พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีอีไลซ่า

วิไล ลินจงสุบงกช[1] กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย[2] จุฬานีย์ น่วมจิตร์[2]
ปิยภรณ์ เจริญผล[2] จรรยา สมานิตย์[2] โสภา สิงคลีบุตร[2] รัตนีย์ ทองทา[2]

บทคัดย่อ

ชุดตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 โดยวิธีอีไลซ่า ได้ถูกพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ ซึ่งได้แก่ แอนติเจนชนิดเข้มข้น (concentrated antigen), rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody จากการตรวจสอบความใช้ได้ของแอนติเจนโดยการไตเตรทด้วยวิธีอีไลซ่า พบว่ามีความจำเพาะสูงต่อไทป์ O, A และ Asia1 โดยให้ค่า working dilution ที่ 1:512, 1:1024 และ 1:1024 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติเจนชนิดเข้มข้นสามารถเก็บรักษาคุณภาพได้ยาวนานไม่ต่ำกว่า 1 ปี ส่วน rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody ไทป์ O, A และ Asia1 เมื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ โดยวิธีไตเตรท พบว่า rabbit trapping antibody ให้ working dilution หรือ optimal dilution สูงที่ 1:12800 ทั้ง 3 ไทป์ ในขณะที่ guinea pig detecting antibody ให้ working dilution หรือ optimal dilution สูงที่ 1:3200 ทั้ง 3 ไทป์ แสดงถึงมีความจำเพาะและความไวสูง สรุปโดยภาพรวมการพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบเหล่านี้ สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีอีไลซ่า และยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น นอกจากนี้พบว่าสารตรวจสอบดังกล่าวสามารถเก็บรักษาคุณภาพที่อุณหภูมิ -20°C ได้ยาวนาน ดังนั้นชุดสารตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะเป็นประโยชน์ทั้งด้านลดการนำเข้าและประหยัดงบประมาณประจำปีในการสั่งซื้อจากต่างประเทศ

คำสำคัญ: ชุดสารตรวจสอบ โรคปากและเท้าเปื่อย อีไลซ่า

---

[1] ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์

[2] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดเกิดจากเชื้อไวรัส ติดต่อง่าย และแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ในสัตว์เศรษฐกิจ ส่งผลทำให้การส่งออกสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังต่างประเทศไม่ได้ เนื่องจากต่างประเทศใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้า โรคปากและเท้าเปื่อยมีทั้งหมด 7 ไทป์คือ O, A , Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3 (Brooksby and Rogers, 1975) ซึ่งในแต่ละไทป์ไม่ให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน นอกจากนี้ยังแบ่งออกเป็นไวรัสชนิดย่อยอีกประมาณ 64 subtype (Pereira,1977) โดยแบ่งตามคุณสมบัติของแอนติเจนของไวรัสแต่ละชนิด พบระบาดในประเทศไทยเพียง 3 ไทป์คือ O, A และ Asia1 การตรวจวินิจฉัยโรคที่ให้ประสิทธิผลถูกต้อง แม่นยำ อ่านผลรวดเร็วและได้มาตรฐานตามหลักวิชาการ จะส่งผลเพิ่มประสิทธิภาพด้านการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งในระดับประเทศและระดับภูมิภาคให้บรรลุผลสำเร็จตามเป้าประสงค์ กรมปศุสัตว์มีนโยบายและแผนยุทธศาสตร์หลักในการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย โดยเน้นควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ และฉีดวัคซีนสัตว์ในพื้นที่ให้ได้ 80% ของประชากรสัตว์ทั้งประเทศเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ให้ได้ herd immunity ไม่ต่ำกว่า 80% ซึ่งทางระบาดวิทยาถือว่าสามารถป้องกันโรคจากการระบาดได้ การตรวจหาไวรัส (antigen detection) ในสัตว์ป่วย และการตรวจหาแอนติบอดี (antibody detection) ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนหรือได้รับการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ซึ่งสามารถตรวจได้หลายวิธี ได้แก่ Complement fixation (CF) test (Casey, 1995), Virus neutralization test (Rweyemamu et al., 1987) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธี Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย โดยตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี ELISA typing จากตัวอย่างเยื่อลิ้นหรือเยื่อกีบของสัตว์ป่วย (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) ซึ่งพบว่าให้ความไวและแม่นยำกว่าวิธี CF test (Ferris and Dawson, 1988; Westbury et al., 1988) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิค ELISA มาใช้ตรวจหาแอนติบอดี ได้แก่ liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Hamblin et al., 1987) ซึ่งให้ความไวและความจำเพาะมากกว่า วิธี VN test ถึง 2-2.5 เท่า (Westbury et al., 1988; Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) สารตรวจสอบที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี ELISA ทั้ง antigen detection และ antibody detection ที่ใช้ปัจจุบัน เป็นสารตรวจสอบที่ผลิตที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อใช้ภายในศูนย์และแจกจ่ายให้กับหน่วยงานศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ของกรมปศุสัตว์ หรือบางครั้งแจกจ่ายให้กับหน่วยงานต่างประเทศภายใต้โครงการ South East Asia and China Foot and Mouth Disease Control (SEACFMD) Campaign สารตรวจสอบเหล่านี้ได้แก่ rabbit trapping antibody serum, guinea pig detecting antibody serum และ inactivated FMD antigen ของไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 ซึ่งเป็นสารตรวจสอบที่มีลักษณะเป็น fresh reagent โดยเฉพาะอย่างยิ่ง inactivated FMD antigen จะมีความไม่คงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

การเก็บรักษาไม่ยาวนานและคุณภาพของแอนติเจนเสื่อมง่าย ส่วนสาร rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody มีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยากับโปรทีนต่างๆ (non specific blinding reaction) ในซีรัมได้ ทำให้เกิด background สูงรวมถึงการเกิดปฏิกิริยาข้าม serotype (cross reaction) ส่งผลให้การตรวจสอบผิดพลาดได้ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นการพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย antigen detection และ antibody detection รวมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของสารตรวจสอบได้แก่ rabbit trapping antibody, guinea pig detecting antibody และ inactivated FMD antigen ทั้งด้านความบริสุทธิ์ ความจำเพาะ ความไว และคุณภาพการเก็บรักษา เพื่อลดการสูญเสียและลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อจากต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมแอนติเจนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเข้มข้น

เพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ลงบนเซลล์ BHK-21 ทำการ inactivate ด้วย 2% binaryethyleneimine (BEI) นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 26°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำให้แอนติเจนเข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วย 7% polyethylene glycol (PEG 6000) ละลายตะกอนด้วย PBS หรือ Tris-Hcl ให้มีปริมาณความเข้มข้นประมาณ 20 เท่าจากปริมาตรเริ่มต้น เติม 1% bovine serum albumin (BSA) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาคุณภาพ ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของ antigen ได้แก่ complete inactivation โดยผ่านลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องกันจำนวน 3 ครั้ง, ตรวจ cross reaction และworking dilution หรือ optimal dilution โดยวิธี antigen titration ด้วยวิธี ELISA ก่อนนำไปใช้

เตรียมอนุภาค 146 S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1

น้ำยาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผ่านการ inactivate ด้วย 2% binary ethyleneimine (BEI) (Bahnemann, 1975) ทำการตกตะกอนด้วย 7% PEG 6000 และทำให้เข้มข้นประมาณ 200-250 เท่า โดยการปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ภายใต้สูญญากาศที่ความเร็ว 30,000 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการแยกอนุภาค 146S ที่บริสุทธิ์โดยผ่าน 15-45 % sucrose density gradient ultracentrifugation ที่ความเร็วรอบ 27,000 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Brown and Cartwright, 1968; Cowan, 1968) ทำการเก็บหลอดที่มีปริมาณ 146S สูง(peak)โดยใช้ fraction collector ที่ต่อเข้ากับเครื่อง monitor ใช้ spectophotometor วัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนมิเตอร์ เพื่อคำนวณค่าปริมาณอนุภาค 146S (ug/ml) (Bachrach et al., 1964) เก็บเป็นสต๊อกในตู้ -80°C ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่ายและหนูตะเภาต่อไป

เตรียม rabbit trapping antibody ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1

เจือจางอนุภาค 146S จากสต๊อกด้วย 0.01M PBS ให้มีปริมาณ 50ไมโครกรัมต่อกระต่าย 1 ตัว นำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ผสมสารทั้งสองให้เข้ากันจนได้ emulsion ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่าย หลังจากนั้น 28 วัน ทำการฉีดซ้ำโดยใช้ 146S ในปริมาณ 25 ไมโครกรัมต่อกระต่าย 1 ตัว ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ผสมสารทั้งสองให้เข้ากันจนได้ emulsion ที่เป็นเนื้อเดียวกัน ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่าย ทำการเจาะเลือดหลังฉีดครั้งที่สอง 10 วัน แยกซีรัมนำไปตรวจสอบความใช้ได้โดยตรวจ cross reaction และตรวจ หา working dilution ก่อนเก็บเป็นสต๊อกสำหรับใช้เป็นสารตรวจสอบในงาน ELISA ต่อไป

เตรียม guinea pig detecting antibody ของไวรัสไทป์ O, A และ Asia1

เจือจางอนุภาค 146S จากสต๊อกด้วย 0.01M PBS ให้มีปริมาณ 25 ไมโครกรัมต่อหนูตะเภา 1 ตัว นำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ผสมสารทั้งสองให้เข้ากันจนได้ emulsion ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อหนูตะเภา หลังจากนั้น 28 วันทำการเจาะเลือดแยกซีรัมนำไปตรวจสอบความใช้ได้โดยตรวจ cross reaction และตรวจหา working dilution ก่อนเก็บเป็นสต๊อกสำหรับใช้เป็นสารตรวจสอบในงาน ELISA ต่อไป

ตรวจสอบความใช้ได้ของชุดสารตรวจสอบ

ชุดสารตรวจสอบที่ผลิตได้คือ แอนติเจนชนิดเข้มข้น, rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibodyไทป์ O, A และ Asia1นำมาตรวจสอบความใช้ได้โดยวิธี titration เพื่อหา working dilution และตรวจสอบ cross reaction เพื่อให้มั่นใจว่าสารตรวจสอบเหล่านี้มีความจำเพาะและมีความไวโดยไม่มี cross binding reaction กับไวรัสไทป์อื่น ดังนี้

Antigen titration สำหรับแอนติเจนชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1

coat เพลทด้วย rabbit trapping antibody ต่อไทป์ O, A และ Asia1 ลงบน ELISA เพลท ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น วันรุ่งขึ้นเตรียมตัวอย่างแอนติเจนเข้มข้นของแต่ละไทป์โดยเจือจางแบบ two fold serial dilution เริ่มที่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 จนถึง 1:8192 ตามลำดับ เติมลงบนเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย guinea pig detecting antibody ของแต่ละไทป์ลงบนเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย conjugate เติมลงในเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย substrate ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลายของกรดซัลฟูริค (H_2SO_4) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนมิเตอร์ และหาค่า optimal dilution หรือ working dilution ของไวรัสแต่ละไทป์ โดยอ่านค่าที่ dilution สูงสุดของไวรัสที่ให้ค่า OD อยู่ในช่วง 1.5-1.8

Rabbit trapping serum titration ต่อไวรัสไทป์ O, A และ Asia1

coat เพลทด้วยตัวอย่าง rabbit trapping antibody ของแต่ละไทป์ โดยการเจือจางแบบ two fold serial dilution เริ่มที่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 จนถึง 1: 10240 ตามลำดับ ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น วันรุ่งขึ้นเตรียมสารละลายแอนติเจนของแต่ละไทป์โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ผ่านการ titrate มาแล้วเติมลงบนเพลท ทำการ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย guinea pig detecting antibody ของแต่ละไทป์ลงบนเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย conjugate เติมลงในเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย substrate ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลายของกรดซัลฟูริคเพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนมิเตอร์ และหาค่า optimal dilution หรือ working dilution ของ rabbit serumแต่ละไทป์ โดยอ่านค่าที่ dilution สูงสุด serum ที่ให้ค่า OD อยู่ในช่วง 1.5-1.8

Guinea pig serum titration ต่อไวรัสไทป์ O, A และ Asia1

coat เพลทด้วย rabbit trapping antibody ต่อไทป์ O, A และ Asia1 ลงบน ELISA เพลท ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น วันรุ่งขึ้นเตรียมสารละลายแอนติเจนของแต่ละไทป์โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ผ่านการ titrate มาแล้วเติมลงบนเพลท ทำการ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมตัวอย่าง guinea pig serum ของแต่ละไทป์ โดยการเจือจางแบบ two fold serial dilution เริ่มที่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 จนถึง 1:6400 ตามลำดับ เติมลงบนเพลท ทำการ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย conjugate เติมลงในเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย substrate ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลายของกรดซัลฟูริค เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนมิเตอร์และหาค่า optimal dilution หรือ working dilution ของ guinea pig serum แต่ละไทป์โดยอ่านค่าที่ dilution สูงสุด serum ที่ให้ค่า OD อยู่ในช่วง 1.5-1.8

ตรวจสอบความคงทนของแอนติเจนชนิดเข้มข้น

การตรวจสอบความคงทนของแอนติเจนชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 หลังเก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม ทำการสุ่มตัวอย่างทุกเดือนมาตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี antigen titration

ผล

การพัฒนาผลิตชุดสารตรวจสอบสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี ELISA นั้นสารตรวจสอบที่ผลิตได้มีดังนี้ แอนติเจนชนิดเข้มข้น, rabbit trapping antibody และguinea pig detecting antibody

ไทป์ O, A และ Asia1 ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้และความจำเพาะโดยวิธี antigen titration, cross reaction titration และ working dilution ผลดังแสดงในรูปแผนภูมิที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของแอนติเจนชนิดเข้มข้น พบว่าแอนติเจนไทป์ O , A และ Asia1 ชนิดเข้มข้นที่ผลิตได้ให้ working dilution ที่ 1:512, 1:1024 และ 1:1024 ตามลำดับ และพบว่าไม่มี cross reaction กับไทป์อื่น ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการตรวจสอบความคงทนของแอนติเจนชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 ที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง -20°C เป็นเวลานาน 12 เดือน ผลปรากฏว่า แอนติเจนแต่ละไทป์ยังคงมีคุณภาพให้ antigen titer สูง โดยมีค่า OD อยู่ในช่วง 2.5–2.8 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ rabbit trapping antibody โดยการตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ได้ค่า working dilution ที่ 1:12800 ทั้ง 3 ไทป์ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ guinea pig detecting antibody โดยการตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ได้ค่า working dilution ที่ 1:3200 ทั้ง 3 ไทป์ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3

สรุปและวิจารณ์

การพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ได้แก่ แอนติเจนชนิดเข้มข้น rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody พบว่าสารตรวจสอบที่ผลิตได้มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงระดับหนึ่ง เป็นสารที่มีคุณภาพ ให้ความจำเพาะและความไวสูงในแต่ละไทป์ ซึ่งปัจจุบันได้มีการแจกจ่ายสารตรวจสอบเหล่านี้ให้กับหน่วยงานในกรมปศุสัตว์ได้แก่ ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาคเพื่อนำไปใช้ในงานตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องและยังให้ความจำเพาะและความไวสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารตรวจสอบที่ผลิตเป็นแอนติเจนที่มีความเข้มข้นประมาณ 20 เท่า เมื่อนำมาตรวจโดยวิธี antigen titration พบว่าให้ค่า working dilution สูงตั้งแต่ 1:512 ถึง 1:1024 (ตารางที่ 1) ซึ่งการใช้ working dilution ที่สูง จะสามารถเพิ่มความจำเพาะให้สูงขึ้นและยังสามารถแก้ปัญหาเรื่อง background อันเนื่องมาจาก non specific binding reaction และการเกิด cross reaction ระหว่างไทป์อื่นได้ การผลิตด้วยวิธีนี้จึงได้แอนติเจนที่มีความจำเพาะสูงและจะส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ จากการทดสอบความคงทนในการเก็บรักษาคุณภาพของแอนติเจนทั้ง 3 ไทป์ โดยการสุ่มตรวจสอบ antigen titration ทุกเดือนเป็นเวลานาน 12 เดือน พบว่าแอนติเจนดังกล่าวไม่มีการเสื่อมคุณภาพ ยังคงให้ titer ในระดับสูงและคงที่ ได้ค่า OD อยู่ระหว่าง 2.5 ถึง 2.8 (แผนภูมิที่ 1) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดลองต่อหลังเก็บรักษาเกินระยะเวลา 1 ปี

ส่วนกรณีการตรวจสอบ rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody ไทป์ O, A และ Asia1 ในแผนภูมิที่ 2 และ 3 พบว่าให้ working dilution ค่อนข้างสูงและไม่มี cross reaction กับไทป์อื่น แสดงถึงความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อเพิ่มปริมาณหรือขยายการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต โดยเพิ่มอุปกรณ์และครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่จำเป็นบางอย่าง เช่น อุปกรณ์สำหรับการขยายปริมาณการเพาะเลี้ยงเซลล์และเพาะเลี้ยงไวรัส เครื่องทำไวรัสให้เข้มข้นและบริสุทธิ์เป็นต้น จากผลสำเร็จในการพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบเหล่านี้จะสามารถประหยัดงบประมาณประจำปีได้ปีละหลายล้านบาท โดยไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ปัจจุบันชุดสารตรวจสอบสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 7 ไทป์ จะมีแหล่งผลิตและจำหน่ายที่หน่วยงาน World Reference Laboratory for FMD, Pirbrigth Laboratory ประเทศอังกฤษเท่านั้น ซึ่งสารตรวจสอบเหล่านี้มีราคาสูงมาก ดังนั้นในการวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบครั้งนี้พบว่าได้สารตรวจสอบที่มีคุณภาพ ได้มาตรฐาน ราคาประหยัด รวมทั้งสามารถแจกจ่ายให้กับหน่วยงานต่างๆในกรมปศุสัตว์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั้ง 7 แห่งของกรมปศุสัตว์ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและการตรวจเฝ้าระวังโรคปากและเท้าเปื่อยตามแผนยุทธศาสตร์กรมปศุสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถแจกจ่ายหรือจำหน่ายให้กับหน่วยงานต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศสมาชิก OIE ภายใต้โครงการ South East Asia and China Foot Mouth Disease Control Campaign (SEACFMD) ให้บรรลุเป้าหมายและผลสำเร็จสำหรับการยื่นขอรับรองจาก OIE ในการจัดตั้งเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยโดยฉีดวัคซีนในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ภายในปี คศ. 2020 ตามแผนยุทธศาสตร์ SEACFMD 2020 Roadmap

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยเตรียมสารและเตรียมเซลล์ ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ให้ความอนุเคราะห์และให้ความช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพาะเลี้ยงไวรัส เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ มีเดียและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในโครงการนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

Bachrach, H.L, Trautman, R., and Breese, S. Jr. 1964. Chemical and physical properties of virtually pure foot and mouth disease virus. Am. J. Res. 25: 333-342.

Bahnemann, H.G. 1975. Binary ethyleneimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and it application for vaccine production. Arch Virol. 17: 47-56.

Brooksby, J. and Rogers. 1957. Method used in typing the virus of foot and mouth disease at Pirbright, 1950-1955. *In* Method of typing and cultivation of foot and mouth disease virus. Project 208 of OEEC, Paris. 31-34.

Brown, F. and Cartwright, B. 1963. Purification of radioactive foot and mouth disease virus. Nature (Lond). 199:1168-1170.

Casey, H.L. 1995. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation micro test. U.S. Public Health Service, Washington D.C., Publ. Health Monogr. 74: 1-34.

Cowan, K.M. 1968. Immunochemical studies of foot and mouth disease. IV. Preparation and evaluation of antisera specific for virus protein, sub-unit and the infection- associated antigen. J. of Imm. 10:1183-1191.

Ferris, N.P. and Dawson, M. 1988. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot and mouth disease and swine vesicular diseases. Vet. Microbiol. 16: 201-209.

Hamblin, C., Kitching, P.R., Donaldson, A.I., Crowther, J.R. 1987. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the antibody against foot and mouth disease virus. III. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. Epidem. Inf. 99: 733-744.

Linchongsubongkoch, W. and Janukit, T. 1994. Detection of antibody titer to foot and mouth disease virus by liquid phase blocking ELISA. Proceeding on 1st Vet. Biologics Conference. 62-72.

Pereira, H.G. 1977. Subtyping of foot and mouth disease virus. Dev. Biol. Stand. 35: 167-174.

Roeder P.L., Le Blance Smith P.R. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immnusorbent assay: a sensitivity, rapid, reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci. 43: 225-232.

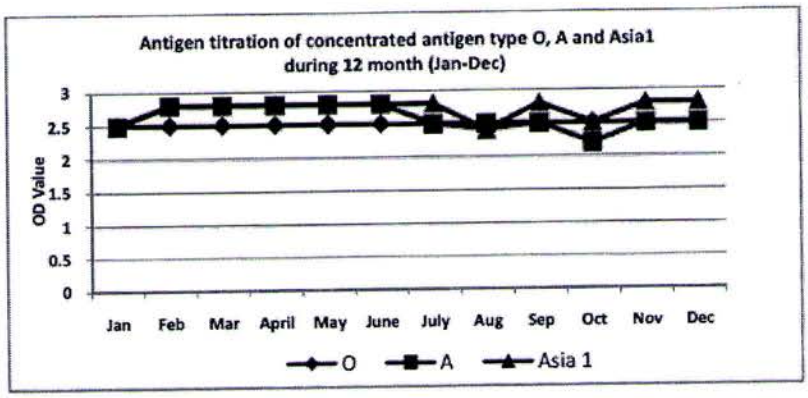
Rweyemamu, M.M., Booth, J.C., Heak, M., Pay, T.W.F. 1987. Microneutralization test for serology typing and subtyping of foot and mouth disease virus strains. J. Hygiene. Camb. 81: 107-122.

Westbury, H.A., Chamnanpood, P., Tungchaitrong,S. Doughty, W.J. 1988 . Single dilution ELISA for detection of serum antibody to foot and mouth disease virus in cattle. Vet. Microbiol. 18: 273-283.

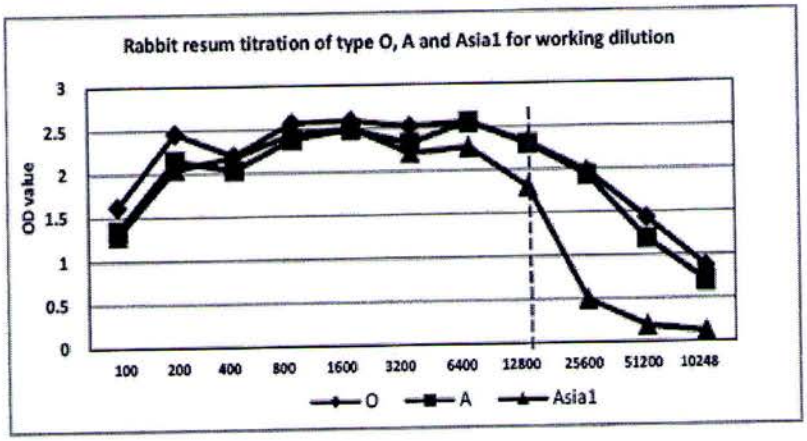
ตารางที่ 1 แสดงการตรวจสอบความใช้ได้ของไวรัสชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 โดยวิธี antigen titration และตรวจหา working dilution และ cross reaction สรุปผลการหา working dilution โดยอ่านค่าที่ OD ช่วง 1.5-1.8 ของไทป์ O, A และ Asia1 เท่ากับ 1:512, 1: 1024 และ 1:1024 ตามลำดับ

	Conc. Ag 20X	Cross titration		Conc. Ag 20X	Cross titration		Conc. Ag 20X	Cross titration	
dilution	type O	to type A and Asia1		type A	to type O and Asai1		type Asia1	to type O and A	
1:2	2.35	0.43	0.38	2.64	0.39	0.41	2.91	0.31	0.15
1:4	2.25	0.37	0.35	2.5	0.34	0.33	2.89	0.31	0.13
1:8	2.07	0.33	0.33	2.49	0.26	0.28	2.85	0.15	0.12
1:16	1.93	0.29	0.28	2.34	0.17	0.21	2.71	0.12	0.13
1:32	1.87	0.13	0.19	2.2	0.13	0.15	2.68	0.13	0.12
1:64	1.74	0.13	0.15	2.18	0.11	0.14	2.41	0.13	0.09
1:128	1.68	0.07	0.13	2.14	0.05	0.12	2.14	0.09	0.08
1:256	1.76	-	-	2.11	-	-	2.2	-	-
1:512	*1.54	-	-	2.09	-	-	2.07	-	-
1:1024	1.13	-	-	*1.65	-	-	*1.87	-	-
1:2048	0.83	-	-	0.8	-	-	0.76	-	-
1:4096	0.51	-	-	0.47	-	-	0.37	-	-
1:8192	0.37	-	-	0.36	-	-	0.29	-	-

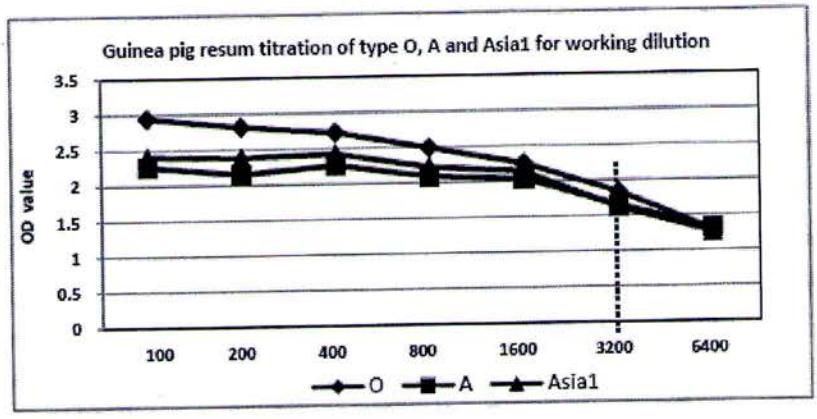
* Working dilution type O = 1:512, type A = 1:1024 , type Asia1 =1:1024



แผนภูมิที่ 1 แสดงค่าการตรวจสอบคุณภาพ ความคงทนของไวรัสชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 ที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลานาน 12 เดือน โดยสุ่มตัวอย่างตรวจทุกเดือน



แผนภูมิที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ rabbit trapping antibody โดยตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ตามลำดับ



แผนภูมิที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ guinea pig detecting antibody โดยตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ตามลำดับ

Development of production of foot and mouth disease ELISA reagent kit

Wilai Linchongsubongkoch[1] Kingkarn Boonsuya Seeyo[2] Julanee Nuamchit[2]
Piyaporn Chareonphol[2] Janya Samanit[2] Sopha Singkleebut[2] Rattanee Thongtha[2]

Abstract

The production of ELISA reagents used for foot and mouth disease diagnosis were developed and validated, those reagents were concentrated antigen, rabbit trapping antibody and guinea pig detecting antibody against serotype O, A and Asia1, respectively. The validation of concentrated antigen using ELISA titration assay was demonstrated specificity that illustrated the high working dilution of serotype O, A and Asia1 at 1:512, 1:1024 and 1:1024 respectively. In addition, a keeping quality of concentrated antigen was investigated; the result demonstrated a high antigen titer that prolonged stability up to one year. The validation of rabbit trapping and guinea pig detecting antibody were carried out, the high working dilution of rabbit antiserum to serotype O, A and Asia1 was found at 1:12800, while working dilution of guinea pig antiserum to serotype O, A and Asia1 was found at 1:3200. This result indicated a high specificity and sensitivity of all reagents. In conclusion, the developed ELISA reagents could be used to enhance the efficacy and accuracy of foot and mouth disease diagnosis and those reagents could be kept freezer -20°C for a long time which prolonged high quality. Thus, these developed reagents will be benefit for reducing of importing and saving of annual budget for purchasing the reagents from foreign country.

Key words: Reagent kit, foot and mouth disease, ELISA

[1] FMD Expert and Consultant of Department of Livestock Development

[2] Regional Reference Laboratory for FMD in Southeast Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130