



**การพัฒนาชุดตรวจ Indirect ELISA เพื่อตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส
Porcine Epidemic Diarrhea ในตัวอย่างนมน้ำเหลืองสุกร
Development of an Indirect ELISA for detection of antibodies against
Porcine Epidemic Diarrhea Virus in swine colostrums**

อรรรรณ บุดรดี^{1*} วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์¹ ณัฐวุฒิ รัตนวณิชยโรจน์¹ อลงกต บุญสูงเนิน¹ พิชัย จิรวัดนาพงศ์¹ ปริวรรต พูลเพิ่ม¹
และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ²

¹ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

*Corresponding Author E-mail: fvetorb@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ชุดตรวจ Indirect ELISA PEDV KU1 ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอีดีวีในสุกร จากตัวอย่างนม น้ำเหลืองของแม่สุกร โดยเตรียมแอนติเจนจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ TRUNG 1/38 ที่แยกได้จากการระบาดในประเทศไทย จากการทดสอบด้วยวิธี checker board titration ของแอนติเจนจากเชื้อที่เตรียมได้กับแอนติบอดีมาตรฐานที่ให้ผลบวกทั้งส่วนที่จำเพาะ ต่ออิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) และอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA) จะสามารถเคลือบแอนติเจนได้อัตราส่วนเท่ากับ 1:320 และอัตราส่วนการ เจือจางแอนติบอดีที่อัตราส่วน 1:40 เมื่อนำมาทดสอบเพื่อหาจุดตัด (cut off point) ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ตัวอย่างนม น้ำเหลืองของแม่สุกรจากฟาร์มปลอดเชื้อ (PEDV negative farm) จำนวน 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากฟาร์มที่ผ่านการได้รับเชื้ออยู่ในฝูง 2-3 สัปดาห์ (Positive farm) จำนวน 100 ตัวอย่าง (n=200) พบว่าทั้งแอนติบอดีส่วนที่จำเพาะต่อ IgG และ IgA จะได้ค่าเท่ากับ คือ ที่จุดตัด ของ S/P ratio = 0.4 และเมื่อนำชุดตรวจมาประเมินเปรียบเทียบกับวิธี IFA พบว่า การทดสอบแอนติบอดีส่วนที่จำเพาะ ต่อ IgG จะได้ค่าความไว เท่ากับ 90.56 เปอร์เซ็นต์ ค่าความจำเพาะ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และค่าการยอมรับทางสถิติ เท่ากับ 0.905 ส่วนแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgA จะได้ค่าความไว เท่ากับ 87.96 เปอร์เซ็นต์ ค่าความจำเพาะ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และค่าการยอมรับ ทางสถิติ เท่ากับ 0.879 ว่า ดังนั้น วิธี Indirect ELISA จากชุดตรวจ PED KU1 จึงสามารถนำมาใช้แทนวิธี IFA ได้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการนำมาใช้ประเมินสถานการณ์ การควบคุมโรคในระดับฝูงได้

ABSTRACT

An Indirect ELISA PEDV KU1 was developed to detect the antibodies of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in colostrum sample from pigs. The viral antigen was prepared from PEDV of TRUNG 1/38 strain outbreak in Thailand. The optimal antigen concentrations were tested with standard antibodies specific for Immunoglobulin G and Immunoglobulin A by checkerboard titration, selected at 1:320 and 1:40 dilution. A total of 200 colostrum samples from non-infected farm (n=100) and 2-3 weeks of post infected farm (n=100) were tested for set a cut-

off point by a two-graph receiver operating characteristics analysis, the result showed of broth antibodies provided a cut-off point at $\geq 0.4 =$ positive. This assay was validated by comparison with an indirect Immunofluorescence assay, the result of IgG antibodies showed that sensitivity = 90.56, specificity = 100% and kappa value at 0.905 and IgA antibodies provided sensitivity at 87.96%, specificity = 100% and kappa value at 0.879. These results indicated that the PEDV ELISA KU1 may be useful for detecting of both antibodies replaced on IFA. It is an alternative to be used to assess the disease situation.

คำสำคัญ: โรคพีอีดี แอนติบอดี นมน้ำเหลือง Indirect ELISA

Keywords: Porcine epidemic diarrhea, Antibodies, Colostrum, Indirect ELISA

บทนำ

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Coronaviridae ซึ่งมีเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันนี้ ได้แก่ human corona virus (FCoV-229E), Transmissible gastroenteritis virus (TGEV), Porcine respiratory corona virus และ hemagglutinating encephalomyelitis virus (Enserink, 2003) เป็นเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมชนิด RNA สายเดี่ยว ไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรหลายประเทศ มีรายงานการเกิดโรคชนิดนี้ครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษและเบลเยียม (Pensaert et al., 1978) และมีรายงานการเกิดโรคนี้นในทวีปเอเชีย คือ ประเทศจีนและญี่ปุ่น ไต้หวัน และประเทศไทยในปี พ.ศ. 2538 (สนอง และคณะ, 2538) ในประเทศไทยมีรูปแบบของการเกิดโรค 2 ชนิด ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของสุกร ชนิดแรกคือโรคพีอีดี 1 จะไม่ทำให้ลูกสุกรในช่วงระยะดูดนมป่วย แต่จะทำให้ลูกสุกรที่อยู่ในช่วงหย่านม เป็นโรคนี้อัตราการป่วย 30% อัตราการตาย 10% ปัจจุบันที่พบระบาดและก่อความสูญเสียอย่างมากคือโรคพีอีดี 2 ซึ่งสามารถเกิดได้กับสุกรทุกช่วงอายุที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน หรือภูมิคุ้มกันไม่สูงพอ อัตราการป่วย 90-100% อัตราการตายในลูกสุกรดูดนมอาจถึง 100% ความเสียหายส่วนใหญ่เกิดกับลูกสุกรไม่เกิน 2-3 สัปดาห์ โดยมีอาการอาเจียนและท้องร่วงอย่างรวดเร็ว เกิดการอักเสบของกระเพาะอาหารและลำไส้ ร่างกายขาดน้ำอย่างรุนแรงและซ็อคตาย สำหรับในสุกรใหญ่จะมีอาการท้องเสียและกลับเป็นปกติภายใน 2-3 วัน ภายหลังจากการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ ฟาร์มส่วนใหญ่จะไม่พบการเกิดโรคประมาณ 2 ปี หลังจากนั้นในช่วงฤดูหนาวอาจพบสุกรเกิดอาการท้องเสียบ้างในกลุ่มแม่อู่มท้องและในสุกรสาว ซึ่ง

เป็นข้อบ่งชี้ว่าไวรัสชนิดนี้ยังคงกลับมาระบาดซ้ำได้อีก (กิจจา, 2551) ปัจจุบันแนวทางการควบคุม และป้องกันของการเกิดโรคชนิดนี้ คือการแก้ไขระบบการจัดการและการป้องกันทางชีวภาพ เริ่มมีการนำวัคซีนเข้ามาทดลองใช้กันแพร่หลายมากขึ้น มีวิธีการตรวจภูมิคุ้มกัน หลังการฉีดวัคซีน การตรวจภูมิคุ้มกันจากตัวอย่างน้ำนม เป็นต้น

น้ำเหลืองของแม่สุกร จึงมีความสำคัญมากขึ้น เพื่อต้องการศึกษาสถานะ หรือวัดระดับปริมาณ IgG และ IgA ของแม่สุกรในระยะต่าง ๆ เพื่อเป็นการประเมินสถานการณ์และควบคุมการเกิดโรคในฟาร์ม ซึ่งวิธีการตรวจสอบสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี SN titer และวิธี IFA เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่ามีความถูกต้องแม่นยำสูง แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องการใช้ระยะเวลาของขบวนการตรวจสอบนาน อีกทั้งหากมีตัวอย่างส่งในปริมาณมาก จะทำให้การผลการตรวจสอบมีความล่าช้า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ELISA ที่มีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละปริมาณมาก แต่เนื่องจากชุดตรวจสอบ ELISA ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (Commercial test kit) มีราคาแพง ทำให้ต้นทุนการตรวจตัวอย่างสูง เกษตรกรต้องเสียค่าตรวจราคาแพง รายงานครั้งนี้คณะผู้วิจัย ได้ผลิตชุดตรวจ Indirect ELISA ขึ้นเพื่อใช้ศึกษาแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG และ IgA จากตัวอย่างนม น้ำเหลืองของแม่สุกรที่ได้รับเชื้อ หรือผ่านการฉีดวัคซีน สามารถนำข้อมูลจากการตรวจ เป็นทางแนวทางในการนำมาใช้ควบคุม และป้องกันการเกิดโรคในฟาร์มให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนการเตรียมแอนติเจน

ใช้เชื้อไวรัส PEDV TRUNG/2538 ที่แยกได้จากกาฬโรคระบาดในประเทศไทย เป็นต้นแบบสำหรับเตรียมเป็นแอนติเจน โดยเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells (ชื่องานมาศ และคณะ, 2539) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มี 0.3% tryptose phosphate broth, 0.3% L-glutamine, 0.03% fetal calf serum, 5% N_2HCO_3 , 0.7 mg/ml เพนนิซิลิน และ สเตอโรโตมัยซิน เลี้ยงใน flask ขนาด 175 cm^2 เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 จนครบ 3 วัน จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชนิด EMEM มี TPB 3% yeast extract 0.02% และ 1:250 ของ trypsin ในความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, เพนนิซิลิน และ สเตอโรโตมัยซิน ทำการเก็บเซลล์ซึ่งเกิด Cytopathic effects ระหว่าง 90-100% จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1500 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ปั่นล้างอีกครั้งด้วย phosphate buffer saline pH.7.4 ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ที่มี 2% ของ OBG (n-octyl-beta-d-glucopyranoside, Sigma, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 25 ไมโครลิตรของ 1 M Tris-HCL pH 9 ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่เย็นบนน้ำแข็งนาน 30 นาที เมื่อครบเวลา จึงเติม 10 มิลลิลิตร ของ 0.25M NaCl แล้วนำไป Freeze-thaw ที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 4000 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนใสนำมาผสมกับ glycerol อัตราส่วน 1:1 (50% glycerol) เพื่อใช้เตรียมเป็น PEDV positive antigen นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C สำหรับ Vero cells ที่ปราศจากเชื้อ จะถูกเตรียมด้วยวิธีการเดียวกันเพื่อใช้เตรียมเป็น Negative antigen (Knuchel et al., 1992; Takikawa et al., 1996)

การเคลือบ Viral antigen และขั้นตอนการทำ ELISA

นำ PEDV antigen และ Vero control มาทดสอบการทำ Checkerboard titration กับตัวอย่างนม น้ำเหลืองของแม่สุกรที่ได้รับเชื้อ PEDV ใช้เป็นแอนติบอดีมาตรฐาน ที่มีความจำเพาะต่อ IgG และ IgA อย่างละ 1 เพลท เริ่มเจือจาง PEDV antigen และ Vero control จากอัตราส่วน 1:10 เป็น serial two fold dilution จนถึงอัตราส่วนสุดท้ายคือ 1:1280 โดย PEDV antigen ทำการเจือจาง และเคลือบลงในหลุมของคอลัมน์เลขคู่ คือ 1, 3, 5, 7, 9, 11 ส่วน Vero control เคลือบลงในหลุมคอลัมน์เลขคู่ คือ 2, 4, 6, 8, 10, 12 ในปริมาตร 100

ไมโครลิตรต่อหลุมของ 96 well ELISA plate (MAXISORB NUNC, DENMARK) บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำคืน เมื่อครบเวลา ทำการล้างด้วย PBST (PBS solution และ 0.05% Tween 20) แล้วจึง block ด้วย 5% skim milk 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C จากนั้นเติมตัวอย่างทดสอบมาตรฐานจากนม น้ำเหลือง ที่ผ่านการเจือจางเป็น Serial two fold dilution อัตราส่วนเริ่มต้นที่ 1:10 จนถึง 1:320 เติมนลงในหลุมของแต่ละคอลัมน์ของเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST แล้วเติม 1:4000 ของ Goat anti swine IgG conjugated HRP (Sigma, USA) จำนวน 1 เพลท ส่วนอีก 1 เพลท เติมน้ำ 1:4000 ของ Goat anti swine IgA conjugated HRP (Bio-Rad, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST เติมน้ำยา TMB substrate (KPL, USA) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1% SDS นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader คำนวณผล โดยหาค่าผลต่างระหว่างระหว่าง หลุม PEDV antigen และหลุม Vero control เพื่อหาค่า dilution ที่เหมาะสมในการใช้งาน

การทดสอบเพื่อหาจุดตัด (Cut-off)

นำตัวอย่างนม น้ำเหลืองจากแม่สุกร 200 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มตัวอย่างที่มาจากฟาร์มสุกรปลอดเชื้อ PEDV จำนวน 100 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างจากฟาร์มที่ติดเชื้อ จำนวน 100 ตัวอย่าง นำมาทดสอบกับชุดตรวจ PEDV KU1 ที่ผ่านการทำ Checkerboard titration มาทำการเคลือบ PEDV antigen และ Vero control ด้วย 0.05M carbonate buffer pH 9.6 ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมของ 96 well ELISA plate (MAXISORB NUNC[®]) โดย PEDV antigen จะถูกเคลือบในหลุมของคอลัมน์ที่เป็นเลขคู่ ส่วน Vero control จะเคลือบในหลุมของคอลัมน์ที่เป็นเลขคู่ บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำคืน จากนั้นเจือจางตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ Positive และ Negative control ด้วย sample diluents ที่มีส่วนผสมของ Vero cells ใน dilution plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ส่วน ELISA coated plate ทำการล้างด้วย PBST (PBS solution และ 0.05% Tween 20) แล้วจึง block ด้วย 5% skim milk 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C เติมน้ำ skim milk และล้างส่วนเกินออก จึงเติมตัวอย่างเจือจางลงในหลุม antigen และหลุม control หลุมละ 100 ไมโครลิตร สำหรับ Positive และ

Negative control ทำ duplicate เติมนลงในหลุมของแต่ละ plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST เติมน 1: 4000 ของ Goat anti swine IgG conjugated HRP (Sigma[®]) จำนวน 1 เพลท ส่วนอีก 1 เพลท เติมน 1: 4000 ของ Goat anti swine IgA conjugated HRP (Bio-Rad[®]) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST แล้วเติมน้ำยา TMB substrate (KPL[®]) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1% SDS นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader คำนวณค่า S/P ratio โดยใช้ค่าผลต่างระหว่างระหว่างหลุม Viral antigen และหลุม Vero control / ค่าเฉลี่ยผลต่างของตัวอย่างบวกมาตรฐาน นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ เพื่อหาค่า Cut-off ที่เหมาะสม ค่าความไว และความจำเพาะต่อ ส่วน IgG และ IgA โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Win episcoper 2.0

การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) ด้วยวิธี Dot blot Assay

นำแอนติเจน TGE, PEDV และ Vero control ที่เจือจางด้วย 1% BSA อัตราส่วน 1:1 หยดลงบน Nitrocellulose membrane ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้น block ด้วย 5% Skim milk และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชม. เมื่อครบเวลา นำซีรัมกระต่ายทดลองก่อนฉีดเชื้อ TGE (day 0) และหลังฉีดเชื้อ TGE (day 14) และซีรัมกระต่ายทดลองก่อนฉีดเชื้อ PEDV (day 0) และหลังฉีดเชื้อ PEDV (day 14) นำแอนติบอดีแต่ละชนิดผ่านการเจือจางให้เป็น 8 dilutions ด้วย sample diluents ที่มีส่วนผสมของ Vero cells โดย เริ่มต้นที่ อัตราส่วน 1:50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง นำแอนติบอดีแต่ละ dilution มาทดสอบกับแอนติเจน TGE, PEDV และ Vero control บ่มที่ 37 °C นาน 1 ชม. แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมน้ำยา goat anti rabbit IgG (HRP labeled) ที่เจือจางด้วย PBS อัตราส่วน 1:500 นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วล้าง 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ด้วย PBS แล้วจึงเติม DAB substrate solution (3, 3'-Diamino Benzidine, Sigma Aldrich, USA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15-20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำยาละลาย แล้วตรวจสอบผลการทดสอบของแอนติบอดีในแต่ละ dilution พร้อมบันทึกผล

การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจกับวิธี อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (Immunofluorescence; IFA)

ตัวอย่างนม น้ำเหลืองแม่สุกร จำนวน 159 ตัวอย่าง ที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้น มาทดสอบด้วย IFA โดยมีวิธีการอย่างย่อคือ เลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มี 0.3% tryptose phosphate broth, 0.3% L-glutamine, 0.03% fetal calf serum, 5% N₂HCO₃, 0.7 mg/ml ของเพนนิซิลิน และสเตรปโตมัยซิน เลี้ยงในไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ จนครบ 3 วัน จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชนิด EMEM ที่มี TPB 3% yeast extract 0.02% และ 1:250 ของ trypsin และเพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 10µg/ml เลี้ยงเชื้อไวรัสจนเกิด cytopathic effects ระหว่าง 80-90% จากนั้นดูอาหารเลี้ยงเชื้อที่ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วเติม 4% paraformaldehydes ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12-14 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง เติมน้ำ 0.5% saponin ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรทุกหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้ว block ด้วย 2% BSA ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำเหลืองสุกรที่ผ่านการเจือจางเริ่มจาก 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 และ 1:1280 ลงในหลุม ๆ ละ 1 dilution บ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จึงเติมน้ำยา goat anti swine IgG/IgA (FITC) ลงในทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่ม 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกผล นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาค่าความไว ความจำเพาะ และค่าการยอมรับทางสถิติ (kappa value) เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

ผลการทดลอง

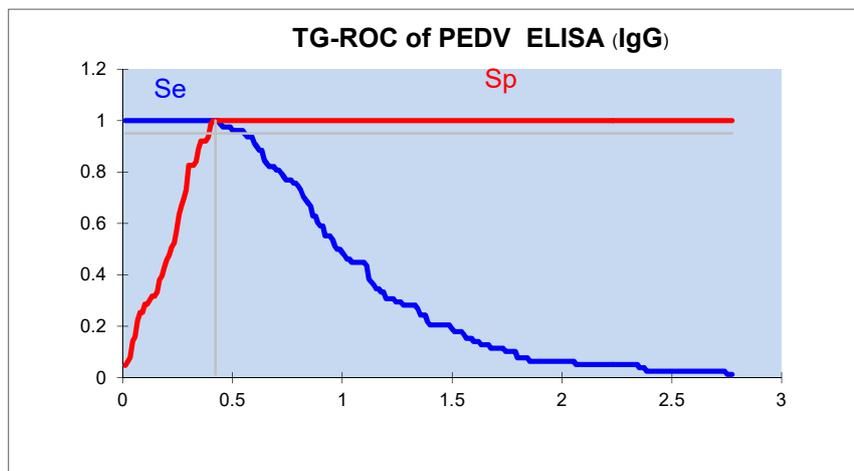
ผลการทำ Checkerboard titration

ผลการทำ Checkerboard titration ของ PEDV antigen ที่เตรียมได้ เมื่อนำมาทดสอบแอนติบอดีจำเพาะต่อส่วนของ IgG และ IgA จากตัวอย่างจากนม น้ำเหลืองของแม่สุกรที่ได้รับเชื้อ PEDV พบว่า ได้อัตราส่วนของการเคลือบแอนติเจน

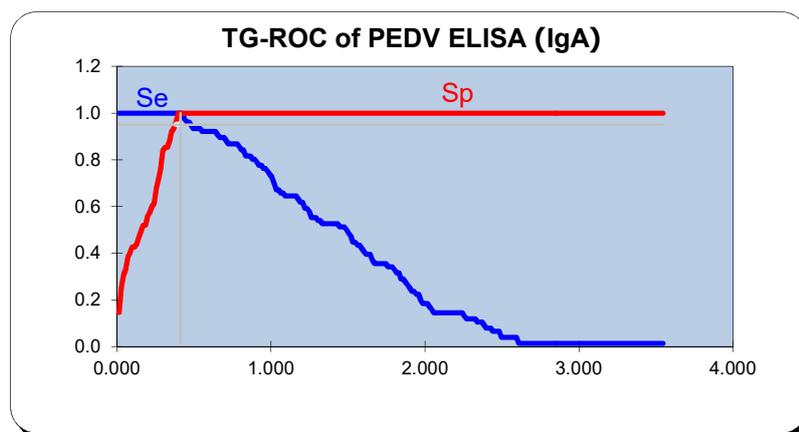
และการเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสม พบการปนเปื้อนจาก nonspecific background จากโปรตีนอื่น ๆ ในหลุม Vero control ได้น้อย และจากการทดสอบแอนติบอดีจำเพาะทั้งส่วน IgG และ IgA จะได้อัตราส่วนในการเจือจางทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีที่เท่ากัน โดยแอนติเจนสามารถเจือจางได้ที่อัตราส่วน 1:320 และสามารถเจือจางแอนติบอดีได้ที่อัตราส่วน 1:40 แตกต่างเพียงการทดสอบกับแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgA ที่จะให้ผลความจำเพาะสูงกว่า ซึ่งในแต่ละ dilution จะเกิด Nonspecific background น้อยกว่าส่วนแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG (ไม่ได้แสดงผล)

ผลการทดสอบหาจุดตัด (Cut-off)

การทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ของชุดตรวจ PEDV KU1 จากกลุ่มตัวอย่างลบ จำนวน 100 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างบวก จำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PEDV (กลุ่มลบ) ออกจากกลุ่มที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PEDV (กลุ่มบวก) ได้ และเมื่อนำค่า S/P ratio ที่คำนวณได้มาวิเคราะห์หาค่าความไวและความจำเพาะ จะได้ค่าความไวที่ 89% และได้ค่าความจำเพาะที่ 100% ทำให้ได้จุดตัด (Cut-off) ที่ S/P ratio ที่ 0.4 (รูปที่ 1 และ 2)



รูปที่ 1 จุดตัด (cut off point) ของเส้น sensitivity; Se (สีน้ำเงิน) และเส้น Specificity; Sp (สีแดง) ของชุดตรวจ indirect ELISA KU1 จากตัวอย่างนมม้าเหลืองของแม่สุกรจำนวน 200 ตัวอย่าง ที่ผ่านการทดสอบความจำเพาะต่อแอนติบอดีส่วน IgG เปรียบเทียบกับวิธี IFA ได้จุดตัด (cut off point) = 0.4 (วิเคราะห์จาก TG-ROC analysis excel program)

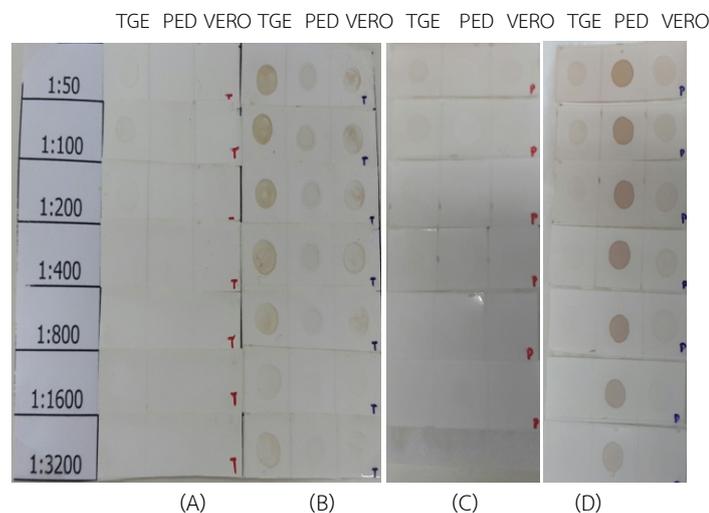


รูปที่ 2 จุดตัด (cut off point) ของเส้น sensitivity; Se (สีน้ำเงิน) และเส้น Specificity; Sp (สีแดง) ของชุดตรวจ indirect ELISA KU1 จากตัวอย่างนมม้าเหลืองของแม่สุกรจำนวน 200 ตัวอย่าง ที่ผ่านการทดสอบความจำเพาะต่อแอนติบอดีส่วน IgA เปรียบเทียบกับวิธี IFA ได้จุดตัด (cut off point) = 0.4 (วิเคราะห์จาก TG-ROC analysis excel program)

ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) ด้วยวิธี Dot blot assay

ผลการทดสอบ Cross reaction เมื่อนำแอนติบอดีต่อเชื้อ TGE จากซีรัมกระต่ายก่อนฉีด (day 0) และหลังฉีด (day 14) มาทดสอบกับแอนติเจน TGE, PEDV และ Vero พบว่าซีรัมกระต่ายก่อนฉีดเชื้อที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ TGE จะให้ผลลบบน dot ของแอนติเจนทุกชนิด (รูปที่ 3A) ส่วนผลการทดสอบแอนติบอดีจากกระต่ายที่ทดลองฉีดเชื้อ TGE (day 14) พบว่าให้ผลบวกจำเพาะต่อแอนติเจน TGE ซึ่งติดสีเข้ม ส่วน แอนติเจน PEDV และ Vero control จะติดสีจางกว่า สามารถแยกได้ชัดเจน ได้ตั้งแต่ระดับไตเตอร์ 1:50 ถึง 1:3200 (รูปที่ 3B)

นอกจากนี้ผลการทดสอบ Cross reaction จากซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อ PEDV ทั้งก่อนฉีด (day 0) และหลังฉีดเชื้อ (day 14) เมื่อนำมาทดสอบกับแอนติเจน TGE, PEDV และ Vero control พบว่า ซีรัมกระต่ายก่อนฉีดเชื้อ จะให้ผลลบต่อแอนติเจนทั้งสองชนิด และให้ผลลบต่อ Vero control (รูปที่ 3C) ส่วนแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายหลังฉีดเชื้อ PEDV (day 14) จะให้ผลบวกต่อแอนติเจน PEDV โดยจะติดสีเข้ม สามารถทำปฏิกิริยาบนแอนติเจน PEDV แยกจากแอนติเจน TGE และ Vero control ได้อย่างชัดเจน โดยสามารถอ่านค่าไตเตอร์ได้ถึงอัตราส่วน 1:3200 (รูปที่ 3D)



รูปที่ 3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) ด้วยวิธี Dot blot assay ของ แอนติบอดีจำเพาะต่อ TGE และ PEDV ทดสอบกับแอนติเจน TGE, PEDV และ Vero control โดย

A= Rabbit anti TGE ก่อนฉีด (day 0)

B= Rabbit anti TGE หลังฉีด (day 14)

C= Rabbit anti PEDV ก่อนฉีด (day 0)

D= Rabbit anti PEDV หลังฉีด (day 14)

ผลการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจ PEDV ELISA KU1 กับวิธี IFA

ผลการทดสอบเปรียบเทียบแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG และ IgA ของชุดตรวจ PEDV ELISA KU1 กับวิธี IFA ทดสอบจากตัวอย่าง จำนวน 159 ตัวอย่าง พบว่าผลการทดสอบแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG ที่ให้ผลบวกเหมือนกันทั้งสองวิธี (True positive; TP) มีจำนวน 96 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลลบเหมือน (True negative; TN) จำนวน 53 ตัวอย่าง มีบางตัวอย่างที่ให้ผลลวงเป็นลบ (False negative; FN) จำนวน 10 ตัวอย่าง และไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลลวงเป็นบวก (False

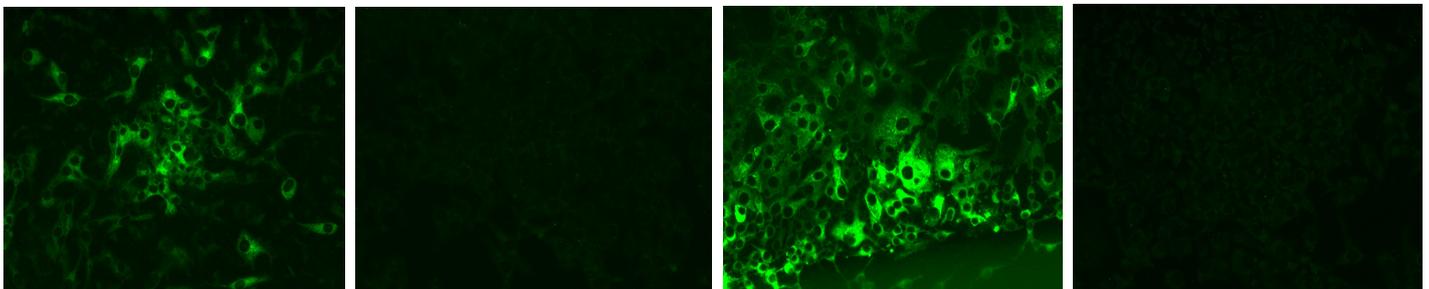
positive; FP) เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ จะได้ค่าความไว เท่ากับ 90.56% ค่าความจำเพาะ เท่ากับ 100% และค่าการยอมรับทางสถิติ เท่ากับ 0.905 สำหรับผลการทดสอบเปรียบเทียบแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgA ของทั้งสองวิธี มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกเหมือน จำนวน 95 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลลวงเป็นบวก จำนวน 13 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลลบเหมือนกัน จำนวน 51 ตัวอย่าง และไม่พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลลวงเป็นลบ เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ จะได้ค่าความไว เท่ากับ 87.96 % ค่าความจำเพาะ เท่ากับ 100 % และค่าการยอมรับทางสถิติ เท่ากับ 0.879 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลเปรียบเทียบระหว่างชุดตรวจ PEDV ELISA KU1 ทดสอบความจำเพาะต่อแอนติบอดีส่วน IgG/IgA กับวิธี immunofluorescence assay

IFA	Total tested	PEDV ELISA KU1 (IgG)		PEDV ELISA KU1 (IgA)	
		positive	Negative	positive	Negative
Positive		96	10	95	13
Negative		0	53	0	51
	Sensitivity of PEDV ELISA KU1 (IgG)	90.56%			
	Specificity of PEDV ELISA KU1 (IgG)	100%			
	Kappa value (IgG)	0.905			
	Sensitivity of PEDV ELISA KU1 (IgA)			87.96%	
	Specificity of PEDV ELISA KU1 (IgA)			100%	
	Kappa value (IgA)			0.879	

การศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่า S/P ratio ของวิธี Indirect ELISA จากชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับระดับไตเตอร์ที่วัดได้ด้วยวิธี IFA พบว่าค่าต่ำสุดของแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG วัดได้ที่ระดับไตเตอร์ <1:10 จะตรวจไม่พบเซลล์ที่ติดสีเรืองแสงของ fluorescence มีค่าเฉลี่ยของ S/P ratio เท่ากับ 0.056 ซึ่งให้ผลเป็นลบ ในขณะที่ค่าสูงสุดสามารถวัดได้ถึงระดับไตเตอร์ 1:640 จะตรวจพบเซลล์ที่ติดสีเรืองแสง fluorescence มีค่าเฉลี่ยของ S/P ratio เท่ากับ 2.90 จะให้ผลเป็นบวก

นอกจากนี้การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ ค่า S/P ratio ของวิธี Indirect ELISA กับวิธี IFA ส่วนที่จำเพาะต่อ IgA จะให้ผลที่สอดคล้องกัน คือที่ระดับไตเตอร์ <1:10 ตรวจไม่พบเซลล์ที่ติดสีเรืองแสง fluorescence ค่าเฉลี่ยของ S/P ratio เท่ากับ 0.114 ให้ผลเป็นลบ ได้ค่าสูงสุดที่ระดับไตเตอร์ 1:1280 ค่าเฉลี่ยของ S/P ratio เท่ากับ 2.90 ค่าความสัมพันธ์ของ S/P ratio และ IFA titers ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4 และ 5



(A)

(B)

(C)

(D)

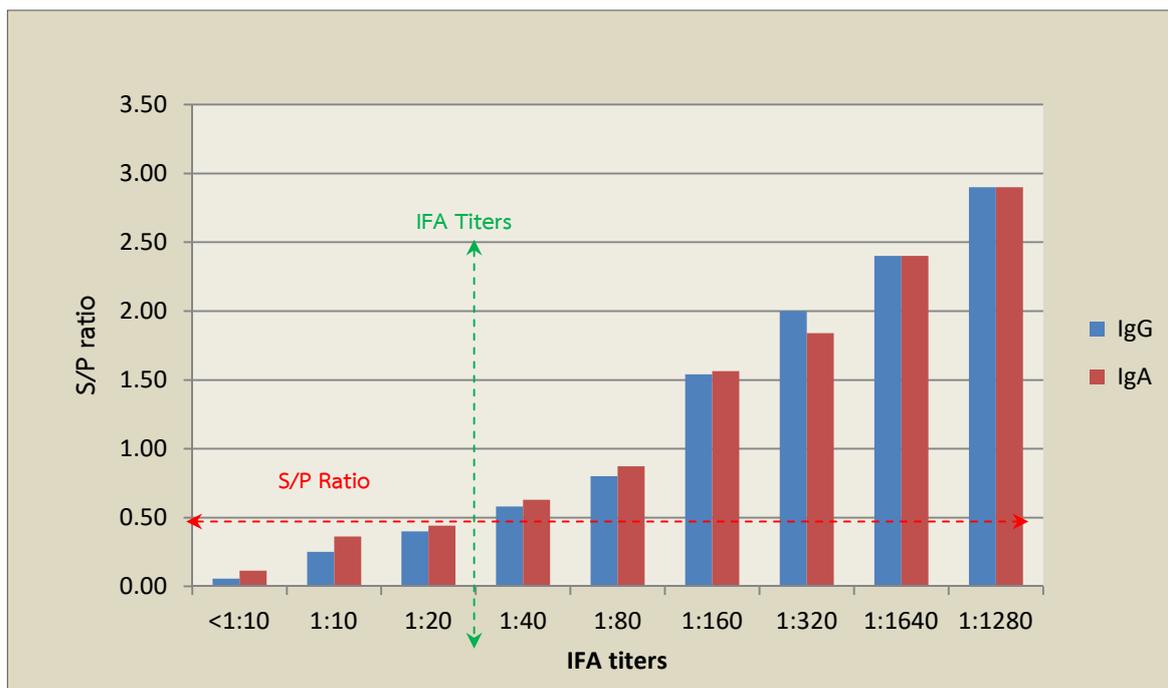
รูปที่ 4 เซลล์ติดเชื้อ PEDV บน Vero cell ที่ผ่านการทดสอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG และ IgA จากตัวอย่างนม น้ำเหลืองบวก และลบ ทดสอบด้วยวิธี immunofluorescence assay (IFA)

A เซลล์ติดเชื้อ PEDV ทดสอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG ให้ผลบวกที่ dilution titer 1:640

B เซลล์ติดเชื้อ PEDV ทดสอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG ให้ผลลบที่ dilution titer <1:10

C เซลล์ติดเชื้อ PEDV ทดสอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgA ให้ผลบวกที่ dilution titer 1:1280

D เซลล์ติดเชื้อ PEDV ทดสอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgA ให้ผลลบที่ dilution titer <1:10



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ของ S/P ratio ของแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgG/IgA ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี PEDV ELISA KU1 เปรียบเทียบกับ IFA titers

สรุปและวิจารณ์

ผลการทำ Checkerboard titration ของ PEDV antigen ที่เตรียมได้ สามารถนำมาใช้เคลือบเป็นแอนติเจนที่ก้นหลุมของเพลทได้ ในอัตราส่วน 1:320 ที่แอนติบอดีอัตราส่วน 1:40 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมทั้งแอนติบอดีส่วนที่จำเพาะต่อ IgG และ IgA จากการวัดค่าผลต่างของ OD ระหว่างหลุมแอนติเจนบวก ((PEDV antigen) และแอนติเจนลบ ((Vero antigen) จะได้ค่าผลต่างของ OD มากที่สุด เนื่องจากพบว่ามีการปนเปื้อนของ nonspecific background ได้น้อยที่สุดในอัตราส่วนดังกล่าว ซึ่งนับว่ามีค่าความไวและความจำเพาะสูง ทำให้เมื่อนำมาทดสอบเพื่อหาจุดตัด (Cut off point) กับตัวอย่างนม น้ำเหลืองของแม่สุกรจำนวน 200 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่มาจากฟาร์มที่ปลอดเชื้อ จำนวน 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากฟาร์มติดเชื้อ จำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่าทั้งแอนติบอดีส่วนที่จำเพาะต่อ IgG และ IgA จะได้ค่า cut off ที่เหมาะสมเท่ากัน คือ $S/P \text{ ratio} = 0.4$ กล่าวคือ ถ้าผลการตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA จากชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น มีค่า S/P ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 0.4 จะแปลผลเป็นบวก แต่ถ้าค่า S/P ratio น้อยกว่า 0.4 ลงมาจะแปลผลเป็นลบ

จากผลการทดสอบ Cross reaction ด้วยวิธี dot blot assay ระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี ของเชื้อไวรัส PEDV และ TGE โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ whole virus ของเชื้อแต่ละชนิด ที่ผลิตในกระต่ายทดลอง คือ Rabbit anti TGE และ Rabbit anti PED นำมาทดสอบ Cross reaction กับแอนติเจน TGE PEDV และ VERO ผลการทดสอบพบว่า แอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ TGE จะติดสีเข้มมากบน dot ของ TGE สามารถแยกได้ชัดเจนกับ dot ของ PEDV และ Vero ซึ่งจะติดสีจาง ๆ ซึ่งอาจเกิด Cross reaction ได้บ้างในบางส่วน และแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ PEDV เมื่อนำมาทดสอบกับ TGE และ Vero จะติดสีจางกว่าบน dot ของ PEDV อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยจะมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำ แอนติบอดีของสุกรที่ติดเชื้อแต่ละชนิด มาทำการทดสอบ Cross reaction หรือในการทดสอบด้วยวิธี ELISA จะเพิ่มการเคลือบแอนติเจน TGE เปรียบเทียบไปด้วยทุกครั้งเพื่อใช้เป็น control การเกิด cross reaction ซึ่งจะช่วยให้ชุดตรวจมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

การเปรียบเทียบผลที่ตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี IFA พบว่าทั้งแอนติบอดีส่วนที่จำเพาะต่อ IgG และ IgA ให้ผลทดสอบที่สอดคล้องกัน โดยค่า S/P ratio และค่า IFA titers มีความสัมพันธ์กัน คือ ค่า IFA titers <math><1:2</math> มีค่าเฉลี่ยของ

S/P ratio ของส่วนจำเพาะต่อ IgG และ IgA = 0.056, 0.114 ซึ่งเป็นค่าที่น้อยกว่า cut off ที่ได้ จึงแปลผลเป็นลบ ส่วนค่า IFA titers วัดได้สูงสุดที่ 1:256 จะมีค่าเฉลี่ยของ S/P ratio ของส่วนจำเพาะต่อ IgG และ IgA = 2.90 เท่ากัน ผลที่ได้จึงเป็นบวก เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น มีความไวและความจำเพาะสูง บ่งชี้ถึงการใช้งานไปใช้งานได้จริง พบว่า การเปรียบเทียบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IgG ได้ค่าความไวเท่ากับ 90.56% ค่าความจำเพาะ เท่ากับ 100% และค่าการยอมรับทางสถิติ เท่ากับ 0.905 ส่วนแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgA จะได้ค่าความไว เท่ากับ 87.96% ค่าความจำเพาะ เท่ากับ 100% และค่าการยอมรับทางสถิติ เท่ากับ 0.879 จึงสรุปได้ว่าวิธี Indirect ELISA จากชุดตรวจ PED KU1 สามารถนำมาใช้แทนวิธี IFA ได้ มีข้อดีกว่า คือ มีความสะดวก รวดเร็ว ในการตรวจสอบมากกว่า สามารถตรวจตัวอย่างในคราวละมาก ๆ โดยไม่ต้องเจือจางหลาย dilution ทำให้สามารถประหยัดเวลา และราคาค่าตรวจได้ จึงนับเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการนำมาใช้ประเมินสถานการณ์ การควบคุมโรคในภาคสนามได้

เอกสารอ้างอิง

กิจจา อุไรรงค์. (2551). แนวทางการป้องกันโรคพีอีดี. สัตว์เศรษฐกิจ 25(578): 29-33.

สนอง ศรีนันทพันธ์, ลัดดา ตรงวงศา, ช้องมาศ อันตรเสน, วาสนา แสงสุวรรณ และไพรสน พรมเมือง. (2538). รายงานการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ที่จังหวัดตรัง. สัตวแพทยสาร 46(3): 11-19.

ช้องมาศ อันตรเสน, ลัดดา ตรงวงศา, พรทิพย์ เจียรสุข, ไพรสน พรมเมือง และสมจิตร รุจิขวัญ. (2539). รายงานการแยกเชื้อ Porcine epidemic diarrhea virus ใน Vero Cell Cultures. สัตวแพทยสาร 47(2): 33-39.

Enserink, M. (2003). Calling all Coronavirologists. Science 300: 413-414.

Knuchel, M., Ackermann, M., Miiller, H.K., and Kihm, U. (1992). An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. Vet. Microbiol. 32: 117-132.

Pensaert, M.B., DeBouck, P. (1978). A New coronavirus - like particles associated with diarrhea in swine. Arch. Virol. 58: 243-247.

Takikawa, N., Kobayashi, S., Ide, S., Yamane, Y., Tanaka, Y. and Yamgishi, H. (1996). Detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Vet. Med. Sci. 58(4): 355-357.

