จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การพัฒนาวิธี ELISA และการยับยั้งการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย

กันยายน 2551

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การพัฒนาวิธี ELISA และการยับยั้งการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย

กันยายน 2551

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยในครั้งนี้ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ ภาควิชาอายุรศาสตร์ ในการอำนวยความสะดวกการทำงานวิจัย เจ้าหน้าที่ หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อำนวยความสะดวกในการเช่าบริการเครื่องมือ คุณวรินตรา ยอดไชสง คุณแสงแข พงษ์ธเนศ และคุณศิริวรรณ ลักษณียกร ที่เป็นธุระในการทำเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ คุณเสาวลักษณ์ อรรคนิวาส ในการประสานงานกับ บริษัท สหฟาร์ม จำกัด และขอขอบคุณ บริษัท สหฟาร์ม จำกัด ในการอำนวยความสะดวกทางด้านห้องปฏิบัติการ ตลอดจนทุกๆ ท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือจนทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ เป็นโรคติดเชื้อไวรัสในไก่ ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสชนิดนี้จากซีรัมไก่มีความสำคัญ และถือเป็นการปฏิบัติงานปรกติของนายสัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์มสัตว์ปีก เพื่อจุดประสงค์ในการตรวจติดตามระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่ถ่ายทอดมาจากแม่ ว่าอยู่ในระดับที่สามารถป้องกันโรคในลูกไก่ได้หรือไม่ และยังเป็นการบอกช่วงเวลาที่เหมาะสมในการจัดทำโปรแกรมวัคซีน ปัจจุบัน ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ นิยมใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปเชิงพาณิชย์จากต่างประเทศ ดังนั้น งานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาชุดทดสอบ ELISA โดยการเตรียมเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่บริสุทธิ์ โดยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น มีข้อดีคือ การใช้แอนติเจนสำหรับเคลือบเพลตชนิดเดียวกับเชื้อไวรัสที่ใช้ทำวัคซีนในฟาร์ม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับชุดทดสอบสำเร็จรูปเชิงพาณิชย์ โดยมีความจำเพาะที่ดี สามารถให้ผลการทดสอบซ้ำได้ และมีต้นทุนการทดสอบที่ถูกกว่าเดิม ช่วยลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ นอกจากนี้ ผู้วิจัย ยังสามารถพัฒนาเทคนิค Haemagglutination inhibition สำหรับการทดสอบระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อได้เช่นกัน โดยวิธีการทดสอบนี้มีประโยชน์คือสามารถนำไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่มีการระบาดในพื้นที่ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Infectious bronchitis (IB), caused heavy economic losses in poultry industry, is an infectious disease of poultry. Determination of antibody in serum against Infectious bronchitis virus (IBV) is important and be the routinely work for the poultry veterinary practitioner. The aim of maternal derived antibody monitoring against IBV is to know the level of protective maternal antibody in chicks and to suggest the appropriate time for arranging a vaccination program. Normally, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) imported from abroad, was used for IBV antibody detection. The objective of this work is to develop the ELISA test kit by using the purified IBV virus. The advantage of the developed test kit is using the antigen for coating plate in the same strain of virus that vaccination in farms. The developed test kits provided the result of antibody titer accord to the commercial test kit. Also, the developed test kit showed the good specificity, reproducibility and lower cost comparing to the commercial test kit and may reduce the imported test kit in the near future. Furthermore, the researcher also developed the Haemagglutination inhibition technique for testing antibodies against IBV that frequently outbreaks in Thailand.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
สารบัญแผนภูมิ	8
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	10
อุปกรณ์ และวิธีการ	15
ผลการทดลอง	20
วิจารณ์ และสรุปผล	35
บรรณานุกรม	38
ภาคผนวก	41
ภาคผนวก ก. เทคนิคต่างๆ สำหรับการบำบัดไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ	41
ภาคผนวก ข. วิธีการทดสอบ	44
ภาคผนวก ค. วิธีการเตรียมสารเคมี	49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	อัตราการตายของตัวอ่อนไข่ฟักภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสจากวัคซีนสายพันธุ์ต่างๆ	20
ตารางที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง (OD) จากการทดสอบด้วยชุด Bio-Rad DC Protein Assay	23
ตารางที่ 3	การเปรียบเทียบค่า OD ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ระหว่างการเคลือบเพลทด้วยโปรตีนของไวรัส IB สายพันธุ์ H120 ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	25
ตารางที่ 4	ค่า OD ที่ได้จากการทดสอบ ELISA จำนวน 3 ครั้ง	26
ตารางที่ 5	แสดงค่า OD จากการทดสอบ ELISA ต่อเชื้อต่างๆ และตัวอย่างควบคุมผล	27
ตารางที่ 6	ค่า OD จากการทดสอบ IBV ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับซีรัมลูกไก่ 10 ตัวที่อายุต่างๆ	28
ตารางที่ 7	ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบด้วยชุด ELISA ที่พัฒนาขึ้นเองและชุดทดสอบเชิงการค้า	29
ตารางที่ 8	ผล HI titer จากการทดสอบ HI ด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ต่างๆ	32
ตารางที่ 9	ค่าเฉลี่ย HI จากการทดสอบ HI กับซีรัมไก่ 4 ฝูง	33
ตารางที่ 10	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย OD จากการทดสอบ ELISA และค่าเฉลี่ย HI titer	34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
แผนภูมิที่ 1	แผนภูมิมาตรฐานสำหรับการคำนวณความเข้มข้นโปรตีน	24
แผนภูมิที่ 2	การเปรียบเทียบความแตกต่างค่า OD ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ระหว่างการเคลือบเพลทด้วยโปรตีนของไวรัส IB สายพันธุ์ H120 ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับซีรัมเจือจางระดับ 1: 50, 1: 100, 1: 200 และ 1: 400	25
แผนภูมิที่ 3	แสดงค่า OD ELISA ชุดทดสอบที่เคลือบเพลท ELISA ด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	26
แผนภูมิที่ 4	แสดงความแตกต่างของค่า OD จากการทดสอบ IBV ELISA ที่พัฒนาขึ้นต่อเชื้อต่างๆ และตัวอย่างควบคุมผลลบ	27
แผนภูมิที่ 5	แสดงการลดลงของค่า OD จากการทดสอบ IBV ELISA กับลูกไก่ซึ่งอายุเพิ่มขึ้น	28
แผนภูมิที่ 6	ค่า OD ELISA ระหว่างการทดสอบด้วยชุดทดสอบ BioChek และชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเองกับซีรัมที่ระดับความเจือจาง 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1; 400 และ 1: 800	29
แผนภูมิที่ 7	แสดงค่า OD ELISA ชุดทดสอบที่เคลือบเพลท ELISA ด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับค่า OD จากชุดทดสอบทางการค้า	30
แผนภูมิที่ 8	แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย OD จากการทดสอบ ELISA และค่าเฉลี่ย HI titer	33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างของไวรัสกลุ่มโคโรนาไวรัส	11
ภาพที่ 2	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของตัวอ่อน ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัส สังเกตลักษณะแคระแกรน และการม้วนตัวของตัวอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนด้านขวามือ	21
ภาพที่ 3	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงอวัยวะภายในที่สำคัญของตัวอ่อน ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัส	21
ภาพที่ 4	ผลการยืนยันการติดเชื้อ IBV ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อนำผลผลิตมาแยกใน 1% agarose gel electrophoresis	22
ภาพที่ 5	ผลการทดสอบ HA จากแอนติเจนที่ผ่านการบำบัด ด้วยเอนไซม์ phospholipase C และ neuraminidase	23
ภาพที่ 6	ผลการเตรียมแอนติเจนความเข้มข้น 4 HA unit ต่อ 25 ไมโครลิตร	30
ภาพที่ 7	ผลทดสอบ HI จากซีรัมไก่	31
ภาพที่ 8	ผลการเตรียมแอนติเจนความเข้มข้น 4 HA unit ต่อ 25 ไมโครลิตร	32
ภาพที่ 9	ผลทดสอบ HI จากซีรัมไก่ (แถว A-D ซีรัมไก่ฝูงที่ 4, แถว E, F ซีรัมไก่ที่ใช้เป็น Positive control ในวิธีทดสอบ ELISA, แถว G ซีรัมที่ใช้เป็น Negative control ในวิธีทดสอบ ELISA)	33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

อุตสาหกรรมการผลิตไก่ เป็นอุตสาหกรรมที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นจำนวนมากในแต่ละปี จากการส่งออกเนื้อไก่ และผลิตภัณฑ์ สามารถนำเงินตราเข้าสู่ประเทศได้มูลค่าหลายหมื่นล้านบาท เมื่อปี พ.ศ. 2546 ประเทศไทยสามารถส่งออกทั้งเนื้อไก่สด และเนื้อไก่แปรรูปสูงถึง 499,384 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 40,690 ล้านบาท ประเทศไทยยังเคยเป็นผู้ผลิตไก่เนื้อมากเป็นอันดับ 7 ของโลก เป็นผู้ส่งออกเนื้อไก่ และผลิตภัณฑ์รายใหญ่เป็นอันดับ 4 ของโลก รองจากสหรัฐอเมริกา บราซิล และสหภาพยุโรป

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อเป็นโรคตามระบบทางเดินหายใจ ที่สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ทั่วโลกทั้งไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสนี้จากซีรัมไก่ มีความสำคัญ และถือเป็นการปฏิบัติงานปกติของสัตวแพทย์ผู้ประกอบการฟาร์มสัตว์ปีก เพื่อจุดประสงค์ในการตรวจติดตามระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่ถ่ายทอดมาจากแม่ ว่าอยู่ในระดับที่สามารถป้องกันโรคในลูกไก่ได้หรือไม่ และยังเป็นการบอกช่วงเวลาที่เหมาะสมในการจัดทำโปรแกรมวัคซีน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาในการตรวจสอบวิธีการทำวัคซีนว่ามีประสิทธิภาพดีพอในการป้องกันโรคหรือไม่ นอกจากวัตถุประสงค์สำหรับการตรวจติดตามโรค ระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อยังสามารถใช้ในการบอกสภาวะการติดเชื้อของไก่ต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อได้ด้วย ปัจจุบันวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่นิยมใช้คือ วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกและไม่ยุ่งยาก และที่สำคัญวิธีการนี้สามารถบอกระดับของแอนติบอดีได้ดี ซึ่งสามารถใช้ในการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีในช่วงอายุและกับฝูงไก่ต่างๆได้ ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบัน เป็นชุดทดสอบที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นการพัฒนาชุดทดสอบต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อขึ้นใช้เองภายในประเทศนับว่ามีความสำคัญ ในการลดค่าใช้จ่าย สร้างองค์ความรู้ภายใน ประเทศ และยังได้ชุดทดสอบ ELISA ที่ใช้ทดสอบกับไวรัสที่แพร่ระบาดในพื้นที่ประเทศไทยและในภูมิภาค ซึ่งอาจเป็นที่นิยมใช้ภายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในอนาคต การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาและพัฒนาเทคนิคในการเตรียมชุดทดสอบ ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบในไก่ ซึ่งอาจช่วยลดการนำเข้าชุดทดสอบสำเร็จรูปในอนาคต และ เพื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบ ELISA ที่เตรียมขึ้นกับวิธี Haemagglutination Inhibition (HI) และชุดทดสอบ ELISA ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์

วัตถุประสงค์

1. การพัฒนาเทคนิคในการเตรียมชุดทดสอบ ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบในฟาร์มไก่

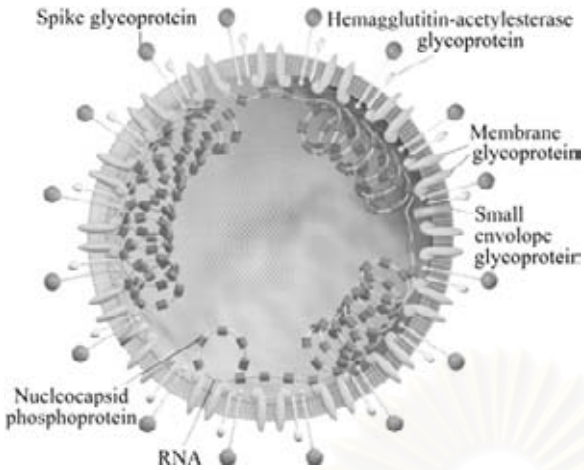
2. การพัฒนาเทคนิค HI เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบในฟาร์มไก่

การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (infectious bronchitis; IB) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสในไก่ที่มีการระบาดอย่างรวดเร็ว และก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก โรคนี้เป็นโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (Parsons et al., 1992) โดยเฉพาะไก่อายุน้อยมีอาการป่วยรุนแรง และอัตราตายสูงกว่าไก่อายุมาก (Animas et al., 1994) ไก่เป็นสัตว์เพียงชนิดเดียวที่สามารถติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ ไก่ไข่จะมีอาการทางระบบหายใจน้อยกว่าไก่เล็ก แต่จะสร้างความเสียหายต่อผลผลิตไข่ไก่ที่ลดลง และคุณภาพของฟองไข่ไก่ นอกจากการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจแล้ว ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อหลายชนิด ก่อให้เกิดรอยโรคที่ไต (nephropathogenic infectious bronchitis) พบลักษณะไตอักเสบ (nephritis) ขยายใหญ่ สีซีด และมีการสะสมของยูเรต (urate) ในท่อไต พบได้ทั้งไก่เนื้อ ไก่ไข่และไก่พ่อแม่พันธุ์ (Ziegler et al., 2002) โรคนี้มีการระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และอีกหลายประเทศทั่วโลก (Lukert, 1980) รวมทั้งในประเทศไทย (Pohuang et al., 2007)

ไวรัสวิทยา

ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (infectious bronchitis virus, IBV) จัดอยู่ในสกุล (genus) โคโรนาไวรัส (*Coronavirus*) วงศ์ (family) โคโรนาวิริดี (*Coronaviridae*) ในอันดับ (order) นิโดไวรัลเลส (Nidovirales) จีโนมไม่เป็นท่อน เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ประจุบวก (non segmented, positive sense and single stranded RNA) (OIE, 2004) ขนาดประมาณ 28 กิโลเบส มีเปลือกหุ้ม (enveloped) ผิวรอบนอกประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูปร่างคล้ายกระบอง (club-shaped proteins) ไวรัสประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิดคือ นิวคลิโอแคปสิดโปรตีน (nucleocapsid protein, N), เมมเบรนไกลโคโปรตีน (membrane glycoprotein, M) และ สไปค์ไกลโคโปรตีน (spike glycoprotein, S) พบรายงานการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาช่วงทศวรรษ 1930 ซึ่งเป็นโรคระบบหายใจแบบเฉียบพลันในลูกไก่



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไวรัสกลุ่มโคโรนาไวรัส (Zhong and Wu, 2003)

การติดเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อ สามารถวินิจฉัยได้โดยการตรวจสอบไวรัสโดยตรง หรือการตอบสนองของแอนติบอดีเฉพาะ โดยวิธีที่นิยมใช้สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อแบบเฉียบพลัน ได้แก่ การแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation: VI), immunofluorescence assay (IFA), immunoperoxidase assay (IPA) และ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ขณะเดียวกัน การติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา โดยการใช้ผลเลือดจากการเจาะเลือด 2 ครั้ง (paired serum test) เพื่อตรวจสอบการตอบสนองของ IBV-specific immunoglobulin M วิธีการทดสอบที่นิยมใช้ ได้แก่ haemagglutination inhibition (HI) test, agar gel precipitation test (AGP) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ส่วนเทคนิค virus neutralization test (VNT) ไม่นิยมใช้ เนื่องจากมีต้นทุนสูง และมีความยุ่งยาก De Wit (2000) จำแนกเทคนิคสำหรับการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรค IBV เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. การทดสอบที่มีความเฉพาะต่อกลุ่ม (group-specific tests) การทดสอบประเภทนี้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของแอนติบอดีที่เกิดจากไวรัสคนละสายพันธุ์ได้ แอนติเจนที่ใช้นิยมใช้เป็นสายพันธุ์แมสซาชูเซต (Massachusetts) ซึ่งสามารถตรวจสอบแอนติบอดีต่อไวรัสซีโรไทป์อื่นๆได้

1.) AGP มีความเฉพาะสูง แต่การอ่านผลโดยอาศัยแนว precipitation lines สำหรับไวรัส IB ยากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น ไวรัสกัมโบโรหรือไวรัสนิวคาสเซิล แอนติเจนมักเตรียมจากเยื่อ chorioallantoic membranes ของตัวอ่อนลูกไก่ที่ติดเชื้อ (OIE, 2004)

2.) Group-specific ELISA ในรูปแบบ indirect ELISA ปัจจุบัน มีชุดทดสอบสำเร็จรูปเชิงพาณิชย์จำหน่าย ซึ่งนิยมใช้สำหรับการตรวจติดตามการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายหลังการให้วัคซีน (OIE, 2004)

2. การทดสอบที่มีความเฉพาะต่อซีโรไทป์ (serotype-specific tests) ได้แก่ VN, HI และ serotype-specific ELISA

1.) VN สามารถตรวจสอบแอนติบอดีได้โดยอาศัยไข่ฟัก เซลล์เพาะเลี้ยง (Tissue origin cultures; TOCs)

2.) HI แอนติบอดีจากการทดสอบด้วยวิธี HI เกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนชนิด S1 spike (Ignjatovic and Galli, 1994) HI เป็นเทคนิคที่รวดเร็ว ไม่แพง สะดวก และยังสามารถจำแนกการติดเชื้อจาก antigenic variant IBV ได้อีกด้วย (OIE, 2004)

3.) Serotype-specific ELISA ในรูปแบบ blocking ELISA

เทคนิค VN มีข้อเสียคือ ราคาแพง และไม่สะดวก และ AGID มีไวในการทดสอบต่ำ ดังนั้นองค์กรโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) จึงแนะนำให้ใช้เทคนิค HI และ ELISA สำหรับการตรวจติดตามระดับแอนติบอดี (OIE, 2004) ปัจจุบัน ฟาร์มเลี้ยงไก่ส่วนใหญ่นิยมให้วัคซีนป้องกันโรค IB ทั้งวัคซีนเชื้อเป็นและวัคซีนเชื้อตาย ทำให้ระดับภูมิคุ้มกันค่อนข้างสูง โดยเฉพาะในไก่ระยะไข่ ซึ่งหากไก่ระยะให้ไข่นี้ติดเชื้อไวรัสจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของเปลือกไข่และส่วนประกอบภายในฟองไข่เท่านั้น โดยมีผลกระทบน้อยมากต่อการให้ผลผลิตไข่ ดังนั้น การตรวจติดตามโรค IB จึงมีความจำเป็นต่อการติดตามสถานการณ์โรค (Saravanan et al., 2006) นอกจากนั้น การจำแนกสายพันธุ์ของไวรัส IB ยังเป็นประโยชน์ต่อการวางมาตรการควบคุมโรค การวิจัย การวางแผนทางระบาดวิทยา และวิวัฒนาการของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ โดยทั่วไป ระบบการจำแนกไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. Functional tests เป็นการใช้คุณสมบัติของไวรัสในการจำแนก ได้แก่ immunotypes หรือ protectotypes และการจำแนกตามชนิดของแอนติเจนคือ serotypes และ epitotypes

2. Non-functional tests เป็นการใช้จีโนมของไวรัสในการจำแนก

การพิจารณาเลือกใช้ระบบการจำแนกไวรัสชนิดใด ขึ้นกับวัตถุประสงค์ เพื่อใช้สำหรับการเลือกโปรแกรมวัคซีนที่เหมาะสม หรือการศึกษาทางระบาดวิทยา ความพร้อมของเครื่องมือ และอุปกรณ์ ประสบการณ์ และต้นทุนการทดสอบ (De Wit, 2000) เทคนิค HI test เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสได้ โดยใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยาก และราคาไม่แพง

การทดสอบ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test

หลักการพื้นฐานของเทคนิค ELISA คือการใช้เอนไซม์สำหรับการตรวจสอบการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เอนไซม์จะเปลี่ยนสับสเตรต (chromagen) ที่ไม่มีสีให้เปลี่ยนสี ซึ่งบ่งชี้ถึงการปรากฏของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เทคนิค ELISA

สามารถใช้สำหรับการตรวจหาการปรากฏของแอนติเจน หรือแอนติบอดีในตัวอย่างก็ได้ (Ma et al., 2006)

ห้องปฏิบัติการที่มีความจำเป็นต้องตรวจคัดกรองตัวอย่างซีรัมจำนวนมาก วิธี ELISA เป็นเทคนิคที่ช่วยในการทำงานได้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรณีที่ตัวอย่างส่วนใหญ่ให้ผลเป็นลบ เช่น การทดสอบเพื่อยืนยัน และรักษาสถานภาพปลอดโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Adair et al., 1990) การทดสอบด้วยวิธี ELISA เริ่มมีการพัฒนามาตั้งแต่ช่วงทศวรรษที่ 1960 แต่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 หลังจากที่ Engvall และ Perlman พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจปริมาณ IgG สำหรับใช้ในการวิจัยทางการแพทย์ (Thayer, 1997) ปัจจุบันห้องปฏิบัติการวินิจฉัยโรคที่มีกิจกรรมการสำรวจโรคทางซีรัมวิทยา มักใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่นำเข้าจากต่างประเทศ สำหรับการตรวจสอบแอนติบอดีต่อนิวคลีโอโปรตีนโดยอาศัยเทคนิค Indirect ELISA (Suarez and Cherry, 2000)

การทดสอบ Haemagglutination inhibition (HI) test

สมาชิกของไวรัสในวงศ์ Coronaviridae มีความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงแตกต่างกันมาก (Ruano et al., 2000) แม้ว่า ไวรัสใน group II จะมีความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ดี แต่ group I หรือ III (ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ) ไม่มีคุณสมบัตินี้ มีงานวิจัยมากมายก่อนหน้านี้ พยายามศึกษาไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง โดยมีรายงานการบำบัด (treat) ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงครั้งแรก ด้วยเอนไซม์ทริปซินกับไวรัสสายพันธุ์ Massachusetts แต่ไม่สามารถนำมาใช้ยับยั้งปฏิกิริยาด้วยซีรัมที่มีภูมิคุ้มกันได้ (Corbo et al., 1959) ต่อมามีรายงานว่า การเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี sucrose gradient สามารถเหนี่ยวนำไวรัสสายพันธุ์ Connecticut ให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ (Bingham et al., 1975) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการใช้เอนไซม์ phospholipase C ซึ่งมีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์อีกด้วย (King, 1984) อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาที่ได้ก็ไม่สามารถยับยั้งด้วยซีรัมที่มีความเฉพาะต่อไวรัส เอนไซม์นี้ เมื่อนำมาบำบัดไวรัสแล้ว ก็ให้ผลเหนี่ยวนำปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ไม่แน่นอน เชื่อว่าน่าจะเป็นผลมาจากการกำจัดเอนไซม์อื่นๆ ในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ phospholipase C ต่อมาจึงมีการใช้เอนไซม์นิวรามินิเดส เพื่อกำจัดกรดกรดไซลิกจากไกลโคโปรตีนชนิด spike บริเวณเปลือกของไวรัส และเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (Ruano et al., 2000) โดยไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจะใช้ α 2, 3-linked N-acetylneuraminic acid เป็น receptor determinant สำหรับการจับกับเม็ดเลือดแดง เอนไซม์นิวรามินิเดสจะมีความสามารถในการจับกับ α2, 3-linked N-acetylneuraminic acid สูง (high affinity) และกำจัดกรดไซลิกบริเวณผิวของไวรัส เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาจับ

กลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง เพื่อให้จับกับกรดไซลิกที่ผิวเม็ดเลือดแดงได้ งานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้ไวรัสที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมไวรัสให้เข้มข้นด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ อย่างไรก็ตาม King (1984) พบว่า การทำให้ไวรัสตกตะกอนด้วยสารโพลีเอธิลลีนไกลคอล (polyethylene glycol precipitation) เป็นวิธีทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้เตรียมไวรัสได้ นอกจากนี้ ขั้นตอนการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ก็มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณ HA titer ที่ได้เช่นกัน การใช้เบต้าโปรปริโอแลกโตนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อ HA titer แต่ในทางตรงกันข้าม การใช้ฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์กลับมีผลต่อการลดลงของ HA titer อย่างมาก

ปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง คือ การทดสอบ neutralization test โดยอาศัยการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง หลักการของวิธีการนี้เป็นการเจือจางแอนติบอดีเฉพาะในซีรัมของสัตว์ปีกที่สามารถยับยั้งการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (Cross, 2002) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยโปรตีน S1 spike โดยทั่วไปการทดสอบ HI สามารถตรวจแอนติบอดีได้ครั้งแรกระหว่าง 1-2 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ (De Wit, 2000) การทดสอบ HI เป็นที่นิยมเพิ่มขึ้น เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วและง่าย นอกจากนี้ ยังสามารถนำมาใช้สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางสมบัติของแอนติเจนได้ด้วย เนื่องจาก ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ มีความหลากหลายของสายพันธุ์ (Lashgari and Newman, 1983) Holmes และ Finney (1985) พบว่า ภายหลังการให้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ สายพันธุ์ H120 แล้วไม่สามารถตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ อาจเป็นผลมาจากการใช้แอนติเจนชนิด heterologous antigen สำหรับการทดสอบ HI แต่หากใช้แอนติเจนชนิด homologous antigen ก็จะสามารถตรวจสอบแอนติบอดีได้ดี และแม่นยำกว่า แม้จะเป็นการให้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบชนิดเชื้อเป็นครั้งแรกเท่านั้น การเก็บตัวอย่างสำหรับการทดสอบ HI สามารถทำให้ง่ายขึ้นได้โดยใช้กระดาษกรองสำหรับเก็บเลือด (Saravanan et al., 2006) ชนิดของแอนติเจนที่นิยมนำมาเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบ HI ตามลำดับ (King, 1988)

1. ซีโรไทป์ Massachusetts เช่น Mass 41, H52
2. ซีโรไทป์ Connecticut เช่น Conn 46
3. ซีโรไทป์ Arkansas เช่น Ark 99
4. ซีโรไทป์ JMK แต่ King (1984) พบว่า น้ำไข่ขาวที่ได้จากเชื้อไวรัสซีโรไทป์ JMK จะมี infectivity titers ที่ต่ำกว่า และให้ปริมาณ HA titers ที่น้อยกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

อุปกรณ์ และวิธีการ

ในการวิจัยครั้งนี้ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ได้แก่

1. การศึกษาคุณสมบัติของไวรัส สำหรับการเตรียมแอนติเจน
2. การพัฒนาวิธีการทดสอบ ELISA
3. การพัฒนาวิธีการทดสอบ HI

การศึกษาคุณสมบัติของไวรัส สำหรับการเตรียมแอนติเจน

1. การเตรียมไวรัส

1.) เตรียมไวรัสซีโรไทป์ 4/91 สายพันธ์ 4/91 จากวัคซีน IB4/91 (Nobilis®, Intervet international B.V., Boxmeer-Holland) ซีโรไทป์ Massachusetts สายพันธุ์ H120 จากวัคซีน IB H120 (Nobilis®, Intervet international B.V., Boxmeer-Holland), ซีโรไทป์ Massachusetts สายพันธุ์ MA5 จากวัคซีน IB MA5 (Nobilis®, Intervet international B.V., Boxmeer-Holland), สายพันธุ์ Nephropathogenic จากวัคซีน Gallivac IBn (Merial, USA.)

2.) ละลายวัคซีน แล้วฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ผ่านทาง Allantoic cavity

3.) เก็บไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อไวรัสแล้วในตู้ฟักไข่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.) ตรวจสอบอัตราการตายของตัวอ่อนไข่ไก่ฟัก ภายหลังการฉีดเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

5.) เมื่อครบเวลา 120 ชั่วโมง เก็บไข่ฟักในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

6.) นำไข่ไก่ฟักออกจากตู้เย็น และเก็บ Allantoic fluid (AF) จากไข่ไก่ฟัก จากนั้นตรวจสอบตัวอ่อนไข่ไก่ฟักที่ได้จากการฉีดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับตัวอ่อนไข่ไก่ฟักปรกติที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อ

2. การยืนยันการติดเชื้อไวรัส IBV ด้วยวิธี RT-PCR

1.) นำ AF ของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ที่เตรียมจาก ข้อ 1. มาแยก RNA โดยใช้ชุดสกัด Viral RNA Extraction (Real Genomic™, Real Biotech Corporation, Taiwan)

2.) นำสารละลาย RNA มาทำปฏิกิริยา One Step RT-PCR กับ Primer ที่เฉพาะต่อ IBV (Hyuk Moo Kwon et al., 1993) โดยครอบคลุม ยีน S1 glycoprotein ทั้งหมด สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา ได้แก่ 1.5 mM $MgSo_4$, 1X buffer, 0.2 mM dNTP mixed, forward และ reverse primer อย่างละ 1 μM คือ Primer S1OLIGO3’ 5’CATAACTAACATAAGGGCAA3’ และ

S1OLIGO5' 5'TGAAAACTGAACAAAAGA CA3', 4 unit AMV reverse transcriptase, 4 unit Tfl taq polymerase, 3 µl RNA solution

3.) ปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที 1 รอบ และอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที 1 รอบ ปฏิกิริยา PCR มีขั้นตอนดังนี้ ขั้น denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ขั้น annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที ขั้น extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที 45 วินาที จำนวน 25 รอบ และขั้น final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที 1 รอบ

4.) นำผลผลิตจากปฏิกิริยา one step RT-PCR 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาแยกขนาดผลผลิตด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ต เวลา 40 นาที จากนั้นนำมาย้อมด้วย ethidium bromide 0.5 µg/ml ซึ่งผลผลิตที่ได้จาก IBV มีขนาด 1,720 คู่เบส (bp)

การพัฒนาวิธีการทดสอบ ELISA

1. การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

1.) เตรียมและตกตะกอนไวรัส IB สายพันธุ์ H120 ที่ผ่านการยืนยันว่าได้รับการติดเชื้อ IBV ด้วยวิธี RT-PCR โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็วรอบ 31,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.) ละลายไวรัสใน HEPES buffer pH 6.5 แล้วทำการปั่นแยกไวรัสให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการ sucrose gradient (Anonymous, 2005a) ที่ความเข้มข้น 50, 45, 40, 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยเครื่อง ultracentrifuge แบบ swing rotor ที่ความเร็วรอบ 25,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นใช้ pipette ดึงส่วนทึบแสงแยกใส่ใน 1.5 micro centrifuge tube และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การหาความเข้มข้นของโปรตีน

1.) นำสารละลายแอนติเจนบริสุทธิ์ ที่ได้จากการปั่นไวรัสให้บริสุทธิ์ มาวัดความเข้มข้นของโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 1.5, 1.0, 0.8, 0.6 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยชุดทดสอบ Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ด้วยความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

2.) นำค่า O.D. ที่ได้จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแอนติเจนบริสุทธิ์ และโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟ

3.) คำนวณหาความเข้มข้นของแอนติเจนบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยแทนค่าในสมการเส้นตรงแบบกำหนดความชัน และระยะตัด สมการ $y = mx + c$

กำหนดให้ m = ความชันซึ่งเป็นค่าคงที่ (0.1901)
C = ค่าคงตัวซึ่งเท่ากับระยะที่กราฟตัดแกน y (0.0563)
y = ค่า O.D. ที่อ่านได้
x = ความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการหาค่า

3. การหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมเพลท ELISA

ทำการเคลือบเพลท ELISA ด้วย แอนติเจนบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำมาทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกต่อเชื้อไวรัส IBV ที่ผลิตเชิงการค้า (Biocheck, Holland) ความเจือจางระดับ 1: 50, 1: 100, 1: 200 และ 1: 400 ด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของซีรัมที่เจือจางในระดับต่างๆ และเลือกใช้เป็นความเข้มข้นในการทดลองต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการตรวจซ้ำได้ (reproducibility test)

เคลือบเพลท ELISA ด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ตามความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งเลือกจากข้อ 3. ทดสอบกับตัวอย่างซีรัมที่เจือจางในระดับต่างๆ ดังนี้ 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400 และ 1: 800 อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบความเฉพาะของวิธีการทดสอบ (specificity test)

เคลือบเพลท ELISA ด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3. นำมาทดสอบกับตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกที่ผลิตเชิงการค้า (Synbiotics Corporation, San Dieco, USA) ซึ่งเป็นซีรัมที่ไม่ได้ระบุสายพันธุ์ของไวรัส ดังนี้ Newcastle Disease Virus (NDV), Avian Influenza Virus (AIV), Infectious Bronchitis Virus (IBV), Infectious Bursal Disease Virus (IBD), Reovirus (REO) และตัวอย่างควบคุมผลลบ (normal control serum, Synbiotics Corporation, San Dieco, USA) อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

6. การทดสอบซีรัมจากลูกไก่ที่มีระดับแอนติบอดีจากแม่ที่ลดลง

นำลูกไก่เนื้อที่มาจากแม่ไก่ซึ่งได้ทำวัคซีน IB H120 อายุ 1 วัน ทำการเจาะเลือด และนำมาทดสอบ ELISA และเก็บข้อมูล จากนั้นทำการเจาะเลือดมาทดสอบ ELISA อีกครั้งเมื่อครบอายุ 5, 7, 9, 14 และ 21วัน และทำการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันไก่เนื้อที่อายุต่างๆ

7. การเปรียบเทียบชุดทดสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบทางการค้า

ทดสอบ ELISA ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเองกับซีรัมต่อเชื้อไวรัส IB จำนวน 10 ตัวอย่าง และใช้ซีรัมชุดเดียวกันทดสอบ ELISA กับชุดทดสอบเชิงการค้า แล้วทำการเปรียบเทียบค่า O.D. ที่ได้จากการทดสอบทั้งสองครั้ง

8. การทดสอบซีรัมจากตัวอย่างในฟาร์ม

การทดลองเคลือบเพลท ELISA ด้วย purified antigen 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับตัวอย่างซีรัมไก่ 4 ฝูง ฝูงละ 20 ตัวอย่าง รวมซีรัมจำนวน 80 ตัวอย่าง จากฟาร์มไก่พันธุ์สุขภาพปรกติ มีประวัติการให้วัคซีนเชื้อเป็น และเชื้อตายต่อเชื้อไวรัส IBV หลายครั้งจนมีระดับแอนติบอดีสูง เปรียบเทียบกับชุดทดสอบทางการค้า อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

การพัฒนาวิธี HI

1. การเตรียมไวรัสเข้มข้น

1.) นำไวรัส สายพันธ์ 4/91, H120, MA5 และสายพันธุ์ Nephro pathogenic ที่ผ่านการยืนยันว่าได้รับการติดเชื้อ IBV ด้วยวิธี RT-PCR มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็วรอบ 31,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.) ละลายตะกอนไวรัสด้วย HEPES buffer pH 6.5 อัตราส่วน สารละลายไวรัส 100 มิลลิลิตร ต่อ buffer 1 มิลลิลิตร

3.) นำสารละลายไวรัส จาก ข้อ 2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บแอนติเจนเฉพาะส่วนใสไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการบำบัดต่อไป

2. การคัดเลือกเอนไซม์เพื่อใช้ในการบำบัดแอนติเจน

1.) นำแอนติเจนแต่ละสายพันธุ์ที่เก็บไว้อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส มาละลาย แล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วน (ส่วนที่ 1 เพื่อบำบัดด้วย neuraminidase และส่วนที่ 2 บำบัดด้วย phospholipase c type I)

2.) เติมเอนไซม์ neuraminidase (Sigma-aldrich, Inc., St. Louis, USA) ความเข้มข้น 2.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ลงในแอนติเจนที่เตรียมไว้ส่วนที่ 1 ตามปริมาตรแอนติเจน 1 ส่วน ต่อเอนไซม์ 1 ส่วน แล้วผสมให้เข้ากัน

3.) เติมเอนไซม์ phospholipase c type I ความเข้มข้น 2.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ลงในแอนติเจนส่วนที่ 2 ตามปริมาตรแอนติเจน 1 ส่วน ต่อเอนไซม์ 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน

4.) นำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาทุก 30 นาที นำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จนครบ 2 ชั่วโมง

5.) เก็บแอนติเจนที่บำบัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดแล้ว ไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียสข้ามคืน ก่อนนำมาทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดง

6.) นำแอนติเจนที่ผ่านการบำบัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (HA Test)

7.) เปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (HA) และเลือกเอนไซม์ที่ทำให้เกิด HA titer สูงที่สุด

3. การคัดเลือกแอนติเจนที่ใช้ในการทดลอง

1.) นำแอนติเจนแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านการบำบัดด้วยเอนไซม์ ไปทดสอบ HA

2.) ปรับความเข้มข้นของแอนติเจนให้ได้ 4 HA unit ต่อ 25 ไมโครลิตร แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (HI) กับซีรัมควบคุมบวกต่อ IBV (Biocheck, Holland) จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งไม่ได้ระบุเสตรนของไวรัส

3.) เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนต่อซีรัมที่ใช้ในการทดสอบ

4.) เลือกใช้แอนติเจนที่สามารถถูกยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุด เพื่อใช้ในการทดสอบ ครั้งต่อไป

4. การทดสอบปฏิกิริยา HI กับตัวอย่างซีรัมในฟาร์ม

1.) เตรียมและทำการตกตะกอนไวรัสสายพันธุ์ที่เหมาะสม จากนั้นทำการบำบัดแอนติเจนด้วยเอนไซม์

2.) ทำการทดสอบ HA และปรับความเข้มข้นของแอนติเจนให้ได้ 4 HA unit ต่อ 25 ไมโครลิตร

3.) นำแอนติเจนความเข้มข้น 4 HA unit ต่อ 25 ไมโครลิตร ทำการทดสอบ HI กับตัวอย่างซีรัมไก่ 4 ฝูง ฝูงละ 20 ตัวอย่าง รวมซีรัมจำนวน 80 ตัวอย่าง (ซีรัมชุดเดียวกับที่ทดสอบ ELISA)

4.) บันทึกระดับ HI titer และหาค่าเฉลี่ยในแต่ละฝูง

5. การเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA และ HI

นำผลการทดสอบ ELISA จากวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง กับวิธีการทดสอบ HI มาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ผล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติของไวรัส สำหรับการเตรียมแอนติเจน

1. การศึกษาคุณสมบัติของไวรัส

การศึกษาคุณสมบัติของไวรัสจากวัคซีน เพื่อใช้สำหรับการเตรียมแอนติเจนในการทดสอบด้วยเทคนิค HI และ ELISA สำหรับประกอบการพิจาณาเลือกใช้ชนิดของสายพันธุ์ไวรัสที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมแอนติเจน เนื่องจากไวรัสบางสายพันธุ์อาจมีความรุนแรงส่งผลให้ตัวอ่อนตายอย่างรวดเร็ว และได้ปริมาณของแอนติเจนค่อนข้างน้อย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการทดลองศึกษาคุณสมบัติของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการตายของตัวอ่อนไก่ และสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนไก่ เพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสภายหลังการฉีดเชื้อ ผลการทดลอง พบว่า ไวรัสจากวัคซีน IB H120 มีอัตราการตายของตัวอ่อนสูงที่สุด คือ 50% รองลงมาคือ IB Nephropathogenic strain, MA-5 และ 4/91 ซึ่งมีอัตราการตายของตัวอ่อนไข่ไก่ฟักเป็น 20, 13 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 และการสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนเมื่อครบ 120 ชั่วโมง ภายหลังการฉีดเชื้อ เพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสพบว่า ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักมีลักษณะแคระ แกรน และขดม้วนตัวแน่น แตกต่างจากตัวอ่อนไข่ไก่ฟักปรกติ ที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส และใช้เป็นตัวอ่อนควบคุมผลลบดังภาพที่ 2 เมื่อผ่าพิสูจน์รอยโรคจากอวัยวะภายในพบว่า ตับของตัวอ่อนไข่ไก่ฟักมีลักษณะเป็นสีเหลือง และมีจุดเลือดออกดังภาพที่ 3 ซึ่งต่างจากตัวอ่อนควบคุมผลลบที่ตับมีสีน้ำตาล ไม่มีจุดเลือดออก

ตารางที่ 1 อัตราการตายของตัวอ่อนไข่ฟักภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสจากวัคซีนสายพันธุ์ต่างๆ

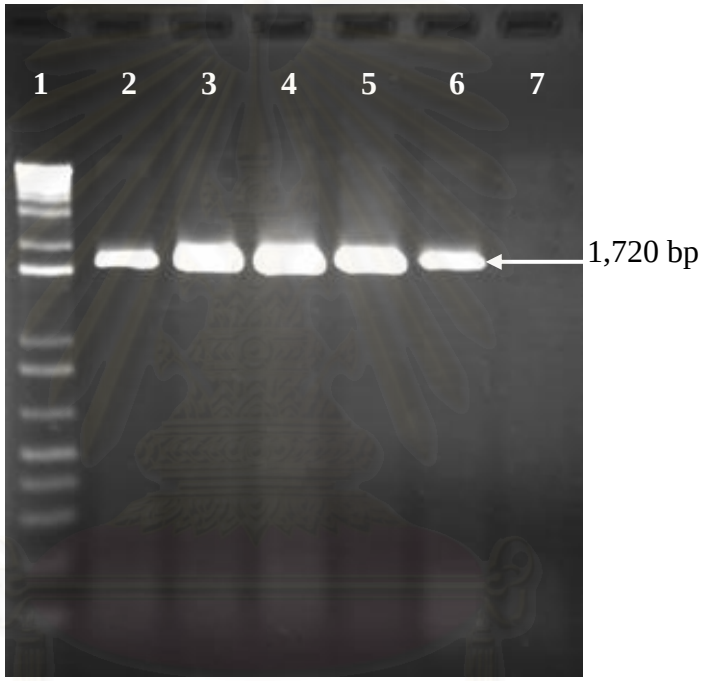
วันที่	*จำนวนไข่ตาย (ฟอง)*			
	H120	***Ma-5***	***4/91***	***Nephro pathogenic strain***
1	2	1	0	0
2	5	2	0	4
3	3	1	1	2
4	4	0	0	0
5	1	0	0	0
6	0	0	0	0
รวม	15/30	4/30	1/30	6/30
%	50 %	13 %	3 %	20 %

ภาพที่ 2 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของตัวอ่อน ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัส สังเกตลักษณะแคระแกรน และการม้วนตัวของตัวอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนด้านขวามือ

ภาพที่ 3 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงอวัยวะภายในที่สำคัญของตัวอ่อน ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัส สังเกตลักษณะตับเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีจุดเลือดออก

2. การยืนยันการติดเชื้อ IBV ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

การยืนยันการติดเชื้อ IBV ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อการยืนยันการติดเชื้อไวรัสเพิ่มเติมจากการสังเกตลักษณะตัวอ่อน เนื่องจากลักษณะการแคระแกรน และขดม้วนตัวของตัวอ่อน สามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย และวิธี RT-PCR เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ แม่นยำ และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว ซึ่งจากการนำ AF ที่ได้จากการฉีดสารละลายวัคซีน 4 ชนิด ลงในไข่ไก่ฟัก มาทำการยืนยันการติดเชื้อไวรัส IBV ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า AF ทั้ง 4 ชนิด ให้ผลผลิตที่จำเพาะต่อปฏิกิริยาเท่ากับ 1,720 คู่เบส ตรงกับ Positive control ดังภาพที่ 4 ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่า AF ที่นำมาทดลองทั้ง 4 ตัวอย่างได้รับการติดเชื้อไวรัส IBV

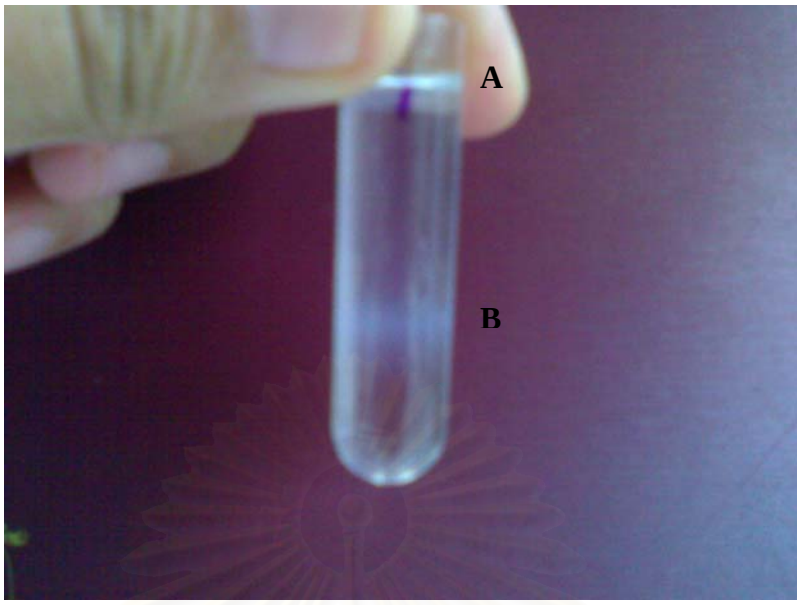


<u>ภาพที่ 4</u> ผลการยืนยันการติดเชื้อ IBV ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อนำผลผลิตมาแยกใน 1% agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1 = 1kb DNA Ladder, 2 = AF จาก IB 4/91, 3 = AF จาก IB H120, 4 = AF จาก IB MA-5, 5 = IB Nephro pathogenic, 6 = Positive control, 7 = Negative Control

การพัฒนาวิธีการทดสอบ ELISA

1. การเตรียมเชื้อไวรัสบริสุทธิ์

หลังจากเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Sucrose gradient แล้ว จะได้แอนติเจนที่บริสุทธิ์ 2 แถบเป็นเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ส่วน A และ B



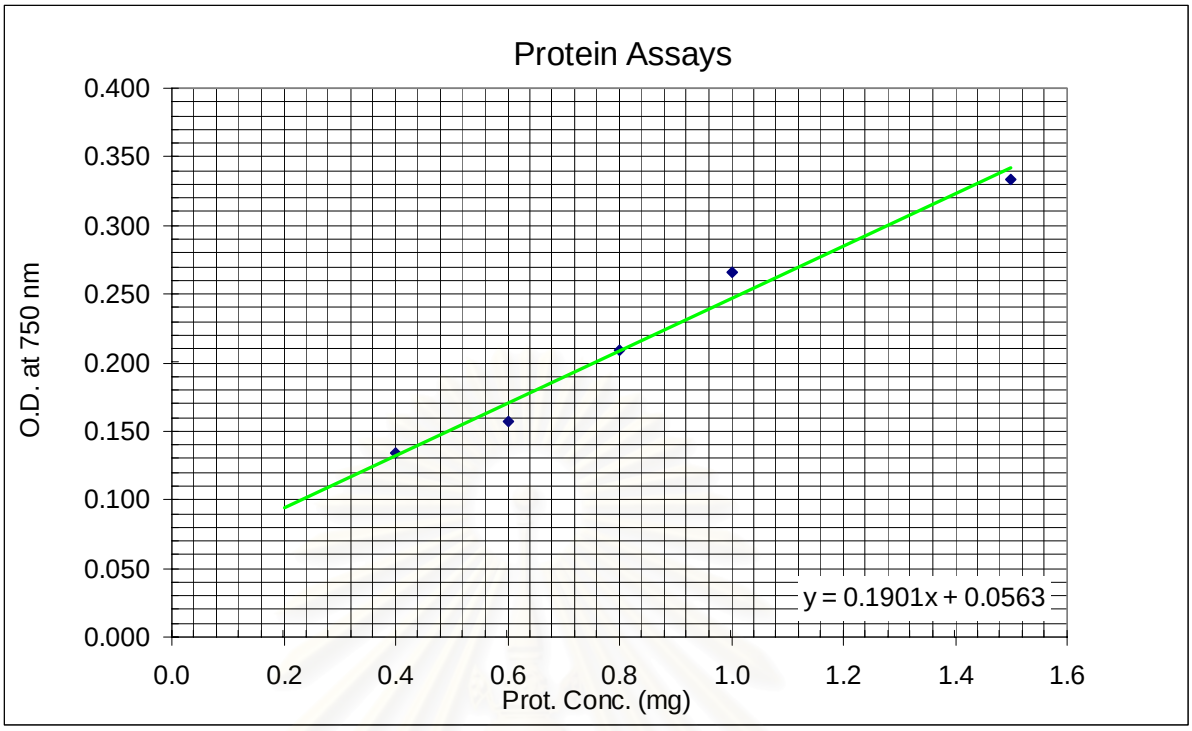
ภาพที่ 5 การเตรียมเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ สังเกตแถบไวรัสเป็นสีขาวขุ่นบาง (ส่วน A) และหนา (ส่วน B)

2. การหาความเข้มข้นโปรตีน

การหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ทั้งสองส่วนจากผลการคำนวณค่าการดูดกลืนแสง (OD) เปรียบเทียบกับ OD ของโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 1.5, 1.0, 0.8, 0.6 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยชุดทดสอบ Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 2 จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟ และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยแทนค่าในสมการเส้นตรงแบบกำหนดความชัน และระยะตัด y = mx + c ซึ่งพบว่า เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ ส่วน A มีความเข้มข้น 598 µg/ml และส่วน B มีความเข้มข้น 1,290 µg/ml

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) จากการทดสอบด้วยชุด Bio-Rad DC Protein Assay

ตัวอย่าง	*ค่า OD*	*ความเข้มข้นของโปรตีน*
1	0.333	1.5 mg/ml
2	0.266	1.0 mg/ml
3	0.209	0.8 mg/ml
4	0.157	0.6 mg/ml
5	0.134	0.4 mg/ml
ส่วน A	0.170	0.598 mg/ml
ส่วน B	0.301	1.29 mg/ml



แผนภูมิที่ 1 กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณความเข้มข้นโปรตีน

การความเข้มข้นของแอนติเจนเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน สมการ y = mx + c

กำหนดให้ m = ความชันซึ่งเป็นค่าคงที่ (0.1901)

C = ค่าคงตัวซึ่งเท่ากับระยะที่กราฟตัดแกน y (0.0563)

y = ค่า OD ที่อ่านได้

x = ความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการหาค่า

ส่วน A มีความเข้มข้น = (0.170-0.0563)/0.1901 = 0.598 mg/ml หรือ 598 µg/ml

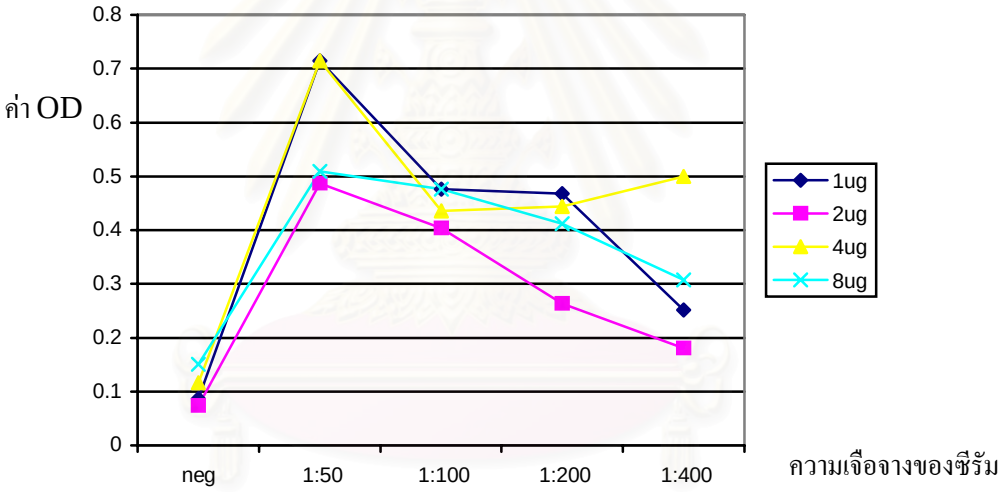
ส่วน B มีความเข้มข้น = 0.301-0.0563/0.1901 = 1.29 mg/ml หรือ 1,290 µg/ml

3. การหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมเพลท ELISA

การเคลือบเพลต ELISA ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน 0.05 M carbonates-bicarbonate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมกับซีรัมอ้างอิงผลลบ (Negative serum) และซีรัมอ้างอิงผลบวกที่ความเจือจางระดับ 1:50, 1:100, 1:200 และ 1:400 ตามลำดับ พบว่า การใช้โปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมก็เพียงพอที่จะสามารถสังเกตความแตกต่างระหว่างซีรัมอ้างอิงผลลบ และซีรัมอ้างอิงผลบวกที่ความเจือจางระดับต่างๆได้ดังตารางที่ 3 และแผนภูมิที่ 2

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่า OD ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ระหว่างการเคลือบเพลทด้วยโปรตีนของไวรัส IB สายพันธุ์ H120 ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่าง/ความเข้มข้นโปรตีน	*1.0 µg*	*2.0 µg*	*4.0 µg*	*8.0 µg*
Negative Serum	0.087	0.074	0.116	0.151
Positive Serum 1:50	0.714	0.487	0.714	0.509
Positive Serum 1:100	0.476	0.404	0.436	0.476
Positive Serum 1:200	0.468	0.263	0.444	0.412
Positive Serum 1:400	0.252	0.181	0.5	0.308



แผนภูมิที่ 2 การเปรียบเทียบความแตกต่างค่า OD ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ระหว่างการเคลือบเพลทด้วยโปรตีนของไวรัส IB สายพันธุ์ H120 ความเข้มข้น 1.0 (—◆—), 2.0 (—■—), 4.0 (—▲—) และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (—×—) กับซีรัมเจือจางระดับ 1: 50, 1: 100, 1: 200 และ 1: 400

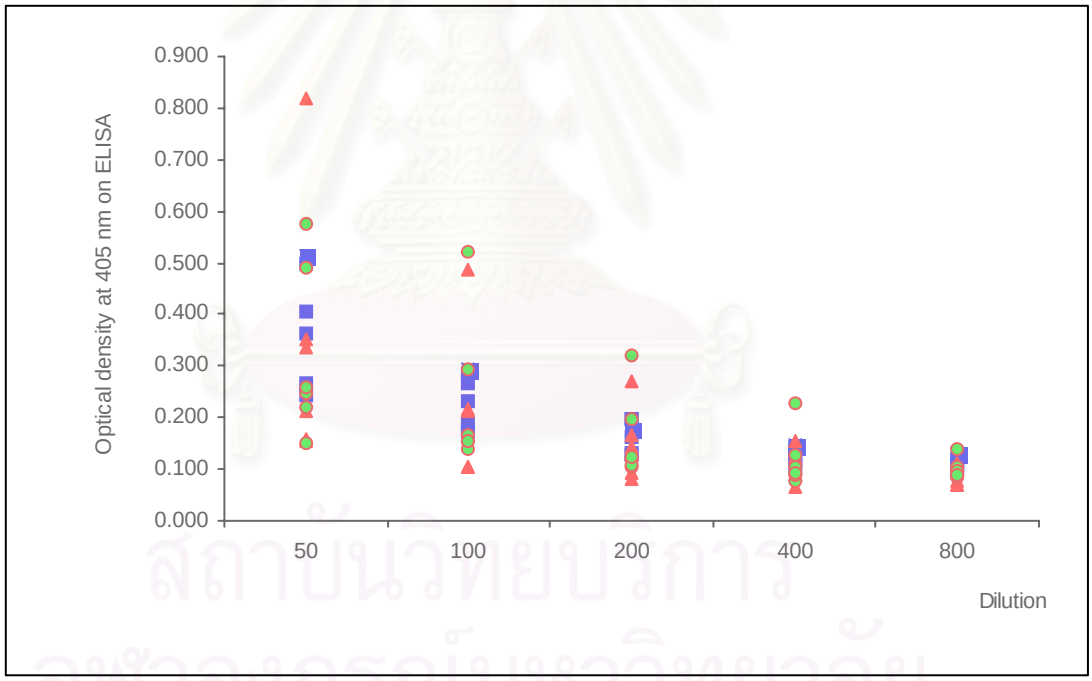
4. การทดสอบความสามารถในการตรวจซ้ำได้ (Reproducibility test)

การเคลือบเพลท ELISA ด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับตัวอย่างซีรัมที่เจือจางในระดับ 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400 และ 1: 800 จำนวน 3 ชุด แล้วอ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร บันทึกค่า OD แล้วทำซ้ำอีกรวมทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจซ้ำได้ โดยประเมินจากความแตกต่างของ

ค่า OD ที่วัดได้ในแต่ละครั้ง (ตารางที่ 4) นำข้อมูลที่ได้สร้างแผนภูมิเพื่อแสดงความแตกต่างที่ชัดเจน ดังแผนภูมิที่ 3 แล้วนำข้อมูลการทดลอง 3 ครั้ง มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 15.0 พบว่า การทดสอบทั้ง 3 ครั้งให้ค่าความเข้มแสงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ค่า OD ที่ได้จากการทดสอบ ELISA จำนวน 3 ครั้ง

ลำดับความเจือจาง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1 : 50	0.382 ± 0.114	0.338 ± 0.251	0.323 ± 0.169
1 : 100	0.239 ± 0.051	0.215 ± 0.141	0.239 ± 0.150
1 : 200	0.166 ± 0.031	0.147 ± 0.068	0.161 ± 0.084
1 : 400	0.131 ± 0.016	0.108 ± 0.030	0.120 ± 0.056
1 : 800	0.112 ± 0.013	0.090 ± 0.019	0.100 ± 0.021



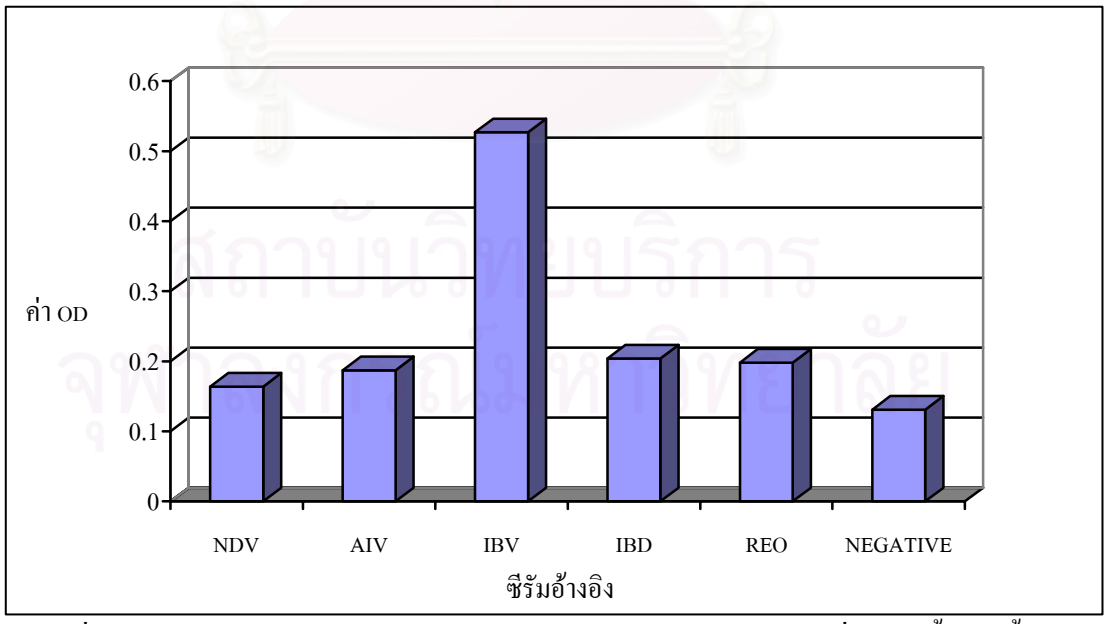
แผนภูมิที่ 3 แสดงค่า OD ELISA ชุดทดสอบที่เคลือบเพลท ELISA ด้วย แอนติเจนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ครั้งที่ 1(■) ครั้งที่ 2 (▲) และครั้งที่ 3 (●) ที่ลำดับความเจือจาง 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400 และ 1: 800

5. การทดสอบความเฉพาะของวิธีการทดสอบ (Specificity test)

การเคลือบเพลต ELISA ด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบ ELISA กับตัวอย่างซีรัม Newcastle Disease Virus (NDV), Avian Influenza Virus (AIV), Infectious Bronchitis Virus (IBV), Infectious Bursal Disease Virus (IBD), Reovirus (REO) และตัวอย่างควบคุมผลลบ อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่า IBV ให้ค่า OD สูงที่สุด ส่วนแอนติเจนจากเชื้ออื่นๆ ให้ค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุมผลลบ ดังตารางที่ 5 และแผนภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่าทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อเชื้อ IBV

ตารางที่ 5 แสดงค่า OD จากการทดสอบ ELISA ต่อเชื้อต่างๆ และตัวอย่างควบคุมผลลบ

ซีรัมอ้างอิงต่อไวรัสชนิดต่างๆ	ค่าเฉลี่ยความเข้มแสง
NDV	0.164 ± 0.017
AIV	0.187 ± 0.086
IBV	0.527 ± 0.048
IBD	0.204 ± 0.054
REO	0.198 ± 0.037
ซีรัมควบคุมผลลบ	0.131 ± 0.030



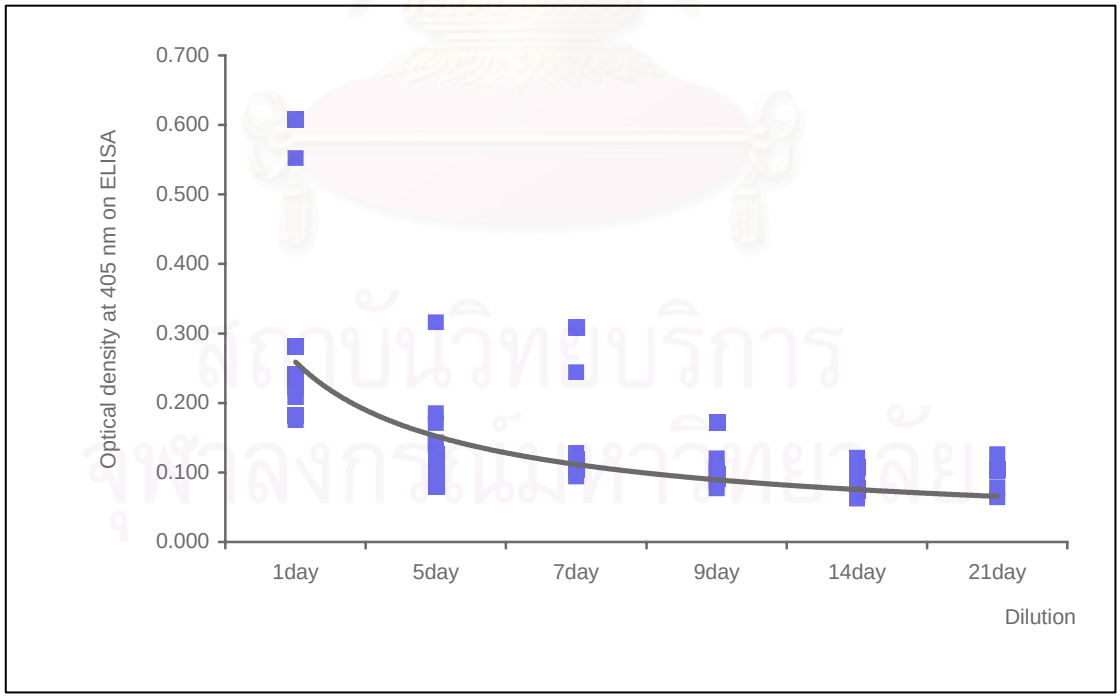
แผนภูมิที่ 4 แสดงความแตกต่างของค่า OD จากการทดสอบ IBV ELISAที่พัฒนาขึ้นต่อเชื้อต่างๆ และตัวอย่างควบคุมผลลบ

6. การทดสอบซีรัมจากลูกไก่ที่มีระดับแอนติบอดีจากแม่ลดลงแน่นอน

เมื่อเจาะเลือดลูกไก่จำนวน 10 ตัวที่มาจากแม่ไก่ที่มีระดับแอนติบอดีสูงจากการให้วัคซีนในฟาร์มไก่พันธุ์ ตามปรกติระดับภูมิคุ้มกันจากแม่จะลดลงตามลำดับ นำมาทดสอบ ELISA และเก็บข้อมูลที่อายุ 5, 7, 9, 14 และ 21 วัน แล้วเปรียบเทียบค่า OD ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งค่า OD ที่ได้จากการทดลองดังกล่าวแสดงไว้ใน ตารางที่ 6 พบว่า ผลจากการทดสอบ ELISA จากซีรัมลูกไก่อายุ 1, 5, 7, 9, 14 และ 21วัน ให้ค่า OD ลดลงตามลำดับตามแผนภูมิที่ 5

ตารางที่ 6 ค่า OD จากการทดสอบ IBV ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับซีรัมลูกไก่ 10 ตัว ที่อายุต่างๆ

อายุไก่	ค่าเฉลี่ยความเข้มแสง
1 วัน	0.291 ± 0.156
5 วัน	0.147 ± 0.069
7 วัน	0.146 ± 0.071
9 วัน	0.104 ± 0.026
14 วัน	0.092 ± 0.020
21 วัน	0.095 ± 0.024



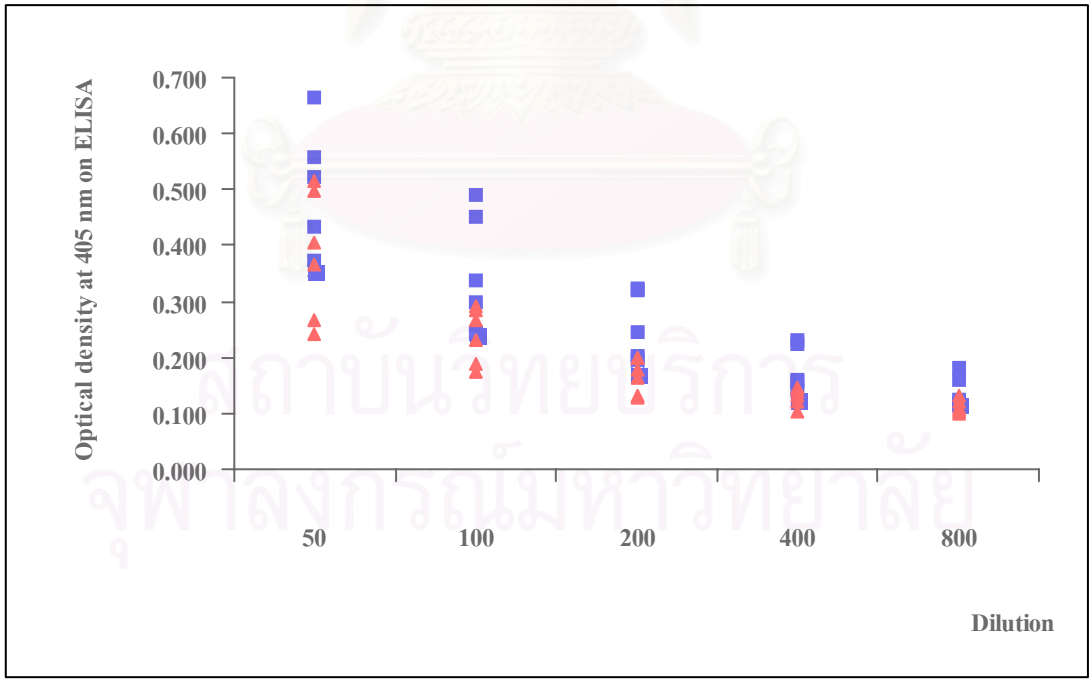
แผนภูมิที่ 5 การลดลงของค่า OD จากการทดสอบ IBV ELISA ในซีรัมจากลูกไก่ที่มีระดับแอนติบอดีจากแม่

7. การเปรียบเทียบชุดทดสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบเชิงการค้า

การทดสอบ ELISA ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง โดยเคลือบเพลตด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับซีรัมที่ระดับความเจือจาง 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400 และ 1: 800 โดยใช้ซีรัมความเจือจางละ 10 ตัวอย่าง และทดสอบ ELISA ด้วยชุดทดสอบเชิงการค้า ที่ระดับความเจือจาง 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400 และ 1: 800 โดยใช้ซีรัมความเจือจางละ 10 ตัวอย่างเช่นเดียวกัน แล้วทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย O.D. ที่ได้จากการทดสอบทั้งสองครั้ง พบว่า ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเองมีลักษณะการลดลงของค่าเฉลี่ย O.D. ตามความเจือจางเป็นไปในทางเดียวกันกับชุดทดสอบเชิงพาณิชย์

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบด้วยชุด ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง และชุดทดสอบเชิงการค้า

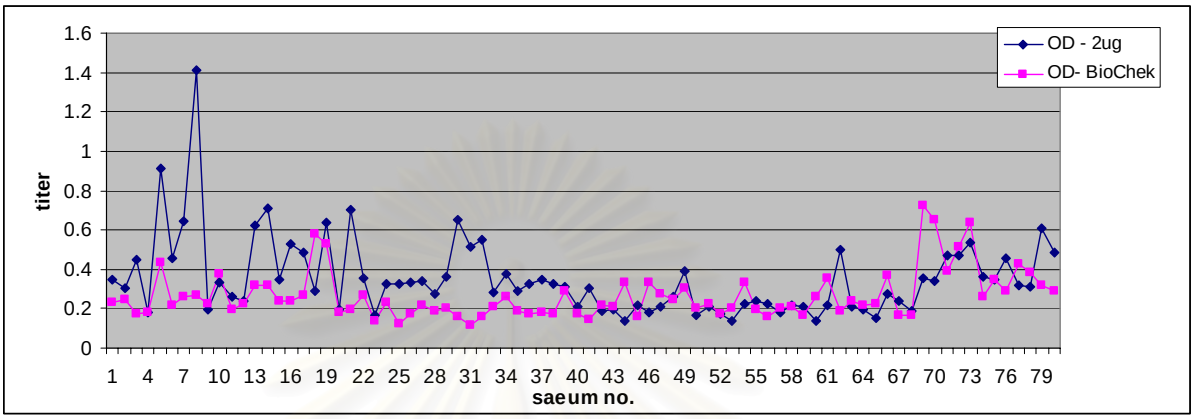
ลำดับความเจือจาง	*ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเอง*	*ชุดทดสอบเชิงพาณิชย์*
1 : 50	0.382 $\pm$ 0.114	0.485 $\pm$ 0.119
1 : 100	0.239 $\pm$ 0.051	0.344 $\pm$ 0.105
1 : 200	0.166 $\pm$ 0.031	0.243 $\pm$ 0.067
1 : 400	0.131 $\pm$ 0.016	0.173 $\pm$ 0.044
1 : 800	0.112 $\pm$ 0.013	0.136 $\pm$ 0.028



แผนภูมิที่ 6 ค่า OD ELISA ระหว่างการทดสอบด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเอง และชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ และกับซีรัมที่ระดับความเจือจาง 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400 และ 1: 800

8. การทดสอบซีรัมจากตัวอย่างในฟาร์ม

การทดสอบ ELISA ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง โดยเคลือบเพลตด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับตัวอย่างซีรัม จำนวน 80 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร



แผนภูมิที่ 7 เปรียบเทียบค่า OD ชุดทดสอบ ELISA ที่เคลือบเพลทด้วยแอนติเจนบริสุทธิ์ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ (Bio Chek)

ภาพที่ 6 ชุดทดสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นใช้เองจากการทดลองครั้งนี้

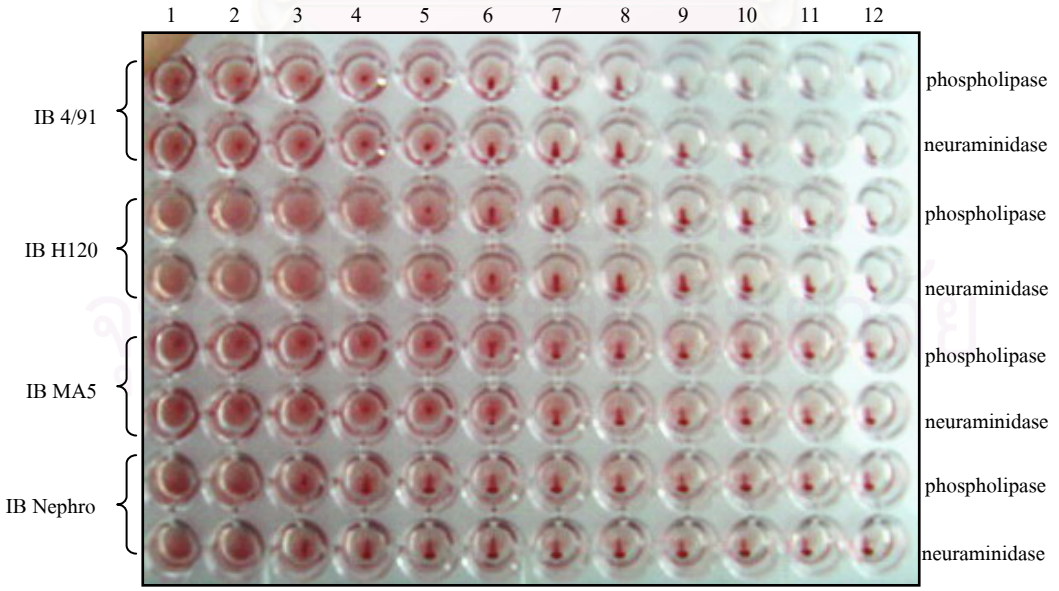
การพัฒนาวิธีการทดสอบ HI

1. การเตรียมไวรัสเข้มข้น

จากการนำสารละลายไวรัสปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็วรอบ 31,500 รอบต่อนาที จากนั้นละลายตะกอนแล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอน แล้วนำแอนติเจนส่วนใสที่เป็นสารละลายไวรัสเข้มข้นไปบำบัดด้วยเอนไซม์ โดยไม่ผ่านขั้นตอนการทำไวรัสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Sucrose gradient แต่พบว่าสารละลายไวรัสเข้มข้นที่ผ่านการบำบัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา HA ได้

2. การคัดเลือกเอนไซม์เพื่อใช้ในการบำบัดแอนติเจน

เมื่อบำบัดแอนติเจนสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเอนไซม์ neuraminidase และ phospholipase C type I แล้วนำแอนติเจนที่ได้ทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการทำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง และเลือกใช้เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงระดับความเจือจางสูงที่สุดในการทดลองต่อไป ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการบำบัดแอนติเจนได้ไม่ต่างกัน นั่นคือทำให้แอนติเจนสายพันธุ์ 4/91, H120 และ MA5 มีระดับ HA titer เท่ากับ 32 HA unit ซึ่งวัดด้วยวิธี HA เท่านั้น เพราะเราต้องการเหนี่ยวนำให้เชื้อมี Haemagglutination activity ซึ่งได้ค่าเท่ากันคือ 32 และทำให้แอนติเจนสายพันธุ์ Nephropathogenic มีระดับ HA titer เท่ากับ 4 HA unit ดังภาพที่ 4 ซึ่งแตกต่างจากก่อนนำไปบำบัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด พบว่าแอนติเจนทั้ง 4 ไม่สามารถเกิดการจับกลุ่มตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงได้ และเมื่อพิจารณาทางด้านราคา และจำนวนของเอกสารอ้างอิงถึงวิธีการทดสอบ พบว่าเอนไซม์ phospholipase C มีราคาที่ต่ำกว่า และพบเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมากกว่าเอนไซม์ neuraminidase ดังนั้น การทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้เอนไซม์ phospholipase C ในการบำบัดแอนติเจน



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบ HA จากแอนติเจนที่ผ่านการบำบัดด้วยเอนไซม์ phospholipase C และ neuraminidase

3. การคัดเลือกแอนติเจน สำหรับใช้ในการทดลอง

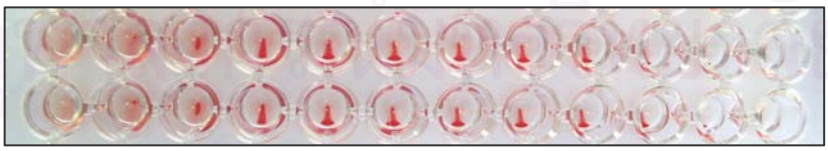
นำแอนติเจนสายพันธุ์ต่างๆ บำบัดด้วยเอนไซม์ phospholipase C แล้วทำการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (HI) แบบ 25 ไมโครลิตร กับซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ IBV ด้วยวิธี ELISA จากชุดทดสอบเชิงการค้า จำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถทำปฏิกิริยา HI ได้ดีที่สุด โดยตัดสินจากค่าเฉลี่ย ***Log $_2$ (HI titer)*** ที่สูงที่สุด ซึ่งผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ H120 สามารถทำปฏิกิริยายับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.1 ส่วนสายพันธุ์ MA5, Nephro pathogenic และ 4/91 มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 1.9, 1.4 และ 1.3 ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงเลือกใช้แอนติเจนสายพันธุ์ H120 บำบัดด้วยเอนไซม์ phospholipase C type 1

ตารางที่ 8 ผล HI titer จากการทดสอบ HI ด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ต่างๆ

แอนติเจน	***Log $_2$ (HI titer) ต่อ serum no.***										***ค่าเฉลี่ย***
	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***Log $_2$ (HI titer)***
4/91	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1.3±0.95
H120	5	5	5	3	3	6	4	4	3	3	4.1±1.1
MA5	3	3	1	1	1	6	1	1	1	1	1.9±1.7
Nephro pathogenic strain	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1	1.4±1.3

4. การทดสอบซีรัมจากตัวอย่างในฟาร์ม

หลังจากบำบัดแอนติเจนของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 120 ด้วยเอนไซม์ Phospholipase C ให้มีความเข้มข้น 4 HA unit ต่อ 25 ไมโครลิตรดังภาพที่ 6 แล้วนำมาทดสอบ HI กับตัวอย่างซีรัมชุดเดียวกับทดสอบ ELISA จำนวน 4 ฝูง ฝูงละ 20 ตัวอย่าง ผลการทดสอบ HI ให้ค่า titer ดังตารางที่ 9



ภาพที่ 8 ผลการเตรียมแอนติเจนความเข้มข้น 4 HA unit ต่อ 25 ไมโครลิตร

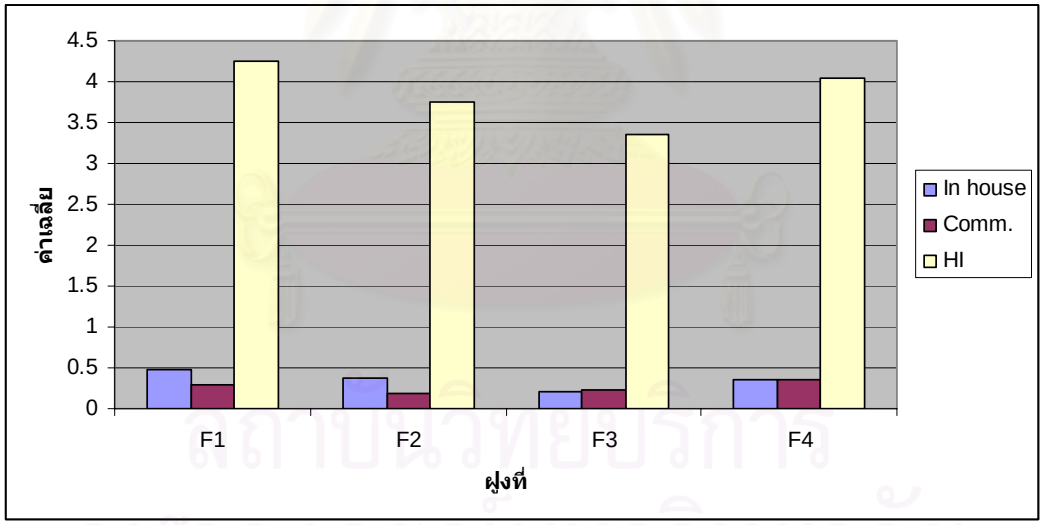
การเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA และ HI

การเปรียบเทียบผลการทดสอบ ELISA จากวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง และวิธีที่ผลิตเชิงการค้ากับวิธีการทดสอบ HI ทำโดยนำค่าเฉลี่ย OD จากการทดสอบ ELISA ทั้งสองวิธีเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ย titer จากวิธี HI มาสร้างกราฟ เพื่อวิเคราะห์แนวโน้มระดับภูมิคุ้มกันของตัวอย่างซีรัมทั้ง 4 ฝูง จากทั้ง 3 วิธี

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย OD จากการทดสอบ ELISA และค่าเฉลี่ย HI titer

ฝูงที่	ค่าเฉลี่ย OD วิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้น	ค่าเฉลี่ย OD วิธี ELISA ที่ผลิตเชิงพาณิชย์	**ค่าเฉลี่ย $\log_2$ (HI titer)**
1	0.478±0.296	0.285±0.114	4.25±0.851
2	0.368±0.136	0.192±0.046	3.75±0.550
3	0.21±0.059	0.227±0.060	3.35±0.671
4	0.352±0.132	0.358±0.162	4.05±0.826

หมายเหตุ ไม่พบความสัมพันธ์ของแต่ละค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ ($p > 0.05$)



แผนภูมิที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย OD จากการทดสอบ ELISA และค่าเฉลี่ย $\log_2$ (HI titer)

วิจารณ์และสรุปผล

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ เป็นโรคติดเชื้อไวรัสในไก่ ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก (Parsons et al., 1992) วิธีที่นิยมใช้สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ได้แก่ haemagglutination inhibition (HI) test, agar gel precipitation test (AGP) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ส่วนเทคนิค virus neutralization test (VNT) ไม่นิยมใช้ เนื่องจากมีต้นทุนสูงและยุ่งยากมาก (De Wit , 2000)

การวิจัยครั้งนี้ ทำการพัฒนาวิธีการทดสอบ ELISA และวิธี HI ต่อไวรัส IB เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อนมากนัก แต่ขาดการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ในประเทศไทยยังคงนำเข้าแอนติเจน และชุดทำสอบ ELISA ที่ผลิตเชิงการค้าจากต่างประเทศ

การพัฒนาวิธีการทดสอบ ELISA

เนื่องจากผู้ประกอบการฟาร์มเลี้ยงไก่หลายแห่งในประเทศไทย เลือกใช้วัคซีนซีโรไทป์ Massachusetts เพื่อกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันในไก่ต่อไวรัส IB และเพื่อป้องกันการระบาดของโรคในพื้นที่ ซึ่งมีรายงานว่าไวรัสดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่มีโอกาสพบว่าก่อให้เกิดโรคบ่อยที่สุด และวัคซีนที่เตรียมจากสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค จะป้องกันการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์นั้นๆได้ดีกว่า นอกจากนั้นซีโรไทป์ Massachusetts ยังมีคุณสมบัติที่ให้การปกป้องข้าม (cross immunity) ต่อซีโรไทป์อื่นได้บ้าง ดังนั้นคณะวิจัยจึงได้เลือกใช้แอนติเจน ซีโรไทป์ Massachusetts สายพันธุ์ H120 ในการพัฒนาชุดทดสอบ ELISA เพื่อจะนำมาใช้ในการตรวจติดตามระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัส IB เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผน ควบคุม และป้องกันการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในฟาร์มต่อไป

ขั้นตอนแรกในการพัฒนาวิธีทดสอบ ELISA คือขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติของไวรัส ไวรัส IB เจริญได้ดีในตัวอ่อนไข่ฟัก และระดับ titer ต่อไวรัสใน AF จะมีค่าสูงที่สุดหลังจากการฉีดเชื้อ 1 ถึง 2 วัน (Clarke et al., 1972; Darbyshire et al., 1975; Hitchner and White, 1995; Perchase et al., 1966) แต่ในการทดลองต้องการศึกษาลักษณะของตัวอ่อนไข่ฟักหลังจากได้รับเชื้อ จึงทำการบ่มเชื้อนานถึง 120 ชั่วโมง หรือ 5 วัน ซึ่งตัวอ่อนไข่ไก่ฟัก ที่ได้รับการฉีดเชื้อจะมีลักษณะม้วนกลม แคระแกร็น และมีอัตราการตายสูง (DeWit, 2000) ซึ่งระยะเวลา 1-2 วัน อาจจะสังเกตลักษณะดังกล่าวได้ไม่ชัดเจน และจากผลการทดสอบอัตราการตายของไข่ฟักหลังจากฉีดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H120 พบว่ามีอัตราการตายสูงถึง 50% ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่นำมาทดสอบ

ความเข้มข้นของแอนติเจนบริสุทธิ์ที่ได้จากการทดลองยังไม่สูงมากนัก อาจเนื่องจากไม่ได้เก็บ AF ในระยะเวลาที่มีระดับ titer ต่อไวรัสสูงที่สุด คือ 1-2 วัน (Clarke et al., 1972; Darbyshire et al., 1975; Hitchner and White, 1995; Perchase et al., 1966) และอาจเกิดการสูญเสียจากการละลายไวรัสในขั้นตอนการปั่นไวรัสให้บริสุทธิ์ แต่แอนติเจนที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 2 ส่วน ส่วนละ 200 ไมโครลิตร (Complete และ Partial IBV) สามารถใช้เตรียมเพลต ELISA ด้วยความเข้มข้น 2.0 μg ได้มากกว่า 40 เพลต ซึ่งหากคิดเป็นมูลค่าตามชุดทดสอบที่ผลิตเชิงการค้า จะมีราคาประมาณ 5 หมื่นบาท และสารเคมีที่เหลือยังสามารถนำมาใช้เตรียมเพลต ELISA ในครั้งต่อไปได้อีก ซึ่งหากพิจารณาในด้านต้นทุนการทดสอบถือว่ามีความเหมาะสมในการนำมาทดแทนชุดทดสอบทางการค้าที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

ด้านผลการทดสอบพบว่าวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีความสามารถในการตรวจซ้ำได้ โดยจากการทดลอง 3 ครั้ง พบว่าให้ค่าความเข้มแสงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิธีการทดสอบมีความเฉพาะต่อ IBV สังเกตได้จากค่า OD ในการทำปฏิกิริยากับซีรัมต่อเชื้ออื่นๆ จะมีค่าต่ำใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุมผลลบ หลังจากทดสอบซีรัมจากลูกไก่ที่มีระดับแอนติบอดีจากแม่ลดลงแน่นอน พบว่าค่า OD ที่ได้จากการทดสอบซีรัมลูกไก่อายุ 1 วัน จะมีค่ามากที่สุด เนื่องจากได้รับแอนติบอดีมาจากแม่ไก่ และจะลดลงเรื่อยๆ เมื่ออายุมากขึ้น แต่ไม่ได้รับการให้วัคซีน สอดคล้องกับรายงาน Davelaar และ Kouwenhoven (1977) ที่กล่าวว่าระดับนิวทริไลซิ่งแอนติบอดีต่อไวรัส IB ที่ได้รับมาจากแม่ไก่จะสูงสุดเมื่ออายุ 1 วัน และจะลดลงเรื่อยๆ จนหมดไปเมื่ออายุ 30 วัน

ผลการเปรียบเทียบชุดทดสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบทางการค้า พบว่าชุดทดสอบทางการค้าให้ค่าเฉลี่ยความเข้มแสงมากกว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเอง แต่แนวโน้มของผลการทดสอบที่ได้มีความคล้ายคลึงกัน

การพัฒนาวิธีการทดสอบ HI

การทดลองใช้เอนไซม์ neuraminidase และ phospholipase C ในการบำบัดแอนติเจน พบว่าให้ผล HA titer ไม่แตกต่างกัน ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองของ Bingham และคณะ (1975) ที่พบว่าเฉพาะ phospholipase C เท่านั้นที่สามารถบำบัดแอนติเจนสายพันธุ์ Massachusettes ได้

การเลือกใช้แอนติเจนในการทดสอบเป็นสายพันธุ์ H120 เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยา HI ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เนื่องจากซีรัมที่ใช้ในการทดสอบมาจากลูกไก่ที่ทำวัคซีน IB H120 แต่จากการทดลองแอนติเจนที่ใช้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ MA5 ได้บางตัวอย่าง เนื่องจากว่าเป็นซีโรไทป์เดียวกัน จึงสามารถทำปฏิกิริยายับยั้งข้ามได้ แต่สายพันธุ์อื่น คือ

Nephropathogenic และ 4/91 มีระดับ HI titer เท่ากับ 2 $\log_2$ HI titer unit ต่อ 25 ไมโครลิตร ซึ่งน้อยมากดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าแอนติเจนที่พัฒนาขึ้นมีความเฉพาะต่อสายพันธุ์ H120

ผลการนำค่าเฉลี่ย OD และค่าเฉลี่ย HI titer จากการทดสอบ ELISA และ HI ที่พัฒนาขึ้นเองกับซีรัม 4 กลุ่ม ซึ่งเป็นซีรัมชุดเดียวกัน มาทำการเปรียบเทียบแนวโน้มระดับ Titer พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน แต่เมื่อนำผลทั้งสองเปรียบเทียบกับชุด ELISA ทางการค้า พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย อาจเนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบ ELISA และ HI ที่พัฒนาขึ้นเอง เป็นสายพันธุ์เดียวกันทำให้แนวโน้มระดับ titer คล้ายเคียงกัน แต่แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบด้วยชุดที่พัฒนาขึ้นเองทั้งสองวิธีอาจจะมีความแตกต่างทางสายพันธุ์กับแอนติเจนที่ใช้เตรียมเพลท ELISA ในเชิงการค้าทำให้ titer มีความแตกต่างเล็กน้อย

ข้อเสนอแนะ

1. การละลายแอนติเจน ในขั้นตอนการปั่นแยกแอนติเจนให้บริสุทธิ์ ต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ ซึ่งหากละลายให้เข้ากันได้ไม่ดี จะทำให้เกิดการสูญเสียแอนติเจน ทำให้ได้ความเข้มข้นโปรตีนต่ำ เมื่อนำมาเตรียมเพลท ELISA ต้องใช้แอนติเจนปริมาณมากขึ้น ทำให้ได้ชุดทดสอบน้อยลง

2. อาจนำผลการวิจัยที่ได้ไปพัฒนาในเชิงอุตสาหกรรม เพื่อผลิตชุดทดสอบ ELISA ต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ขึ้นใช้เองภายในประเทศ เพื่อลดการนำเข้าและอาจส่งออกไปยังประเทศที่อยู่ในเพื่อนบ้านได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

ราตรี วงษ์วัชรดำรง. ปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์. กรุงเทพฯ: หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2532.

Adair, B.M., Burns, K. and McNulty, M.S. 1990. A study of ELISA systems incorporating pooled viral and mycoplasma antigen preparations for antibody screening of chicken sera. Avian Pathology. 19: 263-278.

Animas, B.S., Otsuki, K., Hanayama, M., Sanekata, T. and Tsubokura, M. 1994. Experimental infection with avian infectious bronchitis virus (Kagoshima-34 strain) in chicks at different ages. J. Vet. Med. Sci. 56(3): 443-447.

Bingham, R.W., Madge, M.H. and Tyrrell, D.A.J. 1975. Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus-a Coronavirus. J. Gen. Virol. 28: 381-390.

Cavanagh, D. 1983. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. Gen. Virol. 64: 2577-2583.

Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet. Res. 38: 281–297.

Cook, J. K.A., Brown, A.J. and Bracewell, C.D. 1987. Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralisation test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. Avian Pathol. 16: 505-511.

Corbo, L.J. and Cunningham, C.H. 1959. Haemagglutination by trypsin-modified infectious bronchitis virus. Am. J. Vet. Res. 20: 876-883.

Cross, G. 2002. Haemagglutination inhibition assays. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine. 11(1): 15-18.

De Wit, J.J. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 29:1-93.

Gough, E.R., Randall, J.C., Dagless, M., Alexander, J.D., Cox, J.W. and Pearson, D. 1992. A ‘new’ strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Vet. Rec. 130: 493-494.

Holmes, H.C. and Finney, P.M. 1985. Haemagglutination inhibition antibody titres in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus vaccine. 116: 587-588.

Hyuk Moo Kwon, Mark W., Jackwood and Jack Gelb Jr., 1993. Differentiation of Infectious Bronchitis Virus Serotypes Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis. Avian Diseases, 37: 194-202.

Ignjatovic, J. and Galli, L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M protein of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated broilers. Archives of Virology. 138: 117-134.

Jiang, S. He, Y. and Liu, S. 2007. "Synopsis SARS Vaccine Development" [Online]. Available: http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no07/05-0219.htm

King, D.J. 1984. Observations on the preparation and stability of infectious bronchitis virus haemagglutination antigen from virus propagated in chicken embryos and chicken kidney cell cultures. Avian Diseases. 28(2): 504-513.

King, D.J. 1988. A comparison of infectious bronchitis virus haemagglutination-inhibition test procedures. Avian Dis. 32: 335-341.

King, D.J. and Hopkins, S.R. 1982. Evaluation of the haemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. Avian Dis. 27: 100-112.

King, D.J. and Hopkins, S.R. 1984. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination- inhibition test. Avian Dis. 28:727-33.

Lashgari, M.S. and Newman, J.A. 1983. Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the haemagglutination-inhibition test. Avian Diseases. 28(2): 435-443.

Lukert, 1980. Infectious Bronchitis. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by S.H. Hitchner, C.H. Domermuth, H.G. Purchase and J.E. Willium. American Association of Avian Pathologists. Creative Printing Company, Inc., New York. p. 70-72.

Naik, B.M.C., Santhosh, S.R., Sridhar, B.Y., Mayanna, A. and Gomes, A.R. 2005. International Journal of Poultry Science. 4(8): 584-585.

Ma, H., Shieh, K.J. and Lee, S.L. 2006. Application of ELISA technique. Nature and Science. 4(2): 36-37.

OIE, 2004. "Terrestrial animal health code: 13th edition". [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/en_index.htm

Osmond, C.B. 2004. "Avian infectious bronchitis virus." [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/19010001.htm

Parsons, D., Ellis, M.M., Cavanagh, D. and Cook, A.K.J. 1992. Characterization of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. Vet. Rec. 131: 408-411.

Ruano, M., El-Attrache, J. And Villegas, P. 2000. A rapid-plate haemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. 44: 99-104.

Saravanan, S., Sukumar, S. and Balasubramaniam, A. 2006. Haemagglutinaion inhibition assay for avian infectious bronchitis using elute of blood blotted filter paper samples. Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences. 2(5): 163-166.

Suarez, D.L. and Cherry, S.S. 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. Developmental and Comparative Immunology. 24: 269-283.

Thayer, s.G. 1997. The enzyme-linked immunosorbent assay. In: Laboratory Manual: Avian Virus Diseases (AM 805). Edited by P. Villegas. The University of Georgia. p. 60-70.

Villegas, P. 1997. Haemagglutination inhibitions. In: Laboratory Manual-Avian Virus Diseases (AM 805). The University of Georgia. p.27-35.

Ziegler, F.A., Ladman, S.B., Dunn, A.P., Schneider, A., Davison, S., Miller, G.P., Lu, H., Weinstock, D., Slem, M., Eckroade, J.R. and Gelb, J. 2002. Nephro pathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000. Avian Dis. 46: 847-858.

Zhong, W.C. and Wu, C.C. 2003. The biological characteristics of SARS virus and its related Coronaviruses. ACTA Biochim Biophys Sin. 35: 495-502.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. เทคนิคต่างๆ สำหรับการบำบัดไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

Protocol 1: OIE, 2004

แอนติเจนต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจำเป็นต้องมีการบำบัดเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (Haemagglutination activity) เริ่มแรกทีเดียวจะใช้เอนไซม์ที่ผลิตเชิงการค้า phospholipase C type 1 และกำหนดให้ใช้สารละลายไวรัสผสมกับเอนไซม์ปริมาตรเท่าๆกัน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์เดียวกัน

อย่างไรก็ตาม การใช้ crude filtrate จาก *Clostridium perfringens* culture มีประสิทธิภาพมากกว่า และดูเหมือนว่าเอนไซม์ที่ติดมาด้วยนอกเหนือจาก phospholipase C จะมีส่วนสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงมากกว่าเสียอีก นำ AF ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 30,000 g เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำตะกอนที่ก้นหลอดมาทำละลายด้วย *Clostridium perfringens* type A filtrate ที่เจือจางเป็น 100 เท่า แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Protocol 2: Naik et al. (2005)

ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อมีคุณลักษณะเฉพาะตัว คือ ความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ ภายหลังการบำบัดด้วยเอนไซม์ Naik และคณะ (2005) ใช้ไวรัสจากท้องถิ่นนำมาฉีดเชื้อผ่านไข่แล้วเก็บน้ำไข่ขาวจากตัวอ่อนที่แสดงรอยโรคจำเพาะต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ

1. นำน้ำไข่ขาวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 30,000 g เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำตะกอนมาละลายที่ความเจือจาง 100 เท่า ใน 0.01 M Tris HCl buffer (pH 6.5)
2. สารละลายน้ำไข่ขาว นำมาผสมกับ crude filtrate ของ *Clostridial perfringens* culture ที่เชื่อว่ามีเอนไซม์ neuraminidase แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Protocol 3: Ruano et al. (2000)

ใช้เอนไซม์ neuraminidase type V จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)

1. สารละลาย Working solution เตรียมจากเอนไซม์ neuraminidase ความเข้มข้น 10 units/ PBS 1 ml ที่ pH 7.2
2. น้ำไข่ขาวจากตัวอ่อน ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบำบัดโดยตรงด้วยการผสมกับ AF 0.25 ml กับ neuraminidase working solution 25 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 1.0 U/ml (โดยการนำ working solution 22.5 ไมโครลิตรผสมกับ PBS 22.5 ไมโครลิตร)
3. หลังจากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

Protocol 4: Villegas (1997)

1. เจือจางไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในสัดส่วนที่เหมาะสมในสารละลาย HBSS
2. ฉีดเชื้อลงไข่ฟักอายุ 9-11 วัน ด้วยไวรัสที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อฟอง
3. บ่มไข่ฟัก หากไข่ฟักตายภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังการฉีดเชื้อให้ทิ้ง
4. นำตัวอ่อนออกจากตู้บ่มที่ 30-48 ชั่วโมงภายหลังการฉีดเชื้อ และแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน หรืออย่างน้อย 3 ชั่วโมง นับจากขั้นตอนนี้เป็นต้นไป ให้พยายามวาง AF หรือแอนติเจนในน้ำแข็งเสมอ
5. เก็บ AFไม่ให้มีเม็ดเลือดแดงติดมาด้วย
6. ปั่น AF ที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดง และเศษเซลล์ออก เก็บเฉพาะ AF ส่วนใส บันทึกปริมาตรของ AF ที่ได้เป็นมิลลิลิตร
7. เตรียมไวรัสให้เข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 30,000 g เป็นเวลา 90 นาที แล้วทิ้งส่วนใส
8. ทำละลายตะกอนไวรัสในบัฟเฟอร์ HEPES ที่ pH 6.5 เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ AF ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ได้ก่อนเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (100 X concentration)
9. เติมสาร phospholipase C
10. ผสมให้เข้ากันจนของเหลวเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน
11. บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ว vortex ทุก 30 นาที

12. การเก็บรักษาแอนติเจน แอนติเจนสามารถคงอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน กรณีแช่แข็ง แอนติเจนก็จะสามารถคงอยู่ได้เป็นเวลาใกล้เคียงกัน การแช่แข็งและการละลาย (freeze-thawing) ซ้ำๆหลายครั้ง มีผลต่อไตเตอร์ของแอนติเจน

Protocol 5: King (1984)

ใช้ phospholipase C (PLC) จาก *Clostridium perfringens* (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) ทำละลายให้เป็น 5 units/ml ในสารละลาย PBS (0.14 M NaCl, 0.003 M KCl, 0.008 M Na2HPO4, 0.0015 M KH2PO4 pH 7.2) แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แบ่งเก็บในตู้แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส)

ขั้นตอนการเตรียมแอนติเจน IBV HA

1. ฉีดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่มีปริมาณไวรัส $10^{6.5}$ EID50 ทาง chorioallantoic sac ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อฟอง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วเก็บน้ำไข่ขาว
2. ปั่นตกตะกอนเศษเซลล์ (clarification) ที่ความเร็วรอบ 1,000 g เป็นเวลา 45 นาที
3. ปั่นตกตะกอนไวรัส (concentration) ที่ความเร็วรอบ 39,000 g เป็นเวลา 40 นาที แล้วทำละลายในสัดส่วน 1/100 จากปริมาตรน้ำไข่ตั้งต้นใน HEPES-buffered saline (HBS) (0.025 M HEPES, 0.14 M NaCl, 0.001 CaCl2, pH 6.5)
4. นำไวรัสเข้มข้นที่ได้มาบำบัดด้วย PLC (0.5 units/ml) โดยการผสมเอนไซม์ที่ปริมาตรเท่าๆกัน (1 unit/ml) กับไวรัสเข้มข้น แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Protocol 6: Lukert (1980)

ใช้ phospholipase C type 1 (Sigma Ltd.) และไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อหลากหลายสายพันธุ์

1. เตรียมไวรัสเข้มข้น 100 เท่าโดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 30,000 g เป็นเวลา 40-60 นาที
2. ทำละลายใน 0.01 M Tris/HCl pH 6.5 โดยไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการทำไวรัสให้บริสุทธิ์

3. นำไวรัสเข้มข้นมาบำบัดด้วย phospholipase เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 1 unit/ml

ไวรัสที่บำบัดด้วยเอนไซม์ให้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสดีที่สุด และยังคงรักษาคุณสมบัติที่ดีเป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์

ภาคผนวก ข. วิธีการทดสอบ

1. การเพิ่มปริมาณไวรัส

1.) เจือจางไวรัส IB สายพันธุ์ต่างๆ ด้วย 0.1 phosphate buffer saline (PBS) ที่ pH 7.0-7.4 แล้วเติมยาปฏิชีวนะ 0.05 มิลลิลิตรต่อ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ทาง Allantoic cavity ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อฟอง ปิดเปลือกไข่ด้วยกาวน้ำอเนกประสงค์ (UHO®, GmbH & Co.HG, Germany)

3.) เก็บไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อไวรัสแล้วในตู้ฟักไข่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.) ไข่ที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง ให้เก็บทิ้ง และบันทึกอัตราการตายของไข่ทุกวัน

5.) หลังจากฉีดเชื้อไวรัสครบ 120 ชั่วโมง เก็บไข่ไก่ฟักแช่เย็น 3 ชั่วโมง

6.) นำไข่ออกจากตู้แช่เย็น เก็บ AF โดยระวังไม่ให้ติดเม็ดเลือดแดง

7.) นำ AF มาปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกชั้นเศษเซลล์ด้วยเครื่อง High-speed centrifuge ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

8.) เก็บส่วนใสจากการปั่นแยกเศษเซลล์ และบันทึกปริมาตรส่วนใสที่ได้จากการฉีดเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ไว้

2. การสกัด RNA ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Viral RNA Extraction (Real Genomic™, Real Biotech Corporation, Taiwan)

1.) นำ AF ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.) เติม VB buffer containg carrier RNA ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

3.) เติม 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.) นำหลอดที่ติดกระดาษกรอง วางลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมส่วนผสมในขั้นต้นลงในหลอดกรอง ปริมาตร 600 ไมโครลิตร

5.) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่ไหลผ่านกระดาษกรองทิ้ง

6.) เติมส่วนผสมที่เหลือ และนำไปปั่นซ้ำเช่นเดียวกับ ข้อ 5.)

7.) ล้างสิ่งปนเปื้อนบนกระดาษกรองด้วย wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

8.) เทส่วนที่ไหลผ่านกระดาษกรองทิ้ง เติม wash Buffer ปั่นเหวี่ยง และเทส่วนไหลผ่านกระดาษกรองทิ้งเช่นเดียวกับ ข้อ 7.)

9.) นำหลอดไปปั่นอีกครั้งด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เวลา 3 นาที

10.) นำหลอดที่ติดกระดาษกรองออกจากหลอด 2 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

11.) เติม RNase-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที

12.) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที สารละลาย RNA จะตกลงสู่หลอด microcentrifuge ปิดฝา และเก็บสารละลาย RNA ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การตกตะกอนไวรัส

1.) นำส่วนใสที่ได้จากการแยกเศษเซลล์ มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็วรอบ 31,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม AF ของ IBV ที่เหลือ แล้วปั่นซ้ำจนกว่าเชื้อจะหมด

4.) หลังจากปั่นเหวี่ยง และได้ไวรัสตกตะกอนจับกันเป็นก้อนสีขาวที่ก้นหลอดด้านบนแล้ว เติมสารละลาย HEPES buffer pH 6.5 (HEPES buffer) ให้ท่วมตะกอนไวรัส ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน

5.) ล้างคราบโปรตีนอื่นๆ ที่อยู่ด้านบนตะกอน ด้วยสารละลาย HEPES buffer เบาๆ แล้วเททิ้ง 2 รอบ

6.) ละลายตะกอนไวรัสด้วย HEPES buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซ้ำกันจนครบทุกหลอด

7.) ล้างตะกอนไวรัสที่ติดอยู่ข้างหลอดด้วย HEPES buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซ้ำกันจนครบทุกหลอด

8.) นำสารละลายไวรัสที่ได้จากข้อ 4 และ 5 รวมกัน แล้วเติม HEPES buffer โดยให้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายไวรัสมีอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อสารละลายเชื้อไวรัส 100 มิลลิลิตร

9.) นำสารละลายไวรัส ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนส่วนที่ละลายได้ไม่หมด ที่ความเร็ว 12,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

10.) เก็บสารละลายไวรัสส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

4. การหาความเข้มข้นของโปรตีน (Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.))

1.) เตรียม reagent A ผสมกับ reagent S ในอัตราส่วน 1 ml : 20 µl ตามลำดับ

2.) ถ่ายส่วนผสม reagent A ที่ผสมกับ reagent S แล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.) เติม standard Protein หรือสารละลายไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4.) เติม reagent B ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

5.) นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ด้วยเครื่อง spectrometer ความยาวคลื่นแสง 750 นาโนเมตร และบันทึกค่า O.D.

5. การเตรียมเพลท ELISA

1.) เตรียมแอนติเจนใน 0.05 M carbonates-bicarbonate ให้ได้ความเข้มข้น 2-10 µg/ml

2.) เติมแอนติเจนลงในเพลทก้นแบน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

3.) เติม Wash solution หลุมละ 300 ไมโครลิตร จับเวลา 3 นาที เททิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

4.) เติม Blocking solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

5.) ล้างเพลทด้วย Washing buffer 300 µl/well ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวมทั้งหมด 3 ครั้ง

6. การทดสอบ ELISA

1.) เจือจางซีรัมใน Dilution buffer อัตราส่วน 1:100 แล้วเติมลงในเพลทปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที

2.) ล้างเพลทด้วยการเติม Washing buffer 300 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวมทั้งหมด 3 ครั้ง

3.) เติมคอนจูเกต ที่ผลิตเชิงการค้า (Goat anti-Chicken IgG (H+L) horseradish peroxidase, Synbiotics Corporation, San Diego, USA) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที

4.) ล้างเพลทด้วย Washing buffer 300 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวมทั้งหมด 3 ครั้ง

5.) เติมซับสเตรต ที่ผลิตเชิงการค้า (ABTS-Hydrogen peroxidase, Synbiotics Corporation, San Diego, USA) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที

6.) เติม Stop solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

7.) นำเพลทไปอ่านค่า O.D. ด้วย เครื่อง ELISA Reader (Biotech EL311) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

8.) บันทึกค่า O.D. นำมาคำนวณหาระดับ Titer

7. การทดสอบ ELISA ด้วยชุดทดสอบเชิงการค้า Biocheck

1.) เตรียมตัวอย่างและสารละลาย

1.1) เจือจางตัวอย่างซีรัมอัตราส่วน ซีรัม : dilution buffer (1 : 500)

1.2) เตรียม Wash buffer 1 ซอง ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

1.3) เตรียม Substrate buffer โดย 1 เม็ด ต่อ Substrate buffer 5.5 มิลลิลิตร

2.) การทดสอบตัวอย่าง

2.1) เติม Negative control ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุม A1 และ A2

2.2) เติม Positive control ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุม A3 และ A4

2.3) เติมตัวอย่างที่เจือจางในข้อ 1.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

2.4) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

2.5) เทของเหลวทิ้ง เติม Wash buffer ที่เตรียมในข้อ 1.2) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ต่อหลุม จับเวลา 3 นาที แล้วเท Wash buffer ทิ้ง ทำซ้ำรวมทั้งหมด 4

2.6) เติม Conjugate reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

2.7) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

2.8) ล้างตามขั้นตอนที่ 2.5)

2.9) ใส่ Substrate reagent ที่เตรียมในข้อ 1.3) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

2.10) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.11) ใส่ Stop solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

2.12) อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 nm

3.) การแปรผล

3.1) ค่า Negative control ความเข้มแสงเฉลี่ย น้อยกว่า 0.3

3.2) ส่วนต่างค่าความเข้มแสงเฉลี่ย ระหว่าง Negative control และ Positive control มากกว่า 0.15

8. การเตรียม 1% เม็ดเลือดแดง

1.) ใช้ syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร และ เข็มเบอร์ 21 G ยาว ½ นิ้ว ดึง ดึงเลือดไก่ จากเส้นเลือดแดงที่ปีกไก่ ประมาณ 8 มิลลิลิตร

2.) ถ่ายเลือดออกจาก syringe ลงในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง 2.5 ml ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3.) ดูดไขมัน คราบฝุ่น และส่วนใสทิ้งแล้วล้างเม็ดเลือดแดง ด้วยการเติม 0.85 % NaCl ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำซ้ำ รวมทั้งหมด 3 ครั้ง

4.) เติม 0.85% NaCl ลงในเม็ดเลือดแดง (เม็ดเลือดแดง 1 ส่วน : 0.85% NaCl 99 ส่วน)

5.) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การบำบัดแอนติเจนให้จับกลุ่มตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดง

1.) เตรียมเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2.0 หน่วย ต่อมิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลายไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาตรเท่ากัน

2.) นำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาทุก 30 นาที แล้วนำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จนครบ 2 ชั่วโมง

3.) เก็บแอนติเจนที่บำบัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดแล้ว ไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียสข้ามคืน ก่อนนำมาทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดง

10. การทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดง แบบ 25 ไมโครลิตร

1.) เติม PBS ลงในเพลทชนิด U-shape ทุกหลุมๆ ละ 25 ไมโครลิตร

2.) เติมแอนติเจนที่บำบัดด้วยเอนไซม์ ลงในหลุมแรก แล้วเจือจางลำดับแบบ two-fold dilution

4.) เติม PBS ที่ pH 7.5 ลงในหลุมทดสอบทุกหลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร

5.) เติมเม็ดเลือดแดงไก่ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทุกหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร

6.) เขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

7.) ตรวจดูการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลุม แล้วไหลลงมาเป็นสายคล้ายน้ำตา (Tear-shaped streaming of the RBCs)

8.) การแปลผล โดยการอ่านระดับไตเตอร์จากความเจือจางสูงที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ (เลือดไม่ไหล) หมายถึง เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และแทนค่าเป็น 1 HA unit (HAU) แล้วนำไปคำนวณกลับจากความเจือจางตั้งต้นที่หลุมแรก

11. การทดสอบการยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง แบบ 25 ไมโครลิตร

1.) เติม PBS ที่ pH 7.5 ลงในเพลทชนิด U-shape ทุกหลุมๆ ละ 25 ไมโครลิตร

2.) เติมซีรัมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรก แล้วเจือจางลำดับแบบ two-fold dilution

3.) เติมแอนติเจนที่ทำการบำบัดด้วยเอนไซม์ และมีความเข้มข้น 4 HAU ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1-6 และ 8 จากนั้นเคาะเพลทเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากันในแต่ละหลุม

4.) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

5.) เติมเม็ดเลือดแดงไก่ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร

6.) ผสมโดยการเคาะเพลทเบาๆ แล้วปล่อยให้เม็ดเลือดแดงตกที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จนกระทั่งเม็ดเลือดแดงในหลุมควบคุม สังเกตเห็นเป็นเม็ดกระดุมอย่างชัดเจน

7.) อ่านค่าไตเตอร์ (HI titer) คือ ความเจือจางของซีรัมที่สูงที่สุดที่สามารถยับยั้งแอนติเจนความเข้มข้น 4 HAU โดยเอียงเพลทแล้วสังเกตหลุมที่เม็ดเลือดแดงไหลที่อัตราเร็วเท่ากับหลุมควบคุมจึงจะถือว่า เกิดปฏิกิริยาการยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง

8.) ความถูกต้องของผลการทดสอบพิจารณาจากซีรัมควบคุมลบ ต้องมีค่าไตเตอร์ไม่เกิน 2^2

9.) ตัวอย่างซีรัมที่ถือว่าให้ผลบวกต้องมีระดับไตเตอร์สูงกว่า 2^4

ภาคผนวก ค. การเตรียมสารเคมี

สารเคมีสำหรับเตรียมไวรัส

ยาปฏิชีวนะ

- Nystatin	2.5	μg/ml
- Penicillin G sodium	500	IU/ml
- Streptomycin	100	μg/ml
- Oxytetracyclin	100	μg/ml
- Gentamicin	100	μg/ml
store at 4 °C		

0.1 M PBS (pH 7.0-7.4)

- Na_2HPO_4	12.02	g
- KH_2PO_4	2.09	g
- Distilled Water to	1000	ml
นึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บที่	4 °C	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HEPES buffer pH 6.5

- HEPES	5.96	g
- NaCl	8.19	g
- CaCl	0.15	g
- Distilled Water to	100	ml

ปรับ pH ด้วย 1N NaOH นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมีในขั้นตอน gel electrophoresis

6X loading buffer

- 0.25% bromophenol blue
- 40% (w/v) sucrose in water

เก็บที่ 4 °C

5X TBE buffer

- Tris base	54	g
- boric acid	27.5	g
- 0.5 M EDTA pH 8.0	20	ml
- Distilled Water to	1000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

0.5X TBE buffer

- 5X TBE buffer	100	ml
- Distilled Water	900	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมีสำหรับทดสอบ HA และ HI

สารกันเลือดแข็ง

- Sodium citrate	4	g
- Distilled Water to	100	ml

นึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บที่ 4 °C

0.85%NaCl

- NaCl	8.5	g
- Distilled Water to	1000	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีสำหรับเตรียมเพลท ELISA

0.05 M Carbonates-bicarbonate (pH 9.6)

- $Na2CO_3$	1.59	g
- $NaHCO_3$	2.93	g
- Distilled Water to	1000	ml

เก็บที่ 2-7 °C

Blocking Solution

- skim milk	0.75	g
- 0.05 M Carbonates-bicarbonate (pH 9.6)	15	ml

เก็บที่ 2-7 °C

สารเคมีสำหรับชุดทดสอบ ELISA

Dilution buffer

- Na_2HPO_4	12.02	g
- KH_2PO_4	2.09	g
- Tween-20	0.5	ml
- Distilled Water to	1000	ml

เก็บที่ 2-7 °C

washing buffer (pH 9.6)

- NaCl	8.0	g
- KH_2PO_4	0.2	g
- Na_2HPO_4	1.15	g
- KCl	0.2	g
- Tween-20	0.5	ml
- Distilled Water to	1000	ml

เก็บที่ 2-7 °C

Stop solution

- $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	1	g
- Distilled Water to	100	ml

นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่ 2-7 °C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย