ว.วิทย. มข. 43(3) 439-445 (2558) KKU Sci. J. 43(3) 439-445 (2015)

การพัฒนา Indirect ELISA สำหรับตรวจแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิล โดยใช้แอนติเจนที่ผลิตได้จาก Vero Cell Line

Development of an Indirect ELISA for the Detection of Newcastle Disease Antibodies with the antigen preparation from the Vero Cell Line

อรวรรณ์ บุตรดี[1] วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์[1] น้องนิด เก้าลิ้ม[3] และ นรินทร์ อุประกรินทร์[1]

บทคัดย่อ

ชุดตรวจสอบ NDV KP-54 ELISA ได้พัฒนาขึ้นเพื่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ โดยเตรียมแอนติเจนจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ KP-54 ที่สามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ชนิด African green monkey (Vero) เป็นแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลท จากการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธี HI test กับตัวอย่างซีรั่มไก่ทั้งหมด 14 ฝูง จำนวน 219 ตัวอย่าง (n=219) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) พบว่ามีค่าความไว 79.76% ค่าความจำเพาะ 88.0% ได้จุดตัดของ S/P ratio เท่ากับ 0.450 เมื่อนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า (BioChek®) จากซีรั่มไก่ จำนวน 519 ตัวอย่าง (n=519) นำผลที่ได้มาประเมิน พบว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีค่าความไว 86.47% ค่าความจำเพาะ 84.57% และได้ค่าการยอมรับทางสถิติ (Kappa value) เท่ากับ 0.710 แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น มีคุณภาพได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจจากต่างประเทศ จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการได้

[1]ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[3]หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

ABSTRACT

We developed an indirect ELISA test (NDV KP-54) for the detection of antibodies against Newcastle disease virus (NDV) in chickens. The viral antigen was prepared from NDV KP-54 strain which was produced on African green monkey (Vero) cell line and use for an antigen coated plate. Serum samples from 14 flock of chicken (n=219) were tested by the NDV KP-54 ELISA compared with Hemagglutination inhibition test (HI). A cut-off point was established considering the distribution of reactivity values obtained by Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) template, The sensitivity and specificity of the ELISA were found to be 79.76% and 88.0% respectively, appropriated that cut-off point of the S/P ratio=0.450. In addition, The developed ELISA kit were evaluated by comparison with the ELISA commercial test kit (BioChek®) on 519 chicken serum The result showed that, the ELISA developed had sensitivity = 86.47% specificity = 84.57% and kappa value at 0.710 indicated that the efficiency of developed ELISA was close to that the commercial test kit and useful for improving NDV disease diagnosis in our laboratory.

คำสำคัญ: โรคนิวคาสเซิล Indirect ELISA HI

Keywords: Newcastle disease virus, Indirect ELISA, Hemagglutination inhibition

บทนำ

โรคนิวคาสเซิล (Newcastle dieseae) เป็นโรคระบาดสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก เดิมมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสในสกุลพารามิกโซไวรัส (paramyxovirus) ภายหลังเชื้อชนิดนี้ ได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุล รูบูลาไวรัส (rubulavirus) แฟมิลีพารามิกโซวีรีดี (paramyxoviridae) (Alexander, 1991) เป็นเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ มีการระบาดครั้งแรกที่ฟาร์มไก่ในเมืองนิวคาสเซิล ประเทศอังกฤษ ในปี ค.ศ.1926 หลังจากนั้นได้มีรายงานการระบาดของโรคนี้ในอีกหลายประเทศทั่วโลก (Alexander, 2000) รวมทั้งในประเทศไทย ได้มีการแพร่กระจายของโรคอย่างรวดเร็ว และก่อความเสียหายอย่างรุนแรง มีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 50-100 การวินิจฉัยโรคชนิดนี้เป็นไปตามวิธีการขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) โดยวิธีการเพาะเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง chicken embryo fibroblasts และการตรวจสอบภูมิคุ้มกันทางเซรุ่มวิทยา เช่น วิธีการทดสอบ hemagglutination inhibition (HI) และวีธีอีไลซ่า (ELISA) ข้อเสียของการตรวจด้วยวิธี HI คือ ไม่สามารถวัดภูมิคุ้มกันได้ในระดับต่ำ ในระยะหลังได้มีการพัฒนาการตรวจ viral neutralization test (VN) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถบ่งบอกภูมิคุ้มกันในการป้องกันไวรัสเข้าสู่เซลล์มาใช้ เนื่องจากมีความสอดคล้องกับความคุ้มโรคมากกว่า (นรินทร์และคณะ, 2543) จึงได้มีการนำเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดที่เกิด CPE ได้ชัดเจน นำมาปรับใช้เพื่อเพิ่มความสะดวกในการศึกษาและตรวจวินิจฉัยโดย Reynolds and Maraqa (1999) ได้นำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด swine testicular cell line มาใช้เลี้ยง NDV สายพันธุ์ที่ก่อความรุนแรง คือ Texus GB, การเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด baby hamster

kidney cell line (BHK) (Slosar et al., 1989) และ Bovine kidney cell (MDBK) เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีทดสอบแอนติบอดีด้วยวิธี VN (King, 1993; นรินทร์และคณะ, 2543) นอกจากนี้ Ahamed et al. (2004) ได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด African green monkey kidney cell line (VERO) มาปรับใช้ในการแยกและเลี้ยงเชื้อ Newcastle dieseae virus (NDV) ได้ผลดี โดยเกิด CPE ให้ตรวจสอบได้อย่างชัดเจนและได้เชื้อที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งไวรัสที่ได้เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้เตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบทางเซรุ่มวิทยาได้ทั้งสองวิธี คือ VN test โดยเฉพาะการตรวจด้วยวิธี ELISA จะสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากต่อครั้ง และมีรายงานผลการเปรียบเทียบกับวิธี HI test พบว่าผลที่ได้จะมีความสอดคล้องกัน (วัฒนศักดิ์และคณะ, 2548)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ไวรัสที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการ ทดลองเพาะเลี้ยงในเซลล์ชนิด VERO ซึ่งได้แอนติเจนที่มีความเข้มข้นสูงประกอบกับวิธีการตรวจด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีที่วัดได้ละเอียด ตรวจวัดตัวอย่างได้จำนวนมาก สามารถลดต้นทุนการนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศที่มีราคาแพง จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมและวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลในอนาคตได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม Viral antigen

ใช้เชื้อไวรัส NDV สายพันธุ์ KP-54 ซึ่งเพาะแยกได้จากตัวอย่างที่มีการระบาดในฟาร์มไก่ของเกษตรกรในเขตจังหวัดนครปฐม ส่งมาเพาะแยกเชื้อภายในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells ดัดแปลงตามวิธีการของ Ahamed et.al. (2004) และ Mohd Azmir et al. (2010) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Hyclone®) ที่มี 4mM L-Glutamine และ 25 mM Herpes เติม 2 mM $NaHCO_3$ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 µm แล้วเติม 100 µg/ml ของเพนนิซิลิน G, 500 µg/ml สเตรปโตมัยซิน, 2.5 µg/ml ของ amphotericin B และ 10% FBS (Hyclone®) เลี้ยงใน flask ขนาด 175 cm^2 ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 5% CO_2 จนเซลล์เจริญได้เต็มพื้นผิวภาชนะ จึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออก ล้างด้วย phosphate buffer saline pH.7.4 1 ครั้ง จากนั้นเติมเชื้อไวรัส NDV สายพันธุ์ KP-54 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ทั่วพื้นผิว จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด IMDM อีกครั้ง เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มี 5% CO_2 ทำการเก็บเซลล์เมื่อเกิด CPE ระหว่าง 80-100% นำมาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm. ล้างด้วย PBS แล้วเติมด้วย TE buffer ที่มี 0.5% Triton X 100 นำไป sonicate ที่คลื่นความถี่เสียง 23 KHz ในระดับ 8 amplitude จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนน้ำแข็ง นำไปเขย่าทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสมาผสมให้เป็น 50% glycerol เพื่อใช้เตรียมเป็น Viral antigen เก็บไว้ในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส สำหรับ VERO cell ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จะถูกเตรียมด้วยวิธีการเดียวกันเพื่อใช้เป็น control antigen

การเคลือบ viral antigen และขั้นตอนการทำ ELISA

นำแอนติเจน NDV KP-54และ VERO control ที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Checkerboard titration สามารถเจือจาง Viral antigenได้ในอัตราส่วน 1:320 และเจือจางซีรั่มได้อัตราส่วน 1:40

โดยเคลือบ antigen และ control ด้วย 0.05 M carbonate buffer pH 9.6 ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมของ 96 well ELISA plate (MAXISORB NUNC®) โดย viral antigen จะถูกเคลือบในหลุมคอลัมน์เลข 1 3 5 7 9 และ 11 ส่วน VERO control จะถูกเคลือบในหลุมคอลัมน์เลข 2 4 6 8 10 และ12 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นเจือจางซีรั่มที่ใช้ในการทดสอบ (n=88) ที่อัตราส่วน 1:40 ด้วย sample diluents ที่มีส่วนผสมของเซลล์ VERO ปกติลงใน dilution plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง สำหรับ plate ที่เคลือบแอนติเจนนำมาล้างด้วย PBST (PBS solution containing 0.05% Tween 20) จากนั้นจึง block ด้วย 5% skim milk นาน 1 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา เคาะ skim milk ออก เติมซีรั่มที่เจือจางแล้วลงในหลุม antigen และ control หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้าง PBST 3 ครั้งด้วยเครื่อง automatic washer เคาะฟองอากาศออก จากนั้นเติม 1:5000 ของ goat anti-chicken IgG, HRP conjugated, KPL® ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรทุกหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST เติม 100 ไมโครลิตรของ TMB substrate, KPL บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 1% sodium dodecyl sulfate solution นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 nm. ด้วยเครื่อง ELISA reader คำนวณค่า S/P ratio โดยใช้ค่าผลต่างระหว่างหลุม viral antigen และหลุม control antigen/ค่าเฉลี่ยของ positive control

การทดสอบด้วยวิธี haemagglutination inhibition (HI test)

นำตัวอย่างซีรั่มไก่ จำนวน 219 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบด้วยวิธี HI test ตามวิธีการของ OIE โดยทำการเจือจางซีรั่มด้วย PBS แบบ serial 2-fold dilution โดยเริ่มจาก 1:2 1:4 1:8 ในไมโครเพลท ปริมาตรหลุมละ 25 ไมโครลิตร เว้นหลุมสุดท้ายของแต่ละแถวเติม PBS หลุมละ 50 ไมโครลิตรเป็นหลุมควบคุม (control) แล้วเติม 4 HA unit ของแอนติเจนที่เตรียมจากไวรัสสายพันธุ์ KP-54 ทดสอบหาค่าที่เหมาะสมโดยวิธี HA หลุมละ 25 ไมโครลิตรเว้นหลุมควบคุม เขย่า plate ให้เข้ากันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงไก่ ความเข้มข้น 1% ลงในหลุมทุกหลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เขย่า plate ให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที แล้วอ่านผลระดับแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 1:8 จึงให้ผลบวก (OIE, 2009) แล้วจึงนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับวิธี indirect ELISA ที่เตรียมได้จากไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน

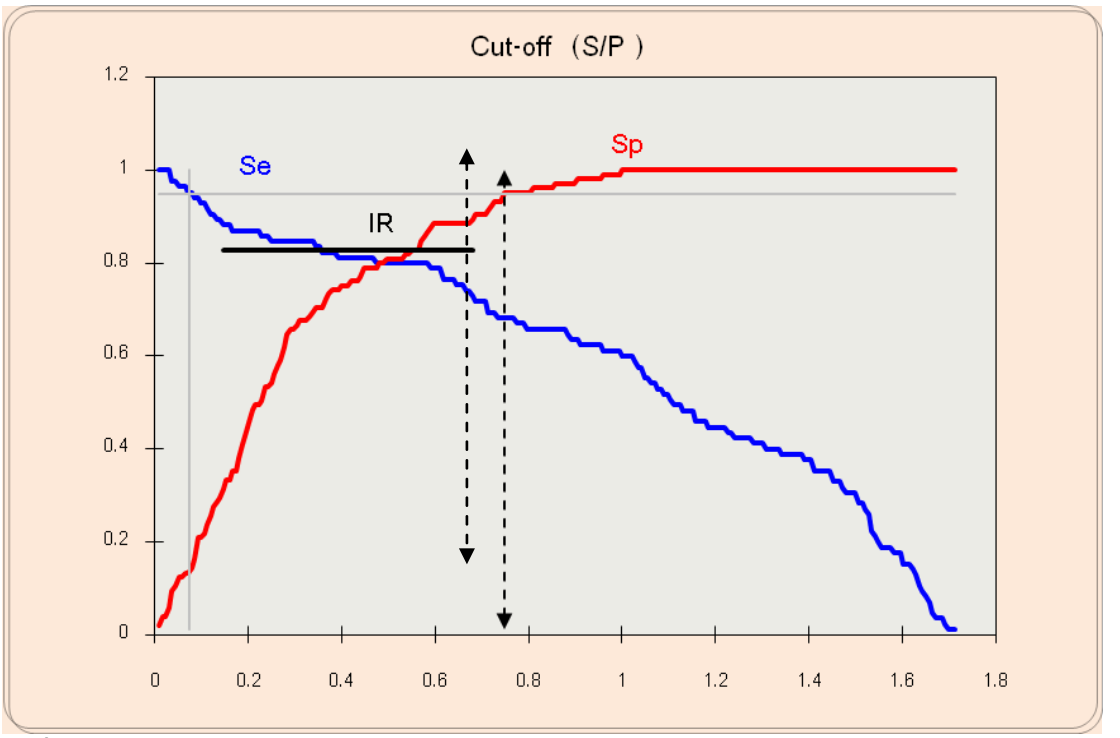
การทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

นำตัวอย่างซีรั่มไก่จำนวน 219 ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี HI test แล้ว นำมาใช้ในการหาแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิล ด้วยชุดตรวจ วิธี indirect ELISA KP-54 ที่พัฒนาขึ้นโดยทดสอบเปรียบเทียบกับวิธี HI นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความไว (sensivity) ความจำเพาะ (specificity) และค่า cut-off ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการตรวจในห้องปฏิบัติการ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป two-graph receiver operating Characteristic (TG-ROC) (Greiner, 1995; Greiner et al., 1995)

การประเมินเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า (Biochek®)

นำตัวอย่างซีรั่มไก่ที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA จากชุดตรวจ NDV KP-54 ตามวิธีการทดสอบข้างต้น จำนวน 519 ตัวอย่าง มาทดสอบเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (Biochek) โดยเจือจางด้วย sample diluents ในอัตราส่วน 1:50 ใน

ไมโครเพลท จากนั้นเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1:500 เติมซีรั่มที่เจือจางแล้วลงในหลุมของเพลทที่เคลือบ NDV แอนติเจน หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำมาล้าง PBST ด้วยเครื่อง automatic washer เคาะฟองอากาศออก จากนั้นจึงเติม 1:5000 ของ goat anti chicken IgG conjugated AP (KPL®) ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรทุกหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงล้างด้วย PBST เติม 100 ไมโครลิตรของ PNPP substrate (KPL®) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำยา stop solution นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader และนำค่า OD ที่วัดได้มาคำนวณหาค่า S/P ratio จากนั้นนำผลที่ได้จากการทดสอบทั้งสองชุดมาคำนวณหา ค่าความไว ความจำเพาะ และเปรียบเทียบค่าการยอมรับทางสถิติ (Kappa value)



รูปที่ 1 แสดงเส้นความไว (Sensitivity) และเส้นความจำเพาะ(Specificity) ของชุดตรวจ NDV KP-54 ตัดกันที่ค่า cut-off = 0.450 วิเคราะห์โดยโปรแกรม Two-Graph Receiver Operating Characteristic (TG-ROC)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบเพื่อหาค่าจุดตัด (cut-off)

จากผลการทดสอบหาแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิลด้วยวิธี indirect ELISA จากตัวอย่างซีรั่มไก่ทั้งหมด 219 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับวิธี HI test พบว่ามีซีรั่มจำนวน 170 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเหมือนกันทั้งสองวิธี โดยแบ่งเป็น ซีรั่มที่ให้ผลบวกเหมือนกันจำนวน 73 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลลบเหมือนกันจำนวน 97 ตัวอย่าง และมีซีรั่มจำนวน 49 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการทดสอบไม่เหมือนกัน แบ่งเป็นซีรั่มที่ให้ผลบวกด้วยวิธี ELISA จำนวน 26 ตัวอย่างแต่ให้ผลลบต่อวิธี HI test และมีจำนวน 23 ตัวอย่างที่ให้ผลลบ

ด้วยวิธี ELISA แต่ให้ผลบวกต่อวิธี HI test เมื่อนำค่า S/P ratio ที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เพื่อหาค่า Cut off ที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม TG-ROC พบว่าได้ค่า S/P ratio เท่ากับ 0.450 จะสามารถแยกกลุ่มที่ไม่มีแอนติบอดีออกจากกลุ่มที่มีแอนติบอดีได้ (รูปที่ 1) และได้ค่าความไวของชุดตรวจสอบเท่ากับ 79.76% ได้ค่าความจำเพาะเท่ากับ 88.0% (ตารางที่ 1) ซึ่งผลที่ได้จะใกล้เคียงกับที่ Hui Xu et al. (1997) รายงานไว้คือสามารถคัดเลือกค่า cut off ที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยทดสอบแอนติบอดีเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (HI test) ได้ค่าความไวและค่าความจำเพาะที่เท่ากันคือ 0.85% และได้ค่า cut off 0.75 ดังนั้นจึงสามารถนำชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิลในระดับฝูงได้

ผลการประเมินเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า (Biochek®)

เมื่อนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาใช้ทดสอบกับซีรั่มจำนวน 519 ตัวอย่างโดยทดสอบเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า (BioChek test kit) พบว่ามีซีรั่มจำนวน 445 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน แบ่งเป็นซีรั่มที่ให้ผลบวกเหมือนกันจำนวน 275 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลลบเหมือนกัน จำนวน 170 ตัวอย่างและมีซีรั่มจำนวน 74 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการทดสอบไม่เหมือนกัน แบ่งเป็นซีรั่มที่ให้ผลบวกด้วยวชุดตรวจ NDV KP-54 ELISA แต่ให้ผลลบต่อชุดตรวจสอบของ BioChek ELISA จำนวน 31 ตัวอย่าง และมีจำนวน 43 ตัวอย่าง ที่ให้ผลลบด้วย NDV KP-54 ELISA แต่ให้ผลบวกต่อชุดตรวจ BioChek เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่าได้ค่าความไวของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นร้อยละ 86.47 และได้ค่าความจำเพาะร้อยละ 84.57 และได้ค่าการยอมรับในทางสถิติ (Kappa value) เท่ากับ 0.710 (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจ indirect ELISA NDV KP-54 ที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ และมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับชุดตรวจสอบทางการค้าได้ จึงเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการหาระดับภูมิคุ้มกันในห้องปฏิบัติการได้

ตารางที่ 1 แสดงค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจ NDV KP-54 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี hemagglutination inhibition (HI)

NDV KP-54	HI test		
	Positive	Negative	Total
No. samples			
Positive	73	26	99
Negative	23	97	120
Total	96	123	219
Sensitivity = 79.76%			
Specificity = 88.0%			
Cut off = 0.450			

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจ NDV KP-54 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า (BioChek®)

NDV KP-54 ELISA	BioChek®		
	Positive	Negative	Total
No. samples			
Positive	275	31	306
Negative	43	170	213
Total	318	201	519
Sensitivity = 85.44%			
Specificity = 79.81%			
Kappa = 0.710			

เอกสารอ้างอิง

นรินทร์ อุประกรินทร์ นำดี แซ่เฮง นันทวัน ญาติบรรทุง วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์ และวรวิทย์ วัชชวัลคุ. (2543). การพัฒนาการตรวจ virus neutralization ต่อไวรัสนิวคาสเซิลโดยใช้ Bovine Kidney cell line. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ครั้งที่ 39: 412-419

วัฒนศักดิ์ จำละคร อนิรุธ เนื่องเม็ก อัจจิมา คล้ายหงษ์. (2548). การเปรียบเทียบผลการตรวจแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิลในนกกระจอกเทศโดยวิธีบล็อกกิ้งอีไลซ่าและฮีแมกกลูติเนชั่น. วารสารวิชาการปศุสัตว์ เขต 5 ครั้งที่ 7 ฉบับที่ 1

Ahamed, T., Hossain, K.M., Billah, M.M., Islam, K.M.D., Ahasan., M.M., and Islam, M.E. (2004). Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) on Vero Cell Line. J. Poultry Sci 3 (2): 153-156

Alexander, D.J. (1991). Newcastle disease and other avian paramyxovirus in fection. In: Diseases of poultry 9 th ed. B.W. Calnek, ed. Iowa State University Press, Ames, IA. Pp. 541-570

Alexander, D.J. (2000). Newcastle disease in ostriches (Struthio camelus) A review. Avian Pathology. 29: 95-100

Greiner, M., Sohr, D., Gobel, P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnosic test. J. Immunol. Medthods. 185: 123-132

Greiner, M. (1995). Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsolf-Excel Template for selection of cut-off values in diagnostic tests. J. Immunol. Medthods. 185: 145-146

Hui Xu., Jurgen. L., Greiner, M. (1997). The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. J. Immunol. Medthods. 208: 61-64

OIE.(n.d.) (2009). OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals: New castle disease, Chapter 2.3.15: 576-589

Reynolds, D.L., and Muench A.D. (1999). A rapid virus neutralization assay for Newcastle disease virus with the swine testicular continuous cell line. Avian Dis. 3: 564-571

❒❒❒❒❒