# การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ดิลก อ้วนพรมมา * วิไล ลินจงสุบงกช

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

* ผู้เขียนรับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-4427-9112 โทรสาร 0-4431-4889 Email: Diloka@dld.go.th

## บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบทางซีรัมวิทยาของโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในตัวอย่างซีรัมโคจำนวน 358 ตัวอย่าง โดยใช้ polyclonal antisera และ inactivated antigen ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตขึ้นเองในประเทศ และ ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจากตัวอย่างซีรัมจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ ตัวอย่างซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและตัวอย่างซีรัมจากโคที่ได้รับการติดเชื้อ พร้อมเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบกับวิธี liquid phase blocking ELISA(LP ELISA) และ Cedi® FMDV type O วิธีทดสอบจะเจือจางตัวอย่างซีรัมในอัตราส่วน 1:5 และ ใช้ phosphate buffer saline, 5% skim milk และ 10% normal rabbit serum เป็นส่วนประกอบใน blocking diluent และกำหนดค่า cut off ของการทดสอบที่ 40% inhibition ผลการทดสอบในตัวอย่างซีรัมจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อให้ค่าความจำเพาะสูง (100%) และ เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบกับวิธีทดสอบ LP ELISA และ Cedi® FMDV type O จะให้ค่าความไวที่สูงในตัวอย่างซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและตัวอย่างซีรัมจากโคที่ได้รับการติดเชื้อ ดังนั้นวิธีทดสอบทางซีรัมวิทยาโดยวิธี C-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จึงมีประสิทธิภาพการทดสอบในด้านความจำเพาะ ความไว และ สามารถแก้ปัญหาการเกิด non specific binding ในกระบวนการตรวจสอบทาง ELISA ทำให้การตรวจแยกสัตว์ที่ไม่มีแอนติบอดีออกจากสัตว์ที่มีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างชัดเจน

**คำสำคัญ**: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย C-ELISA LP ELISA Cedi® FMDV type O

## บทนำ

กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการรณรงค์ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโค และ กระบือ อย่างต่อเนื่องปีละ 2 ครั้ง เพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้สัตว์ในพื้นที่ได้รับการฉีดวัคซีนอย่างทั่วถึงเป็นจำนวนไม่ต่ำกว่า 80 % ของประชากรสัตว์ทั่วประเทศ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าสัตว์เหล่านั้นมีระดับภูมิคุ้มกันสูงเพียงพอต่อการป้องกันโรค การตรวจสอบทางซีรัมวิทยาในห้องปฏิบัติการโดยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (OIE, 2004) ซึ่งวิธีนี้ให้ผลการตรวจสอบที่มีความจำเพาะ ความไวและความแม่นยำสูง แต่บางครั้งยังพบว่ามีข้อผิดพลาดจากการเกิดปฏิกิริยา non specific binding reaction อันมาจากในซีรัมเองและการเลือกใช้ blocking diluent ที่ไม่เหมาะสม ทำให้การตรวจแยกสัตว์ที่ไม่มีแอนติบอดี ออกจากสัตว์ที่มีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ไม่ชัดเจน นอกจากนี้องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ หรือ OIE ยังกำหนดให้วิธี Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) เป็นอีกวิธีหนึ่งในการตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยในตัวอย่างสัตว์หรือสัตว์เศรษฐกิจในการส่งออกต่างประเทศ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี C-ELISA ขึ้น โดยการคัดเลือกชนิดของ blocking diluent ที่เหมาะสม เพื่อจะเพิ่มประสิทธิภาพในด้านความไว ความจำเพาะ และลดปัญหาด้าน non specific binding reaction ในขบวนการตรวจสอบทาง ELISA technique โดยประเมินผลของวิธีทดสอบในด้านความจำเพาะและทดสอบเปรียบเทียบหาความไวจากความสัมพันธ์กับวิธี LP ELISA และ Ceditest ®FMDV type O

## อุปกรณ์และวิธีการ

### แอนติเจนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

เตรียมแอนติเจนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O189/87 A118/87 และ Asia1/85 โดยผ่านไวรัสลงใน BHK-21 cell ที่ 37 °C นาน 18 ชั่วโมงหรือจนเกิด cytopathic effect (CPE) สมบูรณ์ ทำการปั่นแยกส่วนน้ำใสออกจากส่วนกากเซลล์ นำส่วนน้ำใสที่ได้ไป inactivate ด้วย 2% binary ethyleneimine (BEI) ที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นำไปผสมกับ 20% glycerin เพื่อให้มีคุณภาพคงที่และยาวนาน และทำการ titration สารตรวจสอบทางซีรัมวิทยาเพื่อหา working dilution ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบทาง ELISA technique

### Antisera

เตรียม rabbit trapping antibody โดยฉีด inactivated, purified 146S virus particle of FMDV ซึ่งผสมด้วย freund ‘s complete หรือ incomplete adjuvant ในปริมาณที่เท่ากันลงในกระต่าย (Have et al., 1984) โดยฉีดจำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 28 วัน ทำการเก็บเลือดและแยกซีรัมในวันที่ 10 หลังฉีดเข็มที่ 2 นำมาตรวจสอบความใช้ได้และตรวจหา working dilution ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบทาง ELISA technique

เตรียม guinea pig detecting antibody โดยฉีด inactivated, purified 146S virus particle of FMDV ซึ่งผสมด้วย freund 's complete adjuvant ในปริมาณที่เท่ากันลงในหนูตะเภา (Ferris and Donaldson, 1984) ทำการเก็บเลือดและแยกซีรัมหลังฉีด 28 วัน นำมาตรวจสอบความใช้ได้และตรวจหา working dilution ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบทาง ELISA technique

**ตัวอย่างซีรัมทดสอบ**

ตัวอย่างซีรัมโคจากท้องที่และจากห้องปฏิบัติการ จำนวนทั้งสิ้น 358 ตัวอย่าง แบ่งตามประวัติดังนี้คือ ซีรัมจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ ซึ่งเป็นซีรัมโคจากประเทศญี่ปุ่นที่ปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยในปี พ.ศ.2548 จำนวน 80 ตัวอย่าง ซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนจากฟาร์มในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาในปี พ.ศ.2550 จำนวน 158 ตัวอย่าง และซีรัมจากโคที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธี non structure protein (NS) test จากพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาในปี พ.ศ. 2547 จำนวน 120 ตัวอย่าง

Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) test

เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวัน โดยวิธี indirect double antibody sandwich ELISA ตามวิธีการของ Linchongsubongkoch and Janukij (1994) และ Hamblin et al. (1986)

Ceditest® FMDV type O

เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่ผลิตจากหน่วยงาน CEDI diagnostic B.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในตัวอย่างซีรัมสัตว์เท่านั้น โดยวิธี blocking ELISA ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบดำเนินการตามคู่มือของผู้ผลิต

Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA)

เป็นการตรวจแอนติบอดีต่อส่วนที่เป็น structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (SP FMDV) ในตัวอย่างซีรัมสัตว์ วิธีการโดย coat rabbit trapping antibody ลงบน ELISA plate เก็บค้างคืนที่ 4 °C หรือ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม inactivated FMD antigen ที่ถูกเจือจางด้วย blocking diluent ลงในเพลทที่ coat ไว้แล้ว เขย่าที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ทำการเจือจาง control serum (strong positive control serum, weak positive control serum และ negative control serum) และตัวอย่างซีรัมทดสอบด้วย blocking diluent ในเพลทโดยใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 5 แล้วเติมสารละลาย guinea pig detecting antibody ในปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติมสารละลาย

®commercial kit

horseradish peroxidase conjugate เขย่าที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติมสารละลาย substrate/chromogen ที่มี TMB (tetramethylbenzidine) และ phosphate citrate buffer เป็นส่วนประกอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม 1M $H_2SO_4$ เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate นำไปอ่านค่า OD ที่ wavelength 450 nm. โดยใช้เครื่อง ELISA reader แล้วนำค่า OD ที่ได้ไปหาค่า percent inhibition (PI) โดยค่า PI ของตัวอย่างซีรัมที่น้อยกว่า 40% อ่านผลเป็น negative นั้นหมายถึงตัวอย่างซีรัมไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และค่า PI ของตัวอย่างซีรัมมากกว่าหรือเท่ากับ 40% อ่านผลเป็น positive หมายถึงตัวอย่างซีรัมมีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

Blocking diluent

คัดเลือกชนิดของ blocking diluent ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ C-ELISA เพื่อลดปัญหาการเกิด non specific binding ในกระบวนการตรวจสอบทาง ELISA technique และสามารถตรวจแยกสัตว์ที่ไม่มีแอนติบอดีออกจากสัตว์ที่มีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างชัดเจน โดยทำการคัดเลือกจาก blocking diluent จาก 3 ชนิดคือชนิดที่ 1 ประกอบด้วย phosphate buffer saline tween 20 (PBST) และ 5% skim milk ชนิดที่ 2 ประกอบด้วย PBST, 5% skim milk และ 10% horse serum และชนิดที่ 3 ประกอบด้วย PBST ,5% skim milk และ 10% normal rabbit serum

## ผล

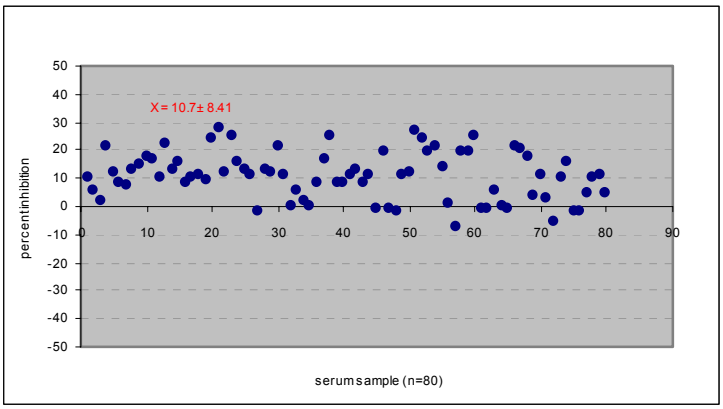
**ผลการคัดเลือก** blocking diluent

blocking diluent ทั้ง 3 ชนิดถูกนำมาใช้ในวิธี C-ELISA เพื่อคัดเลือก blocking diluent ที่เหมาะสมที่สุด โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างที่เป็น negative sera (ซีรัมจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ) และ positive sera (ซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและจากโคที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย) พบว่า blocking diluent ที่ประกอบด้วย PBST, 5% skim milk และ 10% normal rabbit serum สามารถตรวจแยกสัตว์ที่ไม่มีแอนติบอดีออกจากสัตว์ที่มีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างชัดเจนและ สามารถลดปัญหาการเกิด non specific binding ในขบวนการตรวจสอบทาง ELISA technique (ไม่แสดงข้อมูล)

**ผลการทดสอบหา** Cut off value **ของวิธีทดสอบ**

การทดสอบหาค่า percent inhibition (PI) ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็น cut off value ของวิธีทดสอบโดยอาศัยการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ จำนวน 80 ตัวอย่าง โดยวิธี C-ELISA และเจือจางตัวอย่างซีรัมด้วย blocking diluent ในอัตราส่วน 1:5 จากผลการทดสอบเมื่อนำค่า PI ของแต่ละไทป์มาหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation หรือ SD) พบว่าไทป์โอ เอ และเอเชียวันเท่ากับ 10.7%±8.41, 9.86%±9.43

และ 1.88%±4.73 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งสามารถคำนวณ cut off value ได้จากผลรวมของค่าเฉลี่ยกับค่าสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (3SD) พบว่าไทป์โอ เอ และเอเชียวันเท่ากับ 35.93%, 38.09% และ 16.07% ตามลำดับ แต่เพื่อความมั่นใจในผลการทดสอบว่ามีความจำเพาะที่สูง (high specificity) ทั้ง 3 ไทป์ จึงได้กำหนด cut off value ทั้ง 3 ไทป์ เท่ากับ 40% จาก cut off value ดังกล่าวเมื่อทดสอบตัวอย่างที่เป็น negative sera จะได้ค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 100% ทั้ง 3 ไทป์ และให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบ LP ELISA และ Cedi® FMDV type O ดังแสดงในตารางที่ 1,2 และ 3 ตามลำดับ

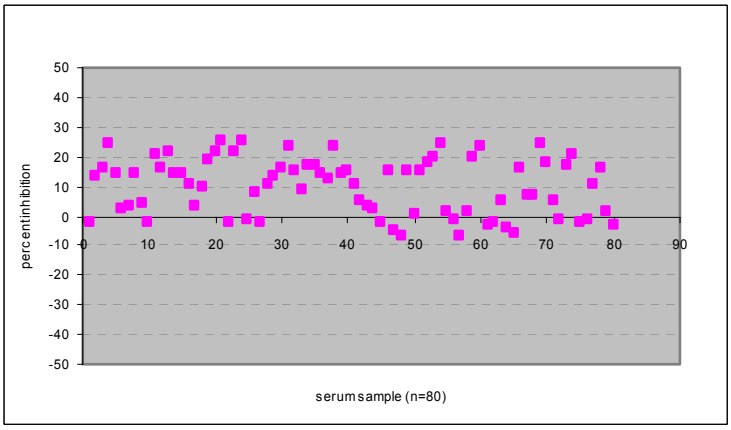



X = arithmetic mean of PI by C-ELISA

± = sample standard deviation

n = number of serum sample

รูปที่ 1 แสดงการกระจายตัวของค่า PI ในไทป์โอ โดยวิธี C-ELISA
จากซีรัมโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ

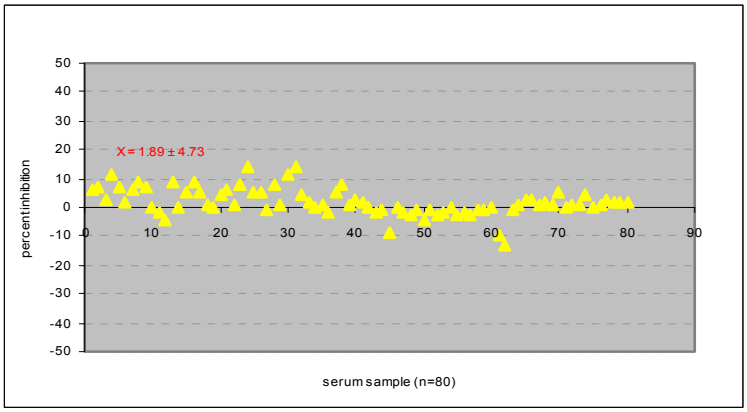



X = arithmetic mean of PI by C-ELISA

± = sample standard deviation

n = number of serum sample

รูปที่ 2 แสดงการกระจายตัวของค่า PI ในไทป์เอ โดยวิธี C-ELISA
จากซีรัมโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ




X = arithmetic mean of PI by C-ELISA

± = sample standard deviation

n = number of serum sample

รูปที่ 3 แสดงการกระจายตัวของค่า PI ในไทป์เอเชียวัน โดยวิธี C-ELISA จากซีรัมโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ

**ผลความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบ C-ELISA กับ LP ELISA และ Cedi® FMDV type O**

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของทั้ง 3 วิธีทดสอบในตัวอย่างซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและซีรัมจากโคที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนจำนวน 158 ตัวอย่าง วิธีทดสอบ LP ELISA ให้ผลบวก (LP ELISA titre มากกว่า 40) ในไทป์โอ เอ และเอเชียวันเท่ากับ 125, 149 และ 150 ตัวอย่างตามลำดับ วิธีทดสอบ Cedi® FMDV type O ให้ผลบวกในไทป์โอเท่ากับ 130 ตัวอย่าง และวิธีทดสอบ C-ELISA ให้ผลบวก (cut off value เท่ากับ 40%) ในไทป์โอ เอและเอเชียวันเท่ากับ 121, 124 และ 121 ตัวอย่างตามลำดับ จากผลการทดสอบสามารถหาค่าความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบ C-ELISA และ LP ELISA ต่อความไวในการทดสอบตัวอย่างที่เป็น positive sera (ค่า relative sensitivity) ในไทป์โอ เอและเอเชียวันเท่ากับ 96.8%,83.2% และ 80.6% ตามลำดับและความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบ C-ELISA และ Cedi® FMDV type O ในไทป์โอ เท่ากับ 93% ดังแสดงในตารางที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบกับซีรัมจากโคที่ได้รับการติดเชื้อจำนวน 120 ตัวอย่าง พบว่าวิธีทดสอบ LP ELISA ให้ผลบวก (LP ELISA titre มากกว่า 40) ในไทป์โอ เอและเอเชียวันเท่ากับ 119, 119 และ 120 ตัวอย่างตามลำดับ วิธีทดสอบ Cedi® FMDV type O ให้ผลบวกในไทป์โอเท่ากับ 119 ตัวอย่าง และวิธีทดสอบ C-ELISA ให้ผลบวก (cut off value เท่ากับ 40 ) ในไทป์โอ เอและเอเชียวันเท่ากับ 119,120 และ 117 ตัวอย่างตามลำดับ จากผลการทดสอบสามารถหาค่าความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบ C-ELISA และ LP ELISA ต่อความไวในการทดสอบตัวอย่างที่เป็น positive sera (ค่า relative sensitivity) ในไทป์โอ เอและเอเชียวันเท่ากับ 100%, 100% และ 97.5% ตามลำดับและความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบ C-ELISA และ Cedi® FMDV type O ในไทป์โอ เท่ากับ 100% ดังแสดงในตารางที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

**ตารางที่ 1** แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โดยวิธี C-ELISA, LP ELISA และ Cedi® FMDV type O จากซีรัมโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ โคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและโคที่ได้รับการติดเชื้อ

| sample | No. of sample | No.of positive sample by Cedi® FMDV type O result | No.of sample antibody titre >40 by LP ELISA type O | C-ELISA type O result | | relative sensitivity* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | positive | negative | C-ELISA and LP ELISA | C-ELISA and Cedi® FMDV type O |
| 1. non vaccinated and uninfected cattle serum | 80 | 0 | 0 | 0 | 80 | 0 | 0 |
| 2. vaccinated cattle serum | 158 | 130 | 125 | 121 | 37 | 96.8 | 93 |
| 3. infected cattle serum | 120 | 119 | 119 | 119 | 1 | 100 | 100 |

relative sensitivity * = number of sera positive in C-ELISA *100 / number of sera positive in LP ELISA or Cedi® FMDV type O

**ตารางที่ 2** แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ โดยวิธี C-ELISA และ LP ELISA จากซีรัมโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ โคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและโคที่ได้รับการติดเชื้อ

| sample | No. of sample | No.of sample antibody titre >40 by LP ELISA type A | C-ELISA type A result | | relative sensitivity* C-ELISA and LP ELISA |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | positive | negative | |
| 1. non vaccinated and uninfected cattle serum | 80 | 0 | 0 | 80 | 0 |
| 2. vaccinated cattle serum | 158 | 149 | 124 | 34 | 83.2 |
| 3. infected cattle serum | 120 | 119 | 120 | 0 | 100 |

relative sensitivity * = number of sera positive in C-ELISA*100 / number of sera positive in LP ELISA

**ตารางที่ 3** แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียวัน โดยวิธี C-ELISA และ LP ELISA จากซีรัมโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ โคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและโคที่ได้รับการติดเชื้อ

| sample | No. of sample | No.of sample antibody titre >40 by LP ELISA type AS1 | C-ELISA type AS1 result | | relative sensitivity* C-ELISA and LP ELISA |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | positive | negative | |
| 1. non vaccinated and uninfected cattle serum | 80 | 0 | 0 | 80 | 0 |
| 2. vaccinated cattle serum | 158 | 150 | 121 | 37 | 80.6 |
| 3. infected cattle serum | 120 | 120 | 117 | 3 | 97.5 |

relative sensitivity * = number of sera positive in C-ELISA*100 / number of sera positive in LP ELISA

## วิจารณ์

จากการคัดเลือก blocking diluent จากทั้ง 3 ชนิดนั้น blocking diluent ที่มีส่วนประกอบของ PBST, 5% skim milk และ 10% normal rabbit serum สามารถลดปัญหาการเกิด non specific binding ในขบวนการตรวจสอบทาง ELISA technique และสามารถตรวจแยก positive และ negative serum ได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ blocking diluent ชนิดอื่น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Mackay et al. (2001) ที่ได้พัฒนาวิธีทดสอบ solid-phase competition ELISA สำหรับตรวจวัดแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยขึ้นที่ Pirbright laboratory ประเทศอังกฤษ โดยใช้ PBST, 10%normal serum of species และ 5% normal rabbit serum เป็น blocking diluent

จากผลการทดสอบหา cut off value โดยทดสอบกับซีรัมจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อ พบว่า cut off value ทั้ง 3 ไทป์เท่ากับ 40% ในขณะที่ผลการศึกษาของ Mackay et al.(2001) พบว่า cut off value เท่ากับ 30% โดยมีค่า SD เท่ากับ 6% และ ค่า mean PI ของไทป์โอ เอ และซีเท่ากับ 9%,10% และ 10% ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ผลการทดสอบมีความแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากสารตรวจสอบที่ใช้มีความแตกต่างกันนั้นคือ การศึกษาของ Mackay et al.(2001) ใช้ purified FMD antigen ซึ่งมีความคงตัวและความจำเพาะที่สูงกว่าทำให้ค่า SD ที่ได้น้อยกว่าและไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้เป็นไทป์ $O_1$BFS 1860, $A_{22}$IRQ 24/64 และ $C_1$ ซึ่งเป็นคนละ subtype กับการศึกษาครั้งนี้

เมื่อหาค่าความสัมพันธ์ด้านความจำเพาะ (relative specificity) และ ความไว (relative sensitivity) ของวิธีทดสอบ C-ELISA กับวิธี LP ELISA และ Ceditest® FMDV type O โดยทดสอบกับตัวอย่างที่เป็น negative sera และ positive sera พบว่าซีรัมจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อทั้ง 3 วิธีทดสอบให้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง (ค่า relative specificity เท่ากับ 100%) นั้นคือทั้ง 3 วิธีทดสอบยังให้ความจำเพาะที่สูงและให้ผลการทดสอบที่ความสัมพันธ์กัน และผลการทดสอบซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและโคที่ได้รับการติดเชื้อ พบว่าซีรัมจากโคที่ได้รับการติดเชื้อทั้ง 3 วิธีทดสอบมีค่าความสัมพันธ์ด้านความไวที่สูง (high relative sensitivity) ซึ่งสอดคล้องกับค่า antibody titre ของวิธีทดสอบ LP ELISA ที่พบว่าโดยส่วนมากมีค่า antibody titre มากกว่า 160 ทั้ง 3 ไทป์ ในขณะที่ค่า relative sensitivity ของวิธีทดสอบ C-ELISA และ LP ELISA ไทป์โอ เอ และเอเชียวันในกลุ่มตัวอย่างซีรัมจากโคที่ได้รับการฉีดวัคซีน พบว่าให้ค่า relative sensitivity ไม่สูงมากโดยเฉพาะไทป์เอและเอเชียวัน ซึ่งเมื่อดูข้อมูลค่า antibody titre ของวิธีทดสอบ LP ELISA ของตัวอย่างซีรัมพบว่าตัวอย่างที่มีค่า antibody titre มากกว่า 160 จะให้ผลบวกต่อวิธี C-ELISA ในขณะที่ antibody titre อยู่ระหว่าง 40-80 ให้ทั้งผลบวกและลบต่อวิธีทดสอบ C-ELISA สาเหตุอาจเนื่องมาจากค่า antibody titre ของวิธีทดสอบ LP ELISA มีโอกาสแตกต่างกันได้ 1 ถึง 2 fold dilution ทั้ง 3 ไทป์ (ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งสัมพันธ์กับผลการศึกษาของ Mackay et al. (2001) ที่พบว่าวิธีทดสอบ LP ELISA บางครั้งให้ผลการทดสอบที่ไม่แน่นอนโดยเฉพาะตัวอย่างที่เป็น low positive sera และ negative sera เนื่องมาจากปัญหาการเกิด non specific binding reaction ในกระบวนการตรวจสอบทาง ELISA technique ของวิธี LP ELISA และจากค่า relative sensitivity ระหว่างวิธี C-ELISA และ Cedi® FMDV type O ที่ให้ผลต่ำกว่าค่า relative sensitivity ของวิธีทดสอบ C-ELISA และ LP ELISA อาจเนื่องมาจาก antigen ของ FMDV subtype ไทป์โอของวิธี C-ELISA เป็น subtype เดียวกันกับวิธีทดสอบ LP ELISA แต่เป็นคนละ subtype กับวิธี Cedi® FMDV type O ทำให้ปฏิกิริยา binding reaction มีความแตกต่างกันด้วย

การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) บรรลุตามจุดประสงค์ที่ต้องการพัฒนาวิธีการทดสอบที่มีประสิทธิภาพในด้านความไว ความจำเพาะ และลดปัญหาด้าน non specific binding reaction ในขบวนการตรวจสอบทาง ELISA technique และสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยในตัวอย่างซีรัมสัตว์ แต่ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความไวของวิธีทดสอบโดยทำการศึกษากับจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นเพื่อให้เกิดความมั่นใจก่อนนำไปใช้งาน และทดสอบในตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่นโดยเฉพาะสุกร และควรได้รับการพัฒนาสารตรวจสอบที่ใช้ในขบวนการทดสอบโดยเฉพาะ antigen ให้เป็น concentrated FMDV antigen หรือ purify 146S FMDV antigen เพื่อให้เกิดความคงตัวของสารและอายุในการเก็บรักษายาวนานโดยที่คุณสมบัติต่อปฏิกิริยาทาง ELISA ไม่เปลี่ยนแปลงและขจัดปัญหา cross reaction ระหว่างไทป์

## สรุป

วิธีทดสอบ Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และ เอเชียวัน ในตัวอย่างซีรัมสัตว์ให้ความจำเพาะและความไวที่สูง และสามารถตรวจแยก positive และ negative serum ได้อย่างชัดเจน และให้ผลการทดสอบที่สัมพันธ์กับวิธีทดสอบ LP ELISA และ Cedi® FMDV type O นั้นคือวิธีทดสอบ C-ELISA ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งก่อนการนำไปใช้ควรมีการศึกษาถึงความไวเพิ่มเติมในสัตว์ชนิดอื่น และเพิ่มจำนวนตัวอย่างทดสอบเพื่อให้เกิดความมั่นใจในวิธีทดสอบ และควรได้รับการพัฒนาสารตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพและคงตัวมากขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวกฤตยา สุนทร และนางสาวโสภา สิงคลีบุตร เจ้าหน้าที่ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมสารตรวจสอบและจัดหาตัวอย่างทดสอบและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ในการดำเนินการทดสอบและศึกษาครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

## เอกสารอ้างอิง

Ferris, N.P. and Donaldson, A.I. 1984. Serological response of guinea pigs to inactivated 146S antigens of foot and mouth disease virus after single or repeated inoculations. Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 3, 563-574.

Hamblin, C., Barnett, I.T.R. and Crowther, J.R. 1986. A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. II. Application. J. Immunol. Methods. 93: 122-129.

Have, P., Lei, J.C. and Schjerning-Thiesen, K. 1984. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the primary diagnosis of foot-and-mouth disease. Characterization and comparison with complement fixation. Acta Vet. Scand. 25, 280-296.

Linchongsubongkoch, W and Janukij, T. 1994. Detection of antibody titer to FMDV by liquid phase ELISA. Proceedings on an Annual Seminar of Veterinary Biologics Division. p. 63-72.

Mackay, D.K.J., Bulut, A.N., Rendle, T., Davidson, F. and Ferris, N.P. 2001. A solid phase competition ELISA for measurement antibody to foot and mouth disease virus. J. Virol. Methods. 97: 33-48.

OIE (2004). Foot and Mouth disease. In : Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Torrestrial Animals. Chapter 2.1.1. 5 $^{th}$ed. Paris, France. p. 111-128.

# Development of competitive enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) for detection of antibody to Foot and Mouth disease virus

Dilok Ounpomma* Wilai Linchongsubongkoch

Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130,Thailand

*Corresponding author Tel 044-279112 Fax. 0-4431-4889 Email: Diloka@dld.go.th

## Abstract

A competitive enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) for the detection of antibody against foot and mouth disease virus in 358 cattle sera was developed. Reagents used were polyclonal antisera and inactivated antigen developed in the country. Samples from non-vaccinated and uninfected, vaccinated, and infected animals were used and validated by comparing with liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) and Cedi® FMDV type O test. Animal sample sera were diluted 1:5 and phosphate buffer saline 5% skim milk and 10% normal rabbit serum was used as a blocking diluent, and the inhibition reaction was cut off at 40%. The results showed a high specificity for non-vaccinated and uninfected animal serum samples (100%) and a high relative sensitivity with LP-ELISA and Cedi® FMDV type O test for vaccinated and infected animal serum samples. In conclusion, C-ELISA can be used to differentiate naive animals from immunized animals

Key words: Foot and mouth disease virus, C- ELISA, LP ELISA, Cedi® FMDV type O