปริมาณและชนิดของสื่อที่ใช้ ดังจะเห็นได้จากวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT ที่มีส่วนผสมของสื่อเป็นชนิดคาร์โบเมอร์ มีปริมาณโปรตีนหลังการกรองลดลงไป 58.47% เนื่องจากมีส่วนประกอบของคาร์โบเมอร์สูงถึง 4 มก./มล. หลังการปั่นเหวี่ยงจะพบของเหลวที่มีลักษณะของเจลติดอยู่กับตัวกรองค่อนข้างมาก ทำให้โปรตีนจำนวนมากติดอยู่กับของเหลวดังกล่าวด้วย จึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างโปรตีนในส่วนนั้นมาได้ เช่นเดียวกับวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ที่มีส่วนผสมของสื่อเป็นชนิดอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลในปริมาณค่อนข้างสูงอยู่ที่ 2 มก./มล. ทำให้มีปริมาณโปรตีนหลังการกรองลดลงไป 53.99% เนื่องจากมีส่วนที่เป็นเจลติดอยู่กับตัวกรองหลังการปั่นเหวี่ยงค่อนข้างมากเช่นกัน สำหรับวัคซีน IngelvacCircoFLEX ที่มีส่วนผสมของสื่อเป็นชนิดคาร์โบเมอร์เช่นเดียวกับวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT แต่มีความเข้มข้นเพียง 1 มก./มล. หลังการกรองมีปริมาณโปรตีนลดลงเพียง 7.58% เท่านั้น เนื่องจากแทบจะไม่มีของเหลวที่มีลักษณะเป็นเจลติดอยู่กับตัวกรองเลย จึงสามารถเก็บตัวอย่างโปรตีนมาได้เกือบทั้งหมด สำหรับวัคซีน Circumvent PCV นั้น จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนหลังการกรองลดลงเพียง 9.08% เท่านั้น เนื่องจากวัคซีนมีการใช้สื่อที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งเป็นส่วนผสมหลัก เมื่อกรองส่วนประกอบอื่นและโปรตีนที่มีขนาดเล็กออกไปในขณะที่สื่อและโปรตีนที่ได้ด้านบนตัวกรองนั้นยังคงมีคุณสมบัติเป็นของเหลวไม่ใช่เจล จึงสามารถเก็บตัวอย่างบนตัวกรองมาได้เกือบจะทั้งหมด ทำให้มีการสูญเสียโปรตีนไปในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ORF2 เป็นส่วนโปรตีนโครงสร้างที่มีเอกลักษณ์เฉพาะสำหรับไวรัส PCV2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28-30 kDa ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด Specific immune response เป็นอย่างมาก และเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (Neutralizing antibodies) จึงทำให้มีวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อ PCV2 ทางการค้าใช้โปรตีนโครงสร้างส่วน ORF2 ในการผลิตเป็นวัคซีนชนิดซบยูนิต (Subunit vaccine) การใช้โปรตีน ORF2 เป็นแอนติเจนสำหรับการทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันจึงเป็นตัวเลือกที่ดีในตรวจหาภูมิคุ้มกันชนิดลบล้างฤทธิ์ต่อเชื้อ PCV2 เพื่อเป็นการตรวจหาภูมิคุ้มโรคที่แท้จริงของสุกร การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดลองสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีนชนิดซบยูนิตเพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกร ซึ่งกระบวนการสกัดแยกโปรตีนดังกล่าวนั้นได้เลือกใช้ Microsep 3K ซึ่งเป็นการกรองด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันที่มี Molecular weight cut-off (MWCO) ขนาด 3K เพื่อกรองให้อนุภาคของเกลือและสารโมเลกุลเล็กอื่น ๆ ผ่านตัวกรองลงไป แต่กักอนุภาคของโปรตีนที่ต้องการซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า 3 kDa เอาไว้ด้านบนตัวกรอง ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนในส่วน ORF2 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 28 kDa (Liu *et al.* 2001; Mahe *et al.* 2000) ไปจนถึง 30 kDa (Nawagitgul *et al.* 2000) จึงได้เลือกใช้ตัวกรองที่มี MWCO ขนาด 3K ซึ่งถือว่าเป็นขนาดที่แนะนำว่าเหมาะสมกับอนุภาคของโปรตีนที่ต้องการ

#### 4.2 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Native PAGE

เมื่อนำโปรตีนจากวัคซีนก่อนและหลังจากที่ถูกสกัดแยกด้วย Microsep 3K มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธี Native PAGE เพื่อหามวลโมเลกุลของโปรตีนเพื่อพิสูจน์และยืนยันว่าโปรตีนที่สกัดแยกได้ยังคงมีโปรตีน ORF2 ที่ต้องการหรือไม่ พบว่าโปรตีนจากวัคซีนทั้ง 4 ชนิดปรากฏเป็นแถบจาง ๆ ไม่มีขอบเขตที่ชัดเจนที่ระดับเดียวกันทั้งหมด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานแล้วพบว่าแถบที่ปรากฏอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 20 kDa และ 66 kDa โดยจะพบแถบโปรตีนชัดเจนที่สุดในวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT ทั้งก่อนและหลังการสกัดแยก และวัคซีน IngelvacCircoFLEX ก่อนถูกสกัดแยก รองลงมาคือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ก่อนและหลังการสกัดแยก สำหรับวัคซีน IngelvacCircoFLEX หลังการสกัดแยกและวัคซีน Circumvent PCV ทั้งก่อนและหลังการสกัดแยกนั้นพบเพียงแถบจาง ๆ ไม่เด่นชัด (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 แสดงแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนจากวัคซีนที่แยกได้ด้วยวิธี Native PAGE ก่อนและหลัง ถูกสกัดแยกออกจากด้วย Microsep 3K โดยช่อง M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1 คือ วัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT ก่อนการสกัดแยก ช่อง 2 คือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT หลังการสกัดแยก ช่อง 3 คือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ก่อนการสกัดแยก ช่อง 4 คือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER หลัง การสกัดแยก ช่อง 5 คือวัคซีน IngelvacCircoFLEX ก่อนการสกัดแยก ช่อง 6 คือวัคซีน IngelvacCircoFLEX หลังการสกัดแยก ช่อง 7 คือวัคซีน Circumvent PCV ก่อนการ สกัดแยก และช่อง 8 คือวัคซีน Circumvent PCV หลังการสกัดแยก โดยแถบของโปรตีน ORF2 ปรากฏอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 20 kDa และ 66 kDa (กรอบสี่เหลี่ยม)

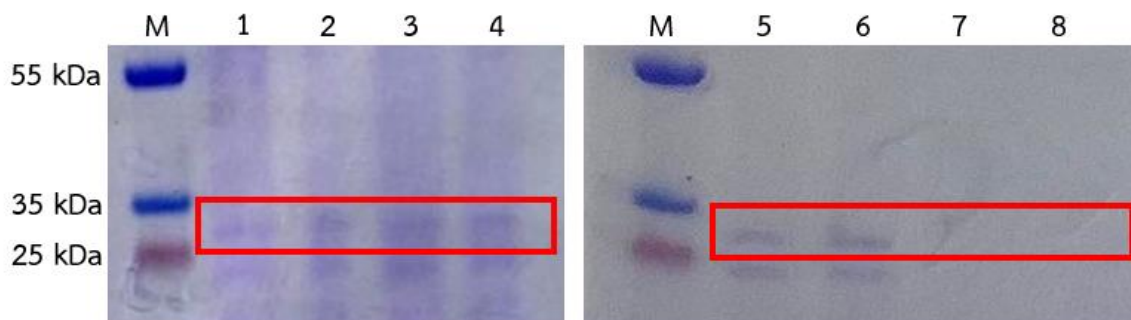
ในส่วนของการนำโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกมาหามวลโมเลกุลของโปรตีนเพื่อพิสูจน์และ ยืนยันว่าโปรตีนที่สกัดแยกได้ยังคงมีโปรตีน ORF2 ที่ต้องการหรือไม่ ด้วยวิธี Native PAGE จะเห็นว่า แถบมวลโมเลกุลของโปรตีนทั้งก่อนและหลังสกัดแยกด้วย Microsep 3K จากวัคซีนทั้ง 4 ชนิด ไม่ได้ ปรากฏเป็นแถบที่มีขอบเขตชัดเจน แต่พบปรากฏที่บริเวณเดียวกันทั้งหมด ซึ่งอยู่ในช่วงมวลโมเลกุล ระหว่าง 20 kDa และ 66 kDa (ภาพที่ 4.2) จึงคาดว่าแถบบางแถบบ้างมีมวลโมเลกุลของโปรตีน ORF2 อยู่ในช่วงดังกล่าวนี้ โดยการที่แถบที่ปรากฏไม่มีขอบเขตที่ชัดเจนก็เนื่องมาจากวิธี Native PAGE เป็นวิธี ที่ใช้ในการแยกโปรตีนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (Non-denatured) ทำให้โครงสร้างของโปรตีนยังคง ประกอบด้วยทั้งประจุบวกและลบ เมื่อใช้สนามไฟฟ้าในการแยก ประจุลบก็จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก ในขณะที่ประจุบวกก็จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ ส่งผลให้แถบที่ปรากฏไม่มีขอบเขตที่ชัดเจน (Boyer. 2012) ซึ่งวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT และ PRO-VAC CIRCOMASTER ปรากฏ แถบโปรตีนดังกล่าวชัดเจนทั้งก่อนและหลังการกรองแยกโปรตีน แสดงให้เห็นการคงอยู่ของกลุ่มโปรตีน ที่มีขนาดระหว่าง 20-66 kDa (ขนาดค่อนข้างไปทาง 66 kDa) ส่วนวัคซีน IngelvacCircoFLEX นั้น ปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจนก่อนการสกัดแยกเท่านั้น หลังการสกัดแยกไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวที่ ชัดเจนทำให้เกิดเป็นข้อสงสัยถึงการคงอยู่ของโปรตีนในรูปแบบที่ไม่มีการทำให้เสียสภาพในช่วงขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าว แต่สำหรับวัคซีน Circumvent PCV นั้นไม่พบแถบโปรตีนปรากฏให้เห็นชัดเจนทั้งก่อนและหลังการสกัดแยก ทั้งนี้เนื่องจากวัคซีนมีการใช้สื่อที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งมีความหนืดกว่าสื่อของวัคซีนชนิดอื่น ๆ ค่อนข้างมากจึงอาจไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาคโปรตีน และอาจส่งผลให้ NativePAGE 5% G-250 sample additive ที่ใช้ในการย้อมสีของตัวอย่างแอนติเจนไม่สามารถเข้าถึงอนุภาคของโปรตีน ส่งผลให้ไม่เห็นแถบของโปรตีนปรากฏ โดยพบว่าแม้จะนำไปผ่านการกรองแยกด้วย Microsep 3K แล้วก็ตาม ลักษณะของของเหลวที่พบก็ยังมีลักษณะขาวขุ่นจากสื่อที่ใช้ ซึ่งแตกต่างจากวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT, PRO-VAC CIRCOMASTER และ IngelvacCircoFLEX อย่างชัดเจนที่มีลักษณะค่อนข้างใสเมื่อผ่านการสกัดแยกด้วย Microsep 3K ทั้งนี้การที่ Native PAGE พบแถบของโปรตีนเพียงบริเวณแถบเดียวแต่เป็นช่วงกว้างนั้นเป็นเพราะจากโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากันในลักษณะเกาะกลุ่มกันไปขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุล (Bollag *et al.* 1996)

#### 4.3 การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำโปรตีนจากวัคซีนก่อนและหลังจากที่ถูกสกัดแยกด้วย Microsep 3K มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธี SDS-PAGE ผลที่ได้พบแถบโปรตีนจากวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT, PRO-VAC CIRCOMASTER และ IngelvacCircoFLEX อยู่ระหว่าง 25-35 kDa ซึ่งเป็นช่วงขนาดของโปรตีน ORF2 (ขนาดประมาณ 28-30 kDa) โดยวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER มีปรากฏแถบโปรตีนชัดที่สุดทั้งก่อนและหลังการสกัดแยก รองลงมาคือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT ก่อนและหลังการสกัดแยก และวัคซีน IngelvacCircoFLEX ก่อนและหลังการสกัดแยกตามลำดับ ส่วนวัคซีน Circumvent PCV นั้นไม่ปรากฏแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนใด ๆ (ภาพที่ 4.3)



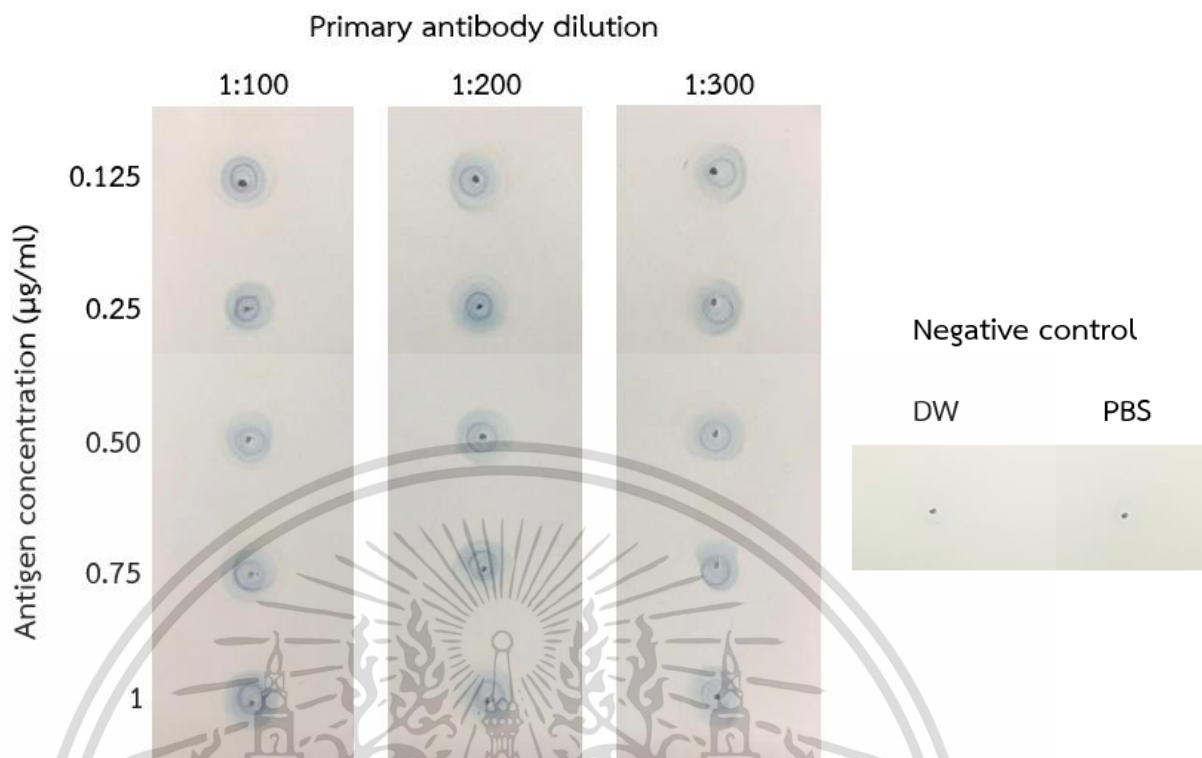
ภาพที่ 4.3 แสดงแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนจากวัคซีนที่แยกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE ก่อนและหลังถูกสกัดแยกออกจากด้วย Microsep 3K โดยช่อง M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1 คือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT ก่อนการสกัดแยก ช่อง 2 คือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT หลังการสกัดแยก ช่อง 3 คือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ก่อนการสกัดแยก ช่อง 4 คือวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER หลังการสกัดแยก ช่อง 5 คือวัคซีน IngelvacCircoFLEX ก่อนการสกัดแยก ช่อง 6 คือวัคซีน IngelvacCircoFLEX หลังการสกัดแยก ช่อง 7 คือวัคซีน Circumvent PCV ก่อนการสกัดแยก และช่อง 8 คือวัคซีน Circumvent PCV หลังการสกัดแยก โดยแถบของโปรตีน ORF2 ปรากฏอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 25 kDa และ 35 kDa (กรอบสี่เหลี่ยม)

สำหรับการหามวลโมเลกุลของแอนติเจนด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.3) นั้นพบว่าวัคซีนชนิด PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT, PRO-VAC CIRCOMASTER และ IngelvacCircoFLEX ปรากฏแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 25-35 kDa ซึ่งเป็นขนาดโปรตีนของ ORF2 โดยตรงกับข้อมูลผลการติดตามโปรตีน ORF2 ด้วยเทคนิค Western blot ของวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT และ PRO-VAC CIRCOMASTER จากทางบริษัท Komipharm International Co. Ltd. (Korea) ว่ามีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ORF2 ที่ใช้เป็นแอนติเจนอยู่ที่ขนาด 28 kDa แต่จะเห็นว่ายังมีแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอื่นปรากฏขึ้นด้วย ทั้งนี้การพบแถบโปรตีนอื่นนอกเหนือจากแถบโปรตีน ORF2 นั้นสอดคล้องกับผลการหาปริมาณโปรตีนรวมซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนอื่นนอกเหนือจาก ORF2 เป็นองค์ประกอบในวัคซีน ซึ่งอาจเป็นองค์ประกอบที่เกิดจากกระบวนการผลิตโดยใช้ Baculovirus expression system ซึ่งคาดว่าในขั้นตอนของการสกัด Recombinant protein หรืออาจจะเป็นองค์ประกอบของ Excipients ที่ใช้ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ถึง 100% แต่ยังคงมีประสิทธิภาพและไม่กระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ส่วนวัคซีน Circumvent PCV ไม่พบแถบของโปรตีนปรากฏเช่นเดียวกับในวิธี Native PAGE ซึ่ง

คาดว่า เป็นผลมาจากสื่อที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาค โปรตีนหรือการย้อมติดสีของโปรตีนเช่นกัน

#### 4.4 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot

ผลการสกัดแยกโปรตีนด้วย Microsep 3K แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ได้จากวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT และ PRO-VAC CIRCOMASTER มีโปรตีนถูกคัดกรองออกไปเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้จากผลการแยกโปรตีนวิธี Native PAGE และ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนจากวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER มีความเหมาะสมที่สุดในการเลือกใช้เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน วัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ที่ถูกสกัดแยกสื่อออกแล้วจึงถูกนำไปเจือจางให้ได้ปริมาณของโปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 µg/ml เพื่อทำ Dot blot ผลที่ได้พบว่า Primary antibody จากซีรัมควบคุมผลบวกของสุกรที่มีแอนติบอดีสูงต่อเชื้อ PCV2 สามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับโปรตีนที่สกัดจากวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ได้ดี โดยมีแนวโน้มในการทำปฏิกิริยาที่ดี (เกิดสีเข้ม) เมื่อใช้โปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง โดยความเข้มของสีมีแนวโน้มแปรผันตามความเข้มข้นของ Primary antibody ที่ใช้ (1:100>1:200>1:300) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวยังคงมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ผลการทำ Dot blot โดยการใช้โปรตีนที่ถูกสกัดแยกออกจากด้วย Microsep 3K ที่ระดับความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 µg/ml ทำปฏิกิริยากับ Primary antibody จากซีรัมของสุกรที่มีแอนติบอดีสูงต่อเชื้อ PCV2 (Titer=10,728) ที่ถูกเจือจางที่ระดับ 1:100, 1:200 และ 1:300 ตามลำดับ และ Negative control ทดสอบด้วยน้ำบริสุทธิ์ Type 1 (DW) และสารละลาย PBS

เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบมวลโมเลกุลหลังจากการสกัดแยกโปรตีนด้วย Microsep 3K ด้วยวิธี Native PAGE และ SDS-PAGE ร่วมกับการหาปริมาณโปรตีนรวมในวัคซีนพบว่าวัคซีน Circumvent PCV ไม่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบทางภูมิคุ้มกัน เนื่องจากไม่สามารถแยกสัออกจากวัคซีนได้ดีพอ สำหรับวัคซีน IngelvacCircoFLEX นั้น แม้ว่าจะสามารถแยกสัออกจากวัคซีนได้ดีพอสมควร แต่เมื่อวัดปริมาณโปรตีนโดยรวมหลังจากสกัดแยกแล้วพบว่าโปรตีนที่ได้มีความเข้มข้นน้อยกว่าวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT และ PRO-VAC CIRCOMASTER และเมื่อพิจารณาผลร่วมกับความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ถูกแยกด้วย SDS-PAGE พบว่าในปริมาณ 11.5 µl (ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE) ที่เท่ากับแถบของโปรตีนที่พบระหว่าง 25-35 kDa ของวัคซีน IngelvacCircoFLEX มีความเข้มข้นน้อยกว่าวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT และ PRO-VAC CIRCOMASTER มาก และเมื่อพิจารณาผลที่ได้นี้ ร่วมกับลักษณะของแถบโปรตีนที่พบเมื่อถูกแยกด้วย Native PAGE ที่ไม่พบแถบโปรตีนที่ชัดเจนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบที่ไม่เสียสภาพเมื่อวัคซีนถูกสกัดแยก จึงเป็นเหตุให้พิจารณาได้ว่าวัคซีน IngelvacCircoFLEX อาจไม่เหมาะในการนำไปใช้งานต่อ เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพของวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT เปรียบเทียบกับวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER แล้ว พบว่าวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ONE-SHOT ซึ่งมีความเข้มข้นของสื่อชนิดคาร์โบเมอร์ในปริมาณสูงซึ่ง อาจเป็นอุปสรรคในการแยกด้วย SDS-PAGE ทำให้แถบของโปรตีนก่อนการสกัดแยกที่พบระหว่าง 25-35 kDa จางกว่าแถบของวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ทั้งที่มีปริมาณโปรตีน ORF2 ต่อ มิลลิตรสูงกว่า และเมื่อผ่านกระบวนการสกัดแยกสื่อออกจากวัคซีนยังพบของเหลวหนืดคล้ายเจลติด อยู่บริเวณด้านบนของตัวกรองทำให้มีความยากลำบากในการเก็บโปรตีนที่ต้องการไว้ใช้งาน ทางผู้วิจัย จึงมีความเห็นว่าวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบทางภูมิคุ้มกัน ดังนั้นวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER ที่ผ่านกระบวนการสกัดแยก โปรตีนออกจากสื่อแล้วจึงถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot ผลที่ได้พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากวัคซีน PRO-VAC CIRCOMASTER มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจน สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับซีรัมที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 โดยพบแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาการจับ กันระหว่างโปรตีนที่สกัดได้กับซีรัมได้ดีขึ้นเมื่อมีการใช้โปรตีนดังกล่าวในปริมาณสูงขึ้นเพื่อเคลือบลง บน Solid phase

การใช้โปรตีน ORF2 เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยชานี้มีความเหมาะสมเนื่องจากโปรตีน ดังกล่าวนี้นี้มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด Specific immune response (Truong *et al.* 2001) จากการศึกษาของ Sun *et al.* (2010) ซึ่งได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไอโซล่าโดยใช้ วิธีการผลิตแอนติเจนจากโปรตีนส่วน Antigenic domain (113-147AA) ของโปรตีน ORF2 ด้วย กระบวนการ Baculovirus expression system เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zepeda-Cervantes *et al.* (2019) ที่ใช้วิธีการ Baculovirus Bac-to-Bac™ system ในการผลิตโปรตีน ORF2 (PH(1 -1 1 0)PCV2 NPs) ด้วยเซลล์ Sf9 ก่อนนำมาตรวจด้วยวิธีอินไตรีคอีไลซ่า ซึ่งทั้งสองงานวิจัยต่างก็พบว่า แอนติเจนที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวมีความบริสุทธิ์และสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาระดับ แอนติบอดีด้วยวิธีอีไลซ่าได้ ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อโปรตีนถูกสกัดแยกด้วย Microsep 3K จะได้โปรตีน โดยรวมที่มีโปรตีน ORF2 เป็นองค์ประกอบที่ยังคงมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน อีกทั้งยังเป็น วิธีการที่สะดวกและประหยัด หลังการแยกแต่ละครั้งได้ปริมาณแอนติเจนค่อนข้างมากกว่าการสกัด โปรตีนออกจากเจลโพลีอะครีลาไมด์ สำหรับวิธี Native PAGE นั้นแม้จะเป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีน ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ไม่เกิดการเสียสภาพของโปรตีน แต่เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกชนิดของ โปรตีนมากกว่าการแยกน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน เนื่องจากจะไม่สามารถแยกความแตกต่างทาง รูปร่างและขนาดได้ ดังนั้นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันจึงอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากัน (Bollag *et al.* 1996) อีกทั้งแถบโปรตีนที่ได้ก็ไม่มีความชัดเจน จึงไม่สามารถนำโปรตีนที่ผ่านการทำวิธี Native PAGE มาใช้ต่อได้ ส่วนแอนติเจนที่ผ่านการทำวิธี SDS-PAGE นั้น แม้ว่าวิธีนี้จะใช้ในการตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความบริสุทธิ์ของโปรตีนได้ และยังใช้ในการหาน้ำหนักของโปรตีนหรือหน่วยย่อย (Subunit) ของโปรตีน แต่ด้วยวิธีนี้มีการทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Seelapai, 2016) จึงอาจส่งผลกระทบต่อรูปแบบของแอนติเจนหากจะนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาในวิธีอิลไลซ่าต่อไปได้

#### 4.5 การเตรียมชุดตรวจอินไคเร็คอิลไลซ่า

##### 4.5.1 การทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจน ซีรัม และคอนจูเกต ด้วยวิธี Checkerboard titration

จากที่ได้มีการทดลองเบื้องต้น (Preliminary) เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมของคอนจูเกตก่อน พบว่าคอนจูเกตที่อัตราส่วน 1:60,000 เป็นอัตราส่วนการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมเมื่อทดสอบด้วยวิธีอินไคเร็คอิลไลซ่าร่วมกับความเข้มข้นของแอนติเจนและระดับการเจือจางซีรัม และเมื่อนำแอนติเจนที่ได้จากการผ่านกระบวนการสกัดแยกโปรตีนเพื่อทำให้บริสุทธิ์และวัดปริมาณโปรตีนของแอนติเจนมาเรียบร้อยแล้วนั้นมาทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมร่วมกับซีรัมควบคุมผลบวกที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 (Titer=10,728) และซีรัมควบคุมผลลบ (Titer=165) เพื่อใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ด้วยวิธี Checkerboard titration โดยทำการเจือจางแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.05-10 µg/ml และซีรัมเริ่มจาก 1:30 ไปจนถึง 1:300 พบว่าแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ร่วมกับการเจือจางซีรัมที่ 1:200 และคอนจูเกตที่อัตราส่วน 1:60,000 เป็นอัตราส่วนสำหรับการทำปฏิกิริยากันที่เหมาะสม (ตารางที่ 4.2-4.5) โดยพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างค่า OD ของซีรัมควบคุมผลบวกต่อซีรัมควบคุมผลลบที่มากที่สุด (Positive to negative ratio; P/N) (ตารางที่ 4.6)

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีการพัฒนาชุดตรวจอิลไลซ่าต่อเชื้อ PCV2 ของ Sun *et al.* (2010) ที่ใช้แอนติเจนจากโปรตีน ORF2 ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ร่วมกับการเจือจางซีรัมที่ 1:100 และการศึกษาของ Zepeda-Cervantes *et al.* (2019) ซึ่งได้รายงานการใช้โปรตีนแอนติเจนที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกันอยู่ที่ 0.33 µg/ml และมีการเจือจางซีรัมที่ 1:200 ในการทำอินไคเร็คอิลไลซ่าเช่นเดียวกับการทดลองนี้ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าอัตราส่วนดังกล่าวนี้ถือว่าเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเตรียมชุดตรวจ I-ELISA ที่จะพัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ต่อไป

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับความเข้มข้นของแอนติเจนเปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวก

Serum dilution	OD at antigen concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0.05	0.1	0.3	0.5	1	1.5	2	3	5	10
1:30	0.129	0.159	0.170	0.178	0.166	0.158	0.149	0.132	0.118	0.103
1:50	0.133	0.171	0.189	0.199	0.173	0.168	0.160	0.147	0.124	0.111
1:100	0.206	0.237	0.244	0.253	0.227	0.192	0.188	0.167	0.134	0.120
1:150	0.299	0.387	0.410	0.439	0.392	0.379	0.347	0.286	0.253	0.198
1:200	0.481	0.505	0.523	0.598*	0.478	0.396	0.385	0.354	0.313	0.210
1:250	0.219	0.237	0.258	0.319	0.200	0.192	0.186	0.173	0.161	0.145
1:300	0.129	0.148	0.166	0.199	0.183	0.177	0.168	0.157	0.136	0.113

หมายเหตุ : ทดสอบด้วยคอนจูเกตที่อัตราส่วน 1:60,000

\* คือ อัตราส่วนที่เหมาะสม

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับความเข้มข้นของแอนติเจนเปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลลบ

Serum dilution	OD at antigen concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0.05	0.1	0.3	0.5	1	1.5	2	3	5	10
1:30	0.035	0.038	0.041	0.045	0.040	0.039	0.030	0.021	0.023	0.019
1:50	0.061	0.064	0.065	0.077	0.077	0.072	0.070	0.069	0.064	0.061
1:100	0.082	0.086	0.086	0.089	0.076	0.091	0.086	0.084	0.079	0.073
1:150	0.087	0.089	0.091	0.098	0.087	0.07	0.069	0.060	0.054	0.042
1:200	0.089	0.092	0.096	0.102*	0.099	0.091	0.088	0.082	0.075	0.069
1:250	0.062	0.068	0.070	0.077	0.077	0.073	0.072	0.069	0.061	0.055
1:300	0.035	0.048	0.057	0.059	0.055	0.051	0.051	0.047	0.041	0.039

หมายเหตุ : ทดสอบด้วยคอนจูเกตที่อัตราส่วน 1:60,000

\* คือ อัตราส่วนที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลบวก  
เปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของคอนจูเกต

Conjugate	Serum dilution						
	1:30	1:50	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
1:50,000	0.186	0.297	0.303	0.458	0.612	0.327	0.256
1:60,000	0.178	0.199	0.253	0.439	0.598*	0.319	0.199
1:70,000	0.163	0.177	0.250	0.425	0.511	0.312	0.193
1:80,000	0.158	0.161	0.189	0.399	0.509	0.289	0.184
1:90,000	0.155	0.159	0.169	0.321	0.494	0.276	0.179
1:100,000	0.142	0.148	0.160	0.302	0.489	0.264	0.168

หมายเหตุ : ทดสอบด้วยแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

\* คือ อัตราส่วนที่เหมาะสม

**ตารางที่ 4.5** แสดงค่า OD ที่ได้จากการทดสอบด้วยระดับการเจือจางของซีรัมควบคุมผลลบ  
เปรียบเทียบกับระดับการเจือจางของคอนจูเกต

Conjugate	Serum dilution						
	1:30	1:50	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
1:50,000	0.118	0.124	0.136	0.190	0.199	0.148	0.133
1:60,000	0.045	0.077	0.089	0.098	0.102*	0.077	0.059
1:70,000	0.041	0.071	0.079	0.086	0.099	0.073	0.048
1:80,000	0.039	0.068	0.077	0.079	0.097	0.064	0.044
1:90,000	0.033	0.062	0.068	0.075	0.095	0.061	0.037
1:100,000	0.030	0.057	0.065	0.071	0.094	0.059	0.029

หมายเหตุ : ทดสอบด้วยแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

\* คือ อัตราส่วนที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.6** แสดงค่า P/N ของระดับความเข้มข้นของแอนติเจนและระดับการเจือจางของซีรัม  
ควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบ

Serum dilution	OD at antigen concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0.05	0.1	0.3	0.5	1	1.5	2	3	5	10
Positive (1:150)	0.299	0.387	0.410	0.439	0.392	0.379	0.347	0.286	0.253	0.198
Negative (1:150)	0.087	0.089	0.091	0.098	0.087	0.070	0.069	0.060	0.054	0.042
P/N (1:150)	3.437	4.348	4.505	4.480	4.506	5.414	5.029	4.767	4.685	4.714
Positive (1:200)	0.481	0.505	0.523	0.598	0.478	0.396	0.385	0.354	0.313	0.210
Negative (1:200)	0.089	0.092	0.096	0.102	0.099	0.091	0.088	0.082	0.075	0.069
P/N (1:200)	5.404	5.489	5.448	5.863*	4.828	4.352	4.375	4.317	4.173	3.043
Positive (1:250)	0.219	0.237	0.258	0.319	0.200	0.192	0.186	0.173	0.161	0.145
Negative (1:250)	0.062	0.068	0.070	0.077	0.077	0.073	0.072	0.069	0.061	0.055
P/N (1:250)	3.532	3.485	3.686	4.143	2.597	2.630	2.583	2.507	2.639	2.636

หมายเหตุ : ทดสอบด้วยคอนจูเกตที่อัตราส่วน 1:60,000

\* คือ ค่า P/N ที่สูงที่สุด

#### 4.5.2 การประเมินค่า Cut-off ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น

ผลจากการตรวจตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลทดสอบเป็นลบจากการตรวจด้วยชุดตรวจที่ผลิตเป็นการค้าจำนวน 60 ตัวอย่าง เมื่อตรวจด้วยชุดตรวจ I-ELISA ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นโดยใช้ความเข้มข้นของแอนติเจน ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) ร่วมกับอัตราส่วนการเจือจางซีรัม (1:200) และคอนจูเกตที่ทดสอบจนได้ค่าที่เหมาะสม (1:60,000) มาแล้วนั้นพบว่าตัวอย่างซีรัมทั้ง 60 ตัวอย่าง มีค่า OD อยู่ในช่วง 0.102-0.357 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.192 และค่า SD เท่ากับ 0.055 เมื่อคำนวณค่า Cut-off จากสูตรค่าเฉลี่ยของค่า OD จากตัวอย่างที่ให้ผลลบ บวกด้วยสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (Shen *et al.* 2015) จึงทำให้ได้ค่า Cut-off ที่เหมาะสมในการกำหนดผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ว่าเป็นบวกหรือลบบนอยู่ที่ 0.36 ทั้งนี้ผลการตรวจสอบตัวอย่างซีรัมจะมีระดับภูมิคุ้มกันเป็นบวกเมื่อค่า S/P ratio มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.36 และมีระดับภูมิคุ้มกันเป็นลบเมื่อค่า S/P ratio มีค่าน้อยกว่า 0.36

นอกจากนี้จากรายงานของนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และคณะ (2559) ที่ทำการพัฒนาชุดทดสอบอีไลซ่าสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหัดหน้าบวม มีการใช้วิธีการประเมินค่า

Cut-off ด้วยวิธีดังกล่าวเช่นเดียวกัน และได้ค่า Cut-off อยู่ที่ 0.334, 0.484 และ 0.678 และจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Sun *et al.* (2010) ที่มีการพัฒนาชุดตรวจอินโดเร็คอีไลซ่าต่อเชื้อ PCV2 โดยใช้ แอนติเจนจากโปรตีน ORF2 ก็ใช้วิธีการประเมินค่า Cut-off ด้วยวิธีการเดียวกัน โดยวัดค่า OD ที่ ความยาวคลื่นแสง 490 nm พบว่าค่า OD ของซีรัมควบคุมผลลบทั้งหมดจำนวน 25 ตัวอย่าง อยู่ใน ช่วง 0.068-0.209 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.12466 และค่า SD เท่ากับ 0.042 จึงได้ค่า Cut-off เท่ากับ 0.224313 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้จะใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ 0.5 µg/ml เท่ากันกับงานทดลองนี้ แต่อัตราการเจอจากซีรัม คอนจูเกต และความยาวคลื่นแสงที่ใช้มีความแตกต่างกัน จึงส่งผลให้ค่า Cut-off มีความแตกต่างกันไปในแต่ละสภาพของการทดลอง

#### 4.5.3 การประเมินค่าความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตรวจ ที่พัฒนาขึ้น

จากการทดสอบตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกจำนวน 60 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบ จำนวน 60 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 120 ตัวอย่าง ด้วยชุดตรวจที่ผลิตเป็นการค้าเพื่อประเมินหา ค่าความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นในการ ศึกษาครั้งนี้เมื่อเทียบกับชุดที่ผลิตเป็นการค้า ผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการ ตรวจด้วยชุด I-ELISA มีจำนวน 49 ตัวอย่าง (True positive) จาก 60 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ ผลลบ 54 ตัวอย่าง (True negative) จาก 60 ตัวอย่าง ทำให้สรุปได้ว่าชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้น มีค่า Sensitivity อยู่ที่ 81.67% และมีค่า Specificity อยู่ที่ 90.00% และให้ผลบวกหลง (False positive) เท่ากับ 10.00% และให้ผลลบหลง (False negative) เท่ากับ 18.33% (ตารางที่ 4.7) ทั้งนี้ ค่า Sensitivity และค่า Specificity ที่ได้เป็นผลที่ใช้ชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เป็น Reference method ในการตรวจยืนยันระดับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและลบ ซึ่ง ชุดตรวจทางการค้าดังกล่าวเป็นชุดตรวจที่ได้มาตรฐานและได้รับการยอมรับในประเทศไทย และมีค่า Sensitivity และ Specificity มากกว่า 90% (ตารางที่ 4.14) โดยยืนยันได้จากงานวิจัยของ Pileri *et al.* (2014) ที่ได้มีการเปรียบเทียบชุดตรวจอีไลซ่าทางการค้าดังกล่าว (BioChek; UK) กับวิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) พบว่าชุดตรวจทางการค้ามีค่า Sensitivity 90.1% และค่า Specificity 100% จึงใช้ชุดตรวจทางการค้าดังกล่าวเป็น Reference method ในการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า Sensitivity และ Specificity ของชุดตรวจ I-ELISA

I-ELISA	BioChek		Total
	Positive	Negative	
Positive	49 (TP)	6 (FP)	55
Negative	11 (FN)	54 (TN)	65
Total	60 (TP+FN)	60 (FP+TN)	120

TP หมายถึง True positive, FP หมายถึง False positive, FN หมายถึง False negative, TN หมายถึง True negative

%Sensitivity:  $[TP/(TP+FN)] \times 100 = 81.67\%$

%Specificity:  $[TN/(FP+TN)] \times 100 = 90.00\%$

%False positive:  $[FP/(FP+TN)] \times 100 = 10.00\%$

%False negative:  $[FN/(TP+FN)] \times 100 = 18.33\%$

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Sun *et al.* (2010) ที่มีการพัฒนาชุดตรวจอินโดเร็คคือไลซ่าต่อเชื้อ PCV2 โดยใช้แอนติเจนจากโปรตีน ORF2 พบว่ามีค่า Sensitivity 93.57% และมีค่า Specificity 87.7% เมื่อใช้วิธี IFA เป็น Reference method และการศึกษาของ Huang *et al.* (2011) ที่มีการพัฒนาชุดตรวจ Blocking ELISA ต่อเชื้อ PCV2 พบว่ามีค่า Sensitivity 98.8% และมีค่า Specificity 88.5% โดยใช้วิธี Serum neutralization assay เป็น Reference method ซึ่งจากทั้งสองงานวิจัยดังกล่าวใช้วิธีการเตรียมแอนติเจนโดยการผลิต Recombinant protein โดยใช้ Baculovirus expression system ซึ่งเป็นการผลิตและทำให้แอนติเจนมีความบริสุทธิ์โดยตรง ทำให้นำแอนติเจนที่ได้มาใช้ ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของแอนติเจนเมื่อนำมาเคลือบเพลทมีความเสถียรมากกว่า แม้ว่าวัคซีนที่งานวิจัยนี้นำมาใช้จะใช้วิธีการผลิตแอนติเจนโดยใช้ Baculovirus expression system และทำให้แอนติเจนมีความบริสุทธิ์มาแล้วเช่นเดียวกันก็ตาม แต่กระบวนการทำให้แอนติเจนมีความบริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้เคลือบเพลทของงานทดลองนี้ใช้วิธีการกรองปั่นเหวี่ยงด้วย Microsep 3K เพื่อสกัดแยกส่วนของแอนติเจนออกจากสื่อของวัคซีนให้ได้มากที่สุด แต่วิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัดคือ Microsep 3K มีคุณสมบัติที่สามารถกรองส่วนประกอบที่เป็นเกล็ดออกได้เท่านั้น จึงอาจทำให้ยังคงมีสื่อในวัคซีนที่ยังหลงเหลือจับอยู่กับส่วนของแอนติเจนภายในสารละลายหลังกรองแยก ทำให้อันติเจนเมื่อนำไปใช้เคลือบเพลทมีส่วนที่ไม่บริสุทธิ์หรือไม่มีความเสถียรมากเพียงพอและไปรบกวนระบบการทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งแอนติเจนหรือส่วนประกอบใดก็ตามที่จะนำไปใช้ในการเคลือบเพลทนั้นควรมีความบริสุทธิ์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งควรเป็นเนื้อเดียวกันไม่เช่นนั้นจะส่งผลให้ความไว (Sensitivity) ลดลงได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การทดลองนี้มีค่า Sensitivity ที่ต่ำกว่างานวิจัยอื่นที่ได้กล่าวไป แต่ในส่วนของค่า Specificity ยังให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สองงานวิจัยที่ได้ยกตัวอย่างไปเล็กน้อย ซึ่งเป็นผลให้สามารถนำไปใช้ได้และให้ผลบวกสูง (False positive) เพียง 10.00%

#### 4.5.4 การประเมินความคลาดเคลื่อนของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นโดยวิธีการทดสอบซ้ำ (Repeatability test)

จากการประเมินค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดสอบซ้ำด้วยวิธี Intra-assay และ Inter-assay เพื่อบอกถึงความแม่นยำของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นเกี่ยวกับความสามารถในการที่จะนำมาใช้ทดสอบซ้ำ ๆ ได้ โดยใช้ซีรัมสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 จากการตรวจด้วยชุดตรวจทางการค้าเป็นซีรัมควบคุมผลบวกที่มีค่า OD ต่าง ๆ กันจำนวน 6 ตัวอย่าง และซีรัมที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 จากการตรวจด้วยชุดตรวจทางการค้าเป็นซีรัมควบคุมผลลบที่มีค่า OD ต่าง ๆ กันจำนวน 6 ตัวอย่าง มาตรวจสอบด้วยชุดตรวจ I-ELISA พบว่าค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นภายในเพลทเดียวกันจากการทดสอบด้วยวิธี Intra-assay ของซีรัมควบคุมผลบวก ( $n=6$ ,  $R=3$ ) มีค่า CV อยู่ในช่วง 1.536-4.161% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 3.296% (ตารางที่ 4.8) ส่วนซีรัมควบคุมผลลบ ( $n=6$ ,  $R=3$ ) มีค่า CV อยู่ในช่วง 2.973-8.103% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 4.385% (ตารางที่ 4.9) สำหรับค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นกับตัวอย่างเดียวกันแต่อยู่คนละเพลทที่ได้จากการทดสอบซ้ำด้วยวิธี Inter-assay ของซีรัมควบคุมผลบวก ( $n=6$ ,  $R=3$ ) มีค่า CV อยู่ในช่วง 3.627-6.138% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 4.678% (ตารางที่ 4.10) ส่วนซีรัมควบคุมผลลบ ( $n=6$ ,  $R=3$ ) มีค่า CV อยู่ในช่วง 3.950-7.133% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 5.718% (ตารางที่ 4.11) จะเห็นได้ว่าค่า CV ที่ได้จากทั้งสองการทดสอบนั้นถือว่าอยู่ในระดับดีเป็นที่ยอมรับ (Acceptable level) คือมีค่าต่ำกว่า 20% โดยค่า CV หากยังมีค่าต่ำจะยิ่งแสดงให้เห็นว่าชุดตรวจมีความคลาดเคลื่อนต่ำด้วย (ตารางที่ 4.12)

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาที่เป็นงานวิจัยในลักษณะเดียวกันจะเห็นได้ว่าค่า CV มีความใกล้เคียงกันกับงานวิจัยนี้ ตามที่คมปาน บัวไพจิตร (2558) ได้มีการพัฒนาชุดทดสอบอินไตรีคอีไลซ่าชนิด PCV2b โดยวิธี Intra-plate มีค่า CV ของซีรัมควบคุมผลบวกและลบอยู่ในช่วง 2.90-10.58% และ 0.47-11.27% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 6.21% และ 3.62% ตามลำดับ ส่วนในวิธี Inter-plate มีค่า CV ของซีรัมควบคุมผลบวกและลบอยู่ในช่วง 2.27-19.62% และ 1.01-23.00% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 6.34% และ 7.16% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Huang *et al.* (2011) ที่มีการพัฒนาชุดตรวจ Blocking ELISA ต่อเชื้อ PCV2 พบว่าในวิธี Intra-batch มีค่า CV อยู่ที่ 1.47-3.89% และในวิธี Inter-batch อยู่ที่ 2.57-7.90% สอดคล้องกับการศึกษาของสุรศักดิ์ จิตตวิสุทธิกุล (2550) ที่ได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS ในสุกร ซึ่งในวิธี Intra-assay มีค่า CV เท่ากับ 5.089% และในวิธี Inter-assay มีค่า CV เท่ากับ 7.645% ส่วนงานวิจัยของนิวัตร จันทศิริพรชัย และคณะ (2559) ที่ทำการพัฒนาชุดทดสอบอีไลซ่าสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม พบว่าแอนติเจนที่ผลิตจากล็อตเดียวกันมีค่าเฉลี่ยของ CV อยู่ที่ 5.45, 3.67 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.85% และแอนติเจนที่ผลิตจากต่างล็อตกันมีค่าเฉลี่ยของ CV อยู่ที่ 4.1, 6.15 และ 6.28% และจากงานวิจัยที่มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคอีโคโนซ่าต่อเชื้อ PCV2 โดยใช้แอนติเจนจากโปรตีน ORF2 ของ Sun *et al.* (2010) ในวิธี Intra-assay มีค่า CV ของซีรัมควบคุมผลบวกและลบอยู่ในช่วง 0.12-14.87% และ 0.46-6.45% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 2.34% และ 2.17% ตามลำดับ ซึ่งมีค่า CV ที่ต่ำกว่างานวิจัยนี้ แต่จะเห็นว่าในวิธี Inter-assay มีค่า CV ของซีรัมควบคุมผลบวกและลบอยู่ในช่วง 11.26-37.04% และ 10.16%-38.26% หรือมีค่ามัธยฐานอยู่ที่ 19.03% และ 31.74% ตามลำดับ ซึ่งมีค่า CV ที่สูงกว่างานวิจัยนี้ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยดังกล่าวมาแล้ว งานวิจัยนี้จึงมีค่า CV ที่อยู่ในระดับเป็นที่ยอมรับเช่นกัน

ตารางที่ 4.8 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Intra-assay ของซีรัมควบคุมผลบวก

	1	2	3	4	5	6
Row D	0.560	0.459	0.389	0.549	0.508	0.405
Row E	0.557	0.448	0.421	0.521	0.525	0.430
Row F	0.544	0.423	0.413	0.519	0.544	0.411
Mean OD	0.554	0.443	0.408	0.530	0.526	0.415
SD	0.009	0.018	0.017	0.017	0.018	0.013
%CV	1.536	4.161	4.085	3.167	3.426	3.142

ตารางที่ 4.9 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Intra-assay ของซีรัมควบคุมผลลบ

	1	2	3	4	5	6
Row A	0.103	0.112	0.131	0.176	0.135	0.120
Row B	0.097	0.125	0.149	0.184	0.136	0.133
Row C	0.099	0.107	0.152	0.174	0.144	0.125
Mean OD	0.100	0.115	0.144	0.178	0.138	0.126
SD	0.003	0.009	0.011	0.005	0.005	0.007
%CV	3.065	8.103	7.887	2.973	3.566	5.204

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Inter-assay ของซีรัมควบคุม  
ผลบวก

	1	2	3	4	5	6
Row D1	0.566	0.436	0.435	0.513	0.522	0.411
Row D2	0.523	0.469	0.387	0.549	0.559	0.433
Row D3	0.572	0.449	0.399	0.565	0.515	0.441
Mean OD	0.554	0.451	0.407	0.542	0.532	0.428
SD	0.027	0.017	0.025	0.027	0.024	0.016
%CV	4.827	3.683	6.138	4.911	4.444	3.627

ตารางที่ 4.11 แสดงค่า OD จากการทดสอบความคลาดเคลื่อนด้วยวิธี Inter-assay ของซีรัมควบคุม  
ผลลบ

	1	2	3	4	5	6
Row A1	0.109	0.115	0.157	0.182	0.137	0.136
Row A2	0.106	0.121	0.141	0.169	0.147	0.121
Row A3	0.095	0.112	0.146	0.185	0.129	0.131
Mean OD	0.103	0.116	0.148	0.179	0.138	0.129
SD	0.007	0.005	0.008	0.009	0.009	0.008
%CV	7.133	3.950	5.531	4.760	6.551	5.905

ตารางที่ 4.12 สรุปผลการทดสอบความคลาดเคลื่อนโดยวิธีการทดสอบซ้ำของชุดตรวจ I-ELISA

I-ELISA	Intra-plate		Inter-plate	
	Positive	Negative	Positive	Negative
%CV	1.536-4.161	2.973-8.103	3.627-6.138	3.950-7.133
Median	3.296	4.385	4.678	5.718

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.5 การเปรียบเทียบชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจทางการค้าในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2

จากการทดสอบตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ทั้งหมดจำนวน 800 ตัวอย่าง (n=800) ด้วยชุดตรวจ I-ELISA จากนั้นนำผลการตรวจระดับแอนติบอดีที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลจากชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) และนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความสอดคล้อง (Agreement) หรือค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) พบว่าตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกเหมือนกันมีจำนวน 524 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลลบเหมือนกันมีจำนวน 108 ตัวอย่าง และให้ผลการตรวจที่แตกต่างกันจำนวน 168 ตัวอย่าง โดยกลุ่มที่ให้ผลบวกกับชุดตรวจทางการค้าแต่ให้ผลลบกับ I-ELISA มีจำนวนถึง 156 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่ให้ผลลบกับชุดตรวจทางการค้าแต่ให้ผลบวกกับ I-ELISA มีจำนวนเพียง 12 ตัวอย่างเท่านั้น ทั้งนี้ชุดตรวจทั้งสองมีค่าความสอดคล้องหรือค่าสหสัมพันธ์ระหว่างกันอยู่ที่ 79.00% ซึ่งอยู่ในระดับของค่าความสอดคล้อง (Level of agreement) ที่ระดับ Strong หรือระดับที่เชื่อถือได้ (McHugh. 2012) แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจ I-ELISA ที่ถูกพัฒนาขึ้นให้ผลการตรวจระดับแอนติบอดีที่เหมือนกับชุดตรวจทางการค้าถึง 79.00% (ตารางที่ 4.13 และ 4.14) และเมื่อนำผลการตรวจระดับแอนติบอดีจากทั้งสองวิธีมาคำนวณเพื่อหาค่าการยอมรับทางสถิติ (Kappa value) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.4488 ซึ่งถือว่ามีขนาดความสอดคล้อง (Strange of agreement) อยู่ในระดับปานกลาง (Moderate) (Landis and Koch. 1977) ซึ่งอยู่ในระดับการยอมรับที่เพียงพอ (McHugh. 2012) โกล้เคียงกับงานวิจัยของ Witte *et al.* (2000) ที่พัฒนาชุดตรวจอีไลซ่าต่อเชื้อ PRRS ที่มีค่า Kappa value อยู่ที่ 0.58 โดยอยู่ในระดับปานกลาง (Moderate) เช่นเดียวกัน

จะเห็นได้ว่าการทดลองนี้มีค่า %Agreement หรือ %Correlation ของชุดตรวจ I-ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้าที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Witte *et al.* (2000) ที่พัฒนาชุดตรวจอีไลซ่าต่อเชื้อ PRRS ที่มีค่า Correlation อยู่ที่ 82.4% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า IDEXX HerdChek ELISA และการศึกษาของ สุรศักดิ์ จิตตวิสุทธิกุล (2550) ที่ได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS ในสุกร ที่มีค่า Correlation อยู่ที่ 82.69% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IPMA แต่การทดลองนี้มี %Agreement ที่สูงกว่างานวิจัยของนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และคณะ (2559) ที่ทำการพัฒนาชุดทดสอบอีไลซ่าสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม พบว่ามี %Agreement อยู่ที่ 53% และ 59% แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงเพียงพอที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ได้

**ตารางที่ 4.13** แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 จากชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK)

I-ELISA	BioChek		Total
	Positive	Negative	
Positive	524 (TP)	12 (FP)	536
Negative	156 (FN)	108 (TN)	264
Total	680 (TP+FN)	120 (TN+FP)	800
Kappa value	0.4488		

TP หมายถึง True positive, FP หมายถึง False positive, FN หมายถึง False negative, TN หมายถึง True negative

%Agreement หรือ %Correlation:  $[(TP+TN)/(TP+FN+TN+FP)] \times 100 = 79.00\%$

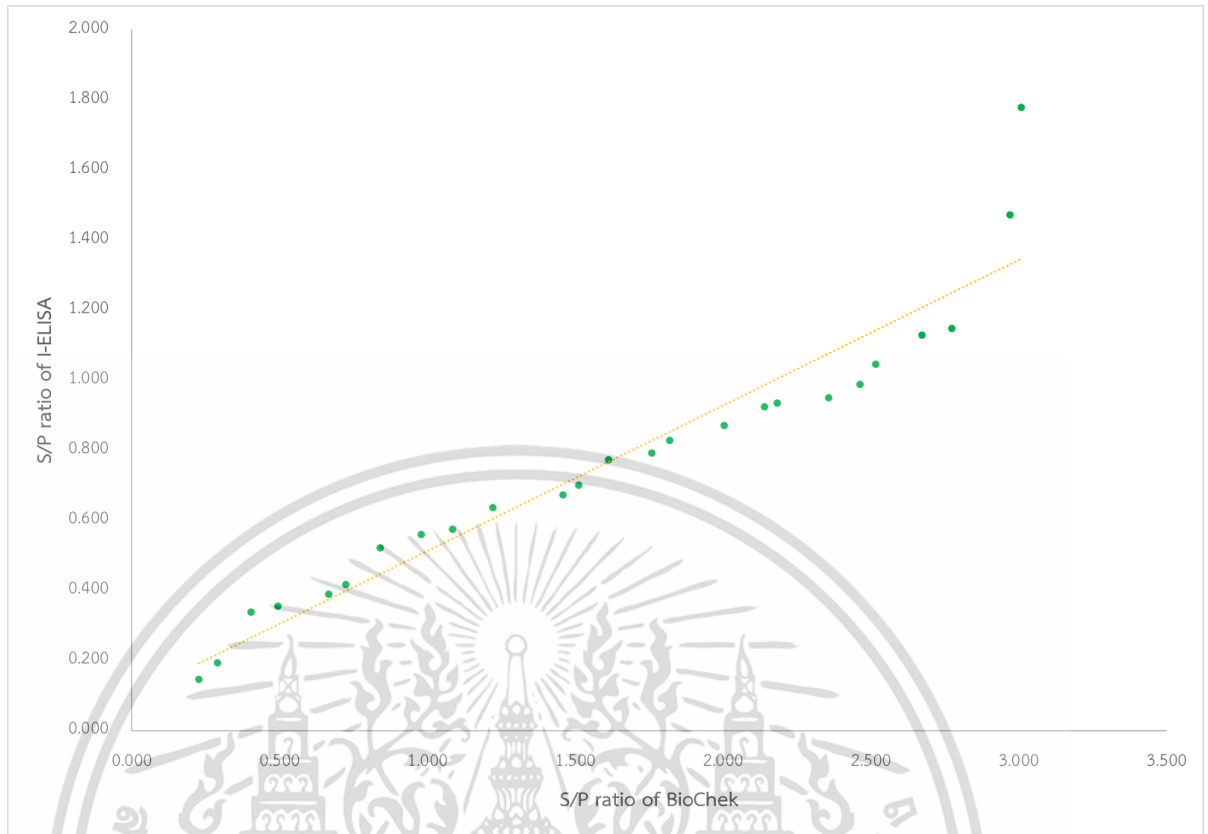
**ตารางที่ 4.14** แสดงค่าความไว ความจำเพาะ และค่าสหสัมพันธ์ของชุดตรวจ I-ELISA และชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK)

Reference method	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Correlation (%)
I-ELISA	81.67	90.00	79.00
BioChek	90.10	99.00-100	

หมายเหตุ : ค่า Sensitivity และ Specificity ของชุดตรวจ I-ELISA คำนวณจากการใช้ชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เป็น Reference method ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัม (n=800) ส่วนค่า Sensitivity และ Specificity ของชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) อ้างอิงจากข้อมูลจากทางผู้ผลิตและงานวิจัยของ Pileri *et al.* (2014)

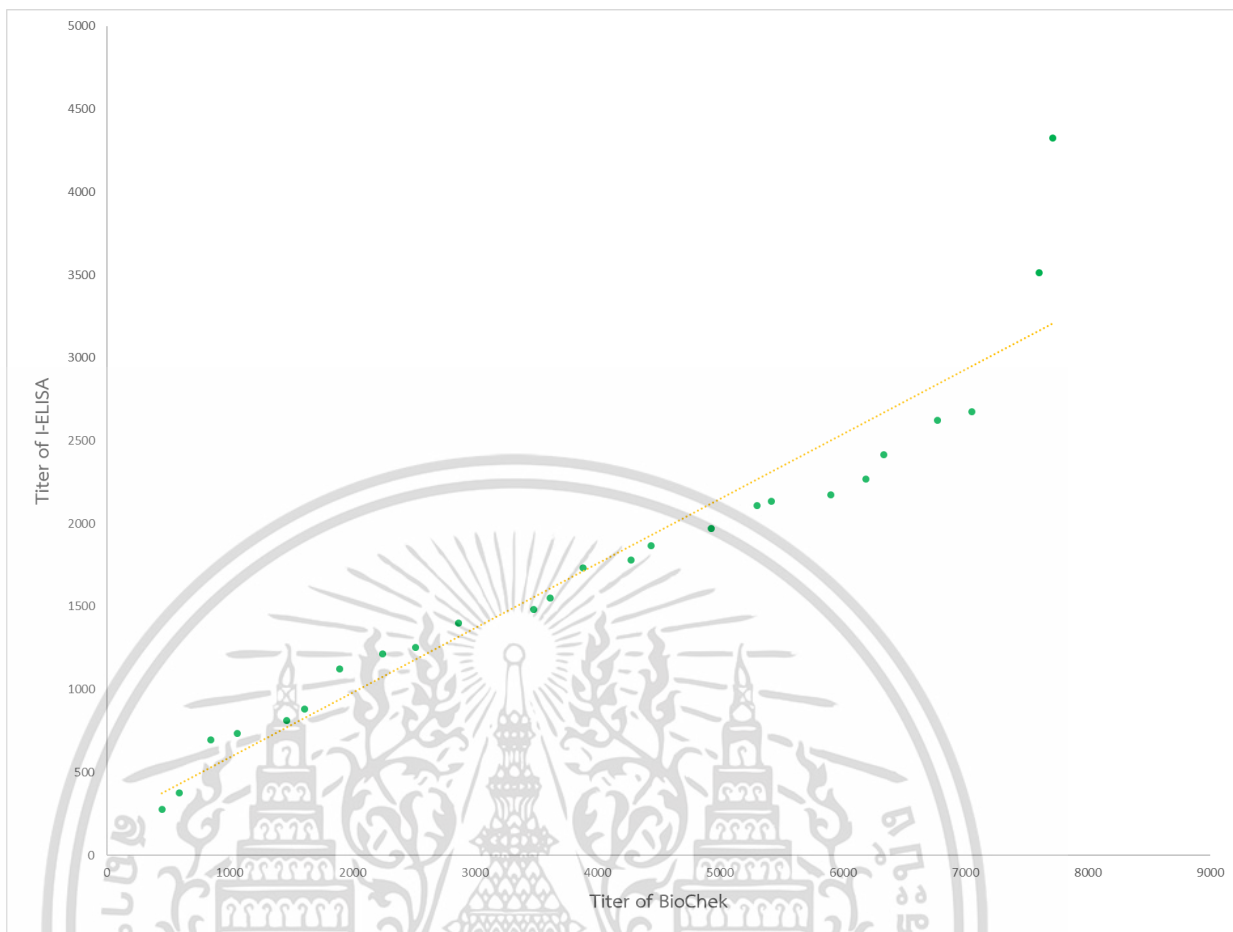
เมื่อนำตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในระดับที่แตกต่างกันทั้งหมดจำนวน 25 ตัวอย่าง โดยมีช่วงระดับแอนติบอดี (Titer) กระจายอยู่ในช่วงระหว่าง 449-7,715 หรือมีค่า S/P ratio อยู่ในช่วง 0.227-3.010 (เป็นค่าอ้างอิงที่ได้จากการตรวจด้วยชุดตรวจทางการค้า) มาทำการหาค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างค่า S/P ratio ของชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้า พบว่าค่า S/P ratio ระหว่างชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นต่อกัน โดยมีค่า Correlation อยู่ที่  $r=0.9563$  ซึ่งแสดงว่าทั้งสองชุดตรวจมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงมาก (Very high correlation) (Mukaka. 2012) (ภาพที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า S/P ratio ระหว่างชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK)

เมื่อนำค่า S/P ratio ที่ได้จากชุดตรวจ I-ELISA มาทำการแปลงเป็นค่า Titer โดยใช้วิธีการคำนวณตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดตรวจทางการค้า พบว่าค่า S/P ratio ที่ได้จากชุดตรวจ I-ELISA เมื่อนำมาแปลงเป็นค่า Titer ของตัวเองแล้วมีค่าสหสัมพันธ์ที่สอดคล้องกันกับชุดตรวจทางการค้าเช่นเดียวกับค่า S/P ratio โดยมีค่า Correlation อยู่ที่  $r=0.9523$  ซึ่งแสดงว่าค่า Titer ระหว่างทั้งสองชุดตรวจมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงมาก (Very high correlation) (Mukaka. 2012) (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า Titer ระหว่างชุดตรวจ I-ELISA กับชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK)

เมื่อพิจารณาจากกราฟในช่วงที่ระดับ Titer ตั้งแต่ประมาณ 5,300 ขึ้นไป (ค่าอ้างอิงที่ได้จากการตรวจด้วยชุดตรวจทางการค้า) พบว่าชุดตรวจ I-ELISA มีค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างจุดข้อมูลกับเส้นตรงเชิงเส้นค่อนข้างมาก (ภาพที่ 4.6) แต่เมื่อพิจารณาจากตัวอย่างซีรัมสุกรที่ทำการเก็บรวบรวมมาใช้ในการศึกษานี้ซึ่งได้เก็บตัวอย่างจากหลายฟาร์มทั่วประเทศไทย พบว่าระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ของสุกรโดยส่วนใหญ่มีระดับ Titer ไม่เกิน 6,000 (Titer ระดับ 165-5,989 มี 687 ตัวอย่าง และระดับ 6,058-10,728 มี 113 ตัวอย่าง) ซึ่งจากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ได้ โดยสามารถรายงานผลการตรวจได้ทั้งในรูปแบบของ S/P ratio และ Titer อย่างไรก็ตามเพื่อให้การรายงานผลในรูปแบบของ Titer มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นจึงควรพัฒนาวิธีการคำนวณค่า Titer ที่เหมาะสมและจำเพาะต่อชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคอีโงลาสำหรับใช้ในการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในซีรัมสุกร ซึ่งได้มีการเตรียมแอนติเจนบริสุทธิ์โดยการสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกรชนิดซบยูนิตด้วย Microsep 3K เพื่อเป็นการนำสารละลายส่วนเกินและสื่อที่ใช้ในการผลิตวัคซีนออกให้มากที่สุด แล้วนำแอนติเจนที่ได้มาทำการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และตรวจสอบหาโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี Native PAGE และ SDS-PAGE พบว่าปรากฏแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงขนาดโปรตีนของ ORF2 (28-30 kDa) จากนั้นทำการพิจารณาคัดเลือกโปรตีนจากวัคซีนที่เหมาะสมไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนด้วยวิธี Dot blot ซึ่งพบว่าโปรตีนจากวัคซีน PRO-VAC CIRCMASTER (ประกอบด้วยโปรตีน ORF2 100 ไมโครกรัม และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มีความเหมาะสมที่สุดในการเลือกใช้เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน จึงนำแอนติเจนจากวัคซีนดังกล่าวมาใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคอีโงลา พบว่าแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ร่วมกับการเจือจางซีรัมที่ 1:200 และคอนจูเกตที่อัตราส่วน 1:60,000 เป็นอัตราส่วนสำหรับการทำปฏิกิริยากันที่เหมาะสม และเมื่อคำนวณค่า Cut-off ในการกำหนดผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ของชุดตรวจ I-ELISA พบว่าอยู่ที่ 0.36 ซึ่งเมื่อทำการประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันของชุดตรวจ I-ELISA โดยใช้ชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK) เป็น Reference method พบว่าชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีค่า Sensitivity เท่ากับ 81.67% และมีค่า Specificity เท่ากับ 90.00% สำหรับการประเมินความคลาดเคลื่อนของชุดตรวจ I-ELISA โดยวิธีการทดสอบซ้ำ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบด้วยวิธี Intra-assay และ Inter-assay มีค่าไม่เกิน 20% ทั้งในซีรัมควบคุมผลบวกและลบ ซึ่งถือว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (Acceptable level) และเมื่อนำผลการทดสอบตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ด้วยชุดตรวจ I-ELISA มาเปรียบเทียบกับผลจากชุดตรวจทางการค้าเพื่อหาค่าความสอดคล้อง (Agreement) หรือค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) พบว่ามีค่าอยู่ที่ 79.00% ซึ่งอยู่ในระดับที่เชื่อถือได้ (Strong) แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจ I-ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการที่จะสามารถนำมาใช้ตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ได้ ทำให้สามารถช่วยลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยและควบคุมโรคในระดับฝูงได้ด้วยวิธีการที่สะดวกและรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ยังคงต้องทำการศึกษาและทดลองเพิ่มเติมในอีกหลายด้าน ทั้งในเรื่องของการพัฒนาประสิทธิภาพในการสกัดแยกและการเก็บรักษาแอนติเจน อายุการใช้งานของชุดตรวจและสารเคมีที่ใช้ ตลอดจนการพัฒนาชุดตรวจ I-ELISA ชุดนี้เพิ่มเติมให้มีความเสถียรมากยิ่งขึ้น มีค่า Sensitivity และค่า Specificity ที่สูงขึ้นเพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการแปลผลและการนำไปใช้ประโยชน์ และนำไปสู่การเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานอื่นที่จะช่วยวัดประสิทธิภาพของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นได้อย่างเหมาะสม ได้แก่ วิธี Virus neutralization assay (VN) เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กฤษฎาภรณ์ พริ้งเพราะ และสมพร เตชะงามสุวรรณ. 2550. “วิทยาภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 (PCV2) ในสุกร.” **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร.** 5(1) : 71-80.
- กิตติกร บุญศรี จิราภรณ์ ศรีทัน พัลลพ ต้นแก้ว และกฤษฎาภรณ์ พริ้งเพราะ. 2555. “ปริศนาพยาธิวินิจฉัย.” **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร.** 10(3) : 223-227.
- คมปาน บัวไฟจิตร. 2558. “การพัฒนาชุดทดสอบอินโดเรกซ์อีไลซาชนิดพีซีวีทูปีสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อพีซีวีทู.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ สударัตน์ ดำรงค์วัฒน์ โภคิน อีระพล ศิริณฤมิตร และวรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2542. “การศึกษาการติดเชื้อ Porcine circovirus ในสุกรในประเทศไทย.” หน้า 242-243. ใน **ประมวลเรื่องงานประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25, 27-29 ตุลาคม.** กรุงเทพฯ : สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.
- นภธร บานชื่น. 2536. **ELISA: ทฤษฎีและปฏิบัติ.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : หมอชาวบ้าน.
- นันทิกา คงเจริญพร กิตตินันท์ โกมลภิส และอนุมาศ บัวเขียว. 2555. “การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลินโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิวัตร จันท์ศิริพรชัย วิษณุ วรรณแสง และปิยะรัตน์ จันท์ศิริพรชัย. 2559. รายงานทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช การพัฒนาชุดทดสอบอีไลซาสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหัวหน้ำขาว. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รชฎ ตันติเลิศเจริญ วิจิตร เกียรติพัฒนสกุล และรุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2542. “รายงานการตรวจพบการติดเชื้อ Circovirus ในสุกรในประเทศไทย.” **เวชสารสัตวแพทย์.** 29(3) : 73-83.
- รุ่งธรรม เกษโกวิท. 2554. “การตรวจพบเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 3 (พีซีวี 3) ในประเทศไทยและกลุ่มอาการที่เกี่ยวข้อง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช ปิยะ วงศ์ญาณิน อมรรัตน์ ทศนกิจ และทศดาว ไทยวงษ์. 2548. “การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรกระบบทางเดินหายใจสุกร.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรวิทย์ วัชชวัลคุ ธีระพล ศิริณฤมิตร ปรีดา เลิศวัชรสารกุล สุदारัตน์ ดำรงค์วัฒน์โกคิน และดวงทอง ปัจฉิมะศิริ. 2542ก. “การพัฒนาวิธี Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัส (Porcine circovirus) จากเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) และเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อเซอร์โคไวรัสสายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย.” หน้า 226-232. ใน **ประมวลเรื่องงานประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25, 27-29 ตุลาคม**. กรุงเทพฯ : สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.

สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ. 2564. **สถานการณ์สินค้าสุกรและแนวโน้ม ปี 2565**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.swinethailand.com/>.

สุรศักดิ์ จิตตวิสุทธิกุล. 2550. “การพัฒนาชุดตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโรค Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) ในสุกร.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Afghaha, Z., Webb, B., Meng, X. and Ramamoorthy, S. 2017. “Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: Is eradication a possibility?.” **Veterinary Microbiology**. 206 : 21-28.

Allan, G.M., Mackie, D.P., McNair, J., Adair, B.M. and McNulty, M.S. 1994. “Production, preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus.” **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 43 : 357-371.

Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A. and Adair, B. 1995. “Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material.” **Veterinary Microbiology**. 44 : 49-64.

Arruda, B., Piñeyro, P., Derscheid, R., Hause, B., Byers, E., Dion, K., Long, D., Sievers, C., Tangen, J., Williams, T. and Schwartz, K. 2019. “PCV3-associated disease in the United States swine herd.” **Emerging Microbes and Infections**. 8(1) : 684-698.

Avrameas, S. 1983. “Enzyme immunoassays and related techniques: development and limitations.” **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 104 : 93-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Avrameas, S., Ternynck, T. and Guesdon, J.L. 1978. "Coupling of enzyme to antibodies and antigens." **Scandinavian Journal of Immunology**. 8(7) : 7-23.
- Baek, J., Cha, S., Cho, S., Lee, M. and Park, C. 2021. "Minimal dosage of porcine circovirus type 2d based virus-like particles to induce stable protective immunity against infection." **Pathogens**. 10 : 1644.
- Banchuin, N, Wheeler, J. and Sussman, M. 1984. "Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-streptococcal protoplast membrane antibodies." **Infection**. 6 : 361-366.
- Bandrick, M., Balasch, M., Heinz, A., Taylor, L., King, V., Toepfer, J. and Foss, D. 2022. "A bivalent porcine circovirus type 2 (PCV2), PCV2a-PCV2b, vaccine offers biologically superior protection compared to monovalent PCV2 vaccines." **Veterinary Research**. 53 : 12.
- Banlunara, W., Suradhat, S. and Thanawongnuwech, R. 2002. "Retrospective immunohistochemical study of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Thailand." p. 469. In **Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress (IPVS) June 2-5**. Iowa : Ames.
- Barrett, T.J., Blake, P.A., Brown, S.L., Hoffman, K., Mateullort, J. and Feeley, J.C. 1983. "Enzyme linked immunosorbent assay for detection of human antibodies to *Salmonella typhi* Vi antigen." **Journal of Clinical Microbiology**. 17 : 625-627.
- Beach, N.M. and Meng, X.J. 2012. "Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2)." **Virus Research**. 164 : 33-42.
- Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." **Analytical Biochemistry**. 72 : 248-254.
- Bullock, S.L. and Walls, K.W. 1977. "Evaluation of some of parameters of the enzyme-linked immunospecific assay." **Journal of the Infectious Diseases**. 136 : 279-285.

- Burt, S.M., Carter, T.J.N. and Kricka, L.J. 1979. "Thermal characteristics of microtitre plates used in immunological assays." **Journal of Immunological Methods.** 31 : 231-236.
- Butler, J.E., Feldbush, T.L., Mc Givern, P.L. and Stewart, N. 1978. "The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a measure of antibody concentration or affinity." **Immunochemistry.** 15 : 131-136.
- Chae, C. 2012. "Commercial Porcine Circovirus Type 2 vaccines: efficacy and clinical application." **The Veterinary Journal.** 194 : 151-157.
- Cohen, J. 1960. "A coefficient of agreement for nominal scales." **Educational and Psychological Measurement.** 20 : 37-46.
- Colwell, D.E., Gollahon, K.A., Mc Ghee, J.R. and Michalek, S.M. 1982. "IgA hybridomas: a method for generation in high numbers." **Journal of Immunological Methods.** 54 : 259-266.
- Darwich, L. and Mateu, E. 2012. "Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2)." **Virus Research.** 164 : 61-67.
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J. and Allan, G. 1998. "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome." **The Canadian Veterinary Journal.** 39 : 44-51.
- Engvall, E. 1980. "Enzyme immunoassay ELISA and EMIT." **Methods in Enzymology.** 70 : 419-439.
- Engvall, E. and Perlmann, P. 1972. "Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes." **Journal of Immunology.** 109 : 129-135.
- Fenaux, M., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Royer, R. and Thomas, P. 2002. "Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions." **Journal of Virology.** 76 : 541-551.
- Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J. and Mateu, E. 2007. "Detection of neutralizing antibodies in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs." **Veterinary Microbiology.** 125 : 244-255.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F. and Segalés, J. 2008. “Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccinations of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins.” **Vaccine**. 26 : 1063–1071.
- Franzo, G. and Segalés, J. 2018. “Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology.” **PLoS ONE**. 13 : 12.
- Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K. and Buechner-Maxwell, V. 2009. “Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease.” **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 23 : 1151-1163.
- Gilpin, D.F., McCullough, K. and Meehan, B.M. 2003. “In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system.” **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 94 : 149–161.
- Hamberg, A., Ringler, S. and Krakowka, S. 2007. “A novel method for the detection of porcine circovirus type 2 replicative double stranded viral DNA and non-replicative single stranded viral DNA in tissue sections.” **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 19 : 135–141.
- Harding, J.C. and Clark, E. 1997. “Recognizing and diagnosing post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).” **Journal of Swine Health and Production**. 5 : 201–203.
- Harms, P.A. 2002. “Post weaning multisystemic wasting syndrome and porcine circovirus: A united state perspective.” pp. 291-295. in Morilla, A., Yoon, K. J. and Zimmerman, J. (editors). **Trends in emerging viral infections of swine**. Iowa State Press.
- Herrmann, J.E. and Colins, M.F. 1976. “Quantitation of immunoglobulin adsorption to plastics.” **Journal of Immunological Methods**. 10 : 363-366.
- Hirschl, A., Stanek, G., Rotter, M.L., Chau, P.Y. and Niemetz, A.H. 1985. “Antibody response to somatic antigen of *Salmonella typhi* in areas endemic and non-endemic for typhoid fever.” **Infection Control**. 6 : 110-114.
- Huang, L., Lu, Y., Wei, Y., Guo, L. and Liu, C. 2011. “Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2.” **Journal of Virological Methods**. 171 : 26–33.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segales, J. and Allan, G.M. 2010. "Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2." **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 136 : 185–193.
- Kelsoe, G.H. and Ueller, T.H. 1978. "Immunodiagnosis of infection with *S. mansoni*: ELISA for the detection of antibody to circulating antigen." pp. 5715-5717. In **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.
- Kiatipattanasakul-Banlunara, W., Tantilertcharoen, R., Suzuki, K. Albarenque, S., Thanawongnuwech, R., Nakayama, H. and Doi, K. 2002. "Detection of porcine circovirus 2 (PCV2) DNA by nested PCR from formalin-fixed tissue of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand." **Journal of Veterinary Medical Science**. 64(5) : 449-452.
- Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F. and Allan, G. 2000. "Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus." **Veterinary Pathology**. 37 : 254–263.
- Landis, J.R. and Koch, G.G. 1977. "The measurement of observer agreement for categorical data." **Biometrics**. 33 : 159-174.
- Larochelle, R., Magar, R. and D’Allaire, S. 2002. "Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions." **Virus Research**. 90 : 101–112.
- Lee, K.S., Sohn, M.R., Kim, B.Y., Choo, Y.M., Woo, S.D. and Yoo, S.S. 2012. "Production of classical swine fever virus envelope glycoprotein E2 as recombinant polyhedral in baculovirus-infected silkworm larvae." **Molecular Biotechnology**. 50 : 211–220.
- Lehtonen, O.P. and Viljanen, M.K. 1980. "Antigen attachment in ELISA." **Journal of Immunological Methods**. 34 : 61-70.
- Li, J., Yu, T. and Zhang, F. 2017. "Inactivated chimeric porcine circovirus (PCV) 1–2 vaccines based on genotypes 2b and 2d exhibit similar immunological effectiveness in protecting pigs against challenge with PCV2b strain 0233." **Archives of Virology**. 162(1) : 235–246.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H. and Kwang, J. 2006. "The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo." **Journal of Virology**. 80 : 5065–5073.
- Liu, Q., Tikoo, S.K. and Babiuk, L.A. 2001. "Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2." **Virology Journal**. 285 : 91-99.
- Lukert, P., de Boer, G.F., Dale, J.L., Keese, P., McNulty, M.S., Randles, J.W. and Tischer, I. 1995. "The circoviridae in virus taxonomy." pp. 166-168. in Murphy, Fauquet, F.A., Bishop, C.M., Ghabrial, D.H.L., Jarvis, S.A., Martelli, A.W., Mayo, G.P. and Summers, M.A. (editors). **Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses**. New York : Springer.
- Madson, D.M., Ramamoorthy, S. and Kuster, C. 2009. "Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars." **Veterinary Research**. 40 : 10.
- Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E. and Jestin, A. 2000. "Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes." **Journal of General Virology**. 81 : 1815-1824.
- Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B. and Kurzendoerfer, P. 2004. "Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication." **Veterinary Microbiology**. 98 : 81–88.
- Mc Laren, M.L., Lillywhite, J.E. and Au, A.C.S. 1981. "Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): practical aspects of standardization and quality control." **Medical laboratory scientist**. 38 : 245-251.
- McCullough, K.C., Ruggli, N. and Summerfield, A. 2009. "Dendritic cells—at the front-line of pathogen attack." **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 128 : 7–15.
- McHugh, M.L. 2012. "Interrater reliability: the kappa statistic." **Biochemia Medica (Zagreb)**. 22(3) : 276-282.
- McKeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D.K. and Elvinger, F. 2005. "Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2." **Clinical and Vaccine Immunology**. 12 : 1347–1351.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Meng, X.J. 2012. "Spread like a wildfire- the omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever expanding association with diseases in pigs." **Virus Research**. 164 : 1-3.
- Meurman, O.H. 1983. "Detection of antiviral IgM antibodies and its problems – a review." **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 104 : 101-131.
- Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J. and Nauwynck, H.J. 2006. "Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells." **Journal of Virology**. 80 : 3487-3494.
- Mukaka, M.M. 2012. "Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research." **Malawi Medical Journal**. 24(3) : 69-71.
- Mukherjee, P., Milton, A.A.P., Karam, A., Chakraborty, A.K., Das, S., Puro, K., Sanjukta, R., Ghatak, S., Shakuntala, I., Laha, R.G. and Sen, A. 2018. "Porcine circovirus2 (PCV2): A review of disease profile and control." **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**. 39 : 38-50.
- Nauwynck, H.J., Sanchez, R. and Meerts, P. 2012. "Cell tropism and entry of porcine circovirus 2." **Virus Research**. 164 : 43-45.
- Nawajitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D. and Paul, P.S. 2000. "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein." **Journal of General Virology**. 81 : 2281-2287.
- Nielsen, J., Vincent, I.E., Botner, A., Ladekaer-Mikkelsen, A.S., Allan, G. and Summerfield, A. 2003. "Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)." **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 12(92) : 97-111.
- O'Sullivan, M.J. and Marks, V. 1981. "Methods for the preparation of enzyme-antibody conjugates for use in enzyme immunoassay." **Methods in Enzymology**. 73 : 147-166.
- O'Sullivan, M.J., Bridges, J.W. and Marks, V. 1979. "Enzyme immunoassay: a review." **Annals of Clinical Biochemistry**. 16 : 221-240.

- Opriessnig, T., Gerber, P.F. and Xiao, C.T. 2014. "Commercial PCV2a based vaccines are effective in protecting naturally PCV2b infected finisher pigs against experimental challenge with a 2012 mutant PCV2." **Vaccine**. 32 : 4342–4348.
- Opriessnig, T., Meng, X.J. and Halbur, P. 2007. "Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 19 : 591-615.
- Opriessnig, T., O'Neill, K. and Gerber, P.F. 2013a. "A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection." **Vaccine**. 31 : 487–494.
- Park, J.S., Kim, J. and Ha, Y. 2005. "Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2." **The Journal of Comparative Pathology**. 132 : 139–144.
- Patterson, A.R., Madson, D.M., Halbur, P.G. and Opriessnig, T. 2011. "Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure." **Veterinary Microbiology**. 149 : 225–229.
- Pejsak, Z., Podgorska, K. and Truszczynski, M. 2010. "Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)." **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. 33 : 1–5.
- Pesce, A.J., Ford, D.J., Gaizutis, M. and Pollak, V.E. 1977. "Binding of protein to polystyrene in solid-phase immunoassays." **Biochimica et Biophysica Acta**. 492 : 399-407.
- Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T.P., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F. and Delwart, E. 2016. "Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation." **Virology Journal**. 13 : 184.

- Pileri, E., Cortey, M., Rodríguez, F., Sibila, M., Fraile, L. and Segalés, J. 2014. “Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2.” **The Veterinary Journal.** 201(3) : 429-432.
- Pogranichniy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Sorden, S.D. and Daniels, M. 2002. “Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with post weaning multisystemic wasting syndrome.” **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** 14 : 449-456.
- Pogranichnyy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J. and Sorden, S.D. 2000. “Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection.” **Viral Immunology.** 13(2) : 143-153.
- Porstmann, B., Porstmann, T., Nugel, E. and Evers, U. 1985. “Which of the commonly used marker enzymes gives the best results in colorimetric and fluorimetric enzyme immunoassays: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or  $\beta$ -galactosidase.” **Journal of Immunological Methods.** 79 : 27-37.
- Rose, N., Eveno, E. and Grasland, B. 2009. “Individual risk factors for post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs: a hierarchical Bayesian survival analysis.” **Preventive Veterinary Medicine.** 90 : 168-179.
- Segalés, J. 2011. **The importance of porcine circovirus type 2 (PCV2) subclinical infection.** [Online]. Available : [https://www.pig333.com/articles/the-importance-of-porcine-circovirus-type-2-pcv2-subclinical-infecti\\_4052/](https://www.pig333.com/articles/the-importance-of-porcine-circovirus-type-2-pcv2-subclinical-infecti_4052/).
- Segalés, J. 2012. “Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis.” **Virus Research.** 164 : 10-19.
- Segalés, J., Allan, G.M. and Domingo, M. 2005. “Porcine circovirus diseases.” **Animal Health Research Reviews.** 6 : 119-142.
- Shekarchi, I.C., Sever, J.L., Lee, Y.J., Gastellano, G. and Madden D.L. 1984. “Evaluation of various plastic microtiter plates with measles, toxoplasma and gamma globulin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay.” **Journal of Clinical Microbiology.** 19 : 89-96.

- Shen, H., Wang, C., Madson, D.M. and Opriessnig, T. 2010. “High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America.” **Preventive Veterinary Medicine.** 97 : 228–236.
- 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.” **Journal of Virological Methods.** 225 : 30-34.
- Shibahara, T., Sato, K. Ishikawa, Y. and Kadota, K. 2000. “Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome.” **Journal of Veterinary Medical Science.** 62 : 1125-1131.
- Sirinarumitr, T., Shamsing, W., Jirawattanapong, P., Suwicha, K. and Ratanavanichroj, W. 2000. “Isolation of porcine circovirus type II (PCV2) using various cell lines.” p. 121. In **The 38<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference.** Bangkok : Kasetsart University.
- Subba Rao, P.V., Mc Cartney-Francies, N.L. and Metcalfe, D.D. 1983. “An avidin-biotin micro ELISA for rapid measurement of total and allergen-specific human IgE.” **Journal of Immunological Methods.** 57 : 71-85.
- Sun, S.Q., Guo, H.C., Sun, D.H., Yin, S.H., Shang, Y.J., Cai, X.P. and Liu, X.T. 2010. “Development and validation of an ELISA using a protein encoded by ORF2 antigenic domain of porcine circovirus type 2.” **Virology Journal.** 7 : 274.
- Suter, M. 1982. “A modified ELISA technique for antihapten antibodies.” **Journal of Immunological Methods.** 53 : 103-108.
- Thangthamniyom, N., Sangthong, P., Poolperm, P., Thanantong, N., Boonsoongnern, A., Hansoongnern, P., Semkum, P., Petcharat, N. and Lekcharoensuk, P. 2017. “Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Thailand during 2009–2015.” **Veterinary Microbiology.** 208 : 239–246.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W. and Koch, M.A. 1982. “A very small porcine virus with circular single-stranded DNA.” **Nature.** 295 : 64-66.

- Tischer, I., Rasch, R. and Tochtermann, G. 1974. "Characterization of papovavirus and piconavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines." **Zentralblatt für Bakteriologie.** 226 : 153-167.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M. and Allan, G.M. 2003. "Dendritic cells harbour infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus." **Journal of Virology.** 77 : 13288–13300.
- Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D.E. 1978. "Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques." **Journal of Clinical Pathology.** 31 : 507-520.
- Weilin, L.S. and Smith, D.J. 2002. "Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 50 : 2742-2747.
- West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K. and Ellis, J.A. 1999. "Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** 11 : 530–532.
- Witte, S.B., Chard-Bergstrom, C., Loughin, T.A. and Kapil, S. 2000. "Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-link immunosorbent assay for quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome." **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** 7 : 700-702.
- Yolken, R.H. 1982. "Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects." **Reviews of Infectious Diseases.** 4 : 35-68.
- Yolken, R.H. and Leister, F.J. 1981. "Investigation of enzyme immunoassay time courses: development of rapid assay systems." **Journal of Clinical Microbiology.** 13 : 738-741.
- Yolken, R.H., Kim, H.W. and Clem, T. 1977. "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis." **Lancet.** 2 : 263-267.

- Yolken, R.H., Wyatt, R.G. and Zissis, G.P. 1978. "Comparative epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay." **The New England Journal of Medicine.** 299 : 1161-1165.
- Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G. and Thacker, E. 2007. "Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs." **Veterinary Immunology and Immunopathology.** 15(115) : 261-272.
- Zepeda-Cervantes, J., Cruz-Reséndiz, A., Sampieri, A., Carreón-Nápoles, R., Sánchez-Betancourt, J.I. and Vaca, L. 2019. "Incorporation of ORF2 from Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) into genetically encoded nanoparticles as a novel vaccine using a self-aggregating peptide." **Vaccine.** 37 : 1928–1937.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก  
การเตรียมสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1. Coating buffer (0.05M bicarbonate-carbonate buffer (pH 9.6))

ชั่งสาร  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 กรัม และ  $\text{NaHCO}_3$  2.93 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้อยู่ที่ 9.6 และเติมน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ทำการปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2. Wash buffer (0.05% Tween-20 ใน PBS (pH 7.4))

เตรียมสารละลาย 10X PBS โดยชั่งสาร  $\text{NaCl}$  80 กรัม  $\text{KCl}$  2 กรัม  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  14.4 กรัม และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.4 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ที่ 7.4 และเติมน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ทำการปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารละลาย 1X PBS โดยตวงสารละลาย 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร และนำมาเตรียมเป็นสารละลาย Wash buffer โดยตวงสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเติมสาร Tween-20 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3. Blocking solution (5% Skim milk ใน PBS ที่มี 0.1% Tween-20)

เตรียม 5% Skim milk ใน PBS โดยชั่ง Skim milk 1 กรัม ละลายในสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารละลาย Blocking solution โดยนำสาร 5% Skim milk ใน PBS ที่เตรียมไว้ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาเติมสาร Tween-20 ลงไป 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

### 4. Stop solution (2M $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

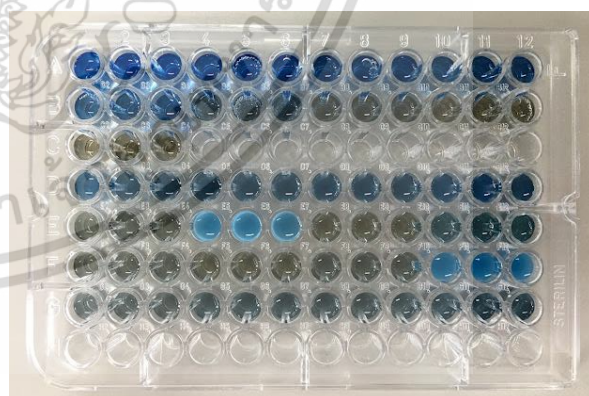
เตรียมน้ำบริสุทธิ์ Type 1 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เติมสาร  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปริมาตร 110 มิลลิลิตร ลงไปอย่างระมัดระวัง ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลา 1 ปี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

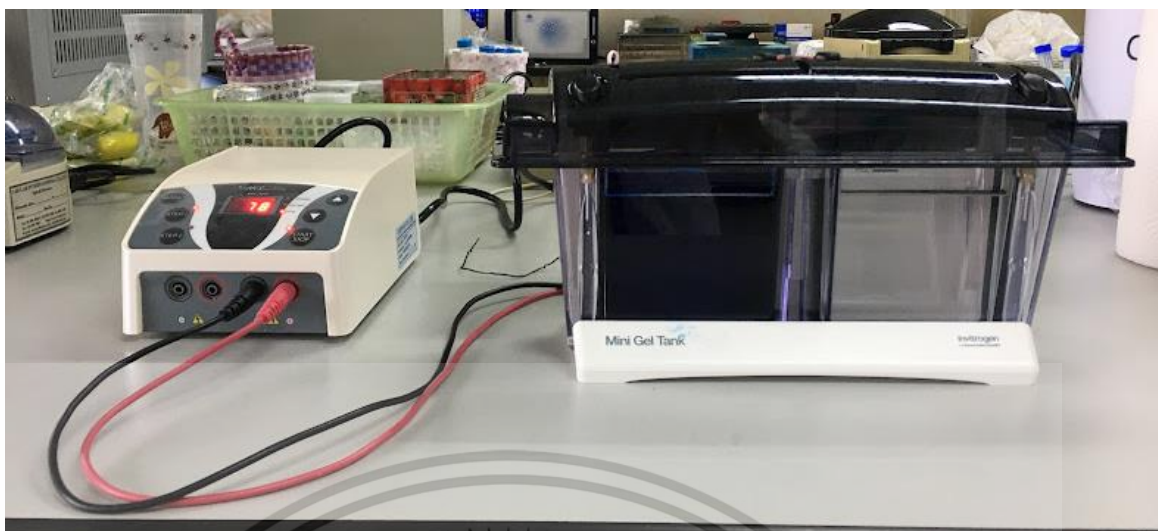


ภาคผนวกที่ ข 1 Microsep 3K สำหรับใช้ในการกรองแยกเกลือและสีออกจากวัคซีนเพื่อเตรียมแอนติเจนบริสุทธิ์



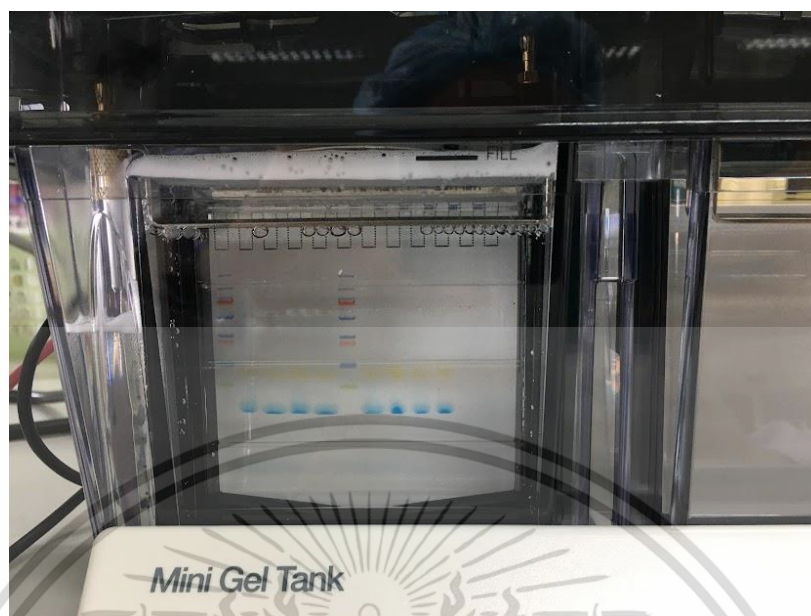
ภาคผนวกที่ ข 2 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนของแอนติเจนด้วยวิธี Bradford

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



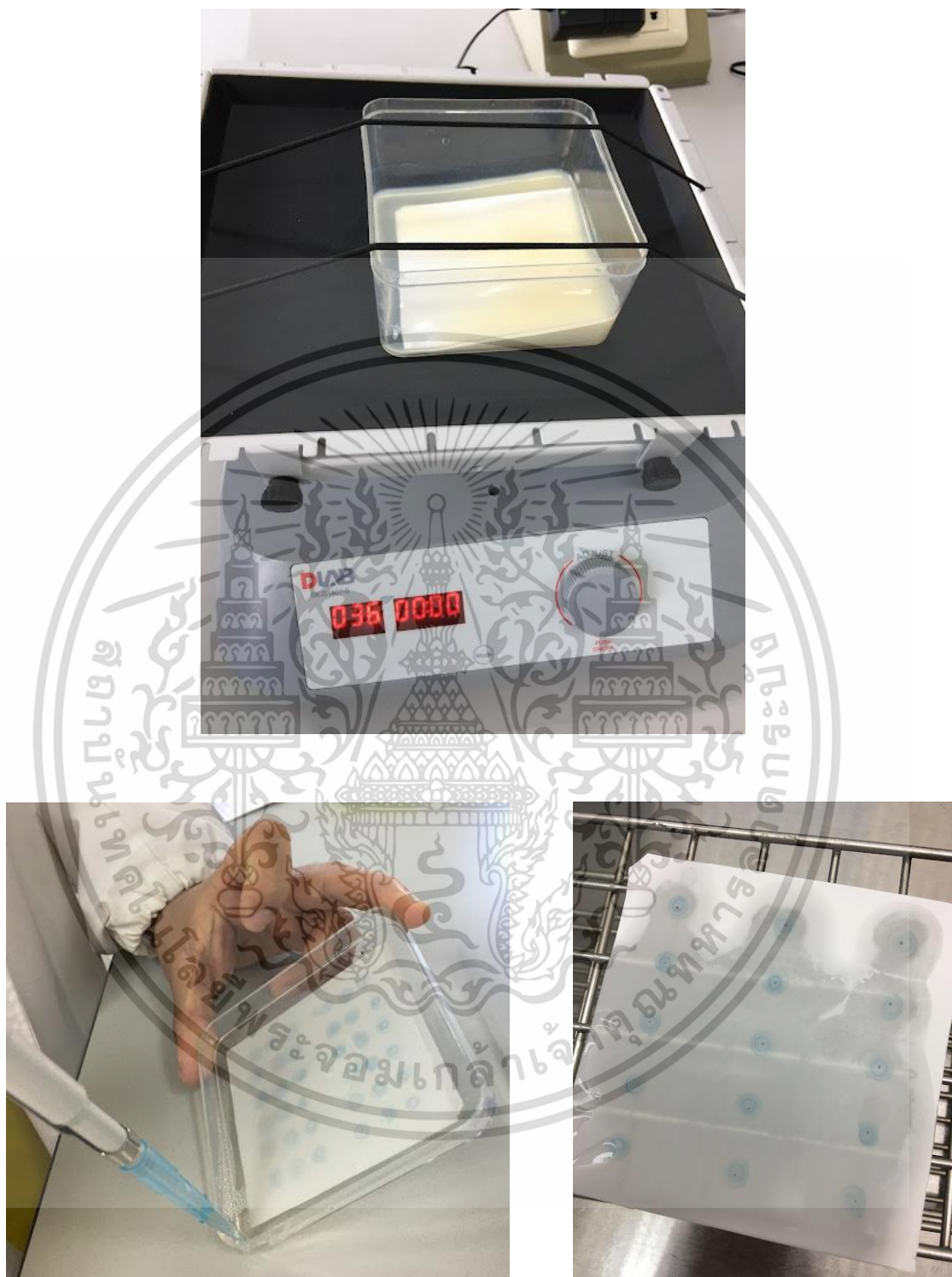
ภาคผนวกที่ ข 3 การหามวลโมเลกุลของแอนติเจนด้วยวิธี Native PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวกที่ ข 4 การหามวลโมเลกุลของแอนติเจนด้วยวิธี SDS-PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

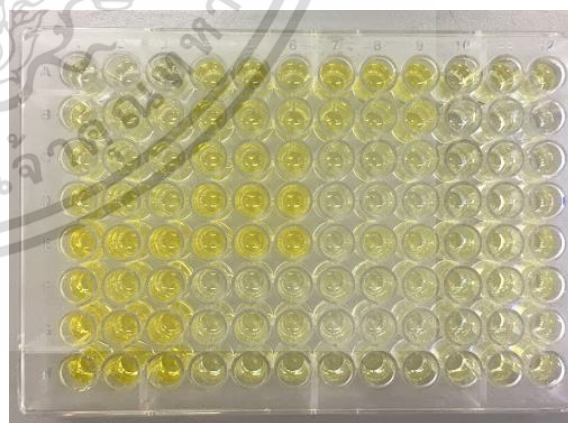
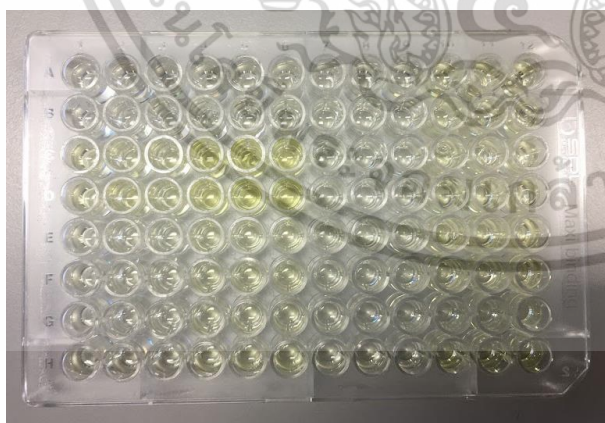


ภาคผนวกที่ ข 5 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

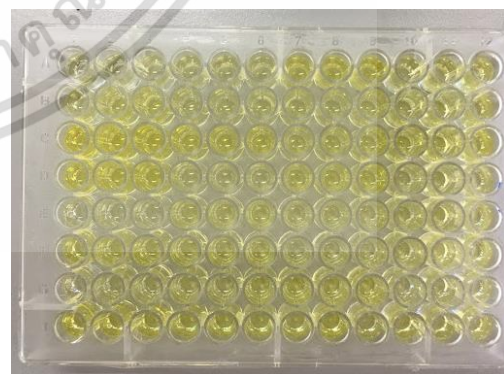
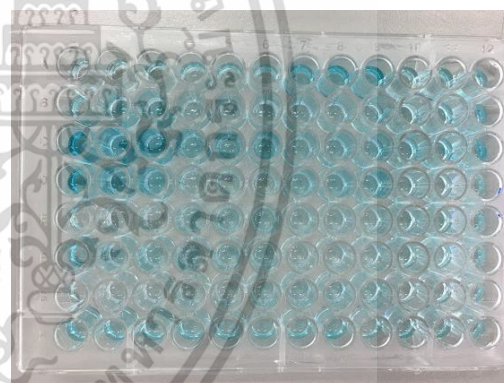
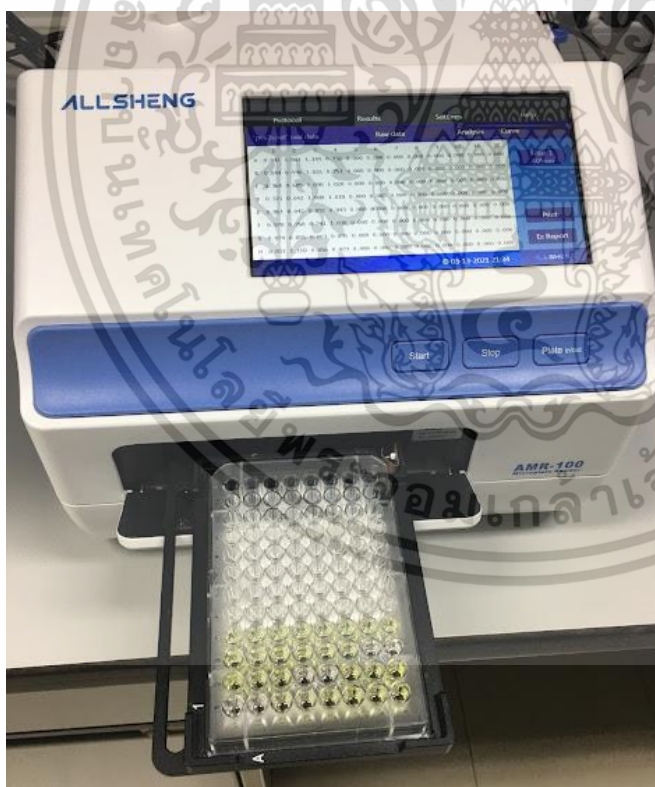


ภาคผนวกที่ ข 6 การตรวจตัวอย่างซีรัมสุกรด้วยชุดตรวจทางการค้า (BioChek; UK)



ภาคผนวกที่ ข 7 การทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันของแอนติเจน ซีรัม และ คอนจูเกต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



### ภาคผนวกที่ ข 8 การตรวจตัวอย่างซีรัมสุกรด้วยชุดตรวจอินโดเรคโอไลซ่าที่พัฒนาขึ้น (I-ELISA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสวรรรยา อ่ำพนพิศลย์
วัน เดือน ปีเกิด	22 มิถุนายน 2538
ที่อยู่	117/2 หมู่ 1 ตำบลทุ่งควายกิน อำเภอกาหลง จังหวัดระยอง 21110
ประวัติการศึกษา	- 2556 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนแก่ง “วิทยสถานาร” - 2560 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง - 2565 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	สวรรรยา อ่ำพนพิศลย์ กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ และชนาธิป ธรรมการ. 2565. “คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนโอเฟ่นรีดดิ้งเฟรม 2 ของเชื้อฟอร์ไซนเซอร์โคไวรัสไทป์ 2 ที่สกัดจากวัคซินด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน.” สัตวแพทยมหาสาร. 17(1) : 23-36.
ประวัติการทำงาน	- เจ้าหน้าที่ประกันคุณภาพ บริษัท ชันพีดี จำกัด พ.ศ.2561-2561 - ปัจจุบัน ฝ่ายสนับสนุนด้านเทคนิควิชาการ (Technical support) บริษัท ยูเนี่ยน อกริฟาร์ จำกัด พ.ศ.2564-ปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้