การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ตรวจหาค่าแอนติบอดี ของโรคออเจสกี้ โดยวิธีไมโครอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

สุจิรา ปาจริยานนท์ วาสนา ภิญโญชนม์ อุราศรี ตันตสวัสดิ์

งานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน กทม. 10900

บทคัดย่อ

การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ตรวจหาค่าแอนติบอดีของโรคออเจสกี้ โดยวิธีไมโครอิมมูโนดิฟฟิวชั่น พบว่าแอนติเจนที่เตรียมโดยใช้ *polyethylene glycol (PEG) 6,000* ให้ผลการตรวจดีกว่าแอนติเจนที่เตรียมโดยใช้ *ammonium sulfate*

ทำการตรวจซีรั่มสุกรจำนวน 514 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีไมโครอิมมูโนดิฟฟิวชั่นเปรียบเทียบกับวิธีซีรั่มนิวทราลไลเซชั่น *Specificity* ของวิธีไมโครอิมมูโนดิฟฟิวชั่น เท่ากับ 98.86% และ 94.12% ในซีรั่มสุกรจากกลุ่มทำวัคซีนออเจสกี้และกลุ่มที่มีการเกิดโรคระบาดตามลำดับ วิธีไมโครอิมมูโนดิฟฟิวชั่น ให้ผล *sensitive* สำหรับซีรั่มสุกรกลุ่มที่มีการเกิดโรคระบาด (90.38%) มากกว่าในกลุ่มทำวัคซีน (49.41%)

โรคออเจสกี้ เป็นโรคติดต่อร้ายแรงโรคหนึ่งในสุกรที่เกิดจากเชื้อไวรัส ปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรยังคงประสบกับปัญหาของโรคนี้อยู่มาก เคยมีรายงานการระบาดของโรคนี้ตั้งแต่ปี 2521[1] ซึ่งปัจจุบันก็ยังไม่สามารถจะควบคุมโรคนี้ได้อย่างเด็ดขาด ผลเสียหายที่ตามมาของการระบาดคือความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นนอกจากการป้องกันโรคที่ดีแล้ว วิธีการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคที่สามารถอ่านผลได้รวดเร็วและถูกต้อง ก็จะเป็นการลดความสูญเสียทางหนึ่ง

การตรวจสอบภาวะการติดโรคออเจสกี้ โดยอาศัยค่าแอนติบอดี มีด้วยกันหลายวิธี วิธีที่เป็นที่ยอมรับกันว่าให้ผลเที่ยงตรง แม่นยำ ได้แก่ ซีรั่มนิวทราลไลเซชั่น *(SN)* แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดเพราะต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลได้ซึ่งต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน จึงควรที่จะมีการศึกษาเปรียบเทียบความไว *(sensitivity)* และความจำเพาะ *(specificity)* ในการตรวจด้วยวิธีอื่น

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นการศึกษาถึงการเตรียมแอนติเจน และเปรียบเทียบ ความไวและความจำเพาะระหว่างวิธีไมโครอิมมูโนดิฟฟิวชั่น *(MIDT)* และวิธี *SN*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เซลเพาะเลี้ยง - ใช้เซล *BHK-21* สำหรับทำแอนติเจน และทำ *SN*

น้ำยาเลี้ยงเซล ประกอบด้วย

growth medium

- *Eagle MEM*
- *Tryptose phosphate broth (TPB) 10%*
- *Calf serum 5%*
- *Antibiotic (Penicillin 200 units/ml, Streptomycin 200 units/ml)*
- *3% L-glutamine 17%*

- 7% Sodium bicarbonate 1%

maintenance medium - ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ *growth medium* แต่ไม่ใส่ *serum*

2. ไวรัส - ใช้เชื้อที่แยกได้จากท้องที่ในจังหวัดนครปฐม ผ่านเซล *BHK-21* ประมาณ 20 ครั้ง

3. การเตรียมแอนติเจน - ผ่านไวรัสในเซลเพาะเลี้ยง ซึ่ง *cytopathic effect (CPE)* จะเกิดหลังอบที่ *37°c* 24-48 ชั่วโมง

- นำเซลที่ได้ไป *freeze-thaw* 1 ครั้ง, *sonicated 20 K cycles/second* นาน 1 นาที แล้วปั่น 755 *g* นาน 20 นาที เก็บส่วนใสไว้

3.1 วิธีที่ 1 - นำส่วนใส 100 มล. ผสมกับ *ammonium sulfate 42.5* กรัม[3] ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่ *4°c 1* คืน ปั่น 1,500 *g 40* นาที เอาตะกอนที่ปั่นได้ละลายใน *saline-tris-EDTA buffer*[8] *(STE buffer)* โดยทำให้มีปริมาตรเป็น 1/60 เท่าของปริมาตรเดิม นำเอาตะกอนที่ละลายแล้ว *dialyze* ในน้ำกลั่นที่ *4°c* โดยใช้ *dialyzing membranes* เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกครึ่งชั่วโมงประมาณ 4 ครั้ง ครั้งที่ 5 เก็บไว้ที่ *4°c* 1 คืน แล้วนำมาทำให้แอนติเจนเข้มข้นเป็น 100 เท่า ของปริมาตรเดิม โดยใช้ *PEG* 20,000 ใส่ไว้รอบ ๆ *dialyzing membranes* หลังจากได้แอนติเจนที่มีปริมาตรตามต้องการแล้ว นำไป *dialyze* ใน *buffer* ซึ่งมี 0.14 *M Nace* และ 0.05 *M tris-(hydroxy methyl) aminomethane pH 7.2* เปลี่ยน *buffer* 5 ครั้ง

ผสม 0.1*M bromoethylamine (BEA)* ใน 0.2 *N Sodium hydroxide* แล้วทิ้งไว้ที่ *37°c 1* ชั่วโมง จะได้ *bromoethylenimine (BEI)*[2,6] นำ *BEI* ไป *inactivate* แอนติเจนที่ได้โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.01*M* นาน 6 ชั่วโมง ใน *waterbath 37°c*[11] และใช้ 1% *(V/V)* ของ *1 M Sodium thiosulfate* ในการ *neutralize BEI* ส่วนที่เหลือ แอนติเจนที่ได้เก็บไว้ที่ *–70°c*

3.2 วิธีที่ 2 - นำส่วนใสที่เก็บไว้ผสมกับ 50% *PEG 6,000* โดยทำให้ได้ *final concentration* เป็น 10%[10] กวนโดยใช้ *magnetic stirrer* ที่ *4°c* นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่น 1,500 *g* นาน 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ ใน *STE buffer* โดยทำให้ปริมาตรเป็น 1/50 เท่าของปริมาตรเดิม เขย่าให้เข้ากันประมาณ 20 นาที ปั่น 1,500 *g* นาน 20 นาที ส่วนใสที่ได้คือแอนติเจนที่ทำให้เข้มข้น 50 เท่าของปริมาตรเดิม

นำแอนติเจนที่ได้ไป *inactivate* เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 แล้วเก็บไว้ที่ *-70°c* สำหรับการทดลอง

4. *MIDT* - ใช้ 0.69% และ 1% *agarose* ตามวิธีของ *Gutekunst et al.*[3]

5. SNT - ตามวิธีของ *Hill et al.*[4]

6. Referenced serum - ใช้ซีรั่มที่มีไตเตอร์ 1 : 64 ในการทำ *MIDT*

7. Test sera - ซีรั่มใช้ในการทดลองได้จากฟาร์มเลี้ยงสุกรแถบภาคกลางของประเทศ โดยสุ่มจากฟาร์มที่มีการทำวัคซีนออเจสกี้ และฟาร์มที่มีการระบาดของโรคนี้ จำนวนทั้งหมด 514 ตัวอย่าง

ค่า *sensitivity* และ *specificity* คำนวนโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Specificity} = \frac{MIDT\,(+)\,SN\,(+)}{MIDT\,(+)\,SN\,(+) + MIDT\,(-)\,SN\,(+)} \times 100\%$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{MIDT\,(-)\,SN\,(-)}{MIDT\,(-)\,SN\,(-) + MIDT\,(+)\,SN\,(-)} \times 100\%$$

MIDT (+) = *microimmunodiffusion positive*

MIDT (−) = *microimmunodiffusion negative*

SN (+) = *serum neutralization positive*

SN (−) = *serum neutralization negative*

ผลการทดลอง

การเตรียมแอนติเจนสำหรับ *MIDT* โดยใช้ *ammonium sulfate* ตามวิธีที่ 1 ใช้เวลาในการเตรียมแอนติเจนมากกว่าวิธีที่ 2 ซึ่งใช้ *PEG 6,000* ในขณะที่ *precipitin line* ที่ได้ไม่คมชัด เปรียบเทียบกับเมื่อใช้แอนติเจนที่เตรียมโดยวิธีที่ 2 ดังนั้นจึงใช้แอนติเจนที่เตรียมโดยวิธีที่ 2 ในการศึกษาขั้นต่อ ๆ ไป

สำหรับการใช้ 0.69% และ 1% *agarose* พบว่า 0.69% *agarose* ให้ *precipitin line* ชัดกว่า 1% จึงใช้ 0.69% *agarose* ในการทดสอบขั้นต่อไปเช่นกัน

ผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากแอนติเจนที่เตรียมตามวิธีที่ 2 ต่อซีรั่มที่มี *SN* ไตเตอร์ต่าง ๆ กันแสดงใน *Fig.1*

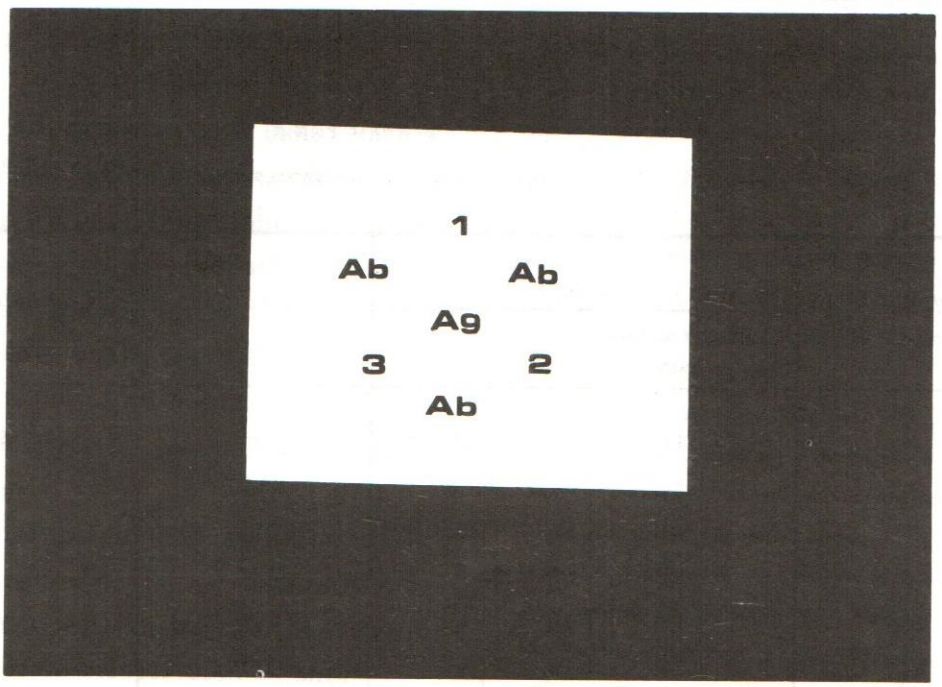

Fig 1. *Microimmunodiffusion reactions between Aujeszky viral antigen and swine sera. Ag = Aujeszky antigen, Ab = referenced antiserum, 1 = positive Aujeszky antiserum (SN titer, 128), 2 = positive Aujeszky antiserum (SN titer, 32), 3 = negative swine serum*

Table 1. *The Aujeszky MIDT sensitivity and specificity, using serum samples form vaccinated swine*

SN titer	MIDT			Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Serum Samples tested	+	−		
Neg	88	1	87	—	98.86
4	56	4	52	7.14	
8	69	19	50	27.54	
16	50	24	26	48.00	
32	25	25	0	100	
64	17	17	0	100	
128	15	15	0	100	
256	21	21	0	100	
Total (av.)	253	125	128	49.41	

Table 2. *The Aujeszky MIDT sensitivity and specificity, using serum samples from infected swine.*

SN titer	MIDT			Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Serum samples tested	+	−		
Neg	17	1	16	—	94.12
4	29	14	15	48.27	
8	34	34	0	100	
16	21	21	0	100	
32	10	10	0	100	
64	18	18	0	100	
128	6	6	0	100	
256	38	38	0	100	
Total (av.)	156	141	15	90.38	

จาก *Table 1* และ *Table 2* ค่า *sensitivity* และ *specificity* ของ *MIDT* ของสุกรกลุ่มทำวัคซีน และสุกรกลุ่มที่มีการเกิดโรคระบาดเท่ากับ 49.41%, 98.86% และ 90.38%, 94.12% ตามลำดับ ค่า *sensitivity* ให้ผล 100% ที่ *SN* ไตเตอร์ มากกว่าหรือเท่ากับ *1:32* ในกลุ่มทำวัคซีนและมากกว่าหรือเท่ากับ *1:8* ในกลุ่มที่มีการเกิดโรคระบาด

วิจารณ์

แอนติเจนที่เตรียมสำหรับ *MIDT* ตามวิธีที่ 1 ให้ผล *precipitin line* ไม่คมชัดเหมือนวิธีที่ 2 และใช้เวลาในการเตรียมมากกว่าวิธีที่ 2 ซึ่งการใช้เวลาในการเตรียมหลายวันอาจจะมีผลทำให้ไวรัสสูญเสียคุณสมบัติบางประการ ทำให้ได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร

เป็นที่ทราบกันดีว่า วิธี *SN* ใช้วัด *neutralizing activity* ส่วน *MIDT* วัด *precipitating activity* ออเจสกี้แอนติบอดี ของซีรั่มสุกร มีทั้ง *neutralizing* และ *precipitating activity* ดังนั้น จึงสามารถใช้ทั้งวิธี *SN* และ *MIDT* ในการหาแอนติบอดี ไตเตอร์ และอาจจะเป็นไปได้ว่า ในซีรั่มที่ค่า *SN* ไตเตอร์ต่ำ *precipitating activity* มีไม่พอที่จะให้ผลบวกใน *MIDT* ในขณะที่ *neutralizing activity* มีเพียงพอที่จะให้ผลบวกต่อวิธี *SN* จึงทำให้ *sensitivity* ของ *MIDT* ต่ำกว่าวิธี *SN* แม้ว่า *sensitivity* ของวิธี *SN* จะมากกว่า แต่ก็ใช้เวลาในการทดสอบนานกว่าและต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่สามารถเลี้ยง *tissue culture cell* ได้ และเป็นวิธีที่มีราคาแพงกว่า[9]

ซีรั่มที่ให้ผลลบจากวิธี *SN* แต่ให้ผลบวกใน *MIDT* อาจเนื่องจาก ซีรั่ม *toxic* ต่อเซลเพาะเลี้ยง ทำให้ไม่สามารถอ่านผล *SN* ไตเตอร์ได้[7] แต่ซีรั่มที่ *toxic* ต่อเซลเพาะเลี้ยงจะไม่มีผลต่อ *MIDT*

จากการทดลองทำให้ทราบว่า *MIDT* จะ *sensitive* ต่อการทดสอบแอนติบอดีในสุกรกลุ่มที่มีการเกิดโรคระบาด มากกว่ากลุ่มทำวัคซีน ซึ่งอาจเนื่องจากสุกรทั้ง 2 กลุ่ม ได้รับแอนติเจนที่แตกต่างกัน ซึ่งแอนติเจนที่แตกต่างกันมีผลทำให้สุกรกลุ่มที่มีการเกิดโรคระบาดสร้างแอนติบอดีที่มี *precipitating activity* มากกว่า *neutralizing* แอนติบอดีเมื่อเทียบกับกลุ่มทำวัคซีน[5] ดังนั้น *MIDT* จึงเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของโรคนี้ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการควบคุมและกำจัดโรคนี้ให้หมดไป

เอกสารอ้างอิง

1. บุญมี สัญญสุจจารี; พิเคราะห์ อาจทรงคุณ; และมาโนช เฟื่องฟูพงศ์. 1978 (2521). รายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการพบโรคซึ่งมีลักษณะของ *Aujeszky's disease* ใน สุกร.สัตวแพทยสาร 29(3) : 1-11.
2. *Bahnemann, H.G. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for Foot-and Mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch. Virol. 47:47-56.*
3. *Gutekunst, D.E.; Pirtle, E.C.; and Mengeling, W.L. 1978. Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. Am. J. Vet. Res. 39:207-210.*
4. *Hill, H.T.; Crandell, R.A.; Kanitz, C.L.; McAdaragh, J.P.; Seawright, G.L.; Solorzano, R.F.; and Stewart, W.C. 1977. Recommended minimum standards for diagnostic tests employs in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). Proc. Ann. Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diag. 20:375-390.*
5. *Johnson, M.E.; Thawley, D.G.; Solorzano, R.F.; and Wright, J.C. 1983. Evaluation of the microimmunodiffusion test for the detection of antibody to pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res. 44(1) : 28-30.*
6. *Larghi, O.P.; and Nebel, A.E. 1980. Rabies virus inactivation by binary ethylenimine : New method for inactivated vaccine production. J. Clin. Microbiol. 11(2) : 120-122.*
7. *Pfeiffer, N.E.; and Schipper, I.A. 1977. An immunodiffusion test for detection of antibody to pseudorabies virus. Proc. Ann. Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diag. 20 : 33-46.*

8. *Robson, M.; Beaty, B.J.; Hildreth, S.W.; and Shope, R.E. 1981. Production of hemagglutinating antigens of La Crosse virus by polyethylone glycol precipitation. J. Clin. Microbiol. 13(3) : 601-602.*

9. *Smith, P.C.; and Stewart, W.C. 1987. Agar-gel immunodiffusion assay for pseudorabies virus antibody. J. Clin. Microbiol. 7(5) : 423-425.*

10. *Sugimura,; and Tanaka,. 1978. The use of polyethylene glycol in concentration and purification of several bovine viruses. Nat.Inst. Anim. Hlth. Quart. 18 : 53-57.*

11. *Sun, I.L.; Gustafson, D.P.; and Scherba, G. 1978. Comparison of pseudorabies virus inactivated by bromoethylene-limine, ^{60}Co irradiation and acridine dye in immune assays systems. J. Clin. Microbiol. 8 : 604-611.*

Antigen Preparation for the Detection of Aujeszky Antibodies by the Microimmunodiffusion Test

Sujira Parchariyanon Wasana Pinyochon Urasri Tantaswasdi

Virology Section, National Animal Health and Production Institute, Bangkaen, BKK. 10900

ABSTRACT

Antigens concentrated and purified by polyethylene glycol (PEG) 6,000 and ammonium sulfate were used to detect Aujeszky antibodies in vaccinated and infected swine. The PEG purified antigen gave better result than the latter one and was used for microimmunodiffusion test (MIDT).

Five hundred and fourteen swine sera were tested, using both the MIDT and the serum neutralization test (SN). The specificity of the MIDT, using serum samples from vaccinated and infected swine, were 98.86% and 94.12%, respectively. The MIDT was found to be more sensitve for the detection of antibodies in infected swine (90.38%) than in vaccinated one (49.41%).