การพัฒนา Indirect ELISA สำหรับตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกร

Development of an Indirect ELISA for the Detection of Aujeszky's Disease Antibodies in Pigs

อรวรรณ์ บุตรดี[1,3] สมเกียรติ พันธ์ธรรม[1,3] วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์[1,3]
สิริลักษณ์ เจริญผล[3] ปริวรรต พูลเพิ่ม[1,3] วรวิทย์ วัชชวัลคุ[2,3]
Orawan Boodde[1,3] Somkiat Punthum[1,3] Wilairat Chumsing[1,3]
Siriluk Charornpol[3] Parivat Poolperm[1,3] Worawidh Wajjwalku[2,3]

บทคัดย่อ

ชุดตรวจ Indirect ELISA ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียม โดยการเตรียมไวรัสแอนติเจนจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมที่แยกได้จากสุกรที่สงสัยและถูกส่งมาตรวจพบการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม ที่หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม จากการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 120 ตัวอย่าง จากกลุ่มสุกรนำเข้าจากต่างประเทศ (n=32) และสุกรนางที่ผ่านการทำวัคซีนในฟาร์มเกษตรกร (n=60) เมื่อนำมาผลที่ได้จากการตรวจด้วยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมาประเมิน พบว่ามี ค่าความไวที่ 95% ค่าความจำเพาะที่ 100% ที่ค่า cut off ของค่าดูดกลืนแสงที่ 0.225 และเมื่อเพิ่มจำนวนซีรัมจากเดิมให้มากขึ้น (สุกรนำเข้าจำนวน 60 ตัว และสุกรนางจำนวน 60 ตัว) และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้าพบว่ามีค่า kappa = 1.0, $p<0.001$ แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนามีความน่าเชื่อถือในการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมและสามารถใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีได้เช่นเดียวกับชุดตรวจทางการค้าซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการพึ่งพาตนเองต่อไป

คำสำคัญ: โรคพิษสุนัขบ้าเทียม แอนติบอดี Indirect ELISA

Keywords: Aujeszky's disease, antibodies, indirect ELISA

[1] ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1] Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2] Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[3] งานชันสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[3] Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

Abstract

An indirect ELISA was developed to detect the antibodies of Aujeszky's disease (AD) in pigs. The viral antigen was isolated from AD infected pigs submitted to the Veterinary Diagnostic Unit of Veterinary Medicine Faculty, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom. Serum samples from the imported pigs (n=32) and sows (n=60) were used for detection of the antibodies by the indirect ELISA. Results revealed that, cut off of optical density at 0.225 provided 95% sensitivity and 100% specificity. This indirect ELISA was used to detect the AD antibodies in 60 imported pigs and 60 sows, the results were compared with the AD antibody results from commercially available test kit. The results of both test showed a high agreement (kappa = 1.0, $p<0.001$). The developed indirect ELISA test kit was as accurate, sensitive and specific for detection of Aujeszky's disease antibodies in swine sera as the commercial kit. This result may be useful for improving disease diagnosis using in-house test kit.

บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้าเทียมเป็นโรคติดเชื้อในสุกร เกิดจากการติดเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัส (Herpes virus) ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั้งในและต่างประเทศ ในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคสามารถทำได้ทั้งการใช้วัคซีนและการตรวจหาสุกรอมโรค โดยการหาแอนติบอดีต่อจีน gE ซึ่งจะพบได้เฉพาะในสุกรที่เคยติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมเท่านั้น เนื่องจากวัคซีนที่มีการใช้ในปัจจุบันเป็นวัคซีนชนิดที่ตัดจีน gE ออก และทำการคัดทิ้งสุกรที่มีแอนติบอดีดังกล่าวออกจากฝูง (Van Oirschot et al., 1986; Van Oirschot et al., 1988; Eloit et al., 1989) และจากการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมแบบดั้งเดิมคือ serum neutralization test (OIE manual, 1996) นั้นใช้ระยะเวลาที่นานด้วยทำให้การใช้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง และแม้อุบัติการณ์ของการเกิดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมจะมีน้อยลงกว่าในอดีต แต่จากการรวบรวมข้อมูลการเพาะแยกไวรัสจากสุกรป่วยที่ส่งมาชันสูตร ณ หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ ในช่วงปี 2544-2547 ยังพบการติดเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัสในสุกรอนุบาล และรุ่นอยู่ถึงประมาณ 3% จากสุกรป่วยที่ส่งมาผ่าชันสูตรซากและสงสัยการติดเชื้อไวรัสทั้งพีอาร์อาร์เอส หรือไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมจำนวนทั้งสิ้น 852 ราย (วิไลรัตน์ และคณะ, 2547) ซึ่งจากรายงานดังกล่าวสะท้อนเห็นว่าแม้จะมีการใช้วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียมอย่างหนาแน่นในประเทศไทย แต่ยังคงพบการแพร่ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมได้

จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบชนิด Indirect ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียม เพื่อการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศซึ่งนำไปสู่การพึ่งพาตนเองต่อไป

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียม viral antigen

ใช้เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม สายพันธุ์ 396 ซึ่งเพาะแยกได้จากทอนซิลและต่อมน้ำเหลืองของสุกรป่วยจากฟาร์มเกษตรกร โดยห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา งานชันสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม สำหรับเตรียมไวรัสแอนติเจน โดยเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Hamster lung cells (Okumura, 1968) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด IMDM ที่มี 0.5% fetal calf serum เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 ได้ดัดแปลงตามแบบวิธีการของ Takikawa et al. (1996) โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ทำการเก็บเซลล์ซึ่งเกิด cytopathic effect ระหว่าง 80-90% รวมกับน้ำเลี้ยง จากนั้นปั่นที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C และปั่นล้างอีกครั้งด้วย phosphate buffer saline pH7.4 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer ที่มี 0.3% Triton X 100 นำไป sonicate ที่ความถี่ 23 KHz 5 amplitude 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที บนน้ำแข็ง เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก เก็บส่วนใสผสมให้เป็น 50% glycerol เพื่อใช้เตรียมเป็น viral antigen เก็บที่ตู้ -80°C สำหรับ Hamster lung cells ปกติจะถูกเตรียมด้วยวิธีการเดียวกันเพื่อใช้เตรียมเป็น control antigen

การเคลือบ viral antigen และขั้นตอนการทำ ELISA

นำ viral antigen และ control antigen ที่ผ่านการทำ checkerboard titration ซึ่งสามารถเจือจาง viral antigenได้ 1:200 และเจือจางซีรัม ได้ 1:100 โดยทำการเคลือบ antigen และ control antigen ด้วย 0.05 M carbonate buffer pH 9.6 ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมของ 96 well ELISA plate (MAXISORB NUNC®) โดย viral antigen จะถูกเคลือบในหลุมของคอลัมน์ที่เป็นเลขคี่ ส่วน control antigen จะถูกเคลือบในหลุมของคอลัมน์ที่เป็นเลขคู่ บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน จากนั้นเจือจางซีรัมที่ 1:100 ด้วย sample diluent ที่มีส่วนผสมของ Hamster lung cells ปกติ ใน dilution plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ส่วน ELISA coated plate ทำการล้าง 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ด้วย PBST (PBS solution และ 0.05%Tween 20) แล้วจึง block ด้วย 5% skim milk 1 ชั่วโมง ที่ 37°C เท skim milk และล้างส่วนเกินออก แล้วเติมซีรัมที่เจือจางแล้วลงในหลุม antigen และหลุม control หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ด้วย PBST แล้วเติม 1:10,000 protein G conjugated HRP (Zymed®) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ด้วย PBST เติมน้ำยา TMB substrate (Zymed®)

100 ไมโครลิตร จนครบเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 1% sodium dodecyl sulfate solution นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader อ่านผลโดยใช้ค่าผลต่างระหว่างหลุม viral antigen และหลุม control antigen

ขั้นตอน ELISA ในส่วนของชุดตรวจทางการค้า (Bommeli DIAGNOSTIC, Switzerland) ทำตามขั้นตอนของคู่มือชุดตรวจสอบ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader อ่านผลและคำนวณตามสูตร value (%) = (OD sample - OD negative)/(OD positive-OD negative) X 100

ซีรัมในการทดสอบ

ตัวอย่างซีรัมจากสุกรที่นำเข้ามาจากประเทศเดนมาร์คจำนวน 32 ตัวอย่าง และซีรัมจากแม่สุกรนางในฟาร์มเกษตรกรซึ่งผ่านการทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม จำนวน 60 ตัวอย่าง มาทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธี Indirect ELISA กับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อหาค่า cut off ของค่าการดูดกลืนแสง ค่าความไว และความจำเพาะ จากนั้นใช้ชุดตรวจ Indirect ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรนำเข้าทั้งหมด 60 ตัว และสุกรนางทั้งหมด 60 ตัว และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้า (Bommeli DIAGNOSTIC, Switzerland) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์และหาค่าการยอมรับทางสถิติ

การคำนวณค่าทางสถิติ

คำนวณค่าหา cut off ของการดูดกลืนแสง ความไว ความจำเพาะ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดตรวจ โดยใช้โปรแกรม STaTa™ (Statistics/Data Analysis)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้ตัวอย่างซีรัมของสุกรนำเข้าจากประเทศเดนมาร์ค (n=32) และจากสุกรนางซึ่งผ่านการทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในฟาร์มเกษตรกร (n=60) พบว่าเมื่อใช้ค่า cut off ของค่าการดูดกลืนแสง 650 เท่ากับ 0.225 สามารถแยกกลุ่มที่ไม่มีแอนติบอดีออกจากกลุ่มที่มีแอนติบอดีได้อย่างชัดเจน (Figure 1) โดยพบว่ามีเพียง 3 ตัวอย่างเท่านั้นจากกลุ่มสุกรนางที่ให้ค่าผลต่างของการดูดกลืนแสงที่ 650 น้อยกว่า 0.225 จัดอยู่ในกลุ่มลบ (negative) ทำให้ได้ค่าความไวที่ 95% และเมื่อตรวจสอบในกลุ่มสุกรนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด พบว่าได้ค่าผลต่างของการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่า 0.225 ซึ่งจัดว่าเป็นลบจริง (true negative) ทำให้ได้ค่าความจำเพาะที่ 100% (ไม่ได้แสดงข้อมูลรายละเอียด) และจากการนำตัวอย่างซีรัมของกลุ่มสุกรต่างประเทศจำนวน 60 ตัวอย่างและตัวอย่างซีรัมกลุ่มสุกรนางจำนวน 60 ตัวอย่าง มาตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธี Indirect ELISA ด้วยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น เปรียบผลการตรวจกับชุดตรวจทางการค้า และหาความคล้ายคลึงกันของผลตรวจ พบว่าผลที่ได้ระหว่างชุดตรวจมีค่า kappa = 1, $p<0.01$ (Figure 2) แสดงให้เห็นว่า

ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ และมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับชุดตรวจทางการค้า สามารถใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมได้ ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการพึ่งพาตนเองต่อไป

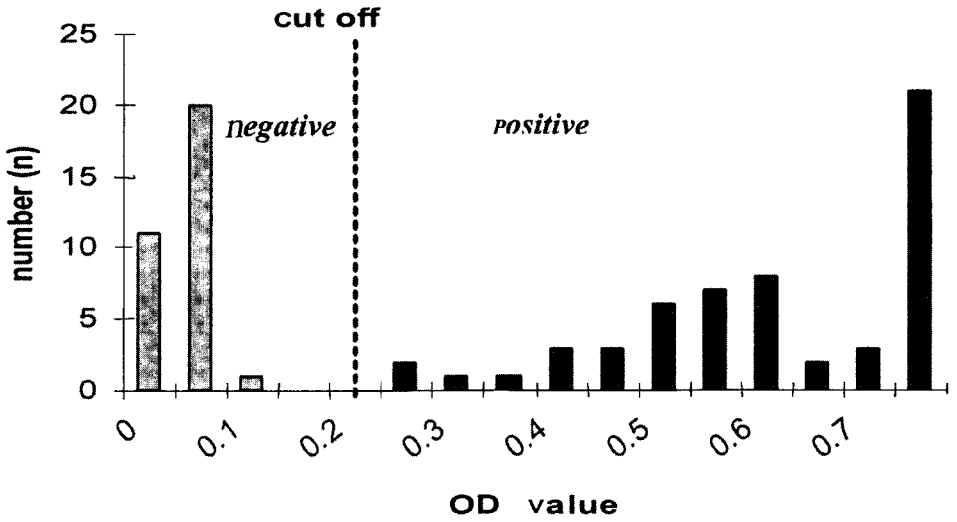

Figure 1 Comparison of OD-values between positive AD antibodies and negative AD antibodies. The cut off value of the developed AD ELISA test kit is OD = 0.225. (n=92)

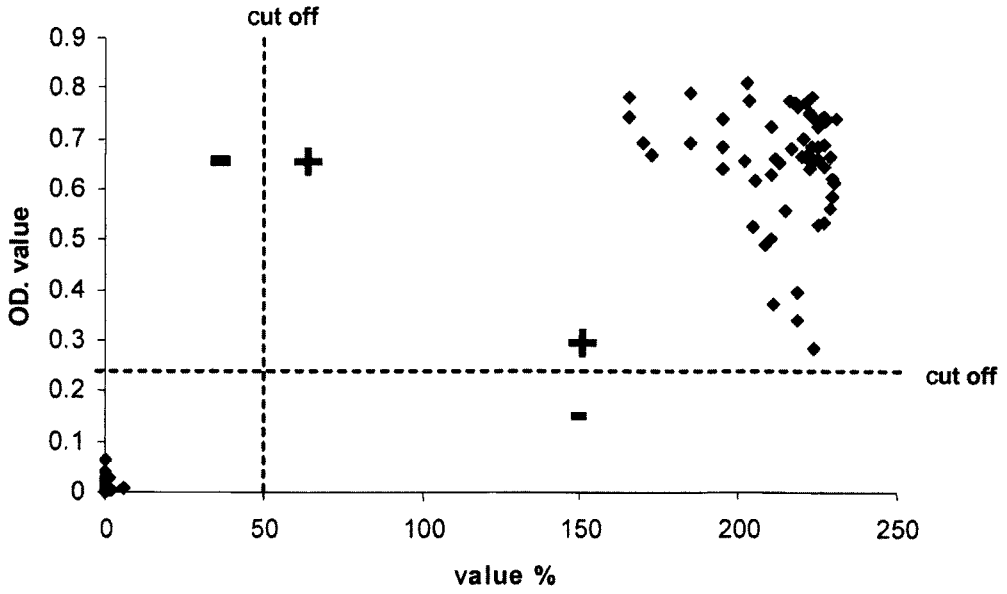

Figure 2 Comparison of OD-value distribution between the developed ELISA test kit (OD value) and CHEKIT® (value %) (Bommeli DIAGNOSTIC; Switzerland) (n=120).

อย่างไรก็ตามเพื่อให้ชุดตรวจ มีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับในการใช้งานในภาคสนามมากขึ้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อประเมินถึงประสิทธิภาพการใช้งานเปรียบเทียบวิธีการตรวจแบบ ดั้งเดิมคือ viral neutralization test ต่อไป รวมทั้งประเมินคุณภาพและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษา และคำนวณต้นทุน ค่าใช้จ่ายในการผลิตเพื่อการใช้งานจริงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อ.น.สพ. วิศณุ บุญญาวิวัฒน์ ที่กรุณาช่วยตรวจสอบและประเมินค่าทางสถิติ และบริษัทอเมริกันมาเกตติ้ง จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อซีรัมสุกรนำเข้าจากประเทศเดนมาร์ค

เอกสารอ้างอิง

วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์ สมเกียรติ พันธ์ธรรม อรวรรณ์ บุตรดี สิริลักษณ์ เจริญผล ปริวรรต พูลเพิ่ม และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2547. การแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสร่วมกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมจากสุกรป่วยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2544-2547. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่1, 200 (บทคัดย่อ).

Eloit, M., Fargeaud, D., Vannier, P. and Toma, B. 1989. Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated or infected by Aujeszky's disease virus. Vet. Rec. 128: 91-94.

Okumura, H. 1968. Spontaneous malignant transformation of hamster lung cells in tissue culture. *In*: proceedings of the International Conference of Tissue Culture in Cancer Research. Park Press Batimore. pp. 292-298.

OIE, Manual. 1996. Aujeszky's disease. *In* Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. pp. 181-191.

Takikawa, N., Kobayashi, S., Ide, S., Yamane, Y., Tanaka, Y. and Yamagishi, H. 1996. Detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Vet. Med. Sci. 58(4): 355-357.

Van Oirschot, J.T., Rziha, H.J., Moonen, P.J.L.M., Pol, J.M.A. and Van Zaane, D. 1986. Differentiation of serum antibodies from infected pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. J. Gen. Virol. 67: 1179-1182.

Van Oirschot, J.T., Houwers, D.J., Rziha, H.J. and Moonen, P.J.L.M. 1988. Developmwnt of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. J. Virol. Met. 22: 191-206.