

การนำไมโครเทคนิคมาใช้กับ อินดิเร็คคอมพลีเมนต์ฟิกเชชัน โรคปากและเท้าเปื่อย

(APPLICATION OF A MICRO TECHNIQUE TO INDIRECT
COMPLEMENT FIXATION IN FOOT-AND-MOUTH DISEASE)

ฉวี คุงิวไล สท.บ.,* Mitsuo Hasegawa D.V.M.,** สุณีจิต คงทน สท.บ.*

SUMMARY

The comparison of the antibody titers of 1,254 cattle serum samples as determined by indirect complement fixation (I.C.F.) test in micro plates and tube test was presented. Eight hundred and thirty four (66.5%) samples yielded the same level antibody titer; whereas two hundred and nine (16.7%) samples gave two-folds lower and one hundred and seven (8.6%) samples gave two-folds higher titers by microplate method.

บทนำ

Dr. Gyula Takatsy, (1) (2), เป็นคนแรกที่น่าเอาระบบ Micro titrator มาใช้ในปี 1950 ตลอดจนถึงในทางซีโรโลยี ในปี 1955 แต่ก็จำกัดวงอยู่ในหมู่นักสัตววิทยาอังกฤษ ต่อมา Sever, J.L. 1962, (3), ได้นำมาใช้บ้างโดยดัดแปลงแก้ไขเครื่องมือเครื่องใช้บางอย่าง และนำมาทดลองใช้ในทางซีโรโลยี เช่น complement fixation (C.F.) test, Hemagglutination (H.A.) test, Hemagglutination inhibition (H.I.) test,

* รับผิดชอบปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย หนองสาหร่าย, ปากช่อง, นครราชสีมา. หัวหน้าสถานปฏิบัติการ นายสัตวแพทย์ ประคัลภ์ สมิตินันท์.

** Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture and forestry, Japan.

ตลอดจน Metabolic inhibition test. Sever เน้นหนักในเรื่องการทำความสอาดเครื่องมือ-เครื่องมือ จากผล C.F. test ของ sever ซึ่งใช้กับ Antigen ต่าง ๆ 14 ชนิดด้วยกัน ปรากฏว่า Microtest ให้ผลไม่แตกต่างกับ Macro test เกินสองเท่า ต่อมาบริษัทต่าง ๆ *** ได้ผลิตเครื่องมือเครื่องใช้เกี่ยวกับ Microtitration ออกสู่ตลาด ทำให้มีผู้นำไปใช้อย่างแพร่หลายในสาขาต่าง ๆ เช่น Casey H.L. 1965, (4) ได้นำไปใช้กับ LBCF Method ปรากฏผลว่าได้ผลตรงกับ Tube test และ Witlin, B. 1967, (5) ได้นำวิธี Micro titrator technique ไปใช้ตรวจหาภูมิคุ้มกันทางซีโรโลยี โดยระบุถึงเครื่องมือเครื่องใช้อย่างละเอียด สำหรับทางด้านโรคปากและเท้าเปื่อย Forman, A.J. 1974. (6) ก็ได้นำวิธี Micro platetest มาใช้ตรวจหาความแตกต่างของ strains ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ tube test ปรากฏว่าสามารถแยกหาความแตกต่างกันได้ แต่ในกรณีที่มี antigen แตกต่างกันเล็กน้อย Tube test ได้ผลละเอียดดีกว่า ทั้งหมดนี้เป็นการทดลองเกี่ยวกับ Direct C.F. test

ส่วน Indirect Complement Fixation (I.C.F.) Test ที่ทดลองนับแต่ Rice, C.E. 1953, (7) ได้เริ่มนำมาใช้กับโรคปากและเท้าเปื่อยแล้ว ก็ไม่มีการใช้กันแพร่หลายนัก Tokuda G. 1970, (8) ได้ทดลองใช้ที่สถานปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย หนอง-สาหร่าย ปากช่อง นครราชสีมา และได้มีการทดลองต่อเนื่องกันมาโดย Sakaki, K. 1971, (9), 1973, (10) และ (11) ตลอดจน Hasegawa, M. 1975, (12) ซึ่งล้วนแต่ใช้วิธี Tube test ทั้งสิ้นเป็นแต่ใช้ Antigen แตกต่างกันไป

อุปกรณ์ และ วิธีการ

สำหรับ Macro หรือ Tube test ใช้วิธีที่กล่าวไว้แล้วโดยละเอียด Sakaki, K. และ Hasegawa, M. โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่อง Antigen การทำ Titration ของ Hemolysin, Complement Antigen และ Antiserum ทำใน Tube test อย่างเดียวเพราะอ่านผล hemolysis

*** Cook Engineering Co., Alexandria, Va: Limbro Chemical Co., new-Haven, Conn.

ได้ง่ายกว่า สำหรับ Micro test ใช้เครื่องมือเครื่องใช้ของ Cooke Engineering Co. การทดลองทำควบคู่กันไประหว่าง Tube test และ Micro test โดยมีข้อแตกต่างกันในเรื่องปริมาณของ Reagents ที่ใช้คือ

Reagents	tube test (ml.)	micro test (ml.)
Cattle serum dilution	0.1	0.025
Optimal dilution antigen	0.1	0.025
Optimal dilution antiserum	0.1	0.025
1:5, 100% unit complement	0.1	0.025
2% sensitized cells	<u>0.1</u>	<u>0.025</u>
Total volume	0.5	0.125

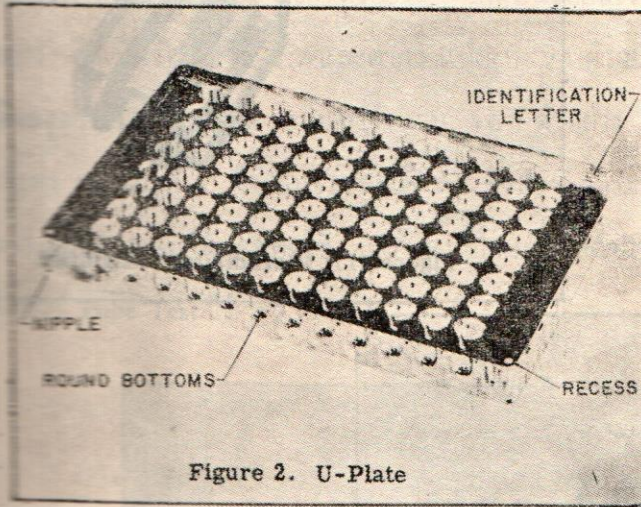


Figure 2. U-Plate

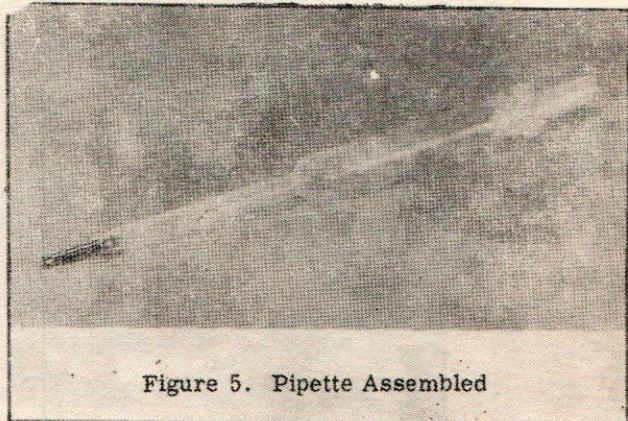


Figure 5. Pipette Assembled

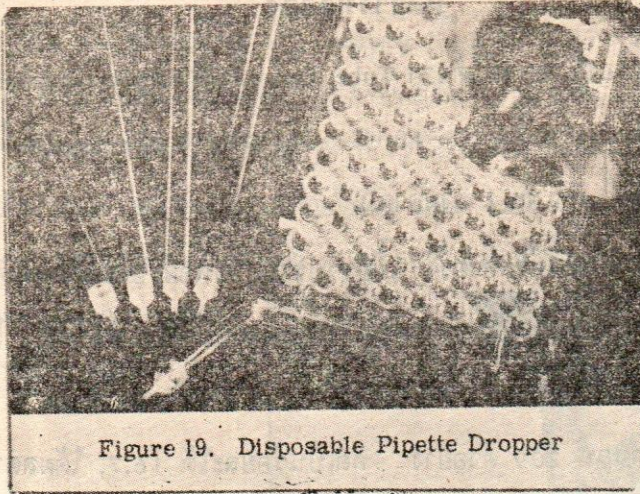


Figure 19. Disposable Pipette Dropper

วิจารณ์

ข้อคิดสำหรับการทดลองนี้ก็คือเนื่องจากการทดลองเปรียบเทียบ จึงได้พยายามทำควบคู่พร้อมกันไปเพื่อหลีกเลี่ยงข้อแตกต่างที่อาจทำให้ได้ผลแตกต่างกันไป บางครั้งไม่มีโอกาสทำซ้ำเพราะ Reagents มีปริมาณจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Concentrated Antigen ตลอดจนเวลาที่จะทำซ้ำ

การทดลองครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง ก็อาจทำให้ความละเอียดถี่ถ้วนลดน้อยลงแม้แต่ใน Tube Test ก็ตาม ที่ไม่สามารถทำควบคู่กันได้ก็คือการอ่านผลซึ่ง Micro Test อ่านหลังจาก Centrifuge แล้ว แต่ Tube Test ไม่อาจทำได้เพราะมีปริมาณมาก สำหรับการเขย่าให้เข้ากันก่อน Incubate นั้น Casey กล่าวว่าจำเป็นมากสำหรับ Micro Test ที่จะต้องใช้เครื่องมือเขย่าซึ่งจะทำให้ได้ผลดีกว่าเขย่าด้วยมือ แต่ในการทดลองนี้ ไม่อาจทำได้เพราะไม่มีเครื่องมือเขย่าดังกล่าว อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการทดลองของ Sever และ For Man ตลอดจนของ Casey ต่างก็ได้ผลจาก Micro Test เท่ากัน หรือต่ำกว่า Tube Test ไม่เกินสองเท่า สำหรับความสะดวกรวดเร็วและประหยัด Reagents แล้ว Micro Test ย่อมเหนือกว่าโดยเฉพาะ I.C.F. Test ของโรคปากและเท้าเปื่อยนี้ประหยัดได้ถึงสี่เท่า ตลอดจนประหยัดเวลาในการทำ Dilution ได้อย่างมาก

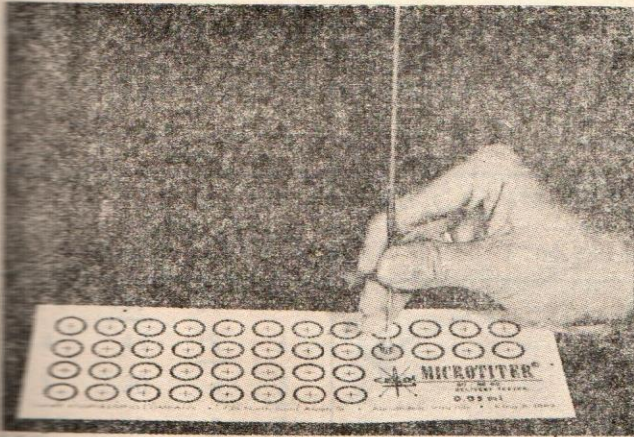


Figure 21. Go No-Go Delivery Tester

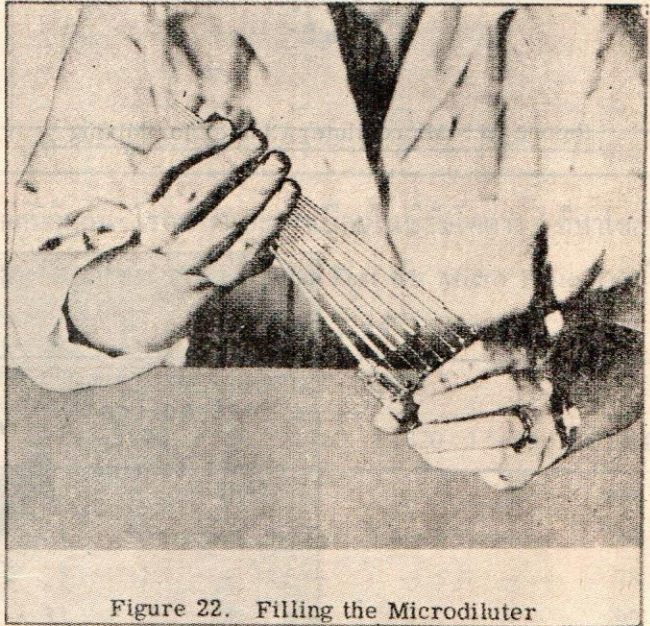


Figure 22. Filling the Microdiluter

สรุป

จากการตรวจหาภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมโคทดลอง และซีรัมโคจาก
 ที่อื่นต่าง ๆ โดยวิธีอินไดเร็คคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันเทส ในไมโครเพลท และในหลอดแก้ว
 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันที่ได้จากไมโครเพลทได้ผลตรงกับที่ได้จากหลอดแก้ว 834 ตัวอย่าง
 (88.5 %) ได้ผลต่ำกว่าสองเท่า 209 ตัวอย่าง (16.7 %) และได้ผลสูงกว่าสองเท่า 107
 ตัวอย่าง (8.6 %) ในจำนวนซีรัมที่ใช้ทดลองทั้งหมด 1,254 ตัวอย่าง



Figure 23. Microdiluter Cluster for Mixing

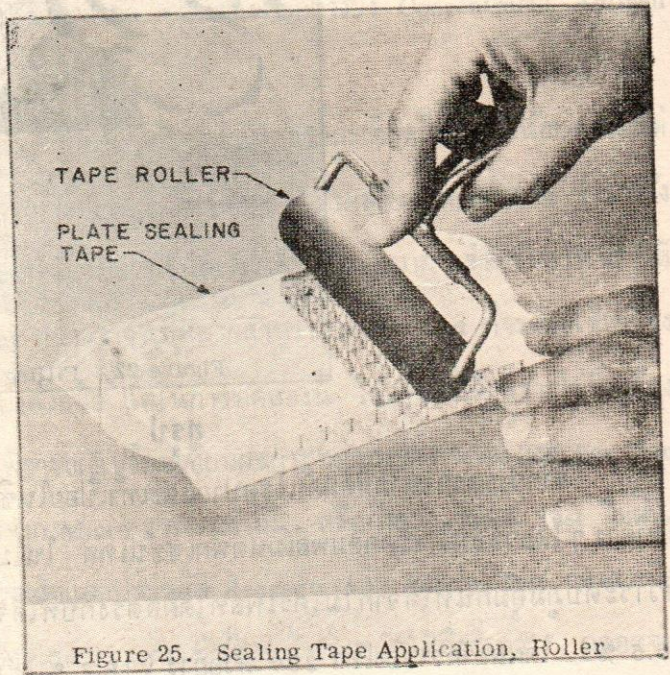


Figure 25. Sealing Tape Application, Roller

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระดับภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมโรคต่างๆ ที่หาโดยวิธีอินไดเร็กคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน Macro Tube Test กับ Micro Plate Test* (26.7.71 — 12.10.71)

		MICRO C.F. ANTIBODY TITER									
		1<4	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	TOTAL**
MACRO C.F. ANTIBODY TITER	1<4	431	24	7	1	—	—	—	—	—	463
	1:4	45	18	3	1	—	—	—	1	—	68
	1:8	20	4	5	2	—	—	—	—	—	31
	1:16	9	2	3	1	—	—	—	—	—	15
	1:32	2	—	—	3	2	1	—	—	—	8
	1:64	1	1	—	1	2	5	5	1	1	17
	1:128	—	—	1	1	—	2	3	4	—	11
	1:256	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
	1:512	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
TOTAL	508	49	19	10	4	8	9	6	1	614	

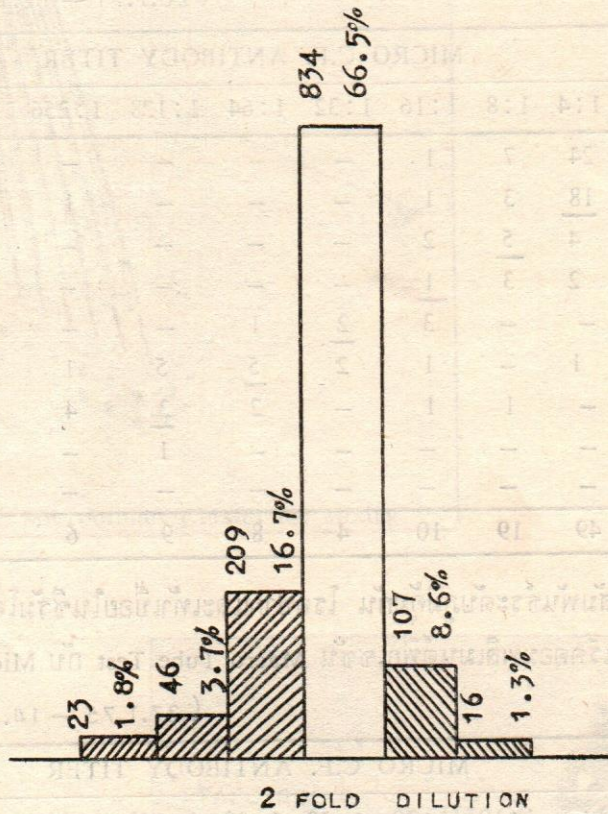
ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระดับภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมโรคต่างๆ ที่หาโดยวิธีอินไดเร็กคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน Macro Tube Test กับ Micro Plate Test* (27.1.75 — 14.3.75)




		MICRO C.F. ANTIBODY TITER									
		1<5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	TOTAL**
MACRO C.F. ANTIBODY TITER	1<5	243	50	4	—	—	—	—	—	—	297
	1:5	24	36	11	1	—	—	—	—	—	72
	1:10	8	25	39	5	1	—	—	—	—	78
	1:20	9	7	40	33	2	1	—	—	—	92
	1:40	2	2	1	29	8	—	—	—	—	42
	1:80	—	1	—	3	14	6	—	—	—	24
	1:160	—	3	1	1	2	14	3	—	—	24
	1:320	—	4	—	—	1	1	3	1	—	10
	1:640	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
TOTAL	286	128	96	72	28	22	7	1	—	640	

* ระดับภูมิคุ้มกันทั้งสามไทป์นำมารวมกัน

** ตัวเลขในตารางหมายถึงจำนวนตัวอย่าง

รูปที่ 1. ความสัมพันธ์ระหว่าง Macro Tube Test กับ Micro Plate Test โดยวิธี Indirect C.F. Test โรคปากและเท้าเปื่อย



-  ไค้ตรงกัน
-  ไค้ต่ำกว่า
-  ไค้สูงกว่า

เอกสารอ้างอิง

- (1) Takatsy, G. 1950. A new method for the preparation of serial dilutions in a quick and accurate way, Kise'ri. Orvostud 2:393
- (2) Takatsy. G. 1955. The use of spiral loops in serological and virological micro-method. Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung. 3:191
- (3) Sever, J.L. 1962. Application of a micro-technique to viral serological investigations. J. Immun, 88:320
- (4) Casey, H.L. 1965. Adaptation of LBCF. method to micro Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. Public Health Monograph No. 74, Public Health Service Publication No. 1228, U.S. Govt. Printing Office.
- (5) Withlin, B. 1967. Detection of antibodies by microtrator techniques, Mycopathologia, 33:241
- (6) Forman, A.J. 1974. A Study of foot-and-mouth disease virus strain by complement fixation. II A. comparison of tube and microplate test for the differentiation of strains, J. Hyg. Camb. 72:407
- (7) Rice, C.E. and Brooksby, J.B. 1953. Studies of the complement-fixation reaction in virus system. V. In foot-and-mouth disease using direct and indirect method. J. Immun., 71:300
- (8) Tokuda, G. and Charutamra, U. 1970. Measurement of antibody in sera of cattle immunized with foot-and-mouth disease virus by indirect complement fixation test. Suiyokaikiji, 19:28
- (9) Sakaki, K. and Suphavailai, P. 1971. Demonstration of complement-fixation antibody agaist foot-and-mouth disease virus in cattle serum. A meeting for the tenth annual conference on animal science, at Kasetsart University, Bangkok, 3-5 February, Suiyokaikiji, 21:10, 1972
- (10) Sakaki, K., Suphavailai, P. and Kongthon, S. 1973. Studies on the diagnosis of foot-and-mouth disease, I. Indirect Complement Fixation on Foot-and-Mouth Disease Using the Viral Antigens Concentrated by Polyethylene Glycol. A meeting for the twelfth annual conference on animal science, at Kasetsart University, Bangkok, 5-7 February.

- (11) Sakaki, K., Hasegawa, M., Chandarkeo, T., Kongthon, S., and Suphavilai, P. 1974. Studies on the diagnosis of foot-and-mouth disease, II. Indirect Complement fixation in foot-and-mouth disease using inactivated-concentrated viral antigens. A meeting for the thirteenth annual conference on animal science at Kasetsart University, Bangkok, 2-6 February,
- (12) Hasegawa, M., Kongthon, S., Suphavilai, P. 1975. Studies on the diagnosis of foot-and-mouth disease II. Antibody response in cattle by indirect complement fixation with inactivated-concentrated viral antigen. Report to the national research council of Thailand under the cooperative program joint research work between Thailand and Japan.

เรียนเชิญ สัตวแพทย์ทุกท่าน ที่ลงทะเบียนสิทธิของท่าน

ขอให้สมัครเป็นสมาชิกสามัญตลอดชีพของ
สัตวแพทยสมาคมฯ

ภายใน ๓ เดือนนี้ ท่านจะจ่ายแค่ ๓๐๐ บาทเท่านั้น
ถ้าเลย ๓ เดือนนี้ ไปแล้วท่านจะเสียเป็น ๕๐๐ บาท