



**มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ**

**มกอช. 10400-2547**

**THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD**

**TACFS 10400-2004**

**การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย**

**DIAGNOSTIC TEST OF FOOT AND MOUTH DISEASE**

**สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ**

**กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**

**ICS 11.220**

**ISBN 974-403-224-3**



## มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10400-2547

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10400-2004

## การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย

## DIAGNOSTIC TEST OF FOOT AND MOUTH DISEASE

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ถนนราชดำเนินนอก เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200

โทรศัพท์ 0 2283 1600 [www.acfs.go.th](http://www.acfs.go.th)

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 121 ตอนพิเศษ 120ง

วันที่ 22 ตุลาคม พุทธศักราช 2547

มาตรฐานการชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อยนี้ กำหนดขึ้นเพื่อให้ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ สามารถชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

มาตรฐานนี้ได้จัดทำร่างขึ้นโดย กรมปศุสัตว์ และมอบให้สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติปรับปรุงแก้ไข แล้วจึงผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการมาตรฐานด้านสุขอนามัยสัตว์ และคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ พิจารณาประกาศเป็นมาตรฐานของประเทศ

มาตรฐานนี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

1. Burrows, R. 1968. Excretion of foot and mouth disease virus prior to development of lesion. Vet. Rec. 82: 387-388.
2. Burrows, R., Mann, J.A., Greig, A., Chapman, W.G. and Goodridge, D. 1971. The growth and persistence of foot and mouth disease virus in the bovine mammary gland. V. Hyg. (Comp.) 69: 307-321.
3. Burrows, R., Mann, J.A., Garland, A.J.M., Greig, A. and Goodridge, D. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot and mouth disease virus in cattle. J. Comp. Patho. 91: 599-609.
4. De Deigo, M., Brocchi, E., Mackey, D. and De Simone, F. 1997. The non structural of polyprotien 3ABC of FMD virus as a diagnosis antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. Arch. Virol. 142: 2021-2033.
5. Hedger, R.S. 1968. The isolation and characterisation of FMDV from clinically normal herds of cattle in Botswana. J. Hyg. (Comp) 66: 27-36.
6. Hedger, R.S., Condry, J.B. and Golding, S.M. 1972. Infection of some species of African wild life with foot and mouth disease virus. J. Comp. Path. 82: 455-461.
7. Mackay, D., Forsyth, M. Davies, P.R. and Salt, J.S. 1998. Antibody to the non structural proteins of foot and mouth disease virus in vaccinated and animal exposed to infection. Vet. Quater. 20: 9-11.
8. Mc Vicar, J.W. and Suttmoller., P. 1970. Foot and mouth disease: The agar gel immunodiffusion precipitation test for antibody to virus infectious associated (VIA) antigen as a tool for epizootiological surveys. Am. J. Epidem. 92: 273-278.
9. Panina, G.F., Amadori, M., Massirio, I., Pavesi, M. and Perini, S. 1988. Persistence of foot and mouth disease virus (FMDV) infection in pigs. Report of the 56<sup>th</sup> General Session of OIE, Paris, Appendix X.

10. Roeder, P.L. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. The detection of typing of foot and mouth disease virus by enzyme-linked immunoassay: A sensitivity, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci* 43: 223-232.
11. Singh, P.P. 1977. Studies on Foot and Mouth Disease in Goats with Special Reference to the Distribution of Virus and Carrier Status. Ph.D. Thesis, Agra University, India.
12. Suttmoller, P. 1970. Persistence of foot and mouth disease virus infections. In: *Viruses Affecting Man and Animals*. W. H. Green Inc., St Louis, USA. pp. 295-308.



ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ :

การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ 1/2547 เมื่อวันที่ 15 มีนาคม 2547 มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

ดังนั้น อาศัยอำนาจของคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งแต่งตั้งโดยมติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 19 พฤศจิกายน 2545 จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย ไว้เป็นมาตรฐานสมัครใจ ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2547

(นายสมศักดิ์ เทพสุทิน)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประธานคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

# มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

## การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย

### 1. บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่ร้ายแรง ติดต่อง่ายและระบาดรวดเร็วในสัตว์กบคู่ทุกชนิด ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร ช้าง อูฐ กวาง เป็นต้น และทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในด้านอุตสาหกรรมปศุสัตว์ทั่วโลก สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสแอฟโฟไวรัส (Aphthovirus) จัดอยู่ในกลุ่มพิกอนาไวรัส (Picornavirus) ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยพบทั่วโลกมีทั้งหมด 7 สายพันธุ์ (serotype) ได้แก่ โอ (O) เอ (A) ซี (C) เอเชียวัน (Asia1) แซทวัน (SAT1) แซททู (SAT2) และแซททรี (SAT3) ในประเทศไทยพบมีระบาดอยู่ 3 สายพันธุ์ คือ โอ เอ และเอเชียวัน ไวรัสแต่ละสายพันธุ์ไม่ทำให้เกิดความคุ้มโรคข้ามกัน (cross immunity) และยังแบ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ย่อย (subtype) ต่างๆ รวมทั้งหมดประมาณ 64 สายพันธุ์ย่อย ดังนี้คือ สายพันธุ์โอ มี 11 สายพันธุ์ย่อย สายพันธุ์เอ มี 32 สายพันธุ์ย่อย สายพันธุ์ซี มี 5 สายพันธุ์ย่อย สายพันธุ์เอเชียวัน มี 3 สายพันธุ์ย่อย สายพันธุ์แซทวัน มี 6 สายพันธุ์ย่อย สายพันธุ์แซททู มี 3 สายพันธุ์ย่อย และสายพันธุ์แซททรี มี 4 สายพันธุ์ย่อย สัตว์ที่ติดเชื้อมีอาการป่วยโดยมีอาการซึม เบื่ออาหาร มีน้ำลายไหล เกิดเม็ดตุ่มใสบนเยื่อลิ้น ภายในช่องปาก กระพุ้งแก้ม และอุ้งเท้า ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเกิดตุ่มใส เม็ดตุ่มจะแตกออกและเกิดการลอกของเนื้อเยื่อที่ลิ้นและเยื่อบุภายในช่องปาก หลังจากนั้น 2-5 วัน ไวรัสจะแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย เกิดเป็นตุ่มใสและแผลบริเวณอุ้งเท้าและไรกีบ ระยะนี้สัตว์จะเริ่มเดินขาเกแปลก ในรายที่เป็นรุนแรงจะพบรอยโรคที่บริเวณเต้านม หัวนมในโค และบริเวณเหนืออุมกในสุกร

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสามารถติดต่อได้หลายทาง ได้แก่ โดยการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ป่วย หรือสัมผัสสิ่งขับถ่ายของสัตว์ที่เป็นโรค เช่น ปัสสาวะ อุจจาระ ลมหายใจ น้ำลาย นานม น้ำจากตุ่มใส หรือสัมผัสสิ่งปนเปื้อนเชื้อ หรือติดต่อโดยกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน เมื่อติดเชื้อมากจะตรวจพบเชื้อไวรัสได้บริเวณคอหอย (pharynx) (Burrows et al., 1971) เชื้อไวรัสจะเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายไปทางกระแสเลือดและระบบน้ำเหลืองไปสู่อวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย ในระยะก่อนที่สัตว์แสดงอาการป่วยพบว่า มีไวรัสถูกขับออกมากับสิ่งขับถ่ายและสารคัดหลั่งในปริมาณสูง (Burrows, 1968; Burrows et al., 1981) กรณีสัตว์ได้รับเชื้อโดยการกินอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน ปริมาณเชื้อไวรัสในร่างกายสัตว์ป่วยจะเริ่มลดลงเมื่อร่างกายมีการตอบสนองโดยสร้างแอนติบอดีให้สูงขึ้นเพื่อไปทำลาย (neutralize) เชื้อไวรัส สัตว์ที่ป่วยจะสามารถเป็นตัวพาหะแพร่เชื้อไปสู่สัตว์ตัวอื่นได้ (carrier) ในโคพบว่าสามารถเป็นตัวพาหะแพร่เชื้อได้นานถึง 2.5 ปี (Hedger, 1968) กระบือแอฟริกา พบนาน 3-5 ปี (Hedger et al., 1972) แพะพบนาน 12 เดือน (Sutmoller, 1970) และพบนาน 4 เดือน (Singh, 1977) แต่สุกรไม่พบว่าเป็นพาหะ (Panina et al., 1988) การตรวจหาเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในสัตว์ที่เป็นพาหะ สามารถตรวจได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำเมือกตรงบริเวณ oesophageal pharyngeal (OP) โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Probang cup แล้ว

นำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส ด้วยวิธี virus isolation และตรวจจำแนกชนิดไวรัส โดยวิธีอีไลซ่า (ELISA Typing)

การป้องกันและควบคุมโรคสามารถดำเนินการได้หลายวิธี ได้แก่ การฉีดวัคซีนเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ ซึ่งวัคซีนที่ใช้ต้องผลิตจากเชื้อไวรัสชนิดเดียวกับที่ทำให้เกิดโรคระบาดในท้องที่นั้น การควบคุมการเคลื่อนย้ายหรือแยกกักสัตว์ป่วยเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 21 วัน จะเป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายไปสู่พื้นที่อื่น ในขณะเดียวกันให้ทำการฉีดวัคซีนแบบวงแหวน (Ring vaccination) ในรัศมี 5-10 กิโลเมตร รอบๆ บริเวณเกิดโรค

นอกจากนี้การป้องกันการติดต่อของโรคนี้ทางอ้อม เนื่องจากเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนมากับอุปกรณ์สิ่งของเครื่องใช้ต่างๆ และผลิตภัณฑ์สัตว์ทุกชนิด สิ่งเหล่านี้เป็นพาหะแพร่เชื้อได้ ควรใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ 2% โซดาไฟ (NaOH) หรือ 4% ปูนขาว ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) หรือ Glutaraldehyde หรือ Iodophore (Iodine compound) หรือ 2% กรดมะนาว (Citric acid) เป็นต้น

การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการสังเกตจากอาการนั้นไม่เพียงพอ เพราะไม่สามารถบอกสายพันธุ์หรือชนิดของเชื้อไวรัสได้ จำเป็นต้องตรวจชันสูตรทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นวิธีเดียวที่สามารถจำแนกชนิดของไวรัสหรือ FMD Typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ การตรวจชันสูตรทางห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การตรวจหาเชื้อไวรัสในรอยโรคจากเนื้อเยื่ออ่อนเนื้อเยื่อบริเวณอุ้งเท้าไว้กับ ทำการตรวจชันสูตรเพื่อจำแนกชนิดเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA Typing วิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation by tissue culture technique) และยืนยันผลด้วยวิธี ELISA typing ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจชันสูตรโรคให้แม่นยำขึ้น โดยวิธีการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส (Viral RNA) ด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR) (Reverse transcription ร่วมกับ Polymerase chain reaction)

การตรวจระดับภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยทำได้หลายวิธี ได้แก่ แอลพี อีไลซ่า (Liquid phase blocking ELISA, LP ELISA) และเวียเอกิต (Virus infection associated agar gel immunodiffusion test, VIA-AGID) วิธี LP ELISA เป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย สายพันธุ์โอเอ และเอเซียวัน หรือสายพันธุ์อื่นๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนที่ฉีดให้กับสัตว์โดยใช้หลักการนำซีรัมมาทำลาย (neutralize) หรือจับ (block) กับไวรัสที่มีความจำเพาะกัน และตรวจหาปริมาณของไวรัสที่ไม่ถูก block หรือหลงเหลืออยู่ โดยใช้หลักการทาง Enzyme immunoassay ส่วนการตรวจสอบโดยวิธี VIA-AGID Test (McVicar and Suttmoller, 1970) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA antigen ในซีรัมสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่เคยได้รับการติดเชื้อมาก่อน ซึ่งวิธีนี้จะสามารถแยกสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนออกจากสัตว์ติดเชื้อมาแล้วได้ถูกต้องและมีความจำเพาะในระดับหนึ่ง แต่มีโอกาสเกิดผลบวกเทียม (false positive) ได้ในสัตว์ที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเชื้อตายที่ใช้ BEI เป็นสาร inactivant ในการผลิตวัคซีน จากผลการวิจัยและพัฒนานำวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน non-structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี indirect ELISA หรือ NS-ELISA Test มาใช้ในการตรวจตัวอย่างซีรัม ในปัจจุบันวิธีนี้สามารถแยกสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนออกจากสัตว์ติดเชื้อมาแล้วได้ถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธี VIA-AGID



Test และปัจจุบันได้นำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานการตรวจสอบในการค้าปศุสัตว์ระดับนานาชาติ (International trade)

## 2. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ที่สงสัยว่าป่วยเป็นโรคเพื่อนำส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ บริเวณที่สามารถเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อได้คือ ในโคและกระบือควรเก็บที่ตุ่มหรือแผลที่เยื่อลิ้น เยื่อภายในช่องปาก แผลที่กีบ และชอกกีบ ในสุกรเนื้อเยื่อที่ควรเก็บคือ ตุ่มใสหรือแผลที่ลิ้น แผลบริเวณดั้งจมูก บริเวณไรกีบ และชอกกีบ

การเก็บตัวอย่างเหล่านี้ควรเก็บเนื้อเยื่อในลักษณะเป็นชิ้น ปริมาณไม่ควรต่ำกว่า 1 กรัม ถ้าเห็นว่าเก็บเนื้อเยื่อจากตัวหนึ่งๆ ได้น้อยก็ควรเก็บจากตัวอื่นเพิ่มด้วย และแยกขวดเป็นตัวๆ ไป แล้วใส่ตัวอย่างเนื้อเยื่อลงในขวดที่มี 50% กลีเซอรินบัฟเฟอร์ ใส่ยาให้ท่วมเนื้อเยื่อ ปิดจุกให้แน่น และปิดทับด้วยเทปกั้นน้ำยาฆ่าเชื้อทำเครื่องหมายขวดให้ชัดเจน ห่อทับด้วยกระดาษหลายชั้น ใส่ในภาชนะหรือกระป๋องที่มีฝาปิดสนิทอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันการรั่วไหล จากนั้นนำไปใส่กระติกน้ำแข็งที่แข็งแรงรับน้ำหนักห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด กรณีที่ต้องนำส่งทางไปรษณีย์ ให้ห่อทับด้วยกระดาษหลาย ๆ ชั้น เพื่อป้องกันการแตกและการรั่วไหล บรรจุลงกล่องหรือภาชนะที่ไม่แตกง่าย พร้อมบันทึกประวัติสัตว์ป่วย รับน้ำหนักห้องปฏิบัติการทันที

การเก็บตัวอย่างซีรัม เก็บโดยการเจาะเลือดใส่หลอดแก้วหรือภาชนะที่สะอาดแห้ง ปล่อยให้เลือดแข็งตัวก่อน จึงทำการเก็บแยกส่วนใสซึ่งเป็นส่วนซีรัม ถ่ายใส่หลอดพลาสติก หากมีเม็ดเลือดปนมากับซีรัมให้นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่เป็นซีรัมและเก็บใส่หลอดพลาสติกปิดจุกให้แน่นป้องกันการรั่วไหล และให้เก็บในภาชนะที่มีน้ำแข็ง หรือเก็บแช่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในขณะที่จะนำส่งห้องปฏิบัติการ

## 3. การตรวจชันสูตรทางห้องปฏิบัติการ

การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อยสามารถชันสูตรเบื้องต้นได้จากอาการ ซึม มีไข้ น้ำลายไหลยืด เลียริมฝีปากบ่อย และเดินขาเกแปลก รอยโรคที่เห็นได้ชัดคือ ตุ่มพองเกิดขึ้นภายในเป็นน้ำเหลืองใสซึ่งเต็มไปด้วยไวรัสจำนวนมาก โดยมากมักเกิดขึ้นครั้งแรกที่บริเวณด้านบนของลิ้น หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่กระแสโลหิตกระจายไปทั่วร่างกายบริเวณกีบ เยื่อที่ ตุ่มใสนี้มักจะแตกใน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะเหลือแต่ร่องรอยโรคเป็นแผลตื้นและลอกหลุดได้ง่ายในบริเวณเยื่อลิ้นโค แต่การชันสูตรการเกิดตุ่มน้ำใสจะต้องแยกจากโรคที่มีอาการคล้ายกันอีกหลายโรคเช่น Vesicular stomatitis, Vesicular exanthema of swine, Swine vesicular disease ดังนั้นการชันสูตรจากอาการจะบอกไม่ได้แน่ชัดว่าเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย จึงต้องอาศัยการชันสูตรจากห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยัน การชันสูตรที่ถูกต้องและแม่นยำทำได้โดยการแยกไวรัสจากรอยโรคที่ส่งมาตรวจจำแนกชนิดโดยการทำ ELISA typing และแยกไวรัสโดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation in cell culture) จากตัวอย่างเลือด หัวใจ และอวัยวะของลูกสัตว์ ซึ่งมักเกิดกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) และเป็นสาเหตุทำให้ลูกสัตว์ตายได้



### 3.1 วิธีการสกัดแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

- 1) ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อ 1 กรัม ใส่ในโถรงบดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- 2) ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรที่สะอาด
- 3) บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด โดยผสมทรายขาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- 4) ทำเป็น 10% suspension โดยใช้ M/25 phosphate buffer saline (PBS) หรือ 0.4M PBS เป็น diluent โดยชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อหนัก 1 กรัม เติมน้ำละลาย M/25 PBS จำนวน 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่น
- 5) นำไปปั่นเหวี่ยง 1000 xg หรือประมาณ 2,500 รอบ/นาที นาน 15-20 นาที
- 6) แยกส่วนน้ำใสนำมาผสมกับ 1'1'2' trichlorotrifluoroethane ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 20 นาที
- 7) ปั่น 2,500 รอบ/นาที นาน 20 นาที เพื่อแยกส่วนตะกอนทิ้ง
- 8) แบ่งส่วนน้ำใสออกเป็น 2 ส่วน เพื่อทำ ELISA typing และ Virus Isolation

### 3.2 วิธีการตรวจจำแนกชนิดของไวรัส (ELISA typing)

เป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพ เพื่อจำแนกชนิดของไวรัสโดยใช้วิธี Indirect double antibody sandwich ELISA มีวิธีการดังนี้

- 1) เคลือบเพลท (coat plate) ด้วยซีรัมกระต่ายที่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย สายพันธุ์ โอ เอ และเอเชียวัน (rabbit anti FMD virus serum type O, A, Asia1) และซีรัมกระต่ายปกติ (normal rabbit serum) ซึ่งปรับความเจือจางเหมาะสมแล้วโดยใช้ coating buffer หยดลงบนเพลทกันเรียบ หลุมละ 50 ไมโครลิตร วางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็วรอบประมาณ 200 รอบต่อนาที ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หรือเก็บค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2) ล้างเพลทด้วย PBS 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง
- 3) เตรียมแอนติเจนควบคุม (antigen control) และแอนติเจนที่ต้องการจำแนกชนิดในไมโครทิวป์ (microtube) โดยใช้ typing diluent (ELISA diluent ที่มี 3% bovine serum albumin เป็นส่วนประกอบ) ทำ 2 fold serial dilution ไป 3 dilution หยดลงในเพลท ปิดฝาเพลท หรือใช้ plate sealer ปิด วางบนเครื่องเขย่า ใช้ความเร็วรอบประมาณ 500 รอบต่อนาที ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
- 4) ล้างเพลทด้วย PBS 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง
- 5) ใส่แอนติซีรัมหนูตะเภาที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์โอ เอ และเอเชียวัน (guinea pig anti FMD virus serum type O, A, Asia1) และซีรัมหนูตะเภาปกติ (normal guinea pig serum) ซึ่งปรับความเจือจางเหมาะสมแล้วใน typing diluent หยดลงเพลท หลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าในตู้บอดูอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

- 6) ล้างเพลทด้วย PBS 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง
- 7) เติมคอนจูเกต (horseradish peroxidase conjugate) ซึ่งปรับความเจือจางเหมาะสมแล้วใน typing diluent หลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- 8) ล้างเพลทด้วย PBS 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง
- 9) เติมสารละลายซับสเตรท (substrate) TMB หรือ (3,3',5,5' tetramethyl benzidine) จำนวน 1 เม็ด ละลายใน citrate acetate buffer, pH 5.6 จำนวน 60 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.05%  $H_2O_2$  (30%  $H_2O_2$  W/V) โดยใช้ 30%  $H_2O_2$  จำนวน 6 ไมโครลิตร เติมในสารละลาย substrate 12 มิลลิลิตร ต่อ 1 เพลทหยอดลงในเพลท หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
- 10) เติม 1N  $H_2SO_4$  ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะติดสีเหลือง แสดงว่าเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์นั้น
- 11) อ่านค่าความเข้มของแสงส่องผ่าน (Optical density, OD) ด้วยเครื่องอ่านผลอีไลซ่า (ELISA Reader) ยี่ห้อ Labsystem Multiskan/Titertek Multiskan อ่านที่ความยาวคลื่น (wavelength) 450 นาโนเมตร (nm) (กรณีใช้ OPD substrate หรือ Orthophenylene diamine เตรียมสารละลาย substrate ต้องอ่าน ค่า optical density ที่ wavelength 492 nm)

### 3.3 การแยกเชื้อไวรัสและพิสูจน์เชื้อไวรัส

การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นวิธีขั้นสุดที่ให้ได้แน่นอนและไวที่สุดวิธีหนึ่ง แต่จำเป็นต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากไตของลูกแกะ (primary lamb kidney cell) หรือเซลล์เพาะเลี้ยงจากต่อมไทรอยด์ของโค (bovine thyroid cell) หรือ cell line จากไตลูกหนู เช่น baby hamster kidney cell (BHK) แต่มีความไวน้อยกว่าเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell)

#### 3.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (BHK cell line) แบบ stationary monolayer มีวิธีการดังนี้

- 1) นำเซลล์ที่เกิด confluent monolayer ที่เตรียมไว้เป็น seed cell มาเพาะเลี้ยงต่อโดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ (medium) เก่าทิ้ง
- 2) ล้างเซลล์ด้วย PBS และดูดทิ้ง
- 3) เติม 0.1% Versene trypsin เพื่อย่อยและแยกเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยว โดยใช้วิธี pipetting technique
- 4) ดูดเซลล์ที่ย่อยแล้วใส่ลงใน growth medium ที่มี 5% bovine serum เป็นส่วนประกอบตามปริมาตรที่กำหนด
- 5) บรรจุลงขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขวดละ 5 มิลลิลิตร (ขนาดขวด 25 ตารางเซนติเมตร)
- 6) เก็บเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 วัน

3.3.2 การแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) เป็นวิธีการผ่านเชื้อไวรัสที่ได้จากการแยกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ส่งมาตรวจแล้ว ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส มีวิธีการดังนี้

- 1) นำเซลล์ที่เกิด confluent monolayer ภายใน 2 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง

- 2) เติมน้ำใสที่ได้จากการสกัดจากเนื้อเยื่อหรือตัวอย่างที่ส่งตรวจ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มในตู้บ่มเพื่อ adsorb ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3) เติมน้ำเลี้ยง (MM) และเก็บในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส
- 4) อ่านผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect หรือ CPE) ทุกวัน เป็นเวลา 2 วัน
- 5) ทำการเก็บไวรัสจากเซลล์โดยการ freeze-thaw และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนน้ำใสออกจากตะกอนที่เป็นกากเซลล์
- 6) นำส่วนของน้ำใสไปผ่านลงในเซลล์เพาะเลี้ยงอีกครั้ง ปฏิบัติตามข้อ 1) ถึง 5) รวม 3 ครั้ง จนกระทั่งเกิด 100% CPE นำส่วนน้ำไวรัสที่ได้นี้มาทำ ELISA typing เพื่อยืนยันชนิดของไวรัสอีกครั้งหนึ่ง

### 3.4 การตรวจเชื้อไวรัสโดยวิธี Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

#### 3.4.1 วิธีการสกัด Viral RNA มีดังนี้

- 1) นำตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร ผสมสาร trizol LS 0.75 มิลลิลิตร ลงในหลอดพลาสติกกันแหลมขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น
- 2) ใช้มือเขย่าเบาๆ ชั่นลง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อให้ nucleoprotein complex แยกจากกันอย่างสมบูรณ์
- 3) เติมน้ำคลอโรฟอร์ม (chloroform) 250 ไมโครลิตร เขย่า 15 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
- 4) ปั่นเหวี่ยง 12,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะเห็นสารละลายแยกเป็น 3 ชั้น เก็บสารละลายส่วนบนซึ่งมี Viral RNA ให้มากที่สุด
- 5) เติมน้ำ isopropanol 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- 6) ปั่นเหวี่ยง 12,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- 7) ล้างตะกอน (RNA pellet) ด้วย 1 มิลลิลิตร ของ 75% ethanol ปั่น 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้ง เก็บตะกอนไวรัจนกว่าจะแห้ง
- 8) ละลายตะกอนด้วย RNase free water หรือ DEPC H<sub>2</sub>O ปริมาตร 30 ถึง 50 ไมโครลิตร
- 9) ปั่นเหวี่ยงแบบ spin down และถ่ายสารละลายลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟ (eppendorf) นำไปทดสอบในขั้นตอนที่ 3.4.2 ต่อไป หรือเก็บในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2 Reverse transcription (Omnigene Thermal Cycler<sup>®</sup>)

- 1) เตรียมสารผสมดังตารางที่ 1 ลงในหลอด eppendorf ขนาด 0.5 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 แสดงสารละลายใช้ในปฏิกิริยา Reverse transcription

| สาร                                     | ความเข้มข้น                       | ปริมาตร/1 ตัวอย่าง |
|-----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| DEPC H <sub>2</sub> O /Rnase free water |                                   | 9.0 ไมโครลิตร      |
| DNTPs                                   | 2.5 มิลลิโมล (mM)                 | 2.5 ไมโครลิตร      |
| 5X buffer                               |                                   | 5.0 ไมโครลิตร      |
| random primer/universal primer          | 25-50 พิโคโมล/ไมโครลิตร (pmol/μl) | 1.0 ไมโครลิตร      |
| Rnasin Inhibitor                        | 20-40 ยูนิต/ไมโครลิตร (U/μl)      | 0.5 ไมโครลิตร      |
| DTT                                     | 0.1 โมล (M)                       | 2.5 ไมโครลิตร      |
| MoMLV                                   | 200 ยูนิต/ไมโครลิตร (U/μl)        | 1.0 ไมโครลิตร      |
| Viral RNA                               |                                   | 5.0 ไมโครลิตร      |

- 2) ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน โดยใช้ Vortex mixer
- 3) นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที, 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที, 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- 4) เก็บสารละลายจากข้อ 3 ที่ 4 องศาเซลเซียส (เก็บระยะสั้น) หรือ -20 องศาเซลเซียส (เก็บระยะยาว)

### 3.4.3 PCR amplification (Omnigene Thermal Cycler<sup>®</sup>)

- 1) เตรียมสารผสมดังตารางที่ 2 ลงในหลอด eppendorf ขนาด 0.5 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 แสดงสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR amplification

| สาร                                                | ความเข้มข้น                    | ปริมาตร/1 ตัวอย่าง |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| DEPC H <sub>2</sub> O /Rnase free H <sub>2</sub> O |                                | 33.5 ไมโครลิตร     |
| DNTPs                                              | 10 มิลลิโมล (mM)               | 1.0 ไมโครลิตร      |
| 10x buffer                                         |                                | 5.0 ไมโครลิตร      |
| Primer 1 (universal)                               | 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร (pmol/μl) | 1.0 ไมโครลิตร      |
| Primer 2 (sense primer)                            | 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร (pmol/μl) | 1.0 ไมโครลิตร      |
| Taq DNA polymerase                                 | 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (U/μl)       | 0.5 ไมโครลิตร      |
| RT product จากข้อ 3.4.2                            |                                | 5.0 ไมโครลิตร      |

- 2) ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง Vortex mixer เติม mineral oil 1 หยด (50 ไมโครลิตร)
- 3) นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้โปรแกรมดังนี้

|                 |     |      |   |        |
|-----------------|-----|------|---|--------|
| 94 องศาเซลเซียส | 4   | นาที | } | 30 รอบ |
| 94 องศาเซลเซียส | 1   | นาที |   |        |
| 55 องศาเซลเซียส | 1   | นาที |   |        |
| 72 องศาเซลเซียส | 1.3 | นาที |   |        |
| 72 องศาเซลเซียส | 5   | นาที |   |        |

- 4) เก็บสารละลายที่ได้จากข้อ 3) ที่ 4 องศาเซลเซียส (ระยะสั้น) หรือ -20 องศาเซลเซียส (ระยะยาว)

#### 3.4.4 วิเคราะห์ผลโดยวิธี Agarose gel electrophoresis

- 1) เตรียมวุ้นของ 1.5% Agarose ที่ได้ทำร่องสำหรับหยอดตัวอย่างนำไปวางบน electrophoresis chamber
- 2) เติม running buffer ให้ท่วม Agarose plate
- 3) หยอด DNA marker และตัวอย่างที่ผสมกับ 6x dye ลงในวุ้น 5 ไมโครลิตร/หลุม
- 4) ปิดฝา chamber ต่อเชื่อมขั้วไฟฟ้า (electrode) เข้ากับเครื่องควบคุมกระแสไฟฟ้า (power supply) ปลอ่ยให้กระแสไฟฟ้าผ่านในขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที
- 5) นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide 5 นาที และล้างน้ำประมาณ 15 นาที
- 6) อ่านผล PCR band โดยวางบนเครื่อง UV transilluminator จะเห็น PCR product เป็นแถบ และถ่ายรูป PCR band โดยใช้กล้อง polaroid

#### 3.5 การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Liquid phase blocking ELISA

Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) เป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณด้านวิทยาภูมิคุ้มกันของโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยปฏิกิริยาสมดุลง (neutralize) หรือการยับยั้ง (block) ที่ใช้ไวรัสในปริมาณคงที่ แต่เจือจางซีรัม และตรวจสอบปริมาณไวรัสที่เหลือหรือถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ โดยใช้หลักการด้าน enzyme immunoassay ด้วยวิธีที่เรียกว่า indirect double antibody sandwich ELISA มีวิธีการดังนี้

- 1) เคลือบ (coat) rabbit trapping antibody ลงบน ELISA plate โดยใช้ coating buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม เก็บค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2) เตรียมตัวอย่าง virus serum mixture ใน U-shape plate โดยเจือจางซีรัมแบบ 2 fold serial dilution และเติม virus ในปริมาณที่คงที่ อย่างละ 50 ไมโครลิตร/หลุม เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3) ในขณะเดียวกันให้เตรียมชุด control panel ซึ่งประกอบด้วย antigen control, strong positive control serum, weak positive control serum และ negative control serum หยอดลงบน U-shape plate ทุกเพลท
- 4) ถ่าย virus serum mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบน coated plate วางบนเครื่องเขย่าแบบแนวราบ (orbital shaker) ในตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส incubator นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง

- 5) เตรียมสารละลายคอนจูเกต guinea pig detecting antibody ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม เขย่าในตุ๋บที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง
- 6) เตรียมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม เขย่าในตุ๋บ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง
- 7) เตรียมสารละลายซับสเตรท (substrate) TMB หรือ (3,3',5,5' tetramethyl benzidine) โดยใช้ TMB จำนวน 1 เม็ด ละลายด้วย Citrate acetate buffer pH 5.6 จำนวน 60 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.05%  $H_2O_2$  (30%  $H_2O_2$  W/V) โดยเติม 30%  $H_2O_2$  จำนวน 6 ไมโครลิตร เติมในสารละลาย substrate 12 มิลลิลิตรต่อเพลท หยดลงในเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที (กรณีใช้ OPD substrate ให้ทิ้งปฏิกิริยาไว้ นาน 15 นาที)
- 8) เติม 50 ไมโครลิตร ของ 1N  $H_2SO_4$  เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate
- 9) อ่านค่าความเข้มของแสงส่องผ่าน (optical density, OD) ด้วยเครื่อง ELISA Reader ยี่ห้อ Labsystem Multiskan/Titertek Multiskan อ่านที่ wavelength 450 nm (กรณีใช้ OPD substrate หรือ orthophenylene diamine ต้องอ่านค่า OD ที่ wavelength 492 nm)
- 10) คำนวณค่าระดับภูมิคุ้มกันโดยดูจากค่า serum dilution ที่สูงสุดที่อยู่ระหว่าง 50% OD ของ antigen control ที่มีค่า OD อยู่ระหว่าง 1.0 ถึง 1.5

### 3.6 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ Virus Infections Associated (VIA) antigen โดยวิธี Agar gel immunodiffusion test (VIA- AGID)

เป็นการตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อ virus infections associated (VIA) antigen ในซีรัมสัตว์ที่เคยติดเชื้อมีไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้หลักการของปฏิกิริยาแอนติเจน แอนติบอดีที่จำเพาะกัน จะมีการเคลื่อนกระจายเข้าหากันโดยอาศัยแรงแม่เหล็กเป็นสื่อกลาง จนถึงจุดๆหนึ่งเมื่อความเข้มข้นพอเหมาะจะหยุดการเคลื่อนที่เกิดเป็นตะกอนวุ้นหรือ precipitation line มีวิธีการดังนี้

- 1) เตรียม 0.8% Agarose ใน petridish พลาสติก
- 2) เจาะรูวุ้นจำนวน 6 หลุมและตรงกลางหนึ่งหลุม โดยใช้ gel puncher ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ดูดวุ้นที่เจาะให้เป็นหลุมโดยใช้ vacuum pump
- 3) หยด positive control serum ตรงหลุมบนและล่างให้ตรงกัน ที่เหลืออีก 4 หลุม สำหรับหยดตัวอย่าง ส่วนหลุมตรงกลางให้หยด VIA antigen ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม
- 4) ปิดฝา petridish นำไปวางในภาชนะพลาสติกใสลากล้นน้ำเพื่อให้เกิดความชื้น ปิดฝาภาชนะวางที่อุณหภูมิห้อง อ่านผล precipitation line ที่เกิดขึ้นภายใน 1-5 วัน

### 3.7 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ Non-structure protein ของ FMDV โดยวิธี Indirect ELISA

เป็นการตรวจสอบทาง enzyme immunoassay โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non-structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเตรียมและสังเคราะห์โดยการตัดต่อยีนทางพันธุวิทยา (genetic



engineering) ในส่วนของยีนนี้เรียกว่า 3A, 3B, 3AB, 3ABC หรือ 3D เป็นต้น วิธีการนี้อาจจะเรียกสั้นๆ ว่า วิธี non-structure (NS test) เพื่อจุดประสงค์ในการแยกสัตว์ที่ติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ฉีดวัคซีน (Deigo et al., 1997; Mackay, 1998) การผลิตสารตรวจสอบในปัจจุบัน ได้มีการพัฒนา non structure protein ในส่วนของ 3ABC/3AB/3B มาผลิตเป็นชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ (commercial kit) และมีการใช้ในต่างประเทศรวมทั้งในประเทศไทยอย่างแพร่หลายแล้ว เพื่อความสะดวกและเหมาะสมในการชันสูตร และประหยัดเวลา

การชันสูตร Indirect ELISA มีวิธีการ ดังนี้

- 1) ทำการเจือจางตัวอย่างซีรัม (test serum) โดยใช้สารละลาย diluent ที่มากับ reagent สำเร็จรูปของแต่ละชุดทดสอบ
- 2) เติมสารละลายตัวอย่างซีรัม ลงบน ELISA plate ที่ได้รับการ pre-coated มาก่อนแล้วด้วย แอนติเจนที่มีส่วนของ non-structure protein
- 3) วางบนเครื่องเขย่าแบบแนวราบ (orbital shaker) ในตู้บที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 4 ครั้ง
- 4) เติมสารละลายคอนจูเกต ที่เตรียมจาก antispecies immunoglobulin ติดฉลากด้วย enzyme horseradish peroxidase
- 5) เขย่าในตู้บ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBST 4 ครั้ง
- 6) เติมสารละลาย substrate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
- 7) เติม 1.25N  $H_2SO_4$  เพื่อหยุดปฏิกิริยา
- 8) อ่านค่า optical density ด้วยเครื่องอ่าน ELISA Reader (Labsystem Multiskan, Titertek Multiskan reader) กรณีใช้ OPD substrate หรือ Orthophenylene diamine ให้อ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 492 nm หรือกรณีใช้ TMB substrate ให้อ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 450 nm



## ภาคผนวก ก

### 1 การเตรียม rabbit anti FMDV สายพันธุ์ O, A และ Asia1

โดยการฉีด 140S แอนติเจนที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ในกระต่าย ซึ่งเตรียมแยกเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ โดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่ายใช้ปริมาณ 146S แอนติเจนประมาณ 40 ไมโครกรัมต่อตัว ปล่อยไว้ 28 วัน จึงทำการฉีดแอนติเจนซ้ำ โดยฉีด 146S แอนติเจนขนาด 20 ไมโครกรัม ต่อตัว ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ทำการเจาะเลือดกระต่ายวันที่ 10 หลังฉีดเข็มที่สอง ทำการแยกซีรัม นำมาทำ titration และหาความเจือจางที่เหมาะสมเพื่อใช้ในงานตรวจสอบ ELISA แยกใส่ไมโครทิวป์ และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

### 2 การเตรียม detecting antibody

เตรียม guinea pig anti FMDV สายพันธุ์โอ เอ และเอเชียวัน โดยฉีด 146S แอนติเจนที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ ซึ่งเตรียมจากหนูตะเภาโดยเตรียมแยกแต่ละสายพันธุ์ ทำการฉีด 146S แอนติเจนโดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหนูตะเภาในขนาด 20 ไมโครกรัมต่อตัว ทำการเจาะเลือดในระยะ 28 วันหลังฉีด แยกซีรัมนำมาทำ titration และหาความเจือจางที่เหมาะสม เพื่อใช้ในงานตรวจสอบ ELISA ทำการแยกใส่ไมโครทิวป์ และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3 การเตรียมสารละลายสำหรับงาน ELISA technique

#### 3.1 Coating buffer

เตรียม 0.05M Carbonate bicarbonate buffer pH 9.5 ดังนี้

|                            |                                      |      |      |
|----------------------------|--------------------------------------|------|------|
| 1)                         | $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (anhydrous) | 1.59 | กรัม |
| 2)                         | $\text{NaHCO}_3$                     | 2.93 | กรัม |
| ผสมในน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร |                                      |      |      |

#### 3.2 PBS สำหรับ washing diluent

เตรียมสต็อก PBS A ความเข้มข้น 10 เท่า สำหรับ 5 ลิตร ดังนี้

|                        |                           |       |      |
|------------------------|---------------------------|-------|------|
| 1)                     | $\text{NaCl}$             | 400.0 | กรัม |
| 2)                     | $\text{KCl}$              | 10.0  | กรัม |
| 3)                     | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 57.5  | กรัม |
| 4)                     | $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 10.0  | กรัม |
| ละลายในน้ำกลั่น 5 ลิตร |                           |       |      |

#### 3.3 สต็อกสารละลาย $\text{MgCl}_2$ ความเข้มข้น 10 เท่า ดังนี้

|                                           |     |      |
|-------------------------------------------|-----|------|
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 5.0 | กรัม |
| ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร             |     |      |

### 3.4 สต็อกสารละลาย $\text{CaCl}_2$ ความเข้มข้น 10 เท่า ดังนี้

- 1)  $\text{CaCl}_2$  (anhydrous) 6.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
- 2) เตรียม washing buffer 10 ลิตร โดยเจือจาง PBS A 1 ลิตร กับน้ำกลั่น 7 ลิตร
- 3) เจือจางสต็อก  $\text{CaCl}_2$  100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร
- 4) เจือจางสต็อก  $\text{MgCl}_2$  100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร
- 5) ผสมสารละลายข้อ 2 และ 3 และ 4 จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.4

### 3.5 ELISA diluent

สำหรับสารละลายปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- 1) เจือจางสารละลาย PBS A ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร
- 2) เจือจางสต็อก  $\text{CaCl}_2$  (ข้อ 3.4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร
- 3) ผสมสารละลายข้อ 1) และ 2)
- 4) เจือจางสต็อก  $\text{MgCl}_2$  (ข้อ 3.3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร
- 5) ผสมสารละลายข้อ 3) และ 4)
- 6) เติมน้ำ  $\text{NaCl}$  10.0 กรัม
- 7) เติมน้ำ 1% phenol red 1.0 มิลลิลิตร
- 8) เติมน้ำ Tween20 0.25 มิลลิลิตร
- 9) ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.4–7.6

### 3.6 Citrate-acetate buffer stock

- 1) เตรียมสต็อกสารละลาย 1M Citric acid ดังนี้  
Citric acid                      20      กรัม  
ละลายในน้ำกลั่น              100      มิลลิลิตร
- 2) เตรียมสต็อกสารละลาย 1M Sodium acetate ดังนี้  
Sodium acetate              8.2      กรัม  
ละลายในน้ำกลั่น              100      มิลลิลิตร
- 3) ใช้ 1M Citric acid ปริมาตรประมาณ 4 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH ของสารละลาย 1M Sodium acetate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ได้ pH 5.6

### 3.7 Blocked diluent ในการเตรียม guinea pig dilution และ conjugate dilution

สำหรับการทดสอบส่วนใหญ่ ไม่จำเป็นต้องใช้ BSA (bovine serum albumin) ชนิดคุณภาพสูง (high level) แต่สามารถใช้ gelatin หรือ skimmed milk แทนได้ สำหรับ ELISA typing assay ใช้ 3% bovine serum albumin สำหรับ LP ELISA assay 3–5% skimmed milk

เตรียม blocked diluent 500 มิลลิลิตร ดังนี้

- 1) PBST 500 มิลลิลิตร
- 2) เติม 0.5% gelatin (V/V) หรือ 3-5% skimmed milk powder (W/V) หรือ 3% bovine serum albumin (W/V) ผสมใน PBST
- 3) ปรับ pH ให้ได้ 7.4 - 7.6

### 3.8 Chromogen/TMB substrate solution (3,3',5,5' tetramethyl benzidine)

เตรียมเป็นสต็อกสารละลาย 1 % ดังนี้

- 1) TMB substrate 0.1 กรัม
- 2) DMSO (Dimethylsulfoxide) 10.0 มิลลิลิตร
- 3) ละลาย TMB substrate ใน DMSO แยกใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

เตรียม working solution ดังนี้

#### 4) เตรียมสารละลาย

|         |                        |     |           |
|---------|------------------------|-----|-----------|
| Part A: | D.W.                   | 9.0 | มิลลิลิตร |
|         | 1% TMB                 | 0.1 | มิลลิลิตร |
|         | Citrate acetate buffer | 1.0 | มิลลิลิตร |

Part B: เจือจาง  $\text{H}_2\text{O}_2$  25  $\mu\text{l}$  (30% W/V) ในน้ำกลั่น 400  $\mu\text{l}$

เจือจาง 25  $\mu\text{l}$  ของสารละลาย part B ในสารละลาย part A เมื่อต้องการใช้ หรือเตรียม substrate solution โดยใช้ TMB (Sigma) 1 เม็ด (tablet) ละลายใน citrate acetate buffer 60 มิลลิลิตร จากนั้นเติม  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% W/V) 30  $\mu\text{l}$

### 3.9 Stopping solution

เตรียม 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ดังนี้

|                                      |    |           |
|--------------------------------------|----|-----------|
| conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$ (36 N) | 1  | มิลลิลิตร |
| ละลายในน้ำกลั่น                      | 35 | มิลลิลิตร |

### 3.10 Disinfectant

- 4%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (W/V)
- 10% Citric acid (W/V)
- 5% Iodophore solution (V/V)

## ภาคผนวก ข

### การเตรียม VIA antigen และสารละลาย

#### 1. การเตรียม VIA antigen โดยหลักการ Ion exchange chromatography

การเตรียมน้ำยาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการเพาะเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยลงในเซลล์เพาะเลี้ยง FMDV ลงบน tissue culture cell ในขนาด high multiplicity of infection (MOI) บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9-12 ชั่วโมง

ทำการเก็บรวบรวมเชื้อไวรัส (harvest) นำไปปั่นเพื่อแยกส่วนน้ำใสออกจากตะกอนเซลล์ เก็บส่วนน้ำใสมาผสมกับ DEAE Sephadex A-50 เซย่าค่างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส นำไปบรรจุ (pack) ในกระบอกแก้ว (column) (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร) ทำการล้างกระบอกแก้วด้วย washing buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.02M Tris-HCl pH 7.6 ผสม 0.15N NaCl จากนั้นแยก VIA antigen ที่จับโมเลกุลของ DEAE sephadex โดยใช้ eluting buffer ที่ประกอบด้วย 0.02M Tris-HCl pH 7.6 ผสม 1N NaCl ทำการต่อ column เข้ากับเครื่องควบคุมที่ต่อเข้ากับ fraction collector วัดค่า optical density ที่ 254 nm ทำการเก็บ VIA peak หลังผ่าน column และทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยสารอัมมัตของ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บเฉพาะส่วนตะกอน แล้วละลายด้วย 0.02M Tris-HCl pH 7.6 ผสม 0.15N NaCl นำไปใส่ใน cellophane tube ทำการ dialysis ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อแยกเกลือ  $\text{NH}_4^{++}$  และ  $\text{SO}_4$  จาก VIA antigen จากนั้นนำไปตรวจสอบด้าน specificity และ optimal working dilution ของ VIA antigen ทำการแบ่งใส่หลอด เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจสอบต่อไป

#### 2. การเตรียม buffer สำหรับงาน VIA-AGID test

##### 2.1 เตรียม stock buffer 0.2M Tris-HCl pH 7.6 ดังนี้

- |                                                 |       |           |
|-------------------------------------------------|-------|-----------|
| 1) Tris (Hydroxymethyl aminomethan)             | 24.2  | กรัม      |
| 2) ละลายใน Deionized water                      | 1,000 | มิลลิลิตร |
| 3) ปรับ pH ให้ได้ 7.6 โดยหยด 0.5 N HCl ที่ละหยด |       |           |
| 4) เติม $\text{NaN}_3$ จาก stock 10% W/V        | 2     | มิลลิลิตร |

##### 2.2 เตรียม buffer A (0.02M Tris-HCl pH 7.6 ผสม 0.15N NaCl) ดังนี้

- |                                          |       |           |
|------------------------------------------|-------|-----------|
| 1) 0.2M Tris- HCl pH 7.6 (จาก 2.1ข้อ 1)  | 100   | มิลลิลิตร |
| 2) ละลายใน Deionized wate                | 900   | มิลลิลิตร |
| 3) เติม NaCl (analar grade)              | 8.766 | กรัม      |
| 4) เติม $\text{NaN}_3$ จาก Stock 10% W/V | 2     | มิลลิลิตร |

## 2.3 เตรียม Buffer B (0.02M Tris-HCl pH 7.6 ผสม 1.0N NaCl)

|                                       |       |           |
|---------------------------------------|-------|-----------|
| 0.02M Tris-HCl pH 7.6 (จาก 2.1 ข้อ 1) | 100   | มิลลิลิตร |
| ละลายใน Deionized water               | 900   | มิลลิลิตร |
| เติม NaCl (analar grade)              | 58.44 | กรัม      |
| เติม $\text{NaN}_3$ จาก stock 10% W/V | 2     | มิลลิลิตร |

2.4 เตรียม saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ดังนี้

|                                                                            |      |           |
|----------------------------------------------------------------------------|------|-----------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ powder                                        | 1000 | กรัม      |
| 0.02M Tris-HCl pH 7.6                                                      | 300  | มิลลิลิตร |
| ละลายในอ่างน้ำอุ่น (warm water bath) จนกระทั่งอิ่มตัวและเกิดผลึก (crystal) |      |           |

## 2.5 Disinfectant

|      |                                         |
|------|-----------------------------------------|
| 4%   | $\text{Na}_2\text{CO}_3$ solution (W/V) |
| 0.5% | Iodophore                               |
| 10%  | Citric acid                             |

## ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

1. 7%  $\text{NaHCO}_2$ 

- |                     |     |           |
|---------------------|-----|-----------|
| 1) $\text{NaHCO}_2$ | 7   | กรัม      |
| 2) น้ำกลั่น (DW)    | 100 | มิลลิลิตร |
- กรองแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2. PBS ความเข้มข้น 10 เท่า

- |                                                           |      |      |
|-----------------------------------------------------------|------|------|
| 1) $\text{NaCl}$                                          | 80   | กรัม |
| 2) $\text{KCl}$                                           | 2    | กรัม |
| 3) $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                              | 11.5 | กรัม |
| หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | 14.0 | กรัม |
| หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 28.9 | กรัม |
| 4) $\text{KH}_2\text{PO}_4$                               | 2.0  | กรัม |
- นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 3. EDTA 1%

- |         |     |           |
|---------|-----|-----------|
| 1) EDTA | 1   | กรัม      |
| 2) PBS  | 100 | มิลลิลิตร |
- นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 4. Trypsin 1%

- |                  |     |           |
|------------------|-----|-----------|
| 1) Trypsin x 250 | 1   | กรัม      |
| 2) PBS           | 100 | มิลลิลิตร |
- เขย่าค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส กรองแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 5. Trypsin-Versine (TV)

- |                |      |           |
|----------------|------|-----------|
| 1) 1% Trypsin  | 12.5 | มิลลิลิตร |
| 2) 1% EDTA     | 2.5  | มิลลิลิตร |
| 3) ละลายใน PBS | 85   | มิลลิลิตร |
- กรองแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 6. Fungizone

- |              |     |           |
|--------------|-----|-----------|
| 1) Fungizone | 50  | มิลลิกรัม |
| 2) น้ำกลั่น  | 100 | มิลลิลิตร |
- กรองแล้วเก็บในหลอดขนาด 3 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 7. Antibiotic

|              |               |                     |
|--------------|---------------|---------------------|
| Penicillin   | 100 – 200     | ยูนิต/มิลลิลิตร     |
| Streptomycin | 10000 – 20000 | มิลลิกรัม/มิลลิลิตร |
| Kanamycin    | 500 – 10000   | ยูนิต/มิลลิลิตร     |
| Fungizone    | 100           | กรัม/มิลลิลิตร      |

กรองแล้วเก็บในหลอดขนาด 3 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 8. Growth medium (GM) ที่มี 5% Bovine serum

|                          |     |           |
|--------------------------|-----|-----------|
| 1) MEM                   | 93  | มิลลิลิตร |
| 2) Bovine serum          | 5   | มิลลิลิตร |
| 3) Antibiotic            | 1   | มิลลิลิตร |
| 4) Fungizone             | 0.5 | มิลลิลิตร |
| 5) 7% NaHCO <sub>2</sub> | 1   | มิลลิลิตร |

## 9. Maintenance medium (MM) ที่มี 2% Bovine serum

|                          |         |           |
|--------------------------|---------|-----------|
| 1) MEM                   | 97      | มิลลิลิตร |
| 2) Bovine serum          | 2       | มิลลิลิตร |
| 3) Antibiotic            | 1       | มิลลิลิตร |
| 4) Fungizone             | 0.5     | มิลลิลิตร |
| 5) 7% NaHCO <sub>2</sub> | 2.5–3.5 | มิลลิลิตร |

## 10. Freezing medium

|                          |      |           |
|--------------------------|------|-----------|
| 1) MEM                   | 7    | มิลลิลิตร |
| 2) Bovine serum          | 2    | มิลลิลิตร |
| 3) 7% NaHCO <sub>2</sub> | 0.15 | มิลลิลิตร |
| 4) DMSO                  | 1    | มิลลิลิตร |