การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ตรวจระดับแอนติบอดี โรคอหิวาต์สุกรโดย นิวทราลไลซิง เปอร์ออกซิเดส ลิงค์ แอสเซ

สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน วาสนา ภิญโญชนม์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กทม. 10900

บทคัดย่อ

ได้พัฒนานิวทราลไลซิง เปอร์ออกซิเดส ลิงค์ แอสเซ (NPLA) มาใช้ในการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกร โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อเชื้ออหิวาต์สุกร พบว่าการใช้ MAb ย้อมไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 ซึ่ง fix ไว้ใน microplate แทนการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ให้ผลการตรวจที่ชัดเจนกว่า และจากการตรวจซีรั่มจากฟาร์มสุกรในแถบภาคกลางของประเทศ จำนวน 414 ตัวอย่าง ด้วย NPLA โดยใช้ Mab เปรียบเทียบกับวิธีนิวทราลไลซิงอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (NIF) และวิเคราะห์ทางสถิติด้วย t-test พบว่าทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยค่าความไว และความจำเพาะของ NPLA เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี NIF เป็น 97.6% และ 83.3% ตามลำดับ และจากการหาค่าความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีโดย correlation coefficient ค่า $r = 0.927$ และ $r^2 = 0.86$ ($p<0.001$) แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 วิธี สามารถใช้แทนกันได้

คำสำคัญ : นิวทราลไลซิง เปอร์ออกซิเดส ลิงค์แอสเซ, โรคอหิวาต์สุกร

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคระบาดร้ายแรงซึ่งทำความสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร หลายประเทศทั่วโลกประสบปัญหาการระบาดของโรคนี้ และพยายามหามาตรการกำจัดโรคนี้ให้หมดไป การกำจัดโรควิธีหนึ่งคือการตรวจแอนติบอดี โดยเฉพาะในประเทศที่ไม่มีการฉีดวัคซีน และทำการคัดทิ้งสุกรที่มีแอนติบอดี (Wensvoort et al., 1988) ส่วนในประเทศที่มีการฉีดวัคซีน การศึกษาระดับแอนติบอดีจะเป็นแนวทางในการควบคุม ป้องกันและกำจัดการระบาดของโรค วิธีการตรวจแอนติบอดีสำหรับโรคนี้มีหลายวิธี เช่น อินไดเรคฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี เทคนิค (Ressang & Den Boer, 1969) อินไดเรค เปอร์ออกซิเดส แอนติบอดี เทคนิค (Saunders, 1977) คอมพลีเมนท์ ฟิกเซชั่น (Eskildsen & Overby, 1976) อการ์ เจล ดิฟฟิวชั่นเทส (Pirtle, 1965)

หรือ อิมมูโนอีเลคโทรออสโมโฟเรซิส (Terpstra, 1978) ซึ่งวิธีดังกล่าวไม่สามารถแยกแอนติบอดีระหว่างโรคอหิวาต์สุกรและโรคที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น bovine viral diarrhea (BVD) ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจด้วยวิธีการทำนิวทราลไลเซชั่น ซึ่งมีอยู่ 2 วิธีคือ นิวทราลไลซิง อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (NIF) (Leiss et al., 1976) และนิวทราลไลซิง เปอร์ออกซิเดส ลิงค์ แอสเซ (NPLA) (Holm-Jensen, 1981) แต่วิธี NIF เป็นวิธีที่มีความยุ่งยากในการอ่านผล ต้องใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ การดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์นานๆ จะทำให้สีของการเรืองแสงในเซลล์เพาะเลี้ยงจางหายไป ไม่สามารถนำมาตรวจดูได้อีกเมื่อต้องการ (Afshar et al., 1989)

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อทดลองนำ NPLA ร่วมกับการใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ตรวจแอนติบอดีของโรคอหิวาต์สุกรและเปรียบเทียบกับวิธี NIF ว่ามีความใกล้เคียง แตกต่างกันอย่างไร เพื่อนำมาใช้ตรวจระดับแอนติบอดีโรคอหิวาต์สุกรในห้องปฏิบัติการต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยงและเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไตสุกร PK-15 เลี้ยงด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ Eagle's MEM และ 5 % fetal calf serum (FCS) ซึ่งปราศจากเชื้อและแอนติบอดีต่อเชื้อ BVD เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรใช้ ALD strain เลี้ยง ในเซลล์ PK-15 เป็นเวลา 4 วัน เก็บเชื้อไวรัสที่ได้โดย freeze-thaw 2 ครั้ง ปั่นตกตะกอนแยกส่วนน้ำใส หาปริมาณไวรัส แจก และเก็บที่ -70°C

แอนติบอดี

เตรียม MAb ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรโดยเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Mitsugu Shimizu (National Institute of Animal Health, Japan) ใน Dulbecco's modified eagles medium และ 10 % FCS Supernatant ของ tissue culture fluid มาตกตะกอน 1 ครั้งด้วย 0.5 เท่าของแอมโมเนียม ซัลเฟต ที่อิ่มตัว ปั่นและแยกตะกอน นำตะกอนที่ได้ละลายใน phosphate buffer saline (PBS) โดยให้เข้มข้นเป็น 100 เท่าของ supernatant culture fluid แล้ว dialyse ใน PBS 2-3 ครั้ง และเก็บที่ -20°C

เตรียม โพลีโคลนอล แอนติบอดี (PAb) ต่อเชื้ออหิวาต์สุกร ALD strain ในกระต่าย โดยฉีดเชื้อ ALD strain ซึ่งผสม Freund incomplete adjuvant ในปริมาตรเท่ากัน เข้าใต้ผิวหนังกระต่าย จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อตัว (มล./ตัว) จากนั้น 2 สัปดาห์ ฉีดเชื้อ ALD strain จำนวน 1 มล./ตัว เข้าเส้นเลือด 2 สัปดาห์ต่อมา เจาะเลือดและแยกซีรั่ม แบ่งและเก็บที่ -20°C

คอนจูเกต

การทำ NPLA ในกรณีใช้ MAb หรือ PAb ใช้ goat antimouse peroxidase conjugate (DAKO, Japan) หรือ goat antirabbit peroxidase conjugate (DAKO, Japan) ตามลำดับส่วนวิธี NIF ใช้ฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดี คอนจูเกต

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีและคอนจูเกต โดยทำ checkerboard titration

Substrate solution

ใช้ 3 amino-9-ethyl carbazole ตามวิธีของ Graham et al. (1965)

ตัวอย่างซีรั่มสำหรับตรวจแอนติบอดี

ใช้ซีรั่มจากสุกรที่เลี้ยงในแถบภาคกลางของประเทศ ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการระบาดของโรค จำนวน 414 ตัวอย่าง โดย inactivate ที่ 56°C นาน 30 นาที ทดสอบซีรั่มด้วย NPLA และวิธี NIF วิเคราะห์ทางสถิติ หาค่าความไว และความจำเพาะ (Martin, 1977) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความไว} = \frac{a}{a + c} \times 100\ \%$$

$$\text{ความจำเพาะ} = \frac{d}{b+d} \times 100\ \%$$

a = ซีรั่ม positive โดย NPLA และวิธี NIF

b = ซีรั่ม negative โดย NPLA และ positive โดยวิธี NIF

c = ซีรั่ม positive โดย NPLA และ negative โดยวิธี NIF

d = ซีรั่ม negative โดย NPLA และวิธี NIF

ซีรั่ม positive = ซีรั่มไตเตอร์เท่ากับหรือมากกว่า 1 : 4 โดยวิธี NIF และ NPLA

วิธี NPLA

ดัดแปลงจากวิธีของ Holm-Jensen (1981) โดยทำนิวทราลไลเซชั่นระหว่าง serial 2-fold dilution ของตัวอย่างซีรั่มจำนวน 50 ไมโครลิตรต่อหลุม กับเชื้ออหิวาต์สุกร ALD strain 100 $TCID_{50}$ (50 ไมโครลิตรต่อหลุม) ใน microplate ชนิด 96 หลุม อบในตู้ 37°C ที่มี 5% CO_2 ในบรรยากาศ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 ความเข้มข้น $3x10^5$ เซลล์ต่อมล. (100 ไมโครลิตรต่อหลุม) แล้วอบต่อ นาน 4 วัน fix เซลล์เพาะเลี้ยงใน microplate ด้วย 4% formaldehyde (100 ไมโครลิตรต่อหลุม) ใน 0.5% PBS tween 20 เป็นเวลา 15-20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์เพาะเลี้ยงใน microplate ด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง แอนติบอดีและคอนจูเกตละลายใน 1% bovine serum albumin ใน PBS-tween เติมแอนติบอดี (50 ไมโครลิตรต่อหลุม) นาน 1 ชั่วโมง ล้างและเติมเปอร์ออกซิเดส คอนจูเกต (50 ไมโครลิตรต่อหลุม) นาน 1 ชั่วโมง ล้างและเติม substrate solution (100 ไมโครลิตรต่อหลุม) นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำ 1 ครั้ง สะบัดให้แห้ง แล้วอ่านผลด้วยตาเปล่า ซีรั่มที่เจือจางมากที่สุดและสามารถนิวทราลไลซ์ไวรัสได้หมด ซึ่งไม่ติดสีน้ำตาลแดง จะเป็นระดับแอนติบอดีของซีรั่มนั้น

วิธี NIF

ตามวิธีของ พวงทิพย์และคณะ (2533) โดยทำนิวทราลไลเซชั่นระหว่าง serial 2-fold dilution ของตัวอย่างซีรั่มจำนวน 50 ไมโครลิตรต่อหลุม กับเชื้ออหิวาต์สุกร ALD strain 100 $TCID_{50}$ (50 ไมโครลิตรต่อหลุม) ใน microplate ชนิด 96 หลุม อบในตู้อบ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมส่วนผสมที่ได้ (10 ไมโครลิตร) ลงใน

multiwell slides ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 ความเข้มข้น 4-5x 10^5 เซลล์ต่อมล. (20 ไมโครลิตร) อบในตู้อบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้าง slide ด้วย PBS 1 ครั้ง และ fix slide ด้วย acetone นาน 10 นาที นำมาย้อมด้วยฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดีคอนจูเกต และอ่านผลแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ ซีรั่มที่เจือจางมากที่สุดและสามารถนิวทราลไลซ์ไวรัสได้หมด ซึ่งไม่ติดสีเรืองแสง เมื่อดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ จะเป็นระดับแอนติบอดีของซีรั่มนั้น

ผลการทดลอง

จากการตรวจระดับแอนติบอดีโรคอหิวาต์สุกรด้วย NPLA โดยใช้ MAb พบว่าการติดสีที่ไม่จำเพาะ (non-specific staining) จะน้อยกว่า PAb ทำให้อ่านผลได้ชัดเจนกว่า การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี NIF โดยใช้ซีรั่มจำนวน 414 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ทางสถิติโดย t-test พบว่าทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และจากการหาค่าความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธี โดย correlation coefficient ค่า $r = 0.927$ และ $r^2 = 0.86$ ($p<0.001$) แสดงดังรูปที่ 1 โดยมี regression equation $y = 0.21 + 0.96x$

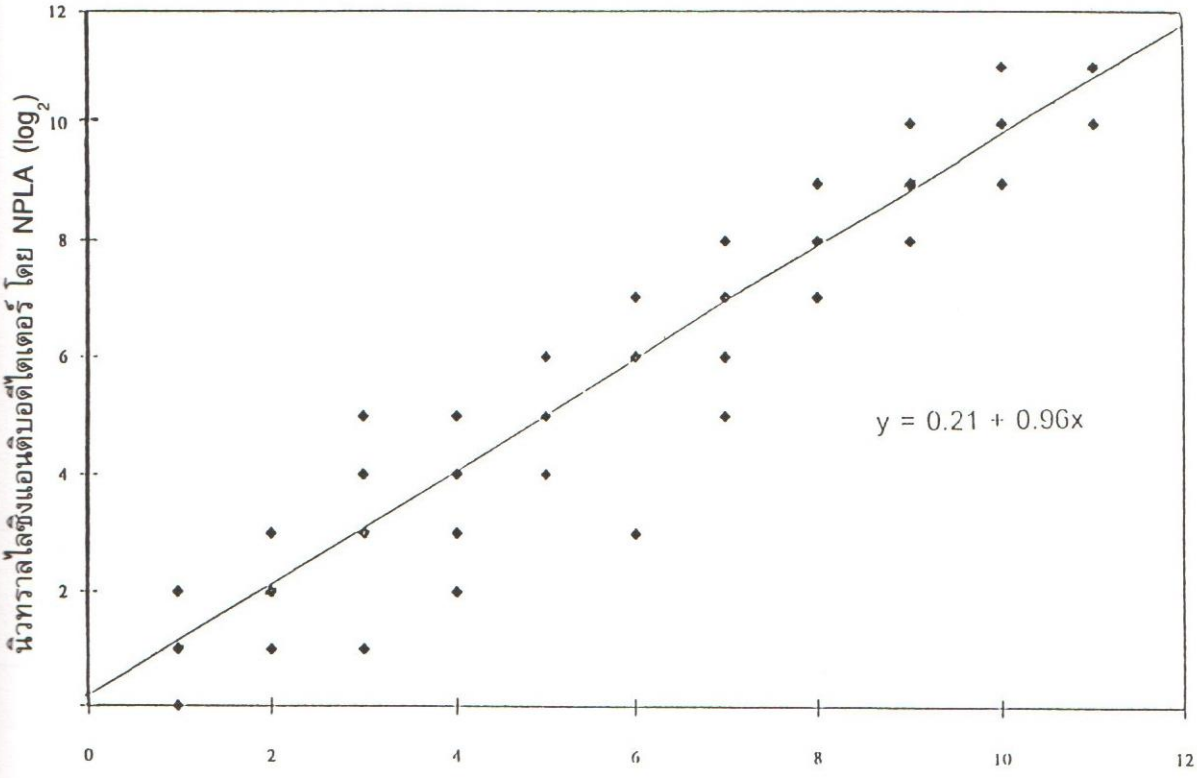
ค่าความไว และความจำเพาะ ของ NPLA เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี NIF เท่ากับ 97.6 % และ 83.3 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าความไว และความจำเพาะของ NPLA และวิธี NIF

		NPLA		
		Pos	Neg	
NIF	Pos	381 (a)	4 (b)	385 (a+b)
	Neg	9 (c)	20 (d)	29 (c+d)
Total		390 (a+c)	24 (b+d)	414

$$\text{ความไว} = \frac{381}{381+9} \times 100\% = 97.6\ \%$$

$$\text{ความจำเพาะ} = \frac{20}{4+20} \times 100\% = 83.3\ \%$$



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของนิวทราลไลซิงแอนติบอดีไตเตอร์ ที่ตรวจโดย NPLA และวิธี NIF

วิจารณ์

จากรายงานของ Afshar et al. (1989) พบว่าการใช้เปอร์ออกซิเดส เลเบล แอนติบอดี แอสเซ ช่วยในการตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มสุกรหลังการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร สามารถตรวจพบแอนติบอดีไตเตอร์ได้ก่อนวิธีที่ใช้อินไดเรคฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีเทคนิค Meyling (1983) ใช้เปอร์ออกซิเดสเทคนิคในการตรวจเชื้อ BVD ในวัว พบว่าให้ความไวในการตรวจ เหมือนกับการใช้ฟลูออเรสเซนต์เทคนิค แต่วิธีการและการอ่านผลง่ายกว่า จากผลการทดลองใช้ MAb แทนการใช้ PAb พบว่าให้ผลการอ่านที่ชัดเจนกว่าอาจเนื่องจาก MAb ที่นำมาใช้เตรียมจาก supernatant ของ tissue culture fluid ของไฮบริโดมาเซลล์ ซึ่งมีแอนติบอดีชนิดอื่นปนเปื้อนน้อยกว่า PAb ที่ได้จากสัตว์ (Harlow & Lane, 1988)

จากการหาค่าความสัมพันธ์ของ NPLA และวิธี NIF โดย correlation coefficient จะเห็นว่า ค่า r และ r^2 มีค่าใกล้ 1.0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมากสามารถใช้แทนกันได้ จากการพิจารณาค่าความไว พบว่า NPLA ให้ค่าความไวค่อนข้างสูง คือ 97.6% ในขณะที่ความจำเพาะเป็น 83.3% ซึ่งอาจเนื่องจาก negative sera ที่ใช้ในการทดสอบมีจำนวนน้อยไป ควรทำการหาค่าความจำเพาะโดยใช้จำนวนซีรั่มที่ไม่มีไตเตอร์ต่อโรคอหิวาต์สุกรมากกว่านี้

สรุป

วิธีที่ใช้ในการตรวจแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรตาม OIE Manual (1995) แนะนำทั้ง NPLA และวิธี NIF ดังนั้นการจะเลือกใช้วิธีใดขึ้นอยู่กับความพร้อมของแต่ละห้องปฏิบัติการ ซึ่งทั้ง 2 วิธีต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ แต่ NPLA สามารถอ่านผลไตเตอร์ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ และยังสามารถนำตัวอย่างมาอ่านผลซ้ำหรือเก็บไว้อ่านผลภายหลังได้โดยสีไม่จางหายไป จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ จากวิธีการและการอ่านผลที่ง่าย ทำให้สามารถตรวจซีรั่มได้ครั้งละจำนวนมาก ทำให้ทราบข้อมูลและสภาวะโรค อันจะนำไปสู่แผนการควบคุมป้องกันโรคอหิวาต์สุกรให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานไวรัสวิทยา และนายสมชาย ช่างทอง ที่ช่วยงานทดลอง และช่วยวิเคราะห์ข้อมูล ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

พวงทิพย์ เมธิยะพันธ์ สุจิรา ปาจริยานนท์ และวาสนา ภิญโญชนม์ 2533. การตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธีไมโครนิวทรัลไลเซชั่น อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ สัตวแพทยสาร 41(2): 83-92.

Afshar, A., Dulac, G.C. and Bouffard, A. 1989. Application of peroxidase labeled antibody assays for detection of porcine lgG antibodies to hog cholera and bovine viral diarrhea viruses. J. Virol. Methods. 23: 253-262.

Eskildsen, M. and Overby, E. 1976. Serological diagnosis of classical swine fever : a comparison of a modified direct complement fixation test with an immunofluorescence plaque neutralization test in the diagnosis of experimental subclinical infection. Acta Vet. Scand. 17: 131-141.

Graham, R.C., Lundholm, U and Karnousky, M.J. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. J. Histochem. Cytochem. 13: 150-152.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Storage and purifying antibodies. In Antibodies : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. p. 283-318.

Holm-Jensen, M. 1981. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhea virus in porcine serum : a comparative examination using CF, PLA and NPLA assays. Acta Vet. Scand. 22: 85-98.

Liess, B., Frey, H.R., Prager, D., Hafez, S.M. and Roeder, B. 1976. Detection of neutralizing antibodies (NIF test) : use of new technical equipment (CCSC system) for laboratory swine fever diagnosis. CEC report on diagnosis and epizootiology of classical swine fever. EUR 5486: 187-197.

Martin, S.W. 1977. The evaluation of tests. Can. J. Comp. Med. 41: 19-25.

Meyling, A. 1983. An immunoperoxidase (PO) technique for detection of BVD virus in serum of clinically and subclinically infected cattle. Proceedings of the third Int. Symp. Ames, lowa. USA, p. 179-184.

Pirtle, E.C. 1965. A soluble precipitating antigen (HCA) from hog cholera virus propagated in tissue culture. II. Incidence of HCA-antibodies in sera of hog cholera immune and non-immune swine. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 28: 297-303.

Ressang, A.A. and Den Boer, J.L. 1969. The indirect fluorescent antibody technique as a method for detecting serum antibodies against hog cholera. Part I. An outline of the technique and its preliminary evaluation. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B. 16: 709-716.

Saunders, G.C. 1977. Development and evaluation of an enzyme labeled antibody test for the rapid detection of hog cholera antibodies. Am. J. Vet. Res. 38: 21-25.

Terpstra, C. 1978. The use of immunoelectro-osmophoresis as a possible aid in the diagnosis of swine fever. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B., 25: 576-585.

O.I.E. Mannual 1995. Classical swine fever (Hog cholera). Chapter 2.1.13 : Amendment 1, May 1995. p. 1-12.

Wensvoort, G., Bloemraad, M. and Terpstra, C. 1988. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. Vet. Micro. 17: 129-140.

Application of Monoclonal Antibody for Detection of Swine Fever Virus Antibodies by Neutralizing Peroxidase Linked Assay

Sujira Parchariyanon Sudarat Damrongwatanapokin Wasana Pinyochon

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Jatujak, Bangkok, 10900, Thailand.

Abstract

Neutralizing peroxidase linked assay (NPLA) using monoclonal antibody (MAb) was developed for detection of swine fever virus (SFV) antibodies in swine sera. Staining positive cells in the microplates using MAb instead of polyclonal antibody in NPLA yielded a better positive reaction. Four hundred and fourteen swine sera from the Central part of Thailand were examined for SFV antibodies by NPLA and neutralizing immunofluorescence (NIF) test. The NPLA had a sensitivity of 97.6% and a specificity of 83.3% when compared with the NIF test. There was no significant difference ($P>0.05$) between the two tests and the correlation coefficient ($r=0.927$ and $r^2=0.86$) was statistically significant ($p<0.001$).

Key word : neutralizing peroxidase linked assay, swine fever