



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10000-2549

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10000-2006

การชันสูตรโรควัวบ้าในโค

DIAGNOSIS OF BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN CATTLE

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220

ISBN 974-403-407-6



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10000-2549

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10000-2006

การชันสูตรโรควัวบ้าในโค

DIAGNOSIS OF BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN CATTLE

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ถนนราชดำเนินนอก เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200

โทรศัพท์ 0 2283 1600 www.acfs.go.th

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 123 ตอนที่ 106 ง

วันที่ 12 ตุลาคม พุทธศักราช 2549

คณะกรรมการเฉพาะกิจพิจารณาร่างมาตรฐานการชันสูตรโรคในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

- | | | |
|-----|---|------------------|
| 1. | อธิบดีกรมปศุสัตว์
(นายยุคล ลิ้มแหลมทอง) | ประธานอนุกรรมการ |
| 2. | ผู้แทนกรมปศุสัตว์
(นางสาวฉวีวรรณ เสียววิจักขณ์
นางปัจฉิมา อินทรกำแหง) | อนุกรรมการ |
| 3. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(นายกิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร) | อนุกรรมการ |
| 4. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(นายธนู ภิญโญภูมิมินทร์) | อนุกรรมการ |
| 5. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
(นางสาวสุณิรัตน์ เอี่ยมละมัย
นายอนันตชัย ชัยยศวิทยากุล) | อนุกรรมการ |
| 6. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
(นายสุวิชัย โรจนเสถียร) | อนุกรรมการ |
| 7. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
(นางสุดสวายใจ กรมาทิพย์สุข
นายจิตรกมล ธนศักดิ์) | อนุกรรมการ |
| 8. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
(นายจตุพร กระจายศรี
นายศักดิ์ชัย เรือนเพชร) | อนุกรรมการ |
| 9. | ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวเมทนี สุนทรักษ์) | อนุกรรมการ |
| 10. | ผู้แทนสำนักรับรองมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นายชัยศิริ มหันตชัยสกุล
นายอภิสิทธิ์ ปรากฏการณ์) | อนุกรรมการ |
| 11. | ผู้แทนสมาคมเวชศาสตร์ชันสูตรทางสัตวแพทย์ไทย
(นายวิจิตร บรรลุนารา) | อนุกรรมการ |

นายรุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
นางอัจฉรา ธวัชสิน)

- | | |
|---|-------------------------------|
| 12. ผู้ทรงคุณวุฒิ หรือผู้แทนภาคเอกชน (เฉพาะคราวประชุม)
(นางสุจิตรา ปาจริยานนท์
นางจิรา คงครอง
ศ.ศุภกิจ อังศุภากร
นางอัจฉริยา ไชยะสูตร
นายสิทธิพร บุรณัญญ์) | อนุกรรมการ |
| 13. ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวตรุณี ทันทสุวรรณ) | อนุกรรมการและเลขานุการ |
| 14. ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นายสมเกียรติ ศรีพิสุทธิ) | อนุกรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ |

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การขนส่งโรควัวบ้าในโค กำหนดวิธีการขนส่งโรควัวบ้า เพื่อรับรองการปลอดโรควัวบ้าในโค และให้ใช้เป็นคู่มือการขนส่งโรควัวบ้าในโคทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อส่งเสริมระบบการผลิตโคและผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัย มีคุณภาพเหมาะสมต่อการบริโภค ทั้งภายในประเทศและเพื่อการส่งออก

มาตรฐานนี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

กรมปศุสัตว์. 2545. กฎกระทรวงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม พ.ศ.2545 ออกตามความในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ.2499. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 119 ตอน 122 ก. หน้า 9-11.

OIE. 2004. Bovine spongiform encephalopathy, Chapter 2.3.13. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organisation for Animal Health. Paris, France.



ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ : การชั้นสูตรโรควัวบ้าในโค
พ.ศ.2549

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ 1/2549 เมื่อวันที่ 8 มิถุนายน 2549 มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรควัวบ้าในโค เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

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

ประกาศ ณ วันที่ 10 สิงหาคม พ.ศ. 2549

(คุณหญิงสุดารัตน์ เกยุราพันธุ์)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ประธานคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

การชันสูตรโรควัวบ้าในโค

1. ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรโรควัวบ้าในโค ทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

2. นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 โค (cattle) หมายถึง สัตว์ในวงศ์ *Bos taurus* และ *Bos indicus* เพศผู้หรือเพศเมีย ที่อยู่เดี่ยวหรือรวมกันเป็นฝูงก็ได้ และเลี้ยงเพื่อบริโภคเป็นอาหารมนุษย์

2.2 โรควัวบ้า (mad cow disease หรือ bovine spongiform encephalopathy หรือ BSE) หมายถึง โรคที่เกิดในโค มีผลทำให้สมองฝ่อหรือสมองพูน

2.3 การชันสูตรโรค (diagnosis) หมายถึง การหาสาเหตุการป่วยหรือตายด้วยโรค

2.4 พรียนโปรตีน (prion protein) หมายถึง อนุภาคโปรตีนขนาดเล็กแบบปกติ (cellular PrP^c)

2.5 พรียนโปรตีนสแครปี (prion protein scrapie: PrP^{sc}) หมายถึง อนุภาคโปรตีนขนาดเล็กที่เปลี่ยนแปลงไปโดยจากพรียนโปรตีนปกติก่อให้เกิดอาการทางประสาทในสัตว์ หากพบในแกะจะก่อให้เกิดโรคสแครปี หากพบในโคจะก่อให้เกิดโรควัวบ้า

2.6 โอเบ็กซ์ (obex) หมายถึง ผนังด้านบนของโพรงสมองที่หนาขึ้น หรือก้านสมอง

2.7 ฟอราเมนแมกนัม (foramen magnum) หมายถึง ช่องเปิดของสมองเพื่อเป็นทางออกสู่ช่องไขสันหลังส่วนคอ

2.8 วิธีทดสอบเบื้องต้น (screening test or rapid test) หมายถึง วิธีการชันสูตรโรคเบื้องต้น ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว เช่น วิธีทางจุลพยาธิวิทยา วิธีวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

2.9 วิธีทดสอบยืนยัน (confirmation test) หมายถึง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการยืนยันผลการทดสอบโรค และเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีความจำเพาะและความไวสูง

2.10 องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organisation for Animal Health หรือ Office International des Epizooties, OIE) หมายถึง องค์การระหว่างรัฐบาล ที่จัดตั้งขึ้นตามข้อตกลงของนานาชาติ เมื่อเดือนมกราคม 2467 เพื่อประสานความร่วมมือในการควบคุมโรคระบาดสัตว์ที่สำคัญ

3. การชันสูตรโรค

การชันสูตรโรควัวบ้าในโค ด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ เช่น วิธีทางจุลพยาธิวิทยา วิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA), Western blot analysis และวิธีอื่นๆ ซึ่งแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน เมื่อได้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้ว สัตวแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญควรพิจารณาอาการป่วยของโค ประวัติทางวิทยาทางระบาด และมาตรการการห้ามใช้เนื้อและกระดูกปนปนในอาหารสัตว์ร่วมด้วย (ภาคผนวก ก) เพื่อให้การป้องกันและควบคุมโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีชันสูตรโรควัวบ้าทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจยืนยันการเกิดโรคที่แนะนำ คือ วิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวสูง กรณีการตรวจเพื่อคัดกรองโรคสามารถใช้วิธีอื่นๆ ที่มีความไว และความจำเพาะต่ำลงมา เช่น วิธีทางจุลพยาธิวิทยา ELISA ได้

3.1. การเก็บตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่า โคที่ติดเชื้อมี PrP^{sc} สะสมอยู่เป็นจำนวนมากที่ก้านสมองส่วนโอเบกซ์ ดังนั้นโอเบกซ์จึงเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue) ของการชันสูตรโรควัวบ้า การเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องจึงเป็นหัวใจสำคัญอันดับแรกที่จะนำไปสู่ความสำเร็จในการชันสูตรโรควัวบ้า

วิธีเก็บตัวอย่างก้านสมองส่วนโอเบกซ์โดยผ่านทางฟอราเมนเมกนัม

- 1) แยกหัวออกจากตัว ตรงระหว่างส่วนปลายสุดของกะโหลกที่ต่อกับกระดูกสันหลัง
- 2) วางหัวโคให้หงายขึ้น จะเห็นฟอราเมนเมกนัม
- 3) ใช้เขียงที่มีขอบคมและด้ามยาวประมาณ 18 cm หรือนิ้วชี้ สอดระหว่างเยื่อหุ้มสมองกับก้านสมอง แล้วเลาะเส้นประสาทโดยรอบจนก้านสมองหลุดเป็นอิสระ
- 4) คว่ำเขียง สอดระหว่างเยื่อหุ้มสมองกับก้านสมองลึกประมาณ 12 cm ถึง 15 cm แล้วกดเขียงให้ส่วนที่คมตัดก้านสมอง จากนั้นดึงเอาก้านสมองออกมาวางบนแผ่นรองตัด (ภาคผนวก ข รูปที่ ข1 และข2) และตัดตามรูป ข2

3.2 วิธีทางจุลพยาธิวิทยา(histopathological method)

หลักการของวิธีนี้ วิธีทดสอบโรคในระดับเนื้อเยื่อ โดยย้อมเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการรักษาให้คงสภาพ ด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin) และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.1 วิธีการ

นำตัวอย่างสมองและไขสันหลังของโคที่ได้จากข้อ 3.1 มาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยา เพื่อทำสไลด์เนื้อเยื่อ ดังนี้

- 1) ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยเอทานอล 95% และ 100% ตามลำดับ
- 2) กำจัดเอทานอล (clearing) ด้วยไซลีน (xylene)

- 3) ทำให้เนื้อเยื่ออิมตัว (impregnating) ด้วยพาราฟิน
- 4) ฝังเนื้อเยื่อ (embedding) ในกล่องพาราฟิน (paraffin box)
- 5) ตัดเนื้อเยื่อ (sectioning)
- 6) ย้อมด้วยสีมาทอกซิลินและอีโอซิน
 - 6.1) ละลายพาราฟินในสไลด์เนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที แล้วนำไปแช่ในไซลีน
 - 6.2) ทำเนื้อเยื่อให้ชุ่มน้ำ (rehydration) โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอล 100%, 95% ตามลำดับ
 - 6.3) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่าน 5 นาที
 - 6.4) จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในสีอีมาทอกซิลิน (Mayer's hematoxylin) นาน 5 นาที ถึง 7 นาที
 - 6.5) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนาน 15 วินาที ถึง 30 วินาที
 - 6.6) จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อในสีอีโอซิน นาน 30 วินาที ถึง 60 วินาที
 - 6.7) ดึงน้ำออกจากสไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอล 95% และ 100% ตามลำดับ
 - 6.8) กำจัดเอทานอล โดยแช่ในไซลีน
 - 6.9) ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์

3.2.2 การอ่านผล

เมื่อตรวจตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (light microscope) จะพบรอยโรคลักษณะรูพรุน (vacuolation) ของเนื้อสมองส่วนนิวโรฟิลและเซลล์ประสาท (ภาคผนวก ข รูปที่ ข3 และ ข4)

อย่างไรก็ดีการพบรูพรุนในสมอง อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ดังนี้

ก. สภาพของเนื้อเยื่อไม่เหมาะสม อันเนื่องมาจาก

- การเปลี่ยนแปลงหลังตายและสภาพซากเน่าเปื่อย (post-mortem changes and autolysis)
- การแช่แข็งตัวอย่างก่อนนำไปดอง (freezing)
- เวลาและปริมาณน้ำยาดองในการแช่ตัวอย่างไม่เพียงพอ (inadequate fixation)
- การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟินที่ร้อน (high temperature paraffin)
- การแช่เนื้อเยื่อสมองในแอลกอฮอล์ 70% นานมากกว่า 48 ชั่วโมง

ข. มีพยาธิสภาพ อันเนื่องมาจาก

- โรคทางพันธุกรรม เนื่องจากมีความผิดปกติของขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน
- สภาวะความผิดปกติในขบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย เช่น พยาธิสภาพของสมองเนื่องมาจากตับ (hepatoencephalopathy)

- สารพิษ เช่น แอมโมเนียเฮกซะคลอโรฟีน (ammonium hexachlorophene)

3.3 วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry method, IHC)

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโรคจากชิ้นเนื้อในระดับเนื้อเยื่อและย้อมสีเซลล์ด้วยวิธีวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาย่อยสลาย PrP^c ด้วยเอนไซม์โปรตีเนสเค (proteinase K) แล้วนำตัวอย่างนั้นมาผ่านกระบวนการย้อมทาง IHC หลังจากนั้นจึงตรวจหา PrP^{sc} โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อพรีออนโปรตีน (PrP) และตรวจดูการติดสีเฉพาะของ PrP^{sc} ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (ภาคผนวก ข รูปที่ ข5) วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นวิธีหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่กำหนดโดยองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ เนื่องจากสามารถตรวจหา PrP^{sc} ในสมองได้ อีกทั้งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ราคาไม่แพง และสะดวก แต่ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างนานกว่าวิธีอื่นๆ

3.3.1 วิธีการ

1) การเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue preparation)

- 1.1) นำตัวอย่างสมองส่วนโอเบกซ์ที่ต้องใน บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลา 48 ชั่วโมงผ่านกระบวนการมาตรฐานในการเตรียมเนื้อเยื่อจนถึงขั้นเป็น paraffin block
- 1.2) นำตัวอย่าง paraffin block มาตัดให้หนาประมาณ 3 μ ถึง 4 μ แล้ววางบน coated slide หรือ positive charge slide

2) การดึงพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อและทำให้ชุ่มน้ำอีกครั้ง (deparaffinization and rehydration)

- 2.1) อบสไลด์เนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที
- 2.2) แช่สไลด์เนื้อเยื่อในไซลีน 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที
- 2.3) แช่สไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอล 100% 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที
- 2.4) แช่สไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอล 95% 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที
- 2.5) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำกลั่นนาน 5 นาที
- 2.6) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อใน phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

3) การย่อยสลาย PrP^c แช่สไลด์เนื้อเยื่อใน proteinase K ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที

4) การเปิดเอพิโทปโดยการนึ่งด้วยความดันสูง (unmasking epitope with autoclave)

- 4.1) ใส่สไลด์เนื้อเยื่อลงในกล่องสเตนเลส เทน้ำกลั่นต้มเดือดลงในกล่องจนท่วมสไลด์เนื้อเยื่อ ปิดฝากล่อง
- 4.2) นำกล่องดังกล่าวใส่ในเครื่องนึ่งความดันสูง (autoclave) โดยตั้งความดันที่ 1 kPa อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที
- 4.3) นำสไลด์เนื้อเยื่อออกมาล้างใน PBS 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

- 5) การกำจัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสภายในเนื้อเยื่อ (quenching of endogenous peroxidase)
 - 5.1) แช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.9% ในเมทานอล (H_2O_2 in methanol) นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
 - 5.2) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อใน PBS 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที
- 6) การระงับการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (blocking non-specific reaction) ให้แช่สไลด์เนื้อเยื่อใน ซีรัมสุกรปกติ 5% (normal swine serum) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
- 7) การหยดแอนติบอดีปฐมภูมิ (apply primary antibody)
 - 7.1) นำสไลด์เนื้อเยื่อวางในกล่องที่มีความชื้น (moisture chamber)
 - 7.2) หยดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PrP ความเข้มข้น 1:800 บ่มที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หรือใช้ความเข้มข้น 1:1000 บ่มที่ 4°C ทิ้งไว้นานข้ามคืน (overnight)
 - 7.3) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อใน PBS 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที
- 8) การหยดแอนติบอดีทุติยภูมิ (apply secondary antibody)
 - 8.1) วางสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องที่มีความชื้น
 - 8.2) หยด biotinylated anti-rabbit IgG antibody (ขวด A) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
 - 8.3) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อใน PBS 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที
- 9) การหยดคอนจูเกต (apply peroxidase conjugated streptavidin)
 - 9.1) วางสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องที่มีความชื้น
 - 9.2) หยด peroxidase conjugated streptavidin (ขวด B) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
 - 9.3) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อใน PBS 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที
 - 9.4) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
- 10) การเกิดสี (coloration)
 - 10.1) วางสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องที่มีความชื้น
 - 10.2) หยดสารละลาย amino ethyl carbazol (AEC) (ขวด C) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
 - 10.3) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น
- 11) การตรึงตัวอย่างด้วยกลีโกลเจอร์รอนส์แสงสว่าง
 - 11.1) ฝืนิกส์ไลด์ (mounting slide) โดยหยดน้ำยา glycerol (mounting medium) 2-3 หยดบนสไลด์เนื้อเยื่อ แล้วฝืนิกส์ไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์

- 11.2) นำสไลด์เนื้อเยื่อตรวจผลโดยกล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับสไลด์ควบคุมทั้งบวกและลบ (positive control slide และ negative control slide) ซึ่งผ่านกระบวนการพร้อมกับตัวอย่าง

3.3.2 การแปลผล

เปรียบเทียบรูปแบบการติดสีจำเพาะ (specific) กับติดสีไม่จำเพาะ (nonspecific) ระหว่างสไลด์เนื้อเยื่อตัวอย่างที่ทดสอบกับสไลด์ positive control และ negative control

ข้อสังเกตบางประการสำหรับการติดสี positive

- หากสไลด์ตัวอย่างมี PrP^{sc} จะพบ PrP^{sc} ติดสีแดง (ภาคผนวก ข รูปที่ 5)
- PrP^{sc} ที่ติดสีต้องอยู่ในเนื้อเยื่อสมองส่วนนอก (grey matter)
- PrP^{sc} ที่ติดสีพบได้ทั้งเป็นแบบหย่อมๆ (focal) และแบบกระจาย (diffuse) ลักษณะติดสีไปตามแนวยาว (linear form) ของแอกซอน (axon) หรือลักษณะเป็นแกรนูล (granular form) รอบๆ เซลล์ประสาท

3.4 การชันสูตรด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป

การชันสูตรโรควัวบ้าแบบรวดเร็วมีหลายวิธี เช่น วิธีเวสเทิร์นบลอต (ภาคผนวก ง) วิธีอีไลซา ซึ่งปัจจุบันมีชุดทดสอบสำเร็จรูปของวิธีดังกล่าวจำหน่าย อย่างไรก็ตามให้เลือกใช้ชุดสำเร็จรูปที่ได้รับการรับรองจากองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศเท่านั้น หากการทดสอบได้ให้ผลสงสัย ต้องชันสูตรซ้ำด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ภาคผนวก ก

วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรควัวบ้าในโค

ก1. วิทยาการระบาด

โรควัวบ้า หรือเรียกว่าโรคสมองฝ่อ หรือโรคสมองพรุนในโค (bovine spongiform encephalopathy, BSE) อยู่ในกลุ่มของโรคสมองฝ่อติดต่อ (transmissible spongiform encephalopathy, TSE) เป็นโรคติดต่อทางระบบประสาทที่มีความรุนแรงถึงตายในโค โดยเฉพาะโคโตเต็มวัย และอยู่ในบัญชีโรคขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ โรควัวบ้าสามารถติดต่อถึงคนได้ พบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคสมองฝ่อในคน (variant Creutzfeldt-Jakob's disease, vCJD) โรควัวบ้าในโคมีรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2529 ที่ประเทศสหราชอาณาจักร ต่อมาจามีรายงานการตรวจพบในหลายประเทศในทวีปยุโรป แคนาดา ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และสวีเดน ประเทศไทยได้มีมาตรการต่าง ๆ ในการป้องกันโรควัวบ้ามิให้เกิดขึ้นในประเทศ ตั้งแต่ พ.ศ. 2533

สาเหตุของโรควัวบ้าเกิดจากโคกินอาหารที่ปนเปื้อนสารก่อโรควัวบ้าที่เรียกว่า ปริออนโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป (PrP^{sc}) ซึ่งเป็นอนุภาคโปรตีนขนาดเล็ก รูปร่างคล้ายกิ่งไม้ (ภาคผนวก ข รูป ข6) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 nm ถึง 16 nm น้ำหนักโมเลกุล 32 kDa ถึง 35 kDa มีคุณสมบัติพิเศษคือ ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนในระดับหุงต้มอาหาร ทนต่อแสงอัลตราไวโอเลต การแช่แข็ง การพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) การสเตอริไรส์ (sterilization) และการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส แต่ถูกทำลายด้วยความร้อนอุณหภูมิ 133 °C ที่ความดัน 3 kPa (หรือ 43.3 psi) เป็นระยะเวลานาน 18 นาที หรือแช่ในสารละลายโซดาไฟ (2N NaOH) หรือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaHClO_4) นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

ก2. พยาธิกำเนิด

เมื่อ PrP^{sc} เข้าสู่ร่างกายโค จะเคลื่อนที่ไปที่เซลล์ประสาทและเหนี่ยวนำ PrP^{c} ที่ผนังเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น PrP^{sc} และไปเหนี่ยวนำ PrP^{c} อื่น ๆ อีกให้กลายเป็น PrP^{sc} ไปเรื่อยๆ ซึ่ง PrP^{sc} นี้จะเป็นตัวทำลายเซลล์ประสาท (neuron) และทำให้เกิดพยาธิสภาพลักษณะรูพรุนคล้ายฟองน้ำ (spongiform) ที่เนื้อเยื่อสมองส่วนนิวโรพิล (neuropil) สารก่อโรควัวบ้าจะฟักตัวในโคนาน 2 ปี ถึง 8 ปี ดังนั้นโคที่เป็นโรคนี้นั้นส่วนมากมักจะแสดงอาการเมื่ออายุประมาณ 24 เดือนขึ้นไป อย่างไรก็ตามก็มีรายงานพบโรควัวบ้าในโคอายุน้อยที่สุด 19 เดือน และมากที่สุด 15 ปี โคที่แสดงอาการแล้วในที่สุดจะตายทุกตัว

ก3. อาการ

อาการของโรควัวบ้าแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

ก3.1) กลุ่มอาการเฉพาะ (typical signs) โคแสดงพฤติกรรมผิดปกติ ได้แก่ ก้าวร้าว เตะถีบ แยกตัวออกจากฝูง เป็นต้น ไวต่อสิ่งกระตุ้น (hypersensitivity) โดยเฉพาะต่อเสียง แสง และการสัมผัส มีการเคลื่อนไหวผิดปกติ ได้แก่ ขณะเดินขาทั้งสองข้างทำงานไม่ประสานกัน โดยเฉพาะขาหลังไม่มีแรง ล้มแล้วลุกไม่ได้ เป็นต้น

ก3.2) กลุ่มอาการไม่เฉพาะ (atypical signs) ได้แก่ น้ำหนักลด ผอม และตายโดยไม่ทราบสาเหตุ เป็นต้น เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มียารักษาและวัคซีนสำหรับป้องกันโรคนี้ ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคนี้คือ ทำลายโคและผลิตภัณฑ์ที่เป็นโรคหรือสงสัยว่าเป็นโรค โรควัวบ้าจึงเป็นสาเหตุของการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบในเรื่องการค้าโคและผลิตภัณฑ์ทั้งในและนอกประเทศ และได้กลายเป็นปัญหาสำคัญในเวทีการค้าโลกด้วย นอกจากนี้ปัจจุบันวิธีการชันสูตรโรควัวบ้าในโคยังมีขีดจำกัด เนื่องจากต้องใช้ตัวอย่างเนื้อสมอง จึงทำได้เฉพาะในสัตว์ตายแล้วเท่านั้น จนถึงขณะนี้ยังไม่มีวิธีใดที่เป็นที่ยอมรับในการชันสูตรโรคนี้ในสัตว์มีชีวิต

ก4. มาตรการเฝ้าระวัง

พ.ศ.2533-2543 มีการชันสูตรโรควัวบ้า โดยตรวจวินิจฉัยจากโรคที่คล้ายกัน (differential diagnosis) ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยากับเนื้อเยื่อสมองโคที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ทั่วประเทศ

พ.ศ.2544-2545 กรมปศุสัตว์โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติร่วมกับกองควบคุมโรคระบาดสัตว์ ได้ทำโครงการนำร่องสำรวจโรควัวบ้าทางห้องปฏิบัติการ ในโคอายุตั้งแต่ 23 เดือนขึ้นไป ทั้งโคนม โคเนื้อ และโคขุน จากโรงฆ่าสัตว์ โดยเฉพาะโคที่แสดงอาการทางประสาททุกชนิด จำนวน 515 ตัวอย่าง โดยดูรอยโรคในสมองโคทางจุลพยาธิวิทยาและตรวจหา PrP^{sc} โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ผลการสำรวจไม่พบโรควัวบ้า

พ.ศ.2546-2547 ดำเนินโครงการสำรวจโรควัวบ้าในประเทศไทยแบบมีกลุ่มเป้าหมาย โดยเก็บตัวอย่างสมองโคในแต่ละพื้นที่ทั่วประเทศตามหลักวิทยาทางระบาด โคกลุ่มเป้าหมาย คือ โคนมอายุ 23 เดือนขึ้นไปที่ส่งโรงฆ่า โคขุนที่ส่งเข้าโรงฆ่าเฉพาะจากฟาร์มที่มีประวัติการให้อาหารข้น โคที่แสดงอาการป่วยทางประสาท โคที่ส่งฆ่ากะทันหัน หรือโคที่ถูกคัตทิ้งจากฝูงเพื่อส่งเข้าโรงฆ่า จำนวนตัวอย่าง (sample size) ตามที่กำหนดโดย OIE มาชันสูตรด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาและวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี สำหรับโครงการปี พ.ศ. 2546 การสำรวจได้สิ้นสุดลงแล้ว มีตัวอย่างที่ตรวจไปแล้ว 950 ตัวอย่าง และให้ผลบ่งชี้ทั้งหมด ซึ่งขณะนี้โครงการยังคงดำเนินการอย่างต่อเนื่อง

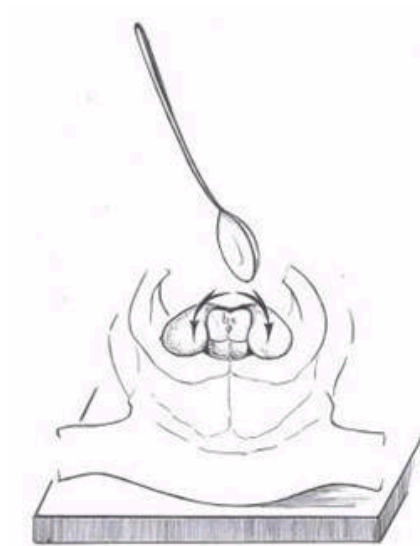
ก5. มาตรการป้องกัน

กรมปศุสัตว์มีมาตรการป้องกันโรควัวบ้าโดยการออกกฎกระทรวง และประกาศกรมปศุสัตว์ หลายฉบับ ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 ดังนี้

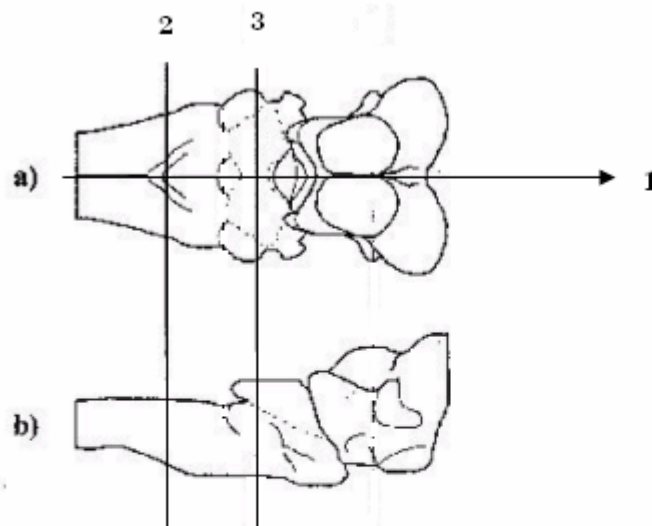
- พ.ศ.2533 ชะลอการนำเข้าโคมีชีวิต เนื้อโคและผลิตภัณฑ์ จากประเทศสหราชอาณาจักร
- พ.ศ.2538 ชะลอการนำเข้าโคมีชีวิตและผลิตภัณฑ์จากประเทศสหราชอาณาจักร และประเทศที่มีรายงานการเกิดโรควัวบ้า
- พ.ศ.2539 ห้ามนำเข้าอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของเนื้อป่นกระดูกป่น และเลือดของโค (meat and bone meal) ที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศสหราชอาณาจักร
- พ.ศ.2540 ห้ามนำเข้าอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของเนื้อป่นกระดูกป่นมาเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง
- พ.ศ.2543 ห้ามนำเข้าเพื่อขายซึ่งอาหารสัตว์ประเภทวัตถุดิบผสมแล้ว ที่มีส่วนผสมของเนื้อ กระดูก และเลือดป่นของสัตว์ที่มีแหล่งกำเนิดจากสหภาพยุโรป และประเทศที่มีรายงานการพบโรค

ภาคผนวก ข

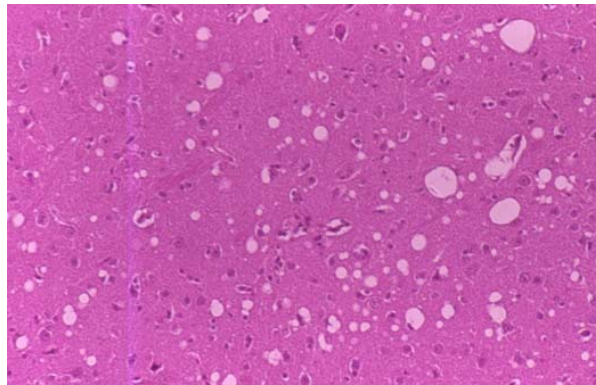
ภาพประกอบการชั้นสูตรโรควัวบ้า



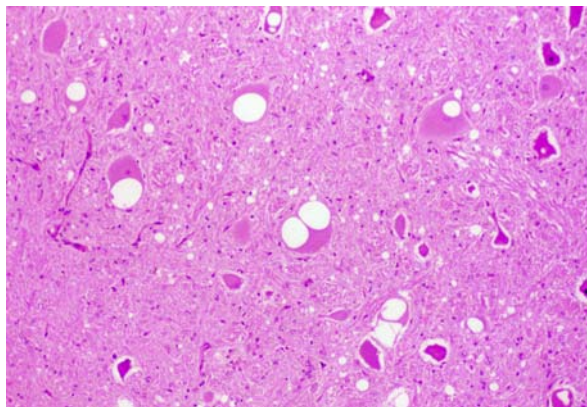
รูปที่ ข1. แสดงวิธีการนำโอเบ็กซ์ (obex) ออกจากกะโหลกผ่านทาง ฟอราเมนแมกนัม (คัดลอกภาพจาก OIE, 2004)



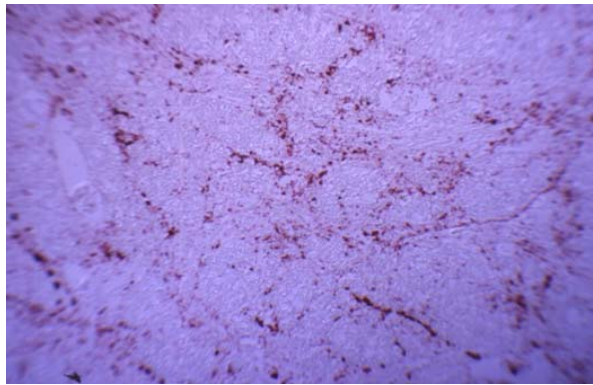
รูปที่ ข2. แสดงตำแหน่งที่ตัดแบ่งเนื้อสมองส่วนโอเบ็กซ์ คือ 1, 2 และ 3 (คัดลอกจาก OIE, 2004)



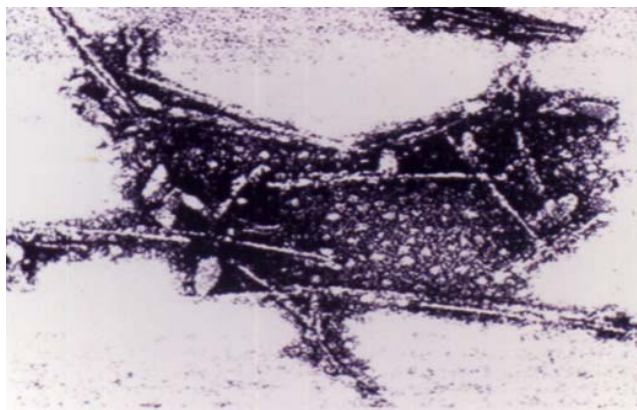
รูปที่ ข3. ภาพทางจุลวิทยาพยาธิแสดงให้เห็นรูพรุนในเนื้อสมองส่วนนิวโรพิล (vacuolation in neuropil) (กำลังขยาย 40 เท่า ย้อมด้วยสี H&E) (เอื้อเฟื้อภาพโดย สพ.ญ.จิรา คงครอง)



รูปที่ ข4. ภาพทางจุลวิทยาพยาธิแสดงให้เห็นรูพรุนในเซลล์ประสาท (vacuolation in neuron) (กำลังขยาย 100 เท่า ย้อมด้วยสี H&E) (เอื้อเฟื้อภาพโดย รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต)



รูปที่ ข5. ภาพทางจุลวิยาพยาธิของเนื้อเยื่อสมองแสดงให้เห็น PrP^{sc} ติดสีแดงของ ABC (กำลังขยาย 40 เท่า ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี) (เอื้อเฟื้อภาพโดย สพ.ญ.จิรา คงครอง)



รูปที่ ข6. ภาพทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเนื้อเยื่อสมองแสดงให้เห็น SAF Tubulofilamentous particle ของ PrP^{sc} (คัดลอกภาพจาก Stack et al., 1996)

ภาคผนวก ค

อุปกรณ์และการเตรียมสารละลายที่ใช้ในวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ค1. อุปกรณ์และสารเคมี

ค1.1 กล้องเก็บความชื้น

ค1.2 สารเคมี

- xylene
- 95% ethanol
- absolute ethanol
- hydrogen peroxide
- methanol
- proteinase K
- phosphate buffer saline (PBS)
- 1 M tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 M CaCl₂
- 5% normal swine serum
- polyclonal rabbit anti-bovine PrP primary antiserum
(Neuro-center, Berne, Switzerland)
- glycerol

ค1.3 coated slide หรือ positive charge slide และ cover glass

ค1.4 Dako kit ChemMate™ detection kit peroxidase/AEC ประกอบด้วย

- ขวด A biotinylated anti-rabbit IgG secondary antiserum
- ขวด B peroxidase conjugated streptavidin
- ขวด C substrate คือ amino ethyl carbazol (AEC)

ค1.5 water bath

ค1.6 autoclave (เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน)

ค1.7 กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

ค2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ค2.1 proteinase K (150 mg)

1 M tris / HCl pH 8.0	7.5	ml
0.1 M CaCl ₂	2.25	ml

proteinase K (14.7 mg/ml Roche 1373196)	51.0	μl
distilled water	140.2	ml

วิธีการ

- 1) เปิดเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C
- 2) ผสม tris/HCl, CaCl₂ และน้ำกลั่นในขวดจาร์ (coffin jar)
- 3) นำขวดจาร์ไปใส่ใน water bath จนกระทั่งสารละลายมีอุณหภูมิ 37 °C
- 4) เติม proteinase K ลงในขวดจาร์ เวลานั้น 15 นาที

ค2.2 0.9% H₂O₂ in methanol

methanol	150	ml
H ₂ O ₂ (30%)	4.5	ml

ค2.3 normal swine serum 5%

PBS	4	ml
normal swine serum	200	ml

ค2.4 polyclonal rabbit anti-bovine PrP primary antiserum

dilution 1:800

PBS	50	ml
primary antiserum	62.5	μl

dilution 1:1000

PBS	50	ml
primary antiserum	50	μl

ภาคผนวก ง

วิธี Western blot technique

วิธี Western blot*

ง1. วิธีการ

- 1) ชั่งตัวอย่างสมองสดส่วนโอเบกซ์ ให้น้ำหนักประมาณ 500 mg (450 mg ถึง 700 mg)
- 2) เติม homogenize buffer ลงในหลอดตัวอย่าง ในอัตราส่วน 1:10 (เนื้อเยื่อสมอง 500 mg : homogenize buffer 5 ml)
- 3) บดตัวอย่างโดยใช้เครื่องบดละเอียด (homogenizer) และนำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ใน master plate หลุมละ 1 ml ในกรณีที่ยังไม่ทดสอบสามารถเก็บที่ -20°C จนกระทั่งใช้งาน
- 4) เติม digestion buffer 10 μl และตัวอย่างที่บดแล้ว 100 μl ลงใน 96 well digestion plate ทุกหลุม
- 5) เติม proteinase K ลงใน digestion plate ทุกหลุมๆ ละ 10 μl ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลง และอุ่นใน heat block ที่อุณหภูมิ 48°C นาน 40 นาที
- 6) เติมสารละลายหยุดปฏิกิริยาการย่อย (digestion stop) ลงใน digestion plate ทุกหลุมๆ ละ 10 μl
- 7) เติม PAGE sample buffer 100 μl ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลง และทำให้ร้อนใน homogenize buffer ที่อุณหภูมิ 96°C นาน 5 นาที
- 8) เตรียมชุดแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) โดยนำ 12% NuPAGE[®] เจล วางลงในชุดแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า
- 9) เติม SDS-MOPS running buffer ท่วมขอบล่างของแผ่นเจลเล็กน้อย
- 10) เติมตัวอย่างควบคุม (control sample) 10 μl ในเจลหลุมแรก และ 10 μl ของตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 7 ลงในเจลหลุมถัดไป ตัวอย่างละ 2 หลุม
- 11) เติม SDS-MOPS running buffer ลงในช่องด้านนอก (outer chamber) และช่องด้านใน (inner chamber) และเติม antioxidant เฉพาะช่องด้านใน 500 μl

* อ้างอิงตามชุดทดสอบ Prionics[®]-Check Western ของบริษัท Prionic ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ได้รับการรับรองจาก OIE (สารเคมีที่ใช้ในวิธีนี้ปรากฏในภาคผนวก ค ข้อ 3)

- 12) ปลอ่ยไฟฟ้ากระแสตรงที่มีแรงดัน 200 V นาน 30 นาที จนกระทั่งแถบสีม่วงห่างจากขอบล่างของเจล 1 ml ถึง 2 ml
- 13) แช่แผ่น PVDF membrane ใน เมธานอล นาน 2 ถึง 3 วินาที หลังจากนั้นแช่ใน transfer buffer นาน 10 นาที
- 14) นำ PVDF membrane วางบนกระดาษกรอง ซึ่งอยู่บนฟองน้ำที่วางอยู่บน cassette frame ของ transfer unit
- 15) นำแผ่นเจลที่ได้จากข้อ 12 ตัดส่วนบนของเจล (stacking gel) และส่วนล่างของเจลได้แถบสีม่วงออก แล้วจึงนำเจลวางลงบนแผ่น membrane ในข้อ 14
- 16) วางกระดาษกรองลงบนเจล แล้ววางทับด้วยแผ่นฟองน้ำ แล้วจึงปิดด้วย cassette frame
- 17) สอด cassette frame ลงใน transfer unit โดยให้เจลอยู่ซ้ายลบ (สีดำ) ซึ่งโปรตีนจะวิ่งจากซ้ายลบไปหาซ้ายบวก
- 18) เติม transfer buffer ที่แช่เย็น (4°C) ลงใน transfer unit ให้ท่วม cassette frame
- 19) ปลอ่ยไฟฟ้ากระแสตรงที่มีความดันขนาด 150 V นาน 1 ชั่วโมง โดยใช้ transfer unit ที่มีระบบควบคุมความเย็น (cooling system) ที่ 4°C
- 20) นำแผ่น membrane ออกจาก cassette frame แล้ววางในถาด ย้อม membrane นาน 2 นาที ด้วย 1X Ponceau S บนแป้นโยก (rocker) แล้วใช้ปากกากำหนดตำแหน่งของตัวอย่างควบคุม
- 21) ล้างแผ่น membrane ด้วย Tris buffered saline ผสม Tween 20 (TBST) จนกระทั่งสีหายไป
- 22) แช่แผ่น membrane ใน PVDF blocking buffer 50 ml นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง บนแป้นโยก
- 23) แช่แผ่น membrane ในส่วนผสมของ 6H4 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 10 μl และ 50 ml ของ TBST เป็นอัตราส่วน 1:5000 อบที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง บนแป้นโยก
- 24) ล้างแผ่น membrane ด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 25) แช่แผ่น membrane ในส่วนผสมของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (goat anti-mouse conjugated alkaline phosphatase) 10 μl และ TBST 50 ml (1:5000) และอบที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที บนแป้นโยก
- 26) ล้างแผ่น membrane ด้วย TBST 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 27) แช่แผ่น membrane ใน luminescence buffer นาน 5 นาที
- 28) วางแผ่น membrane บนแผ่นกระดาษ แล้วเท CDP-Star[®] (CDP-Star ready to use) ลงบนแผ่น membrane และหุ้มกระดาษด้วยแผ่นพลาสติกใส (Saran foil)

- 29) ประคบแผ่น membrane กับฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (ECL hyperfilm[®]) แล้ววางลงใน film cassette นาน 5 นาที ถึง 20 นาที ล้างฟิล์มและอ่านผล

ง2. การแปลผล

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีลักษณะดังนี้

- พบ band ของ PrP^{sc} หลังย่อยด้วย proteinase K
- น้ำหนักโมเลกุลของ protease-resistant PrP^{sc} จะมีขนาดลดลง (27 kDa ถึง 30 kDa)
- พบรูปแบบ glycosylation pattern ของ PrP^{sc}

ภาคผนวก จ

หน่วย

หน่วยและสัญลักษณ์ที่ใช้ในมาตรฐานฯ นี้ และหน่วยที่ SI (International System of Units หรือ *Le Système International d' Unités*; SI) ยอมรับให้ใช้ได้ มีดังนี้

ปริมาณ	ชื่อหน่วย	สัญลักษณ์หน่วย SI
มวล	กรัม (gram)	g
	มิลลิกรัม (milligram)	mg
	ไมโครกรัม (microgram)	µg
ปริมาตร	มิลลิลิตร (milliliter)	ml
	ไมโครลิตร (microliter)	µl
ความยาว	เซนติเมตร (centrimeter)	cm
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส (degree Celsius)	°C