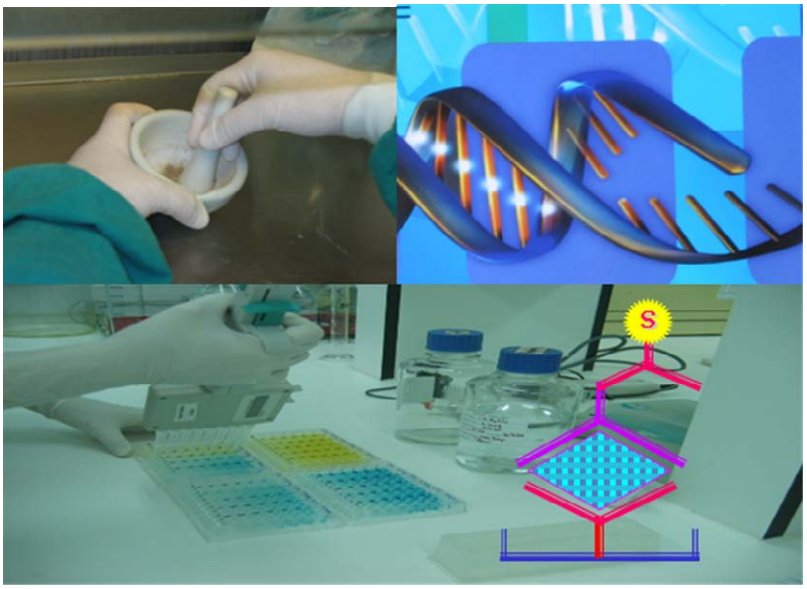
มาตรฐานการตรวจสอบและวินิจฉัย
โรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการ



โดย

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ	3
2. พยาธิกำเนิด	4
3. การเก็บตัวอย่าง	5
4. การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ	5
4.1 วิธีสกัดแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ	6
4.2 การตรวจจำแนกชนิดไวรัส โดยวิธี ELISA Typing	6
4.3 การเพิ่มปริมาณไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation)	8
4.4 การตรวจหาไวรัสโดยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)	10
4.5 การตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี liquid phase blocking ELISA test (LP ELISA)	12
4.6 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ Non structure protein of FMDV โดยวิธี Indirect ELISA test (NS test)	14
5. เอกสารอ้างอิง	17
6. ภาคผนวก	
6.1 การเตรียม ELISA reagent	18
6.2 การเตรียมสารละลายสำหรับงาน ELISA technique	18
6.3 การเตรียมสารละลายสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์	20
6.4 แผนผังการตรวจวินิจฉัยโรค	22

1. บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย เป็นโรคระบาดที่รุนแรง ติดต่อง่ายและระบาดรวดเร็วในสัตว์กีบคู่ทุกชนิด ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร ช้าง อูฐ กวาง เป็นต้น และทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในด้านอุตสาหกรรมปศุสัตว์ทั่วโลก สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสแอฟโทไวรัส (Aphthovirus) จัดอยู่ในกลุ่มพิโคน่าไวรัส (Picornavirus) ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยพบทั่วโลกมีทั้งหมด 7 ชนิดหรือ serotype ได้แก่ โอ (O) เอ (A) ซี (C) เอเซียวัน (Asia1) แซทวัน (SAT1) แซททู (SAT2) และแซททรี (SAT3) ในประเทศไทยพบมีระบาดอยู่ 3 ชนิดหรือไทป์ คือ โอ เอ และเอเซียวัน ไวรัสแต่ละชนิดไม่ทำให้เกิดความคุ้มโรคข้ามซึ่งกันและกัน (cross immunity) และยังแบ่งเป็นไวรัสชนิดย่อย (subtype) ต่างๆ รวมทั้งหมดประมาณ 64 ชนิดย่อย ดังนี้คือ ไทป์O มี 11 ชนิดย่อย ไทป์ A มี 32 ชนิดย่อย ไทป์ C มี 5 ชนิดย่อย ไทป์ Asia1 มี 3 ชนิดย่อย ไทป์ SAT 1 มี 6 ชนิดย่อย SAT2 มี 3 ชนิดย่อย และ SAT3 มี 4 ชนิดย่อย สัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจะแสดงอาการป่วยโดยมีอาการซึม เบื่ออาหาร มีน้ำลายไหล เกิดเม็ดตุ่มใสบนเยื่อลิ้น ภายในช่องปาก กระพุ้งแก้ม และอุ้งเท้าภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเกิดตุ่มใส เม็ดตุ่มจะแตกออกและเกิดการลอกของเนื้อเยื่อที่ลิ้นและเยื่อบุภายในช่องปาก หลังจากนั้น 2-5 วัน ไวรัสจะแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย เกิดเป็นตุ่มใสและแผลบริเวณอุ้งเท้าและไรกีบ ระยะนี้สัตว์จะเริ่มเดินขากะเผลก ในรายที่เป็นรุนแรงจะพบรอยโรคที่บริเวณเต้านม หัวนมในโค และบริเวณเหนือจมูกในสุกร

การป้องกันและควบคุมโรคสามารถดำเนินการได้หลายวิธี ได้แก่ การฉีดวัคซีนเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ ซึ่งวัคซีนที่ใช้ต้องผลิตจากเชื้อไวรัสชนิดเดียวกับที่ทำให้เกิดโรคระบาดในท้องที่นั้นการควบคุมการเคลื่อนย้ายหรือแยกกักสัตว์ป่วยเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 21 วัน จะเป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายไปสู่พื้นที่อื่น ในขณะเดียวกันให้ทำการฉีดวัคซีนแบบวงแหวน (Ring vaccination) ในรัศมี 5-10 กิโลเมตร รอบๆ บริเวณเกิดโรค

นอกจากนี้การป้องกันการติดต่อของโรคนี้ทางอ้อม เนื่องจากเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนมากับอุปกรณ์ สิ่งของเครื่องใช้ต่างๆ และผลิตภัณฑ์สัตว์ทุกชนิด สิ่งเหล่านี้เป็นพาหะแพร่เชื้อได้ ควรใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ 2% โซดาไฟ (NaOH) หรือ 4% ปูนขาว (Na2CO3) หรือ Glutaraldehyde หรือ Iodophore (Iodine compound) หรือ 2% Citric acid เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการสังเกตจากอาการนั้นไม่เพียงพอ เพราะไม่สามารถบ่งบอกหรือแยกชนิดไวรัสได้ จำเป็นต้องตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นวิธีเดียวที่สามารถจำแนกชนิดของไวรัสด้วยวิธี ELISA Typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการประกอบด้วยการตรวจหาเชื้อไวรัสจากรอยโรค ได้แก่ตัวอย่างเนื้อเยื่อลิ้น เนื้อเยื่อบริเวณอุ้งเท้าไรกีบ โดยวิธี ELISA Typing วิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation by tissue culture technique) และยืนยันผลด้วยวิธี

ELISA typing ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจชันสูตรโรคให้แม่นยำขึ้น โดยวิธีการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส (Viral RNA) ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) (Reverse transcription ร่วมกับ Polymerase chain reaction)

การตรวจระดับภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยทำได้หลายวิธี ได้แก่ แอลพี อิไลซ่า (Liquid phase blocking ELISA, LP ELISA) และเวียเอกิด (Virus infection associated agar gel immunodiffusion test, VIA-AGID) วิธี LP ELISA เป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิด O, A และ Asia1 หรือ ชนิดอื่นๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนที่ฉีดให้กับสัตว์โดยใช้หลักการนำแอนติบอดีที่มีอยู่ในซีรัมมายับยั้ง (neutralize หรือ block) กับไวรัสที่มีความจำเพาะกันและตรวจหาปริมาณของไวรัสที่ไม่ถูก block หรือหลงเหลืออยู่ โดยใช้หลักการทาง Enzyme immunoassay ส่วนการตรวจสอบโดยวิธี VIA–AGID Test (McVicar and Sutmoller, 1970) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA antigen ในซีรัมสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่เคยได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน ซึ่งวิธีนี้จะสามารถแยกสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนออกจากสัตว์ติดเชื้อได้ถูกต้องและมีความจำเพาะในระดับหนึ่ง แต่มีโอกาสเกิดผลบวกเทียม (false positive) ได้ในสัตว์ที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเชื้อตายที่ใช้ BEI เป็นสาร inactivant ในการผลิตวัคซีน จากผลการวิจัยและพัฒนานำวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน non-structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี indirect ELISA หรือ NS–ELISA Test มาใช้ในการตรวจตัวอย่างซีรัม ในปัจจุบันวิธีนี้สามารถแยกสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนออกจากสัตว์ติดเชื้อได้ถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธี VIA-AGID Test และปัจจุบันได้นำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานการตรวจสอบในการค้าปศุสัตว์ระดับนานาชาติ (International trade)

2. **พยาธิกำเนิด** (Pathogenicity)

การติดต่อของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย สามารถติดต่อได้หลายทาง ได้แก่ โดยการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ป่วยหรือสัมผัสสิ่งขับถ่ายของสัตว์ที่เป็นโรค เช่น ปัสสาวะ อุจจาระ ลมหายใจ น้ำลาย น้ำนม น้ำจากตุ่มใส หรือสัมผัสสิ่งปนเปื้อนเชื้อ หรือติดต่อโดยกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน เมื่อติดเชื้อทางลมหายใจจะตรวจพบเชื้อไวรัสได้บริเวณคอหอย (pharynx) (Burrows et al., 1971) เชื้อไวรัสจะเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายไปทางกระแสเลือดและระบบน้ำเหลืองไปสู่อวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกายในระยะก่อนที่สัตว์แสดงอาการป่วยพบว่ามีไวรัสถูกขับออกมากับสิ่งขับถ่ายและสารคัดหลั่งในปริมาณสูง (Burrows, 1968; Burrows et al., 1981) กรณีสัตว์ได้รับเชื้อโดยการกินอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน ปริมาณเชื้อไวรัสในร่างกายสัตว์ป่วยจะเริ่มลดลงเมื่อร่างกายมีการตอบสนอง โดยสร้างแอนติบอดีให้สูงขึ้นเพื่อไปทำลาย (neutralize) เชื้อไวรัส สัตว์ที่ป่วยจะสามารถเป็นตัวพาหะแพร่เชื้อไปสู่สัตว์ตัวอื่นได้ (carrier) ในโคพบว่าสามารถเป็นตัวพาหะแพร่เชื้อได้นานถึง 2.5 ปี (Hedger,

1968) กระบือแอฟริกา พบนาน 3-5 ปี (Hedger et al., 1972) แกะพบนาน 12 เดือน (Sutmoller, 1970) แพะพบนาน 4 เดือน (Singh, 1977) แต่สุกรไม่พบว่าเป็นพาหะ (Panina et al., 1988) การตรวจหาเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในสัตว์ที่เป็นพาหะ สามารถตรวจได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำเมือกตรงบริเวณ oesopharyngeal (OP) โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Probang cup แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส ด้วยวิธี virus isolation และตรวจจำแนกชนิดไวรัสโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA Typing) หรือตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR Real time หรือ RT-PCR

3. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ที่สงสัยว่าป่วยเป็นโรค เพื่อนำส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ บริเวณที่สามารถเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อได้คือ ในโคและกระบือควรเก็บที่ตุ่มหรือแผลที่เยื่อลิ้น เยื่อบุภายในช่องปากแผลที่กีบ และซอกกีบ ในสุกรเนื้อเยื่อที่ควรเก็บคือ ตุ่มใสหรือแผลที่ลิ้น แผลบริเวณดั้งจมูก บริเวณไรกีบและซอกกีบ

การเก็บตัวอย่างเหล่านี้ควรเก็บเนื้อเยื่อในลักษณะเป็นชิ้น ปริมาณไม่ควรต่ำกว่า 1 กรัม ถ้าเห็นว่าเก็บเนื้อเยื่อจากตัวหนึ่งๆ ได้น้อยก็ควรเก็บจากตัวอื่นเพิ่มด้วย และแยกขวดเป็นตัวๆ ไป แล้วใส่ตัวอย่างเนื้อเยื่อลงในขวดที่มี 50% กลีเซอร์รีนบัฟเฟอร์ ใส่น้ำยาให้ท่วมเนื้อเยื่อ ปิดจุกให้แน่นและปิดทับด้วยเทปกันน้ำยารั่วไหลทำเครื่องหมายขวดให้ชัดเจน ห่อทับด้วยกระดาษหลายชั้น ใส่ในภาชนะหรือกระป๋องที่มีฝาปิดสนิทอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันการรั่วไหล จากนั้นนำใส่กระติกน้ำแข็งที่แข็งแรงรีบนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด กรณีที่ต้องนำส่งทางไปรษณีย์ ให้ห่อทับด้วยกระดาษหลายๆ ชั้น เพื่อป้องกันการแตกและการรั่วไหล บรรจุลงกล่องหรือภาชนะที่ไม่แตกง่าย พร้อมบันทึกประวัติสัตว์ป่วย รีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันทีการเก็บตัวอย่างซีรัม เก็บโดยการเจาะเลือดใส่หลอดแก้วหรือภาชนะที่สะอาดแห้ง ปล่อยให้เลือดแข็งตัวก่อน จึงทำการเก็บแยกส่วนใสซึ่งเป็นส่วนซีรัม ถ่ายใส่หลอดพลาสติก หากมีเม็ดเลือดปนมากับซีรัมให้นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่เป็นซีรัมและเก็บใส่หลอดพลาสติกปิดจุกให้แน่นป้องกันการรั่วไหล และให้เก็บในภาชนะที่มีน้ำแข็ง หรือเก็บแช่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในขณะที่นำส่งห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยสามารถวินิจฉัยเบื้องต้นได้จากอาการ ซึม มีไข้ น้ำลายไหลยืด เลียริมฝีปากบ่อย และเดินขากะเผลก รอยโรคที่เห็นได้ชัดคือ ตุ่มพองเกิดขึ้นภายในเป็นน้ำเหลืองใสซึ่งเต็มไปด้วยไวรัสจำนวนมาก โดยมากมักเกิดขึ้นครั้งแรกที่บริเวณด้านบนของลิ้น หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่กระแสโลหิตกระจายไปทั่วร่างกายบริเวณกีบ เยื่อกีบ ตุ่มใสนี้มักจะแตกใน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะเหลือแต่ร่องรอยโรคเป็นแผลตื้นและลอกหลุดได้ง่ายในบริเวณเยื่อลิ้นโค แต่การ

ชันสูตรการเกิดตุ่มน้ำใสนี้จะต้องแยกจากโรคที่มีอาการคล้ายกันอีกหลายโรค เช่น Vesicular stomatitis, Vesicular exanthema of swine, Swine vesicular disease ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยจากอาการจะบอกไม่ได้แน่ชัดว่าเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย จึงต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเท่านั้นที่จะสามารถบ่งบอกชนอดไวรัสได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยการเก็บตัวอย่างจากรอยโรคบริเวณเยื่อลิ้น อุ้งเท้า สัตว์ป่วย นำส่งห้องปฏิบัติการ กรณีลูกสัตว์ป่วยและตายกระทันให้เก็บอวัยวะกล้ามเนื้อหัวใจ ที่มีลักษณะคล้าย tiger heart ใส่ในภาชนะที่สะอาดแช่ในน้ำยา 50% glycerine buffer นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด การตรวจทางห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างดังกล่าวสามารถดำเนินการได้โดยวิธี จำแนกชนิดไวรัส หรือ ELISA typing และแยกไวรัสโดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation)

4.1 วิธีการสกัดแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1) ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อ 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
2) ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกรที่สะอาด
3) บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด โดยผสมทรายขาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4) ทำเป็น 10% suspension โดยใช้ M/25 phosphate buffer saline (PBS) หรือ 0.04M PBS เป็น diluent โดยชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อหนัก 1 กรัม เติมสารละลาย M/25 PBS จำนวน 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่น
5) นำไปปั่นเหวี่ยง 2,500 รอบ/นาที นาน 15-20 นาที
6) แยกส่วนน้ำใสด้านบน กรองด้วย 0.45 μm Syringe filter
7) แบ่งส่วนน้ำใสออกเป็น 2 ส่วน เพื่อทำ ELISA typing และ Virus Isolation

4.2 การจำแนกชนิดของไวรัส (ELISA typing) โดยวิธี Indirect double antibody sandwich ELISA มีวิธีการดังนี้

1. Coat plate ด้วย rabbit trapping antibody FMDV type O, A, Asia1 และ normal rabbit serum ในความเข้มข้น (working dilution) ที่เหมาะสม ทำการเจือจาง rabbit serum ด้วย coating buffer (0.05 M Carbonate bicarbonate buffer pH 9.5) หยอดลงบน ELISA plate ก้นเรียบหลุมละ 50 ไมโครลิตร

วางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ความเร็วรอบประมาณ 200 รอบ ต่อนาที นตู้ 37°C incubator นาน 60 นาที หรือเก็บค้างคืนที่ 4 °C

2. ล้างด้วย 0.01M PBS (Phosphate buffer saline) 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

3. เตรียมสารละลาย antigen control และ ตัวอย่างจาก 10% suspension หรือตัวอย่าง isolation tissue culture fluid ใน microtube โดยใช้ ELISA diluent (PBST) ทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ไป 3 dilution หยอดลงในเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ต่อหลุม ปิดฝาเพลท หรือใช้ plate sealer ปิด นำไปวางบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบประมาณ 500 รอบ ต่อนาที ในตู้ 37 $^{\circ}$ C incubator นาน 60 นาที

4. ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

5. ใส่สารละลาย guinea pig anti FMDV type O, A, Asia1 และ normal guinea pig serum ในความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย typing diluent (ประกอบด้วย PBST + 3% bovine serum albumin) หยอดลงเพลท หลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าที่ 37 $^{\circ}$ C incubator นาน 30 นาที

6. ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

7. เติม horseradish peroxidase conjugate ในความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย tying diluent หยอดหลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าที่ 37 $^{\circ}$ C incubator นาน 30 นาที

8. ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

9. เติมสารละลาย 0.01% tetramethyl benzidine substrate (TMB substrate) (ดูวิธีการเตรียมในเอกสารภาคผนวก) หยอดลงในเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร ให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

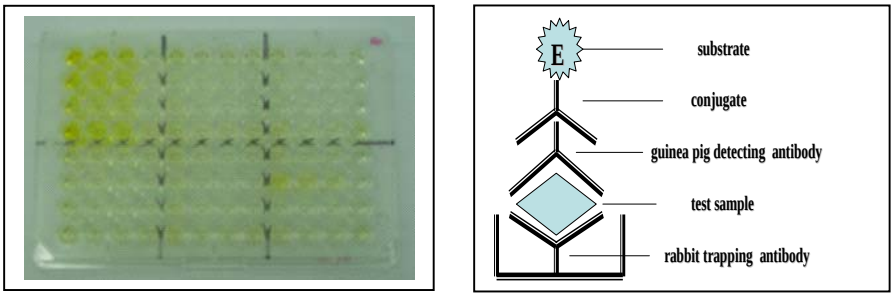
10. เติม stopping solution ของ 1 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate ตัวอย่างที่ positive จะติดสีเหลืองใน serotype นั้น

11. อ่านค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง ELISA Reader ยี่ห้อ Labsystem Multiskan/Titertek Multiskan อ่านที่ wavelength 450 nm (กรณีใช้ OPD substrate หรือ orthophenylene diamine ต้องอ่าน ค่า optical density ที่ wavelength 492 nm)

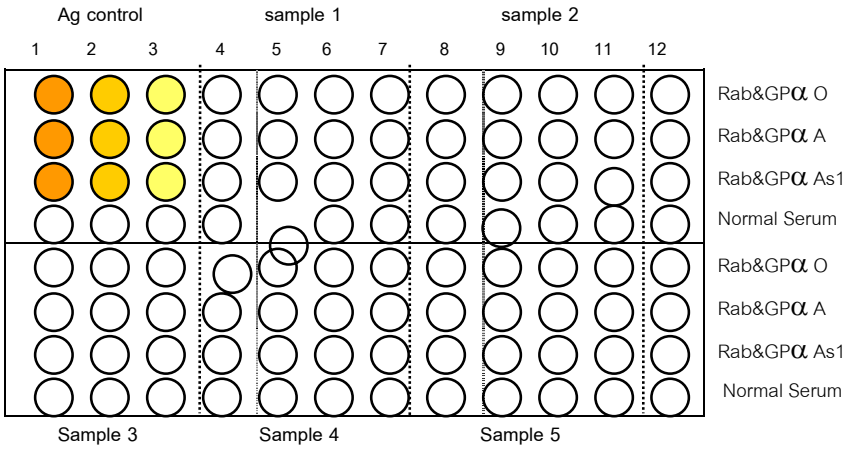
12. การแปลผล

อ่านค่า OD ทุกหลุม หลังหักค่า OD ของ background ออกแล้ว ให้ค่า OD มากกว่า 0.2 ทุกหลุม แสดงว่าให้ผลเป็นบวกหรือ positive และเป็น FMD serotypeใด ให้ดูว่าตรงกับแถว antigen control ของ serotypeใด กรณี OD มีค่าน้อยกว่า 0.2 หลังหักค่า OD ของ background ออกแล้ว ให้อ่านค่าเป็นลบ หรือ negative

รูปที่ 1 Diagram แสดงขั้นตอนการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี ELISA Typing



รูปที่ 2 Diagram แสดงรูปแบบการจัด format plate ของการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี ELISA Typing



4.3 **การเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง** (virus isolation)

การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นวิธีชันสูตรที่ให้ผลแน่นอนและไวที่สุดวิธีหนึ่ง แต่จำเป็นต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากไตของลูกแกะ (primary lamb kidney cell) หรือ เซลล์เพาะเลี้ยงจากต่อมไทรอยด์ของโค (bovine thyroid cell) หรือ cell line จากไตลูกหนู เช่น baby hamster kidney cell (BHK) แต่มีความไวน้อยกว่าเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell)

4.3.1 **การเพาะเลี้ยงเซลล์** (BHK cell line) แบบ monolayer มีวิธีการดังนี้

1) นำเซลล์ที่เกิด confluent monolayer ที่เตรียมไว้เป็น seed cell มาเพาะเลี้ยงต่อ โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ (medium) เก่าทิ้ง

2) ล้างเซลล์ด้วย PBS และดูดทิ้ง

3) เติม 0.1% Versene trypsin เพื่อย่อยและแยกเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยว โดยใช้วิธี pipetting technique

4) ดูดเซลล์ที่ย่อยแล้วใส่ลงใน growth medium ที่มี 5% bovine serum เป็นส่วนประกอบตามปริมาตรที่กำหนด

5) บรรจุลงขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขวดละ 5 มิลลิลิตร (ขนาดขวด 25 ตารางเซนติเมตร)

6) เก็บเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 วัน

4.3.2 **การเพิ่มปริมาณไวรัส** (virus isolation)

เป็นวิธีการผ่านเชื้อไวรัสที่ได้จากการแยกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ส่งมาตรวจแล้วลงในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส มีวิธีการดังนี้

1) นำเซลล์ที่เกิด confluent monolayer ภายใน 2 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง

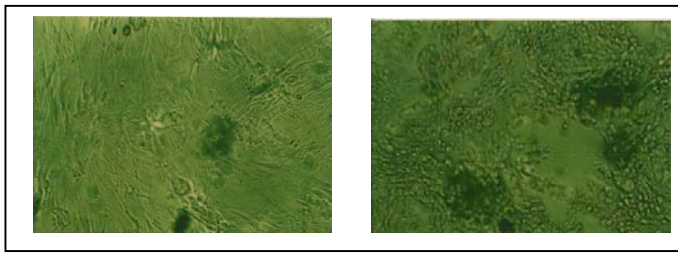
2) เติมส่วนน้ำใสที่ได้จากการสกัดจากเนื้อเยื่อหรือตัวอย่างที่ส่งตรวจ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มในตู้อบเพื่อ adsorb ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3) เติม maintenance medium (MM) และเก็บในตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส

4) อ่านผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect หรือ CPE) ทุกวัน เป็น เวลา 2 วัน

5) ทำการเก็บไวรัสจากเซลล์โดยการ freeze-thaw และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนน้ำใสออกจากตะกอนที่เป็นกากเซลล์

6) นำส่วนของน้ำใสนี้ไปผ่านลงในเซลล์เพาะเลี้ยงอีกครั้ง ปฏิบัติตามข้อ1 ถึงข้อ 5 รวม 3 ครั้ง จนกระทั่งเกิด 100% CPE นำส่วนน้ำไวรัสที่ได้นี้มาทำ LISA typing เพื่อ ยืนยันชนิดของไวรัสอีกครั้งหนึ่ง



Normal cell CPE cell

4.4 **การตรวจหาไวรัสโดยวิธี** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

4.4.1 **วิธีการสกัด** Viral RNA **มีดังนี้**

1) นำตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร ผสมสาร Trizol LS 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น
2) ใช้มือเขย่าเบาๆ ขึ้นลง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อให้ nucleoprotein complex แยกจากกันอย่างสมบูรณ์
3) เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) 250 ไมโครลิตร เขย่า 15 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
4) ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะเห็นสารละลายแยกเป็น 3 ชั้น เก็บสารละลายใสส่วนบน ซึ่งมี Viral RNA ให้มากที่สุด
5) เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
6) ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
7) ดูดส่วนที่เป็นน้ำทิ้งไป จะเหลือส่วนที่เป็น RNA pellet ติดที่ก้นหลอด
8) ล้างตะกอน RNA pellet ด้วย 1 มิลลิลิตร ของ 75% ethanol ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
9) ดูดส่วนน้ำทิ้งไป จะเหลือส่วนที่เป็น RNA pellet ติดที่ก้นหลอด
10) ทำให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย RNase - free water ปริมาตร 30 ถึง 50 ไมโครลิตร
11) ปั่นเหวี่ยงแบบ spin down นำไปทดสอบในขั้นตอนที่ 3.4.2 ต่อไป หรือเก็บในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

4.4.2 Reverse transcription (RT)

1) เตรียมสารผสมเหล่านี้ ลงในหลอด eppendorf ขนาดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร / 1 ตัวอย่าง
RNase - free water		2.5 µl
dNTPs	10 mM	2.5 µl
5X buffer		5.0 µl
random primer/universal primer	20 pmol/µl	1.0 µl
Rnasin Inhibitor	40 pmol/µl	0.5 µl
DTT	0.1 M	2.5 µl
M-MLV	200 U/ µl	1.0 µl
Viral RNA จากข้อ 3.4.1		10 µl

2) ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน โดยใช้ Vortex mixer

3) นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที, 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

4) เก็บสารละลาย RT product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บระยะสั้น) หรือ -20 องศาเซลเซียส (เก็บระยะยาว)

4.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR amplification)

1) เตรียมสารผสมเหล่านี้ ลงในหลอด eppendorf ขนาดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร / 1 ตัวอย่าง
RNase - free water		28.5 µl
dNTPs	10 mM	1.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	3.0 µl
10X buffer		5.0 µl
Primer 1 (universal primer)	20 pmol/µl	1.0 µl
Primer 2 (sense primer)	20 pmol/µl	1.0 µl
Taq DNA polymerase	5 U/ µl	0.5 µl
RT product จากข้อ 3.4.2		10 µl

2) ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง Vortex mixer

3) นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้โปรแกรมดังนี้

94 องศาเซลเซียส	4 นาที	
94 องศาเซลเซียส	60 วินาที	30 รอบ
55 องศาเซลเซียส	60 วินาที	30 รอบ
72 องศาเซลเซียส	90 วินาที	30 รอบ
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

4) เก็บสารละลาย PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ระยะสั้น) หรือ -20 องศาเซลเซียส (ระยะยาว)

4.4.4 **วิเคราะห์ผล โดยวิธี** Agarose gel electrophoresis

1) เตรียม 1.2% Agarose gel และทำหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง นำไปวางบน electrophoresis chamber

2) เติม TAE หรือ TBE buffer ให้ท่วม Agarose plate

3) หยอด DNA marker และตัวอย่างที่ผสมกับ 6x dye ลงในหลุม agarose gel 5 µl/หลุม

4) ปิดฝา chamber ปล่อยให้กระแสไฟฟ้าผ่านในขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที

5) นำแผ่น agarose gel ไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide 10 นาที และล้างน้ำประมาณ 5 นาที

6) อ่านผล PCR product โดยวางบนเครื่อง UV transilluminator จะเห็น PCR product เป็นแถบ

7) ถ่ายรูปแถบ PCR product โดยใช้กล้อง Polaroid MP^{4+}

4.5 การตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Liquid phase blocking ELISA

Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) เป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณด้านวิทยาภูมิคุ้มกันของโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยปฏิกิริยาสมดุล (neutralize) หรือการยับยั้ง (block) ระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่จำเพาะต่อกัน โดยใช้ไวรัสหรือแอนติเจนในปริมาณคงที่ ผสมกับซีรัมที่มีถูกเจือจางเป็นลักษณะ serial dilution และตรวจสอบปริมาณไวรัสที่เหลือจากการถูกยับยั้ง โดยใช้หลักการด้าน enzyme immunoassay ด้วยวิธีที่เรียกว่า indirect double antibody sandwich ELISA ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4 โดยมีวิธีการดังนี้

1) เคลือบ (coat) rabbit trapping antibody anti FMDV ลงบน ELISA plate โดยใช้ coating buffer เป็นตัวเจือจาง ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2) เตรียมตัวอย่าง virus serum mixture ใน U-shape plate โดยเจือจางซีรัมแบบ 2 fold serial dilution และเติม virus ในปริมาณที่คงที่ในแต่ละหลุม อย่างละ 50 ไมโครลิตร/หลุม ในขณะเดียวกันให้เตรียมชุด control panel ซึ่งประกอบด้วย antigen control, strong positive control serum, weak positive control serum และ negative control serum หยอดลงบน U-shape plate ทุกเพลท เขย่าค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3) ถ่าย virus serum mixture จาก U-shape plate ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงบน coated plate วางบนเครื่องเขย่าแบบแนวราบ (orbital shaker) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง ด้วย PBS 5 ครั้ง

4) เติมสารละลาย guinea pig detecting antibody anti FMDV ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม เขย่าในตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง

5) เติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม เขย่าในตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 7 ครั้ง

6) เติมสารละลายซับสเตรท TMB (3,3'5,5' tetramethyl benzindine) หยอดลงในเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร ปล่อยทิ้งไว้ 20 นาที

7) เติม 1M H_2SO_4 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate

8) อ่านค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ด้วยเครื่อง ELISA Reader ยี่ห้อ Labsystem Multiskan/Titertek Multiskan ที่ wavelength 450 nm

9) ในแต่ละเพลท จะมีการควบคุมคุณภาพภายในของทดสอบ โดยจะมีชุดควบคุม antigen control และ serum control ในแต่ละเพลท เพื่อประกันคุณภาพของผลการทดสอบว่าถูกต้องตามวิธีทดสอบ ดังนี้

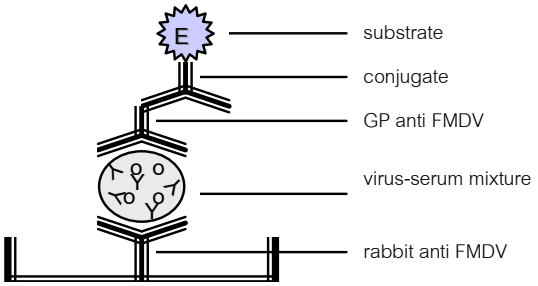
   9.1) strong positive control serum (C++) มีค่า percent inhibition (PI) range = 90-100%

   9.2) weak positive control serum (C+) มีค่า percent inhibition (PI) range = 50-89%

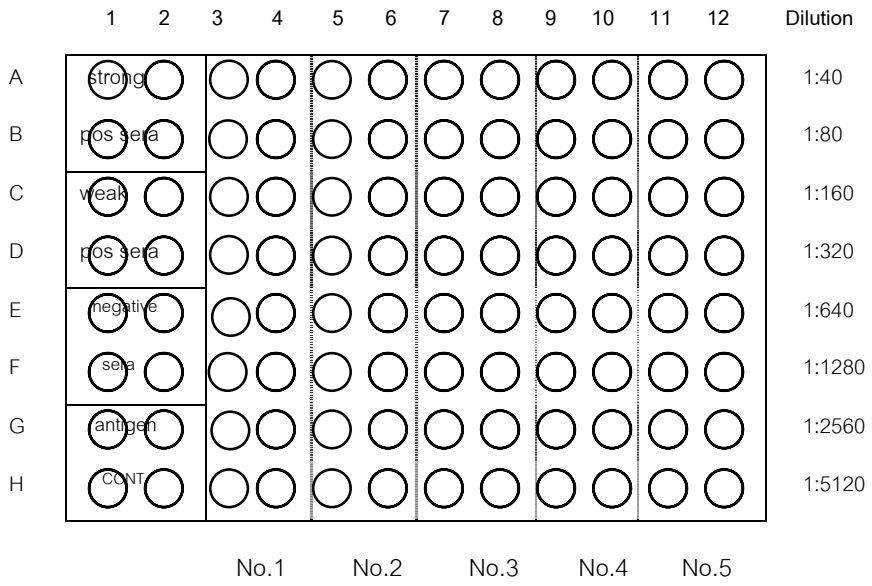
   9.3) negative control serum (C-) มีค่า percent inhibition (PI) range = 0-49%

   9.4) control antigen (Ca) ของแต่ละ serotype ต้องมีค่า OD อยู่ในช่วง 0.9 – 1.5 และ มีค่า percent inhibition (PI) range = -25 –25 %

10) คำนวณค่าระดับภูมิคุ้มกัน โดยดูจากค่า serum dilution สูงสุดที่มีค่า OD อยู่ระหว่าง 50% ของ OD antigen control (OD control antigen ต้องมีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.9 ถึง 1.5) รูปที่ 3 Diagram แสดงขั้นตอนการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Liquid phase blocking ELISA



รูปที่ 4 Diagram แสดงรูปแบบการจัด format plate ของ test serum, control serum, control antigen ของการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Liquid phase blocking ELISA



4.6 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ Non-structure protein ของ FMDV โดยวิธี ELISA

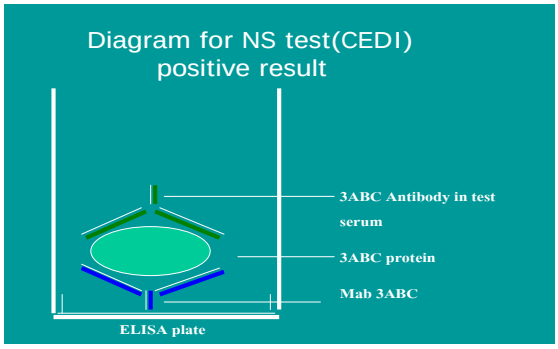
เป็นการตรวจสอบทาง enzyme immunoassay โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non-structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเตรียมและสังเคราะห์โดยการตัดต่อยีนทางพันธุวิทยา (genetic engineering) ในส่วนของยีนนี้เรียกว่า 3A, 3B, 3AB, 3ABC หรือ 3D เป็นต้น วิธีการนี้อาจจะเรียกสั้นๆ ว่าวิธี non-structure (NS) test เพื่อจุดประสงค์ในการแยกสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ฉีดวัคซีน (Deigo et al., 1997; Mackay, 1998) การผลิตสารตรวจสอบในปัจจุบัน ได้มีการพัฒนา non structure protein ในส่วนของ 3ABC,3AB,3B มาผลิตเป็นชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ (commercial kit) และมีการใช้ในต่างประเทศรวมทั้งในประเทศไทยอย่างแพร่หลายแล้ว เพื่อความสะดวกและเหมาะสมในการชันสูตร และประหยัดเวลา ชุดตรวจสอบ Cedi test เป็นอีกชุดตรวจสอบหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการชันสูตรแยกสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ฉีดวัคซีน.ในตัวอย่างซีรัมในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีที่เรียกว่า blocking ELISA ดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6 โดยมีวิธีการดังนี้

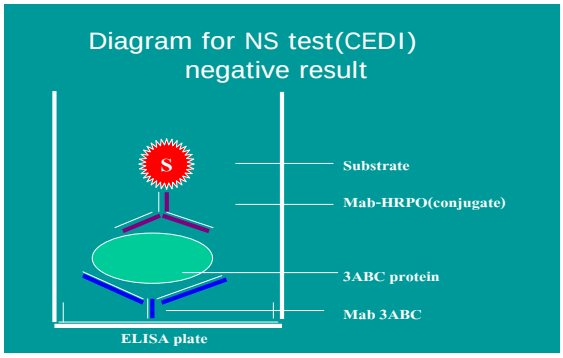
1) ทำการเจือจางตัวอย่างซีรัม (test serum) เป็น 1: 5 โดยใช้สารละลาย ELISA

buffer เป็นตัวเจือจาง ใน ELISA plate ที่ได้รับการ pre-coated มาก่อนแล้วด้วยแอนติเจนที่มีส่วนของ 3ABC non-structure protein

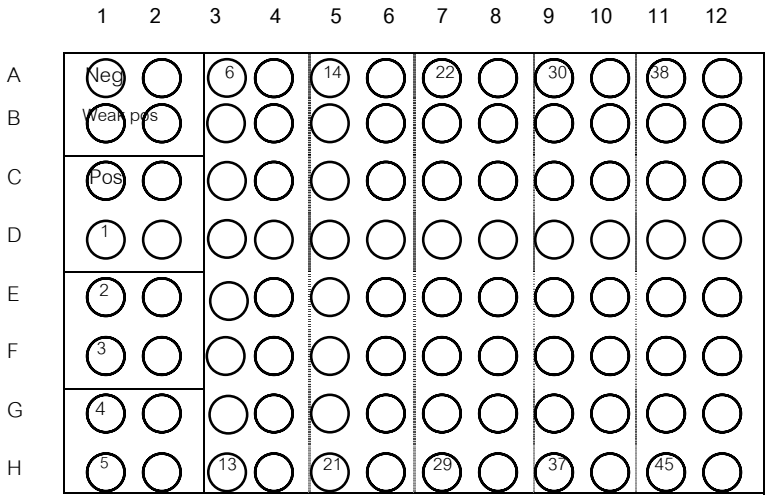
2) วางเพลทที่อุณหภูมิห้อง เก็บค้างคืน แล้วล้างด้วย washing buffer จำนวน 6 ครั้ง
3) เติมสารละลายคอนจูเกต ที่มากับชุดตรวจสอบสำเร็จรูป
4) วางเพลทที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที แล้วล้างด้วย washing buffer จำนวน 6 ครั้ง
5) เติมสารละลาย substrate ที่มากับชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
6) เติม H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยา
7) อ่านค่า optical density ด้วยเครื่องอ่าน ELISA Reader (Labsystem Multiskan, Titertek Multiskan reader)
8) ในชุดตรวจสอบ Cedi test จะมีการควบคุมคุณภาพของชุดทดสอบ โดยจะมีชุดควบคุม negative serum control และ positive serum control ในแต่ละเพลท เพื่อประกันคุณภาพของผลการทดสอบว่าถูกต้องตามวิธีของแต่ละชุดตรวจสอบ ดังนี้
   8.1) ค่า OD ของ Negative serum control ต้องมีค่ามากกว่า 1.0
   8.2) ค่า Percentage inhibition ของ weak positive serum control ต้องมีค่ามากกว่า 50%
   8.3) ค่า Percentage inhibition ของ positive serum control ต้องมีค่ามากกว่า 70%
9) หลักเกณฑ์ในการแปลผล positive (ตัวอย่างซีรัมสัตว์ที่เคยได้รับการติดเชื้อมาก่อน) หรือ negative (ไม่พบว่าตัวอย่างซีรัมสัตว์เคยได้รับการติดเชื้อมาก่อน) มีหลักเกณฑ์การแปลผล ดังนี้
   9.1) ค่า Percentage inhibition ของตัวอย่างซีรัมมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 50% ผลเป็น positive
   9.2) ค่า Percentage inhibition ของตัวอย่างซีรัมมีค่าน้อยกว่า 50% ผลเป็น negative

รูปที่ 5 Diagram แสดงขั้นตอนวิธีการตรวจสอบ blocking ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบ Cedi test





รูปที่ 6 Diagram แสดงรูปแบบการจัด format plate ของ test serum, positive serum control และ negative serum control ของชุดตรวจสอบ Cedi test



5. เอกสารอ้างอิง

Burows, R. 1968. Excretion of foot and mouth disease virus prior to development of lesion. Vet. Rec. 82:387-388.

Burows, R., Mann, J.A., Greig, A., Chapman, M.G. and Goodridge, D. 1971. The growth and persistence of foot and mouth disease virus the bovine mammary gland. V. Hyg. (Camb.). 69: 307-321.

Burows, R., Mann, J.A., Garland, A.J.M., Greig, A. and Goodridge, D. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot and mouth disease virus in cattle. J. Comp. Patho. 91: 599-609.

De Deigo, M., Brocchi E., Mackey, D. and De Simone, F. 1997. The non structural of polyprotein 3ABC of FMD virus as a diagnosis antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. Arch Virol 142: 2021-2033.

Ferris NP and Dowson, M. 1988. Routine application of enzyme-linked immunoassay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot and mouth disease and swine vesicular disease. Vet. Micro 16: 201-209.

Hedger, R.S. 1968. The isolation and characterisation of FMDV from clinically normal herds of cattle in Botswana. J. Hyg. (Camb.). 66: 27-36.

Hedger, R.S., Condy, J.B. and Golding, S.M. 1972. Infection of some species of African wild life with foot and mouth disease virus. J. Ccmp. Path. 82: 455-461.

Mackay, D., Forsyth, M., Davies, P.R. and Salt, J.S. 1998. Antibody to the non structural proteins of foot and mouth disease virus in vaccinated and animal exposed to infection. The Veterinary Quaterly. 20: 9-11.

Mc Vicar, J.W. and Sutmoller, P. 1970. Foot and mouth disease: The agar gel immunodiffusion precipitation test for antibody to virus infectious associated (VIA) antigen as a tool for epizootiological surveys. Am. J. of epidem. 92: 273-278.

Panina, G.F., Amadori, M., Massirio, I., Pavesi, M. And Perini, S. 1988. Persistence of foot and mouth disease virus (FMDV) infection in pigs. Report of the 56th General Session of OIE, Paris, Appendix X.

Roeder, P.L. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. The detection of typing of foot and mouth disease virus by enzyme-linked immunoassay: a sensitivity rapid and reliable technique for primary duagnosis. Res. Vet. Sci. 43: 223-232.

Singh, P.P. 1977. Studies on foot and mouth disease in goats with special reference to the distribution of virus and carrier status. Ph.D. Thesis, Agra University, India.

6. ภาคผนวก

6.1 การเตรียม ELISA reagent

1. การเตรียม trapping antibody,rabbit anti FMDV type O, A และ Asia1 โดยการฉีด 146S แอนติเจนที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ในกระต่าย ซึ่งเตรียมแยกเชื้อไวรัสแต่ ละสายพันธุ์ โดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่ายใช้ปริมาณ 146S แอนติเจน ประมาณ 40 ไมโครกรัมต่อตัว ปล่อยไว้ 28 วัน จึงทำการฉีดแอนติเจนซ้ำ โดยฉีด 146S แอนติเจน ขนาด 20 ไมโครกรัม ต่อตัว ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ทำการเจาะเลือดกระต่ายวันที่ 10 หลังฉีดเข็มที่สอง ทำการแยกซีรัม แล้วนำมา titration เพื่อหาความเจือจางที่เหมาะสมที่ใช้ในงาน ตรวจสอบ ELISA แล้วแยกใส่ไมโครทิวและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมdetecting anibody, guinea pig anti FMDV type O, A และ Asia1 โดยการฉีด 146S แอนติเจนที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ในหนูตะเภา ซึ่งเตรียมแยกเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์โดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหนูตะเภาในขนาด 20 ไมโครกรัมต่อตัว ทำการเจาะเลือดในระยะ 28 วันหลังฉีด ทำการแยกซีรัม แล้วนำมา titration เพื่อหาความเจือจางที่เหมาะสมที่ใช้ในงานตรวจสอบ ELISA แล้วแยกใส่ไมโครทิวและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

6.2 การเตรียมสารละลายสำหรับงาน ELISA technique

1. Coating buffer

   ละลาย 0.05 M carbonate – bicarbonate buffer capsules, Sigma code no. C-3041 จำนวน 5 capsule ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2. PBS สำหรับเป็น washing buffer

   เตรียมสต๊อก PBS A ความเข้มข้น 10 เท่า สำหรับ 5 ลิตร ดังนี้

1) NaCl	400.0	กรัม
2) KCl	10.0	กรัม
3) Na2HPO4	57.5	กรัม
4) KH2PO4	10.0	กรัม

   ละลายในน้ำกลั่น 5 ลิตร

3. ELISA diluent (PBST)

   สำหรับสารละลายปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

   1) ละลาย 0.01M Phosphate buffer saline ชนิดผง Sigma cod no. p3813 จำนวน 1 ซอง ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   2) เติม tween 20 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

3) เติม 1% phenol red ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

4) ปรับ pH เป็น 7.6

4. Citrate-acetate buffer stock

1) เตรียมสต๊อกสารละลาย 1M Citric acid ดังนี้

Citric acid	20	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2) เตรียมสต๊อกสารละลาย 1M Sodium acetate ดังนี้

Sodium acetate	8.2	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3) ใช้ 1M Citric acid ปริมาตรประมาณ 4 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH ของสารละลาย 1M Sodium acetate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ได้ pH 5.6

5. Blocked diluent **ในการเตรียมสารละลาย** guinea pig dilution **และ** conjugate Dilution

สำหรับการทดสอบส่วนใหญ่ ไม่จำเป็นต้องใช้ BSA (bovine serum albumin) ชนิดคุณภาพสูง (high level) แต่สามารถใช้ gelatin หรือ skimmed milk แทนได้ สำหรับ ELISA typing assay ใช้ 3% bovine serum albumin สำหรับ LP ELISA assay 5% skimmed milk เตรียม blocked diluent 500 มิลลิลิตร ดังนี้

1) PBST	500	มิลลิลิตร

2) เติม 0.5% gelatin (V/V) หรือ 5% skimmed milk powder (W/V) หรือ 3% bovine serum albumin (W/V) ผสมใน PBST

3) ปรับ pH ให้ได้ 7.6

6. Chromogen/TMB substrate solution (3,3'5,5' tetramethyl benzindine)

เตรียมเป็นสต๊อกสารละลาย 1 % ดังนี้

1) TMB substrate	0.1	กรัม
2) DMSO (Dimethylsulfoxide)	10.0	มิลลิลิตร

3) ละลาย TMB substrate ใน DMSO แยกใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

เตรียม working solution ดังนี้

4) เตรียมสารละลาย

Part A: D.W.	9.0	มิลลิลิตร
1% TMB	0.1	มิลลิลิตร
Citrate acetate buffer	1.0	มิลลิลิตร

Part B: เจือจาง H_2O_2 25 μl (30% V/V) ในน้ำกลั่น 400 μl

ดูด 25 μl ของสารละลาย part B ใส่ลงในสารละลาย part A

7. Stopping solution

เตรียม 1 M H_2SO_4 ปริมาตร 450 มิลลิลิตรดังนี้

conc. H_2SO_4 (36 N)	25	มิลลิลิตร
ละลายในน้ำกลั่น	425	มิลลิลิตร

8. Disinfectant

4%	Na2CO3 solution (W/V)
10%	Citric acid (W/V)
5%	Iodophore solution (V/V)

6.3 การเตรียมสารละลายสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

1. 7% NaHCO3

1) NaHCO3	7	กรัม
2) น้ำกลั่น (DW) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	100	มิลลิลิตร

กรองแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. PBS **ความเข้มข้น** 10 **เท่า**

1) NaCl	80	กรัม
2) KCl	2.0	กรัม
3) Na2HPO4	11.5	กรัม
หรือ Na2HPO4 2H2O	14.0	กรัม
หรือ Na2HPO4 12H2O	28.9	กรัม
4) KH2PO4	2.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 1% EDTA

1) EDTA	1	กรัม
2) PBS	100	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. Trypsin 1%

1) Trypsin x 250	1	กรัม
2) PBS	100	มิลลิลิตร

เขย่าค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส กรองแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. Trypsin–Versine (TV)

1) 1% Trypsin	12.5	มิลลิลิตร
2) 1% EDTA	2.5	มิลลิลิตร
3) ละลายใน PBS	85	มิลลิลิตร

กรองแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. Fungizone

1) Fungizone	50	มิลลิกรัม
2) น้ำกลั่น (DW) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	100	มิลลิลิตร

กรองแล้วเก็บในหลอดขนาด 3 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. Antibiotic

Penicillin	100 – 200	ยูนิต/มิลลิลิตร
Streptomycin	10000 – 20000	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Kanamycin	500 – 10000	ยูนิต/มิลลิลิตร

กรองแล้วเก็บในหลอดขนาด 3 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8. Growth medium (GM) **ที่มี** 5% Bovine serum

1) MEM	93	มิลลิลิตร
2) Bovine serum	5	มิลลิลิตร
3) Antibiotic	1	มิลลิลิตร
4) Fungizone	0.5	มิลลิลิตร
5) 7% NaHCO3	1	มิลลิลิตร

9. Maintenance medium (MM)

1) MEM	97	มิลลิลิตร
2) Antibiotic	1	มิลลิลิตร
3) Fungizone	0.5	มิลลิลิตร
4) 7% NaHCO3	2.5–3.5	มิลลิลิตร

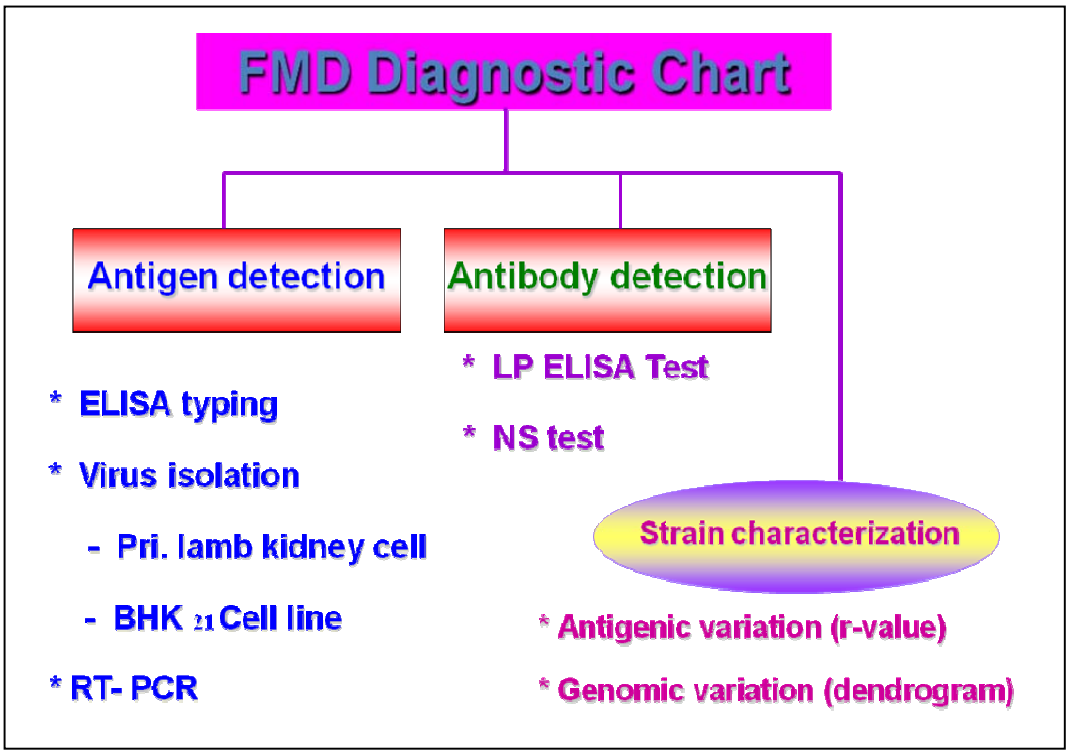
10. 2.92% L-glutamin

1) L-glutamin	2.92	กรัม
2) น้ำกลั่น (DW) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	100	มิลลิลิตร

11. Freezing medium

1) Growth medium (GM)	10	มิลลิลิตร
2) Bovine serum	0.5	มิลลิลิตร
3) DMSO	1	มิลลิลิตร

6.4 แผนผังการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย



****