การตรวจหาความคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี

Agar gel Precipitin Test

โดย พินิจ ศุภวิไล และ ร.ต. พยม ตรงสวัสดิ์

สรุป

ซีรัมจากสัตว์ที่หายป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย (Convalescent serum) เมื่อนำมาทำปฏิกริยากับเชื้อวิสาชนิดเดียวกัน (Homotypic virus) ในวุ้นจะเกิด Precipitin line เห็นชัดได้ด้วยตาเปล่า เชื้อวิสาที่ใช้ในการทดลองใช้เชื้อวิสาจาก vesicular fluid ได้กล่าวถึงการใช้เชื้อวิสาจากเยื่อดนและจาก Frenkel culture ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน โดยการทำให้เชื้อวิสานั้นเข้มข้นก่อนที่จะนำมาใช้ นอกจากนี้ยังกล่าวถึงการตรวจหาความคุ้มโรคในซีรัมจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโดยเปรียบเทียบกับผลการปลูกพิษทับด้วย

คำนำ

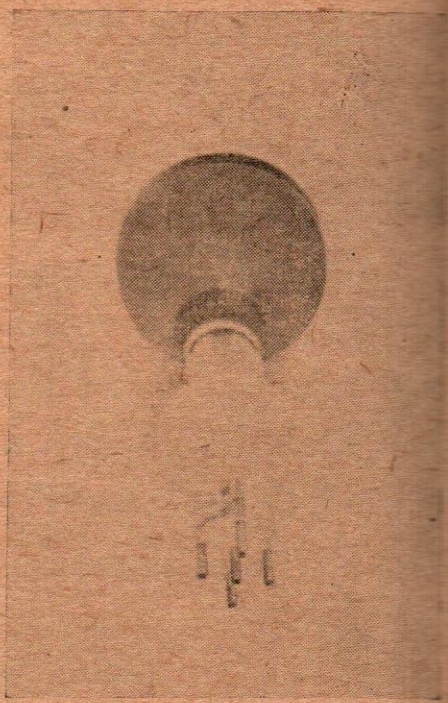
หลังจาก Oudin (๑๙๔๒) และ Ouchterlony (๑๙๔๘) ได้อธิบายถึงวิธี Agar gel Precipitin techniques แล้ว ได้มีผู้นำมาใช้ในการตรวจหา Complex protein mixture อย่างแพร่หลาย ในทาง Virology ได้มีผู้นำมาใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อวิสา เช่น Pox group โดย Gispen (๑๙๕๕) และ Myxomatosis โดย Mansi (๑๙๕๗) นอกจากนี้ยังได้มีการนำใช้เกี่ยวกับ Immunological types ของ Virus influenza โดย Jensen และ Francis (๑๙๕๓) และของโรคปากเท้าเปื่อย โดย Bodon (๑๙๕๕). โดย Brown และ Crick (๑๙๕๗) สำหรับรายงานนี้ได้กล่าวถึงการนำมาใช้เพื่อตรวจหาความคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมสัตว์ที่หายป่วยและในซีรัมสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคนี้ไว้ และถือว่าเป็นเพียงรายงานเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งสมควรจะได้ทดลองในรายละเอียดต่าง ๆ ตลอดจนให้ได้สถิติมากขึ้น เพื่อให้ได้ผลเฉลี่ยแน่นอนยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

วุ้นที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ตามวิธีของ Brown และ Crick (๑๙๕๙) เพราะทำได้ง่าย และสะดวกกว่าวิธีของ Mansi (๑๙๕๗) ทำ Stock ๕ % washed agar โดยหลอมละลาย Bacto - agar ของ difco ในน้ำกลั่น เมื่อเย็นแล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ๓–๕ ครั้ง แช่ทิ้งไว้ครั้งละ ๕ – ๖ ช.ม. ตามวิธีของ William และ Garbar (๑๙๕๕) วุ้นที่ได้จะใส, เก็บไว้ใช้ทำ Diffusion medium ต่อไป

Diffusion medium ใช้ agar ๑.๕ % โดยนำ ๕% washed agar มาหลอมละลายใน Veronal Buffer ธรรมดาที่ใช้ในการทำ Complement fixation test ตามวิธีของ Brooksby (๑๙๕๒) และเติม Sodium merthiolate ให้มีความเข้มข้น ๑ ใน ๑๐,๐๐๐ ใช้ไปเปตดูดวุ้นที่กำลังหลอมละลายนี้ใส่ลงในจานแก้ว (Petridish) ขนาด 10 cm. โดยใส่จานละ 15 ml. ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องอย่างน้อย ๒๔ ช.ม. ก่อนนำไปใช้



ภาพแสดงเครื่องเจาะวุ้น

วิธีใช้เจาะรูขนาด 2 m.m. ห่างกัน 8 mm. ด้วยเครื่องเจาะ (ดูรูป) รูหนึ่ง ๆ จะจุได้ 30 ml. โดยปกติใช้ Pasteur pipettes หยด antigen ลงในรูกลางและหยด antiserum ในรูรอบ ๆ หลังจากหยด ๓ – ๕ ครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จะเกิด precipitin lines ภายใน ๒๔ ถึง ๔๘ ช.ม.

การเตรียมเชื้อวิสา

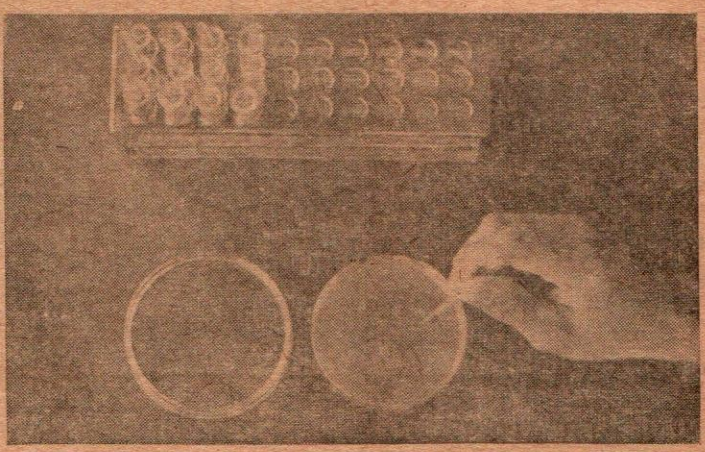
โดยปกติใช้เชื้อวิชาจาก vesicular fluid ที่ฉีดโคซึ่งใช้ผ่านเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย หรือที่ฝ่าเท้าหลังของหนูตะเภาที่ใช้ผ่านเชื้อเช่นกัน เชื้อวิสาจากเยื่อฉีดหรือจาก frenkel

culture ที่ใช้ผลิตวัคซีนก็สามารถทำให้เกิด precipitn lines ได้เช่นกัน แต่ต้องทำให้เข้มข้นเสียก่อน

วิธีทำให้เข้มข้นก่อนอื่นต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วย choroform หรือด้วย Freon 113 หรืออาจใช้วิธีกรองด้วยเครื่องกรอง Seitz EK. ถ้ามีจำนวนเชื้อไวรัสที่สกัดได้มากพอ ตามรายงานของ Girard และ Pinit Suphavilai (๒๕๐๔) หลังจากนั้นทำให้เข้มข้นโดยการทำให้ตกตะกอนด้วย Acetone หรือโดย Dialysis ตามวิธีของ Kohn (๑๙๕๙) ก็ได้

การเตรียมซีรัม

ซีรัมจากหนูตะเภา (Type specific hyperimmune sera) สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกเชื้อโดยวิธี Complement fixation test ซึ่งวิธีทำได้กล่าวไว้โดยละเอียดโดยพินิจ ศุภวิไล (๒๕๐๒) ใช้เป็น control sera. โดยใช้ความเข้มข้น 1/8 ถึง 1/64 ตามลำดับ ทั้งนี้ขนกับ Titre ของ serum นั้น ๆ ด้วย



ภาพแสดงการหยดเชื้อไวรัสลงในรูกลางโดย Pasteur pipette

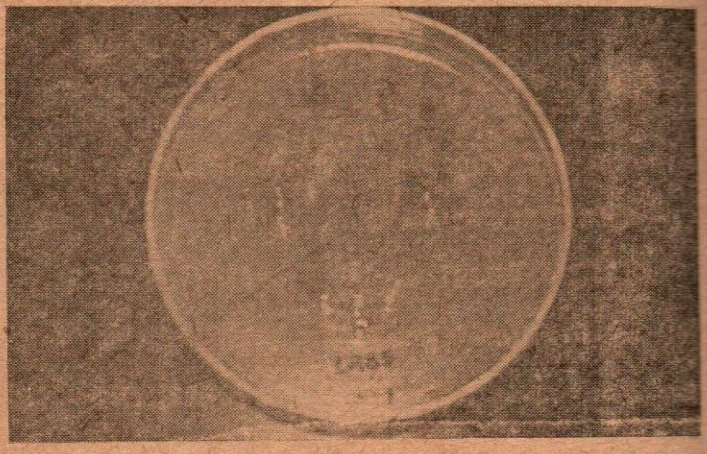
สำหรับซีรัมของโคกระบือที่ใช้ในการทดลองได้จากการเจาะเลือดแล้วทิ้งไว้ให้ clot หลังจากนั้นแยกซีรัมด้วยเครื่องปั่น ส่วนซีรัมที่ได้จากท้องที่นั้นหลังจากเลือด clot แล้วแยกซีรัมโดยการเทหรือดูดด้วยกระบอกฉีดยาใส่ขวดที่มี Sodium merthiodate ส่งมายังสถานผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทางพัสดุไปรษณีย์ ซึ่งมักมีเม็ดเลือดติดมาด้วยจึงต้องปั่นแยกซีรัมออกอีกครั้งหนึ่ง ซีรัมที่ได้ดังกล่าวนำไปตรวจโดยใช้ความเข้มข้น undiluted ถึง 1/8 ตามลำดับ เพื่อใช้พิจารณาในกรณีที่สัตว์มีความคุ้มมากกว่า 1 Type ว่า Type ใดเป็น Type ที่เกิดใหม่

น้ำยาที่ใช้เป็นตัวทำให้เจือจางใช้ Veronal buffer.

ผลการทดลอง

เชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละ Type สามารถทำให้เกิด Precipitin lines ด้วย Homotypic antirerum ได้ Cross reaction ระหว่าง Type ไม่ค่อยมีเชื้อวิสาชนิด Complete virus จะให้ 2 lines ห่างกันประมาณ 1 mm. ซึ่งเป็น line ของ Crick particle ขนาด 7 mm. และ 20 mm. ตามลำดับรายงานของ Brown และ Crick (๑๙๕๙) ได้ทดลองกับเชื้อวิสาที่มีในประเทศไทยคือ Type O, Type A และ Type Asl ปรากฏว่าได้ผลเช่นกัน (ดูรูป)

ได้ทดลองตรวจหาความคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมสัตว์ที่หายป่วย (Convalescent serum) และซีรัมสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคนี้ไว้ โดยเปรียบเทียบผลกับผลการปลูกพิษทับ ปรากฏผลดังต่อไปนี้



ภาพแสดงการตรวจซีรัมสัตว์ที่หายป่วย ซึ่งส่งมาจากประเทศลาว

ผลการตรวจซีรัมของสัตว์ที่หายป่วย (Convalescent serum)

ได้ตรวจซีรัมของสัตว์ที่หายป่วยในการทดลองปลูกพิษทับ และซีรัมของสัตว์ที่หายป่วยในท้องที่ซึ่งสัตวแพทย์ในท้องที่ส่งมาให้ตรวจ รวมทั้งการส่งเจ้าหน้าที่ไปเก็บซีรัมในท้องที่เช่นที่ จ.ว. เพชรบุรี, ราชบุรี (มิ.ย. – กค. ๐๔) และในท้องที่ จ.ว. หนองคาย, อุดรธานี, สกลนคร (ธ.ค. ๐๔) ผลการตรวจจนถึง ๓๐ ก.ค. ๐๕ มีดังต่อไปนี้

๑. ซีรัมจากสัตว์ทดลองปลูกพิษทับ

ก. จากโค ๔๘ ตัวได้ผล	๔๒ ตัว
ข. จากกระบือ ๓๘ ตัวได้ผล	๓๗ ตัว

๒. ซีรัมจากท้องที่รวมทั้งที่ส่งเจ้าหน้าที่ไปเก็บ

ก. จากโค ๖๔ ตัวได้ผล ๕๓ ตัว

ข. จากกระบือ ๓๘ ตัวได้ผล ๓๗ ตัว

รวมทั้งจากสัตว์ทดลองและจากท้องที่

จากโค ๑๑๒ ตัวได้ผล ๙๕ ตัว = ๘๔ %

จากกระบือ ๕๓ ตัวได้ผล ๔๘ ตัว = ๙๒ %

เมื่อคิดรวมทั้งโคและกระบือ

โคกระบือ ๑๖๕ ตัวได้ผล ๑๔๔ ตัว = ๘๗ %

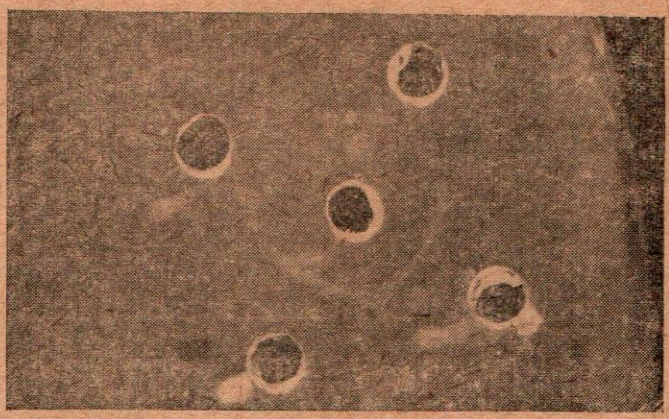
ผลการตรวจซีรัมของสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย

ได้ตรวจซีรัมของสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนก่อนที่จะทำการปลูกพิษทับ เพื่อเทียบเคียงกับผลการปลูกพิษทับ ได้ผลดังต่อไปนี้.

ก. จากโค ๕๘ ตัวได้ผลตรงกับผลการปลูกพิษทับ ๕๑ ตัว = ๘๘ %

ข. จากกระบือ ๓๔ ตัวได้ผลตรงกับผลการผลปลูกพิษทับ ๒๙ ตัว = ๘๕ %

ถ้าคิดรวมทั้งโคและกระบือที่ให้ผลตรงกับการปลูกพิษทับแล้ว โคกระบือ ๘๒ ตัวได้ผลตรงกับผลการปลูกพิษทับ ๗๙ ตัว = ๘๖ %



ภาพขยายแสดงเส้นขาว ๆ ของ Precipitin Line แสดงว่าเป็น Positive reaction

ข้อคิดเห็น

วิธี Agar Gel precipitn test ไม่อาจใช้สำหรับตรวจจำแนกเชื้อวิสาปากและเท้าเปื่อยเป็นงานประจำเหมือนกับวิธี Complement fixation test เพราะต้องใช้เชื้อวิสาที่

เข้มข้นมากเช่นจาก vesicular fluid สมควรนำมาใช้สำหรับตรวจหาความคุ้มโรคดังกล่าว ในระยะที่มีโรคปากและเท้าเปื่อยเกิดขึ้น สัตวแพทย์ไปถึงจุดเกิดโรคก็สัตว์หายป่วยเกือบหมดแล้วหรือเป็นระยะปลายของโรค ไม่สามารถเก็บเยื่อดนมาเพื่อตรวจตามวิธี Complement fixation test ได้ ก็อาจเจาะเลือดแยกซีรัมส่งมาให้ตรวจ เพื่อทราบว่าเชื้อที่เกิดขึ้นแล้วนั้นเป็น Type อะไร ทำให้สามารถทราบการระบาดและสภาพของโรคที่จุดเกิดโรคนั้นได้

การตรวจซีรัมสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนไว้ ก่อนนำมาปฏิกิริยาทับเพื่อเปรียบเทียบกับผลการปฏิกิริยาทับ เพื่อให้ทราบว่าได้ผลสัมพันธ์กันเพียงใด ซึ่งจะทำให้ทราบได้ล่วงหน้าว่าสัตว์ตัวใดจะมีความคุ้มโรคต่อการ ปฏิกิริยา ทับหรือไม่ เป็นการประหยัดเวลาในการทดลอง และสมควรจะได้ทดลองกับสัตว์ก่อนฉีดวัคซีนด้วยเพื่อให้ได้ผลแน่นอนยิ่งขึ้น

จากผลการทดลองนับว่าได้ผลดีพอใช้ สมควรจะได้ทดลองต่อไปให้มากขึ้นเพื่อให้ได้ผลเฉลี่ยแน่นอนยิ่งขึ้น และจะได้ข้อมูลต่าง ๆ มากขึ้นด้วย

ผู้รายงานขอขอบคุณ นายอุดม จารุตามระ หัวหน้าสถานผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่อนุญาตให้ทำการทดลองนี้ ตลอดจนให้ข้อแนะแนวในการเขียนรายงานนี้ และขอขอบคุณ Dr. H. C. Girard ที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทำให้เชื้อให้เข้มข้นตลอดจนจัดอุปกรณ์ในการทำ มา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

Boben, L (1955) Typing Foot-and-mouth disease virus with the agar gel diffusion method. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 5, 157.

Brooksby, J. B. (1952) The technigne of complement fixation in foot-And-mouth disease research. Agr. Rerearch council Spec. Rept. Ser. No. 12,p 18.

Brown, F., and Crick, J. (1957) Specific precipitin reaction with the virus of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. Nature 179,316

Brown, F., and Crick, J. (1958) Application of agar-gel precipitin test to the study of the virus of foot-and-mouth disease. Virology, 5, 133

Gispen, F. (1955) Analysis of pox-virus antigens by means of Double diffusion. J. Immunol. 47, 134

Jensen, K.E., and Francis. T. (1953) Antigen-antibady precipitates in solid medium with influenza virus. J. Immunol. 70, 321

Kohn, J. (1959) A simple method for the concentration of fluid containing protein. Nature 183, 1055

Mansi, W. (1957) The study of some viruses by the plate gel diffusion precipitin test. J. Comp. Pathol. Therap. 67, 297.

Ouchterlony, O. (1949) Antigen-antibody reaction in gels. Ark. Kimi, mineral., Geol. 26 B, No. 14, 1.

Williams, C. A., and Grabar, P. (1955) Immunoelectrophoretic studies on serum protein 1 The antigens of human serum. J. Immunol. 74, 158.

พินิจ ศุภวิไล. (๒๕๐๒) การตรวจแยกเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย ที่สถานผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย หนองสาหร่าย สัตวแพทยสาร ปีที่ ๑๐ เล่ม ๒ หน้า ๑๐.

Girard, H.C., Suphavilai Pinit (2504) The practical problems of foot-and-mouth disease virus fillration on asbestos disks.

สัตวแพทยสาร ปีที่ ๑๒ เล่ม ๓