

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการพัฒนา dipstick colloidal dye ในการทดสอบทางด้านอิมมูโนวิทยา
ในห้องที่สำหรับโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวและแบคทีเรียในโคนม

Development of dipstick colloidal dye Immunoassay systems for
the field diagnosis of bovine protozoal and bacterial diseases in dairy cattle

โดย

นางสุรีย์	ธรรมศาสตร์
นางสาวมณฑา	เอกัตร์
นายสุรพงษ์	วงศ์เกษมจิตต์

ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สัญญาเลขที่ RDG 4120005

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การศึกษาทางด้านโปรโตซัว (<i>Trypanosoma evansi</i>, <i>Anaplasma marginale</i> และ <i>Babesia bigemina</i>)	
1. การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อโปรโตซัว (Protozoa)	3
1.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อโปรโตซัวในสัตว์ทดลอง เพื่อใช้เตรียมแอนติเจน	
1.2 การแยกเชื้อโปรโตซัวออกจากเลือดสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์	
1.3 การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อที่แยกได้จากข้อที่ 1.2	
1.4 การวัดหาความเข้มข้นของโปรตีนใน crude extract antigen จากข้อ 1.3	
1.5 การ purified antigen เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป	
1.5.1 การทำ SDS - PAGE และ Western blot เพื่อดูลักษณะโดยรวมของแอนติเจน	
1.5.2 การ purified antigen เพื่อใช้ในการฉีดสัตว์ทดลองและใช้ในการทดสอบต่างๆ	
2. การฉีดแอนติเจนเข้าสัตว์ทดลอง เพื่อเตรียมทำ Monoclonal antibodies และ Hyperimmune serum	8
2.1 การฉีดแอนติเจนเข้าหนู mice เพื่อเตรียม Monoclonal antibodies	
2.2 การฉีดแอนติเจนเข้ากระต่ายทดลอง เพื่อเตรียม Hyperimmune serum	
2.3 การตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมสัตว์ทดลอง (หนู mice และกระต่าย)	
3. การ Purified Hyperimmune serum และการวัดหาปริมาณโปรตีน	10
3.1 การเตรียม Affinity column	
3.2 การแยก Immunoglobulin ด้วย Affinity column	
4. การเตรียม Monoclonal antibodies ต่อเชื้อ Trypanosome และการทดสอบ	11
4.1 การทำ cell fusion	
4.2 การ screen positive hybridoma clones	
4.3 การทดสอบคุณสมบัติ hybridoma clones จากน้ำเลี้ยงเซลล์	
4.4 การทำ cloning จาก poly hybridoma clones ให้เป็น single clone	
4.5 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างชนิดของ Immunoglobulin ของ Single clone	
4.6 การทดสอบคุณสมบัติของ Monoclonal antibody (McAb) โดยวิธี Western blot กับ Homologous antigen และการทำ ELISA	
4.7 การทดสอบ specificity ของ McAb กับ Heterogenous antigen ด้วยวิธี ELISA (cross- reaction test)	
4.8 การหา sensitivity ของ McAb ต่อแอนติเจน Trypanosome	

	หน้า
5. การผลิต McAb ในหนู mice	16
5.1 การผลิต McAb	
5.2 การ purified McAb จาก ascites fluid	
5.3 การวัดหาปริมาณความเข้มข้นของ McAb ที่ได้	
6. การกำหนดระบบการทดสอบซีรัมด้วยวิธี Dipstick colloidal dye immunoassay (DIA)	17
6.1 การเตรียม Nitrocellulose strip	
6.2 การเตรียม Dye-Antibody Reagent	
6.3 วิธีการทดสอบ	
7. การประเมินผลการทดสอบ	20
8. รูปภาพ	26
การศึกษาทางด้านแบคทีเรีย (Brucellosis, Tuberculosis and Paratuberculosis)	
1. การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อแบคทีเรีย	35
2. การเตรียม polyclonal antibodies	36
3. การกำหนดระบบการทดสอบซีรัมด้วยวิธี Dipstick colloidal dye immunoassay (DIA)	37
3.1 อุปกรณ์	
3.2 การเตรียม Nitrocellulose strip	
3.3 การเตรียม Dye-Antibody Reagent	
3.4 การพัฒนาระบบ DIA	
3.5 ผลการศึกษาระบบการทดสอบโรคโดยวิธี DIA	
4. การศึกษา Diagnostic Sensitivity (DSn) และ Diagnostic Specificity (DSp)	41
5. การทดสอบตัวอย่างซีรัมโคนมในพื้นที่โดยวิธี DIA	42
6. การศึกษาวิธี Dot-ELISA	43
7. การศึกษา Diagnostic Sensitivity (DSn) และ Diagnostic Specificity (DSp) ของวิธี Dot-ELISA	45
8. การทดสอบตัวอย่างซีรัมโคนมในพื้นที่โดยวิธี Dot-ELISA	47
9. การศึกษา Cross reaction ในการตรวจ Tuberculosis และ Paratuberculosis โดยวิธี Western blotting	48
10. วิจัย	51
11. ตารางและรูปภาพ	54
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	66
บทคัดย่อ	69

การพัฒนา dipstick colloidal dye ในการทดสอบทางด้านอิมมูโนวิทยาในห้องที่ สำหรับโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวและแบคทีเรียในโคนม

คำนำ

ตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2540-2544) รัฐบาลได้กำหนดนโยบายในด้านการเกษตรและปศุสัตว์ โดยมุ่งเน้นในการเพิ่มผลผลิตการเกษตรและการปศุสัตว์เพื่อลดการนำเข้า เพิ่มการส่งออกและให้มีเพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศ แต่การพัฒนาอุตสาหกรรมด้านการเลี้ยงปศุสัตว์โดยเฉพาะโคนมยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับสุขภาพและโรคต่างๆที่เกิดขึ้น ดังนั้นการดูแลและควบคุมโรคต่างๆ ในโคนมโดยใช้เทคนิค วิธีการที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็น

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก องค์การความร่วมมือระหว่างประเทศของญี่ปุ่น (JICA) ในด้านการพัฒนางานวิจัยโรคที่สำคัญในสัตว์ ตลอดจนการให้บริการตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์ต่างๆและจากผลการตรวจวินิจฉัยที่ผ่านมาพบว่า ยังมีโรคที่สำคัญหลายโรค เช่น Brucellosis, Tuberculosis (TB) ในโคนม มีอัตราการเกิดโรคอยู่ประปรายและอาจจะมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยเฉพาะโคนมที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพราะสภาวะการเกิดโรคข้างต้นนั้นในโคพื้นเมืองพบว่ามีความต้านทานโรคมามากกว่าและที่สำคัญโรค Brucellosis และ Tuberculosis เป็นโรคสัตว์ติดคนที่ควรจะได้ตระหนักเช่นกัน นอกจากนี้ปัญหาโรคพยาธิโปรโตซัวที่มีแมลงเป็นพาหะ ก็มีความสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในโคนม เช่นโรค Trypanosomosis, Babesiosis และ Anaplasmosis ซึ่งโรคที่เกิดจากพยาธิโปรโตซัวทั้ง 3 ชนิด สามารถทำให้สัตว์ตายแบบเฉียบพลัน หรือป่วยเรื้อรัง อันมีผลต่อการลดปริมาณของน้ำนมในโคนมด้วย

ปัจจุบันแม้สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จะให้บริการตรวจวินิจฉัยโรคอยู่ แต่การเลี้ยงปศุสัตว์โดยเฉพาะโคนมมีการเลี้ยงอยู่ทั่วประเทศ ทำให้การบริการไม่อาจครอบคลุมได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการที่จะใช้ตรวจสอบโรคได้ง่ายและมีความไว สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้สะดวกโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยู่งยาก ซึ่งการพัฒนาวิธีทดสอบที่ง่ายและสะดวกนี้ จะเป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญในงานด้านระบาดวิทยา

การทดสอบโรคโดยวิธี ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวในการทดสอบมีการใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน แต่เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการทดสอบพอสมควร รวมถึงต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีหลายชนิด ซึ่งในห้องที่ไม่สามารถหาได้ ดังนั้นเมื่อมีการพัฒนา dipstick colloidal dye immunoassay (DIA) เพื่อใช้ในการทดสอบหาแอนติเจนพร้อมกันทีเดียวได้หลายชนิดขึ้นมา จึงเกิดแนวคิดในการประยุกต์วิธี sandwich ELISA, dot blotting และ colloidal particle-linked antibodies มาปรับใช้ร่วมกันเพื่อทำให้ได้ dipstick test ที่เป็นวิธีการทดสอบหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีบน nitrocellulose โดยแยกแต่ละแถบของ nitrocellulose ในการทดสอบที่ต่างกัน โดยผลการทดสอบจะเกิดเป็นจุดสีขึ้นบนแถบ nitrocellulose ถ้าการทดสอบนั้นให้ผลบวก

การใช้วิธี DIA เป็นวิธีที่ไม่สิ้นเปลือง ง่าย และสามารถทำครั้งละมากๆ ได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการใช้งานด้านการสำรวจทางระบาดวิทยา การคัดกรองโรคเบื้องต้นและเป็นเครื่องมือที่มีค่าในการทดสอบโรคในห้องที่ โดยเฉพาะโรคที่ทำให้เกิดการตายเฉียบพลันในโคนม เพราะจะช่วยทำให้การรักษาได้ทันต่อเหตุการณ์

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจหาเชื้อและแอนติบอดีของโรคโปรโตซัวและแบคทีเรียในโคนมที่สำคัญในเบื้องต้นได้ด้วยตนเอง

การพัฒนา Dipstick colloidal dye ในการทดสอบทางด้านอิมมูโนวิทยาในห้องที่สำหรับ โรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว

การศึกษาทางด้านโปรโตซัว (*Trypanosoma evansi*, *Anaplasma marginale* และ *Babesia bigemina*)

1. การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อโปรโตซัว (Protozoa)

- *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*)
- *Anaplasma marginale* (*A. marginale*)
- *Babesia bigemina* (*B. bigemina*)

1.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อโปรโตซัวในสัตว์ทดลอง เพื่อใช้เตรียมแอนติเจน

การเตรียม

1. นำเลือดโคที่มีเชื้อ *T.evansi* ที่เก็บได้จากสัตว์ป่วยในแต่ละท้องถิ่น คือ
 - กำแพงแสน
 - อยุธยา
 - ราชบุรี
 - ปราชินบุรี
 - สิงห์บุรี
 - เพชรบุรี
 - สระบุรี
 - ลพบุรี
 - ฉะเชิงเทรา
2. นำมาฉีดเข้าช่องท้องหนู rat (ขาวใหญ่) จำนวนตัวละ 0.5 ml. โดยเชื้อจากแต่ละแหล่งจะฉีดเข้าหนู 12 ตัว ทำการแบ่งฉีด 2 ครั้ง ครั้งละ 6 ตัว หลังจากฉีดแล้ว 2 วันตรวจเช็คว่าจำนวนเชื้อ จากการตัดหางหนูแล้ว หยดเลือดลงบน slide (fresh blood smear) ถ้าปริมาณเชื้อได้ $10^8 - 10^9$ ตัว/ml ก็จะทำให้การเจาะเลือดจากหัวใจ หนูโดยวางยาสลบหนูด้วย ether แล้วจึงเจาะเลือดโดยมีสาร heparin 1000 unit ใส่ปริมาณ 0.10 ml ต่อเลือด 10 ml
3. หนูขาวใหญ่ 1 ตัว จะเจาะได้เลือดประมาณ 4 - 5 ml นำเลือดที่มีเชื้อ *T. evansi* ผสม heparin แฉะเย็นไว้โดยแบ่งส่วนหนึ่งมา 2 ml เพื่อเก็บไว้เป็น stock ของเชื้อ จากนั้นนำเลือดที่เหลือไปแยกเชื้อออกจากเม็ดเลือดต่อไป (โดยทั่วไปฉีดเชื้อครั้งหนึ่ง 6 ตัว แต่จะเก็บเชื้อได้ไม่พร้อมกัน คือ การเกิด parasitaemia จะต่างกัน 1 - 2 วัน คือ จะเจาะเลือดได้ 2 - 3 ตัวต่อครั้ง เลือดที่ได้แต่ละครั้งจะรวมกันประมาณ 10 - 15 ml)

1.2 การแยกเชื้อโปรโตซัวออกจากเลือดสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

นำเลือดที่ได้มาผสมกับบัฟเฟอร์ PSG (phosphate saline + glucose) ก่อนที่จะนำไปผ่าน anion exchange column โดยใช้ preswollen DE 52 เป็น anion matrix (whatman product) ซึ่งขั้นตอนการแยกเชื้อ *T. evansi* จากเลือดหนูทำดังนี้

การเตรียม anion exchange column

ละลาย preswollen DE 52 ด้วย PS buffer (phosphate saline buffer pH 8.0) แล้วเท PS buffer ที่ทำแบบเดิม 2-3 ครั้ง จนเจลจับกันดีไม่ลอยฟุ้งแล้วจึงเปลี่ยนจาก PS buffer เป็น PSG buffer แล้วปรับ pH ของเจลให้ได้ pH 8.0 ก่อนที่จะเทเจลลงในกรวย Three pieces funnel ซึ่งเป็นกรวยทรงกระบอกมีส่วนประกอบแผ่นรองด้านล่างเป็นพลาสติกที่เจาะรูทั่วแผ่นแล้วประกอบด้วยส่วนของปลายกรวยเป็นทรงกระเปาะมีปลายแหลมที่ต่อกับสายยางที่มี three ways junction เพื่อปรับความเร็วของ buffer ในระหว่างการ elute ให้เชื้อ *T. evansi* ออกมา ก่อนการแยกเชื้อให้ตัดกระดาษกรองขนาดเท่าเส้นผ่าศูนย์กลางด้านล่างของกรวยวางปิดรูเปิด แล้วเท buffer ลงไปก่อนประมาณ 1 ใน 3 ของกรวยกรองแล้วจึงเทเจลลงไป (เท PSG ออกจากเจลบางส่วนก่อน) ค่อยๆ ให้เจลจับตัวแน่นจนเจลแพ็คเกือบถึงขอบด้านบนของกรวยกรองแล้วจึงตัดแผ่นกระดาษกรองอีกแผ่นปิดทับหน้าเจลไว้โดยยังมี PSG เหลืออยู่เหนือขอบของเจลกันไม่ให้เจลแห้ง (ขอบเจลควรห่างจากขอบกรวยบนประมาณ 1-1.5 ซม.) จากนั้นเทเลือดที่ผสม PSG ในอัตราส่วน 1:1 ลงไปบนกระดาษกรองเหนือเจลโดยเทเบาๆปล่อยให้เลือดค่อยซึมผ่านเจลลงไปจนผ่านกระดาษกรองหมดแล้วจึงใช้ PSG เติมลงไปเพื่อ elute เอาเชื้อ *T. evansi* ออกจากเจลโดยเมื่อดูดเลือดแดงจะจับกับเจลปล่อยให้เชื้อไหลผ่านเจลไปตามแรงดันของ buffer ที่ไล่ลงไปเรื่อยๆ ปลายกรวยจะมี flask ที่แช่ในถังน้ำแข็งรองรับเชื้ออยู่ ระหว่างที่เชื้อกำลังไหลผ่านกรวยกรองสามารถมองเห็นเชื้อไหลผ่านในกระเปาะกรวยด้านล่างเป็นสายขุ่นๆได้ชัดเจน ตรวจสอบเช็ดดูเชื้อเป็นระยะว่ามีมากน้อยแค่ไหน โดยใช้กระจกสไลด์รองหยด buffer ที่ไหลลงมาแล้วปิดด้วย cover slide นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x 40 ถ้าเชื้อเหลือจำนวนน้อยหรือ buffer ในกระเปาะกรวยใสแล้วจึงเลิกเก็บเชื้อ นำ eluate ที่ได้ทั้งหมดแบ่งใส่หลอด centrifuge ขนาด 50 ml ในการผ่าน column ครั้งหนึ่งจะได้ eluate ประมาณ 200 - 250 ml เมื่อแบ่งใส่หลอด centrifuge แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2500 rpm นาน 20 นาที ที่ 4°C ในครั้งแรกและการปั่นในครั้งต่อมาจะเป็นการล้างเฉพาะเชื้อ *T. evansi* ซึ่งจะตกลงมาอนที่ก้นหลอด โดยนำแต่ละหลอดในครั้งแรกมารวมกันแล้วทำการปั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งสุดท้าย sediment ที่ได้จะเติม PBS ในปริมาณเท่ากับปริมาณ sediment ซึ่งคือเชื้อที่มีอยู่แล้ว นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°C เพื่อเตรียมทำเป็นแอนติเจนต่อไป หนูขาว 1 ตัวจะได้เชื้อปริมาณประมาณ 0.15 - 0.2 ml

1.3 การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1.2

เมื่อรวบรวมเชื้อที่ผ่าน column ในแต่ละแหล่ง ได้ปริมาณมากพอก็นำมาเตรียมเป็นแอนติเจนโดยวิธีการ freeze and thaw คือ นำเชื้อ Trypanosome ที่แช่แข็งไว้มาละลายแล้วนำไปทำให้แข็งโดยแช่ในไนโตรเจนเหลว 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำอุ่น 37°C 2 นาที แล้วนำไปแช่ลงใน Liquid nitrogen อีก ทำซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง จากนั้นก็นำเชื้อที่ละลายครั้งสุดท้ายไปปั่นด้วยความเร็ว 10000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C เก็บส่วนใสที่ได้ ซึ่งจะใช้เป็นแอนติเจนโดยแบ่งใส่หลอด vial ไว้ 5 µl เพื่อนำไปวัดค่าโปรตีน ส่วนที่เหลือแบ่งใส่หลอดเล็กๆหลอดละ 200 µl แล้วนำเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°C ซึ่งจะใช้เป็นแอนติเจนต่อไป

1.4 การวัดหาความเข้มข้นของโปรตีนใน crude extract antigen จากข้อ 1.3

วิธี coomassie protein assay.

1. เตรียม coomassie blue G250 20 mg โดยละลายใน 10 ml 95% ethanol เติม 20 ml ของ 85% phosphoric acid แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 200 ml แล้วนำสารละลายกรองผ่านกระดาษกรอง สารละลายที่ได้เก็บในขวดสีชาในตู้เย็นที่ 4°C
2. การวัดค่า Protein ใช้ sample 100 μ l + coomassie blue reagent 1 ml แล้วอ่านค่าโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความเข้มแสง 595 nm
3. การหาค่าโปรตีนในตัวอย่างจะต้องทำ standard curve ก่อน โดยใช้ bovine serum albumin ในการทำจะเตรียม standard reagent ไปพร้อมกับการทำ sample และอ่านค่าพร้อมกัน จากนั้นนำค่า standard มาเขียนกราฟ แล้วนำค่า O.D. ที่ได้จาก sample มาอ่านเปรียบเทียบกับ standard curve ที่ได้ ก็จะได้ค่าของความเข้มข้นของ Protein ที่ต้องการวัด ซึ่งการวัดค่า Protein ทุกครั้งจะทำ standard curve ไปด้วยทุกครั้งเช่นกัน

ผล

การเตรียมแอนติเจน *T. evansi* ซึ่งเป็น Trypanosome lysate antigen และเป็น crude extract antigen จากการฉีดเชื้อที่ได้จากพื้นที่ต่างๆเข้าหนู แห่งละ 12 ตัว จะได้ Trypanosome lysate antigen ดังนี้

แหล่งที่มาของแอนติเจน	ปริมาณแอนติเจน (ml)	ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)
1. กำแพงแสน	2.0	14.6
2. อยุธยา	2.5	5.9
3. ราชบุรี	1.7	6.4
4. ปราจีนบุรี	1.8	15.0
5. ลพบุรี	1.8	10.3
6. สิงห์บุรี	1.7	18.5
7. เพชรบุรี	1.5	20.5
8. สระบุรี	2.5	7.4
9. ฉะเชิงเทรา	2.3	13.1

หนูที่นำมาฉีดเชื้อทั้งหมด 100 ตัว แต่มีหนูตายระหว่างการฉีดเชื้อจำนวน 10 ตัว

1.5 การ purified antigen เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

1.5.1 การทำ SDS - PAGE และ Western blot เพื่อดูลักษณะโดยรวมของแอนติเจน

โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมได้จากเชื้อ Trypanosome ในแต่ละแหล่ง นำมาแยกโดย SDS - PAGE แล้วทำ Western blot ซึ่งแอนติเจนที่ใช้ในแต่ละแหล่งในปริมาณ 20 μ g/lane และใช้ Positive serum จากโคที่ตรวจพบเชื้อโดยการดูจาก thin blood smear และ Negative serum จากโคที่เป็นปกติไม่ติดเชื้อ ในการทำ Western blot ซึ่งขั้นตอนการทำ SDS - PAGE และ Western blot มีดังนี้

1. SDS - PAGE

1.1 การเตรียม gel

- gel ที่ใช้เตรียม 10% separating gel และ 5% stacking gel ใน minigel apparatus ของ Bio-rad

1.2 การเตรียม sample

- ใช้แอนติเจน *Trypanosoma evansi* crude extract ที่มีความเข้มข้น 20 µg/lane

1.3 หยอด sample ลงใน stacking gel ที่ทำเป็นช่องไว้ ใช้ micropipette tip ที่มีปลายเรียวเล็กยาว จุด sample ให้ได้ตามปริมาตรที่ต้องการคือ แอนติเจน *Trypanosoma evansi* 10 µl/lane โดย lane ที่อยู่ริมทั้ง 2 ข้างหยอด sample buffer และ lane ที่ถัดเข้ามาหยอด Molecular weight marker (MWM) ซึ่งเป็น prestained (sigma product) ทั้ง sample buffer และ Molecular weight marker หยอด lane ละ 10 µl แล้วเติม running buffer (Tris:glycine + SDS-pH 8.3) ลงในกล่องบรรจุเจลจนได้ระดับก่อนที่จะเริ่มขบวนการต่อไป

1.4 running condition

- ครั้งแรกเมื่อเปิดเครื่องให้ปรับความต่างศักย์ไว้ที่ 50 volt เมื่อ sample วิ่งผ่าน stacking gel แล้ว
จึงเปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 100 volt และปล่อยให้วิ่งจนกว่า sample จะวิ่งลงไปจนสุดขอบของ gel
จึงปิดเครื่อง

2. Western blotting and immunostains

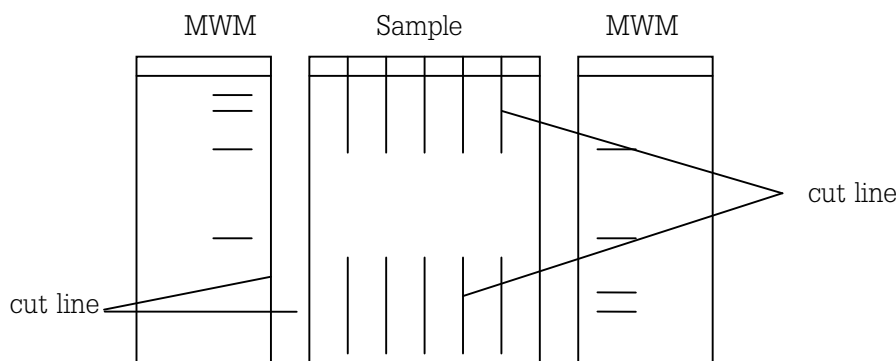
2.1 แยก gel ออกจากแผ่นแก้วที่ประกอบอยู่หลังจากการทำ SDS - PAGE เสร็จแล้ว โดยแช่แผ่น gel ลงใน transfer buffer (Tris-glycine pH 7.8)

2.2 ตัดแผ่นกระดาษกรอง 4 แผ่น ขนาดเท่ากับแผ่นกระดาษที่กว้างกว่า membrane 0.5 mm. แล้ว ตัดกระดาษ immobilion P membrane (PVDF = Polyvinylidene difluoride) ให้มีขนาด ใหญ่กว่า gel 0.5 cm. จำนวน 2 แผ่น

2.3 ประกอบแผ่น gel immobilion P กระดาษกรอง และแผ่น fiber ในลักษณะซ้อนกันเป็นชั้นในชั้น ของ plastic lock ซึ่งเมื่อนำไปใส่ลงในกล่องที่มี transfer buffer แล้วด้านที่เป็น gel จะอยู่ในด้าน ที่เป็นขั้วลบของกระแสไฟฟ้าและอยู่เหนือแผ่น immobilion P membrane เพื่อให้ประจุลบดัน แถบ protein ที่อยู่ใน gel ลงสู่ membrane เป็นการถ่ายแถบโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

2.4 ปลอ่ยกระแสไฟฟ้าให้ผ่าน transfer buffer ที่เติมจนพอดีในกล่องซึ่งจะท่วมแผ่นพลาสติกที่ใส่ไว้ โดยใช้ constant current 100 mA โดยปล่อยให้ค้างคืนไว้ในที่เย็น 4°C

2.5 หลังจากการ transfer หรือถ่ายแถบ protein ลงสู่ immobilion P membrane แล้วถอดส่วน ประกอบออกเหลือแต่ membrane นำไปย้อมสี Ponceau S นาน 2 นาที เพื่อดูแถบ protein บน membrane และทำเครื่องหมายของ MWM ไว้ รวมทั้งเครื่องหมายที่แบ่งแยกแต่ละ lane ของ sample ไว้ แล้วตัดแผ่น membrane ตามรูปข้างล่าง



แยก MWM ไว้ให้แห้ง ส่วนแผ่น membrane ที่มี sample อยู่นำไป block ใน 5% skim milk in PBS นาน 2 ชม. บนเครื่องเขย่า

- 2.6 ล้างแผ่น membrane 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บนเครื่องเขย่า ด้วย washing buffer (PBS + 0.2% tween 20)
- 2.7 ตัดแผ่น membrane ตามรอยที่ตัดไว้จากข้อ 2.5 ให้เป็น strip แล้วแยกแต่ละ strip ใส่ลงใน positive และ negative serum ที่เจือจางเป็น 1:20 ด้วย PBS และวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1.5 ชม.
- 2.8 ล้างแผ่น strip จากข้อ 2.7 ด้วย washing buffer 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 2.9 นำแผ่น strip ทั้งหมดจากข้อ 2.8 แช่ลงใน horseradish peroxidase conjugate rabbit anti cow immunoglobulin (DAKO) ละลาย 1:1000 ด้วย washing buffer แช่ไว้ 1 ชม. บนเครื่องเขย่า
- 2.10 จากข้อ 2.9 ล้าง 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ด้วย washing buffer
- 2.11 เตรียม substrate โดยใช้ 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ละลายใน 50 mM Tris - HCL pH 7.6 และ 30% H_2O_2 แล้วนำ strip แต่ละอันจุ่มลงไป substrate รอจนแถบสีน้ำตาลปรากฏขึ้น จึงนำ strip นั้นแช่ลงใน PBS เมื่อทำเสร็จหมดแล้วจึงเท PBS ทั้งแช่ใน DW 2 - 3 นาที เปลี่ยน DW ใหม่แช่ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นทำให้ strip แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อ strip แห้งหมดแล้ว นำมาเรียงต่อกับ MWM ของแต่ละ membrane ตามที่ได้บันทึกไว้ก่อน จะได้แถบของ protein ที่มีปฏิกิริยาเฉพาะระหว่างแอนติเจน - แอนติบอดีของโรคที่ทดสอบ

1.5.2 การ purified antigen เพื่อใช้ในการฉีดสัตว์ทดลองและใช้ในการทดสอบต่างๆ

การ purified antigen จาก Tryp.lysate extract เพื่อใช้ในการฉีดหนู mice ในการเตรียม monoclonal antibodies ทำโดยการแยก common band ของ proteins ใน crude extract antigen จากการทำ SDS - PAGE แล้วตัด band ของ protein ที่พบว่าทุกแอนติเจนมีเหมือนกัน ซึ่งการทำ SDS - PAGE สำหรับการแยก protein band ครั้งนี้จะใช้เครื่อง electrophoresis ขนาดใหญ่ ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการแยกของแอนติเจนแต่ละแหล่งจะใช้ 500 - 1000 ug/lane และเมื่อแยก protein ใน SDS - PAGE แล้วก็ทำการตัดส่วนที่เป็น common band ของทุกแอนติเจน ซึ่งจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 55 - 70 kdal และ 39 - 55 kdal

นำเอาส่วนเจลมาเข้าเครื่อง electro-eluter เพื่อ elute เอา protein ที่ต้องการออกจากเจล มีขั้นตอนการ elute protein ออกจากเจล ดังนี้

1. ใส่ gel slice ลงในหลอดแก้วที่มี membrane ปิดกันหลอดและมีจุกยางปิดด้านบน
2. ใส่ elution buffer ให้ท่วมเหนือจุกยางด้านบนแล้วให้เติมใน tube และใน tank ให้ท่วมเกือบครึ่ง
3. ทำการ elute โดยใช้กระแสไฟฟ้า 8 - 10 mA/glass tube ใช้เวลาประมาณ 3 - 5 ชม. ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ของเจลและน้ำหนักโมเลกุลของ protein
4. Elution buffer ประกอบด้วย NH_4HCO_3 50 mM และ SDS 0.1% + DW
5. เมื่อสิ้นสุดการ elute เก็บส่วนที่ elute ใน membrane ซึ่งในแต่ละหลอดจะได้ปริมาณของ protein ที่อยู่ใน eluting buffer ประมาณ 0.3 - 0.5 ml ต่อหลอด (ในเครื่อง minigel eluter จะมีหลอดแก้ว 6 หลอด แต่ละหลอดมีปริมาตร 5 ml)
6. รวบรวม eluate ที่ได้มา dialysis ในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง

ผล สารละลายที่ได้หลังการ dialysis และทำให้เข้มข้นแล้ว นำไปหาค่าปริมาณโปรตีน โดย band 1 (55 - 70 kdal) จะได้ 3.45 mg/ml จำนวน 2.0 ml ส่วน band 2 (39 - 55 kdal) จะได้ 3.25 mg/ml จำนวน 2.25 ml ซึ่งได้จากการแยกโปรตีนด้วย SDS - PAGE จำนวน 4 ครั้ง protein ที่แยกได้จะใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้าหนู mice เพื่อเตรียม monoclonal antibodies ต่อไป ซึ่งผลของการทำ SDS - PAGE และ Western - blot ได้แสดงใน Fig. 1, 2

2. การฉีดแอนติเจนเข้าสู่สัตว์ทดลอง เพื่อเตรียมทำ Monoclonal antibodies และ Hyperimmune serum

2.1 การฉีดแอนติเจนเข้าหนู mice เพื่อเตรียม monoclonal antibodies

- แอนติเจนเชื้อ Trypanosome (partial purified antigens จากการทำ SDS - PAGE ซึ่งมี 2 band (band 1, band 2) ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ใช้ 30 μg /ตัว และใช้หนู mice bulb/c จำนวน 6 ตัว/antigens
- การฉีดครั้งแรกจะใช้แอนติเจนผสมกับ Complete Freund's adjuvant ฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านบนหลัง 4 ตำแหน่ง โดยแต่ละตัวฉีด 0.1 ml. แอนติเจน + 0.1 ml adjuvant
- การฉีดครั้งที่ 2, 3 (booster) ใช้ปริมาณแอนติเจนเท่าเดิม (30 μg /ตัว) กับ Incomplete Freund's adjuvant ปริมาตร 0.2 ml/ตัว ฉีดเข้าช่องท้อง (I/P) ฉีดระยะห่าง 2 สัปดาห์/ครั้ง
- หลัง booster ครั้งที่ 3 แล้วตัดหางหนูเก็บเลือดด้วย capillary tube ตัวละ 2 tube แล้วนำมาปั่นแยกพลาสมา เพื่อนำไปตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ถ้าแอนติบอดีสูงพอก็จะนำไปทำ fusion เพื่อเตรียม Monoclonal antibodies ต่อไป

2.2 การฉีดแอนติเจนเข้ากระต่ายทดลอง เพื่อเตรียม Hyperimmune serum

- แอนติเจนใช้ crude extract Tryp.lysate ปริมาณ 500 μg /กระต่าย 1 ตัว
- ใช้กระต่าย 6 ตัว
- ใช้ Complete Freund's และ Incomplete Freund's เป็น adjuvant
- ตำแหน่งที่ฉีดคือ เข้ากล้ามเนื้อขาหลัง 2 ข้าง ฉีดครั้งละ 1 ml

- จำนวนที่ฉีด 4 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์/ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะเปลี่ยนเป็นแอนติเจนที่ได้จากต่างพื้นที่
- หลังจากฉีดครั้งที่ 4 แล้วเจาะเลือดจากใบหูจำนวน 1 ml เพื่อแยกซีรัม นำไปตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ถ้าปริมาณของแอนติบอดีสูงก็จะทำการเก็บเลือดกระต่ายทั้งตัว โดยการเจาะจากหัวใจ แยกเก็บซีรัมไว้ เพื่อเป็น Hyperimmune serum ซึ่งจะนำไป purified ใช้งานต่อไป

2.3 การตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมสัตว์ทดลอง (หนู mice และกระต่าย)

การตรวจหาระดับแอนติบอดีของหนู(mice)และกระต่ายทดลอง ที่ฉีดแอนติเจนจากเชื้อ Trypanosome จะใช้วิธี Indirect ELISA ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ และขั้นตอนดังต่อไปนี้

สารที่ใช้

1. แอนติเจน Trypanosome ใช้ crude extract Tryp.lysate ความเข้มข้น 20 µg/ml
2. ซีรัมของทั้งหนู mice และกระต่ายทดลองจะทำการเจือจางเริ่มตั้งแต่ 1:100 และทำ ten fold dilution จนถึง 1×10^5
3. Conjugated สำหรับซีรัมหนู mice ใช้ anti-mouse peroxidase conjugated ส่วนซีรัมกระต่าย ใช้ anti-rabbit peroxidase conjugated
4. Chromogen ใช้ ABTS (2, 2 - Azino di-ethylbenzothiazoline sulfonic acid)
5. Substrate ใช้ H_2O_2 (0.002%)

ขั้นตอนการทดสอบด้วย Indirect ELISA มีดังนี้ คือ

1. เคลือบเพลทด้วยแอนติเจนหลุมละ 100 µl ทุกหลุมแล้วเก็บเพลทเข้าตู้เย็นที่ 4°C ค้างคืน
2. ล้างเพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer (PBS + 0.02% Tween 20)
3. นำพลาสมาหรือซีรัมสัตว์ทดลองที่ต้องการตรวจมาเจือจางด้วย PBS แบบ ten fold dilution แล้วหยดลงในเพลทที่ล้างแล้วหลุมละ 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.
4. ล้างเพลท 3 ครั้ง ด้วย washing buffer
5. เติม conjugated ที่ละลายเป็น 1: 2000 ด้วย washing buffer ลงในหลุมๆ ละ 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
6. ล้างเพลท 3 ครั้ง ด้วย Washing Buffer
7. เติม chromogen + enzyme substrate solution ลงในทุกหลุมๆ ละ 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
8. เติม stopping solution (1% SDS) ลงในทุกหลุมๆ ละ 50 µl
9. อ่านผลด้วย ELISA reader (Dynatech MR 5000) ที่ความเข้มแสง 405 nm

ผลการฉีดแอนติเจน Trypanosome เข้าสัตว์ทดลอง

1. หนู mice จากการตรวจระดับแอนติบอดี หากพบมีระดับไม่ถึง 10^6 ก็จะฉีดหนู mice ซ้ำอีกครั้งด้วยแอนติเจนเดิม หลังจากนั้น 10 วัน ตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วย ELISA อีก และฉีดแอนติเจนซ้ำจนกว่าจะได้ระดับแอนติบอดีที่ต้องการ จึงนำหนู mice นั้นไปใช้ในการ fusion ต่อไป

2. กระต่ายมีระดับแอนติบอดีที่ตรวจวัดได้ก่อนการเก็บซีรัมคือ 10^{-6} โดยเก็บได้ประมาณ 15-20 ml ต่อกระต่าย 1 ตัว ในการทดลองใช้กระต่ายฉีดแอนติเจนทั้งหมด 18 ตัว พบตาย 4 ตัวระหว่างการ booster เหลือกระต่ายที่เก็บเลือดได้ 14 ตัว

3. การ Purified Hyperimmune serum และการวัดหาปริมาณโปรตีน

เมื่อทำการเจาะเลือดจากกระต่ายทุกตัวแล้ว แยกเก็บซีรัมนำมารวมกันเป็น pooled serum นำมาผ่าน Affinity column โดยมีขั้นตอนการเตรียม Affinity column และการ purified ซีรัมดังนี้

3.1 การเตรียม Affinity column

การเตรียม Affinity column (CNBr - sepharose 4B) เพื่อแยก Immunoglobulin

1. ใส่ CNBr - sepharose 4B ซึ่งเป็นผงจำนวน 1 กรัมลงในกรวยแก้วที่มีแผ่นกรอง ซึ่งมีสารละลาย 1 mM HCl อยู่ 35 ml. แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
2. ล้างเจลด้วยสารละลาย 1 mM HCl จำนวน 35 ml. 4 - 5 ครั้ง
3. ครึ่งสุดท้ายล้างด้วย coupling buffer (0.1 M NaHCO₃ / 0.5 M NaCl, pH 8.3)
4. ใส่ coupling buffer 6.5 ml. ลงในหลอดกันแหลมที่มีความจุ 50 ml. แล้วเติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการให้จับกับเจลลงไปในปริมาณความเข้มข้นเท่ากับ 20 mg.
5. ถ่ายเจลจากข้อ 3. ลงในข้อ 4. โดยใช้ข้อตักสารเคมีช่วย แล้วจึงล้างเจลให้หมดจากในกรวยกรองด้วยบัฟเฟอร์จำนวน 5 ml. พยายามให้เจลลงมาในหลอดให้มากที่สุด ปริมาตรสุดท้ายของเจลทั้งหมดรวมบัฟเฟอร์โดยประมาณจะเท่ากับ 20 ml.
6. นำหลอดที่มีเจล + แอนติเจน/แอนติบอดี ไปเข้าเครื่อง Rotate เพื่อหมุนเบาๆ โดยทำที่อุณหภูมิ 4 °C ทั้งค้างคืนหรือใช้เวลา 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้โปรตีนจับกับเจลได้ดี
7. นำหลอดเจลจากข้อ 6. มาปั่นด้วยความเร็วต่ำๆ (1,000 รอบ/นาที หรือน้อยกว่า) แล้วนำส่วนใสบางส่วนไปวัดหาค่าโปรตีน ซึ่งจะต้องมีค่าเกือบเท่าศูนย์
8. จากข้อ 7. ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 1 M ethanolamine pH 8.0 จำนวน 16.5 ml. ลงในเจลแล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเบาๆ อีกครั้ง เพื่อกำจัดส่วนที่เหลือของ active group ของโปรตีนออก (จากข้อ 1 - 8 ต้องทำในห้องที่เย็น และสารละลายทุกชนิดต้องอยู่ในสภาพแช่เย็นก่อนใช้)
9. ใช้ syringe พลาสติกปริมาตร 10 มล. ที่มีปลายสำหรับใส่เข็มฉีดยาตรงกลาง นำใยแก้วใส่ลงตรงปลายของ syringe เพื่อกันเจลไหลออก แล้วเทเจลลงไปอย่างเบาๆ เมื่อเจล pack ดีแล้ว ก็ล้างเจลอีกครั้งด้วย coupling buffer จำนวน 35 ml.
10. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 - 30 ml. ลงใน column ปลอ่ยน้ำกลั่นทิ้งแล้วล้างด้วย 0.1 M acetate buffer / 0.5 M NaCl, pH 4 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งเมื่อปลอ่ยน้ำกลั่นหมด เติม coupling buffer ล้างอีกครั้ง
11. ทำซ้ำตามข้อ 10.

12. Column ที่ได้พร้อมที่จะใช้งาน โดยเจลที่อยู่ใน column ถ้าไม่ใช้จะต้องเติม 0.05% Sodium azide หรือ 0.02% thimerosol in PBS เพื่อช่วยเก็บรักษาแล้วนำ column เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4°C

3.2 การแยก Immunoglobulin ด้วย Affinity column

1. ล้าง Affinity column ที่เตรียมไว้ด้วย binding buffer จำนวนปริมาตร 5 เท่าของเจลใน column (อาจใช้น้ำกลั่นได้)
2. แล้วรับ column ให้มีสภาพเหมาะสมด้วย binding buffer อีกครั้งโดยใช้ binding buffer อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตรเจล
3. ปั่นหรือกรองซีรัมที่จะแยก โดยซีรัมจะต้องเจือจางด้วย binding buffer 2 - 3 เท่า กรองเพื่อแยกสิ่งสกปรกออกก่อน จากนั้นค่อยๆ เทซีรัมลงใน column ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.
4. ล้าง column ด้วย binding buffer จำนวนปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล (ถ้าล้าง column ด้วย binding buffer จำนวนมาก จะทำให้แอนติเจน (แอนติบอดี) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกาะกับเจลแบบหลวมๆ หลุดออกได้)
5. ก่อนนำ elution buffer ไปใช้จะต้องวัด pH ของ elution ให้ได้ pH 2.7 ก่อนเสมอ ถ้า pH สูงกว่านี้จะต้องปรับ pH ด้วย HCl
6. Elute อิมมูโนโกลบูลินด้วย eluting buffer โดยปล่อยให้หยดลงในหลอดกันแหลม ที่มีปริมาตร 15 - 50 มล. โดยในหลอดนี้จะมี Neutralizing buffer อยู่ หลังจากได้ eluate ในปริมาตรที่ต้องการแล้ว จะต้องปรับ pH ของ eluate ที่ได้ให้เป็น pH 7.0 ด้วย Neutralizing buffer อีกครั้ง ควรวัดหาปริมาณโปรตีนใน eluate ด้วย UV spectrophotometer เป็นระยะๆ เท่าที่ทำได้
7. เมื่อได้ eluate แล้ว ก็ล้าง column ด้วย binding buffer
8. Column เมื่อไม่ใช้ต่อถ้าจะเก็บจะต้องล้างด้วย 0.02% thimerosol in PBS จำนวน 2 - 3 ครั้ง ก่อนนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4°C

ผลการ purified

การ purified hyperimmune serum ต่อแอนติเจน Trypanosome ได้ปริมาณของ polyclonal antibodies (PcAb) ต่อแอนติเจน Trypanosome จำนวน 3 ml จากซีรัมกระต่ายทั้งหมด 90 ml. โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีน 6.7 mg/ml ซึ่ง PcAb ที่ได้จะนำไปใช้ในการศึกษา Dipstick colloidal dye immunoassay ต่อไป

4. การเตรียม Monoclonal antibodies ต่อเชื้อ Trypanosome และการทดสอบ

การเตรียม Monoclonal antibodies มีขั้นตอนดังนี้

4.1 การทำ cell fusion

1. นำหนู mice ที่ฉีดแอนติเจนจากเชื้อ Trypanosome ที่ purified แล้วและผ่านการตรวจหาระดับแอนติบอดีว่าสูงพอ (คือ $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-6}$) มา booster อีกครั้งด้วยแอนติเจนเดิมผสมกับ PBS โดยไม่ใส่ adjuvant ฉีดเข้าช่องท้องก่อนการ fusion 3 - 4 วัน

2. ช่วงที่ booster หนู mice ให้ทำการเพาะเลี้ยง myeloma cell (P_3U_1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ medium ที่มีปริมาณ 30 ml. และตรวจดูเซลล์หลังการเพาะ 2 วัน ถ้าในวันที่ 3 เซลล์โตเต็มที่ก็ให้ทำการ fusion ได้
3. นำหนู mice ที่ booster แล้วมาตัด้าม โดย sterile technique แยกเอาเฉพาะ้ามมาทำให้เซลล์แตกจาก capsule โดยใช้ปลายเข็มที่อ่อนเป็นมุมฉากเขี่ยให้เซลล์กระจายใน medium
4. จากนั้นทำการล้างเซลล์้ามด้วย medium 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายใส่ medium ที่มี 10% fetal calf serum ลงไป 10 ml แล้วจึงนำเซลล์ที่อยู่ใน medium ไปนับเพื่อให้ทราบว่าเซลล์ทั้งหมดมีจำนวนเท่าใด
5. หลังการนับเซลล์้ามแล้ว ก็นับเซลล์ของ myeloma ด้วยเช่นกันเพื่อให้ทราบว่า 1 ml ของ myeloma มีเซลล์ทั้งหมดจำนวนเท่าใด เพื่อนำไปคำนวณในการที่จะนำไปทำ fusion กับเซลล์้าม
6. การ fusion ใช้อัตราส่วนของ myeloma cell 1 cell ต่อเซลล์้าม 10 cells
7. เมื่อคำนวณทราบแล้วว่าจะใช้ myeloma cell เท่าใดที่จะผสมกับเซลล์้ามทั้งหมด นำเซลล์ทั้งสองชนิดมารวมกันในหลอดเดียวกัน
8. ทำการปั่นล้างเซลล์ที่รวมกันแล้ว 2 ครั้งโดยใช้ medium ที่ไม่มี fetal calf serum
9. หลังการล้างดูด medium ที่ทิ้งไปจะเหลือเฉพาะเซลล์ ซึ่งนำมาเติมด้วย 50% Polyethylene glycol (PSG) และ medium ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปปั่นล้างอีก 2 ครั้ง โดยใช้ medium ที่ไม่มี fetal calf serum
10. เมื่อดูด medium ที่ทิ้ง หลังจากนั้นให้เติม OPI - HAT medium ลงในอัตราส่วน 30 ml. ต่อเซลล์้าม 1×10^8 เซลล์
11. แยกเซลล์ผสมที่อยู่ใน OPI - HAT medium ลงใน 96 well tissue culture plate ในปริมาณ 200 μ l/well
12. นำ plate ที่มีเซลล์อยู่เข้าตู้อบที่มี CO_2 อยู่ โดยตั้งอุณหภูมิที่ $37^\circ C$
13. หลังการเก็บ plate ไว้ 5 - 7 วัน ให้ตรวจสอบว่ามีเซลล์ขึ้นที่หลุมใดบ้างแล้วจดบันทึกตำแหน่งของเซลล์ไว้

4.2 การทำ screening positive hybridoma clones

1. เมื่อพบเซลล์โตเต็มที่ในแต่ละหลุมทำการทดสอบว่าเซลล์ที่ได้ให้ผลบวกต่อแอนติเจน Trypanosome ก็เซลล์ โดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA ด้วยการดูดน้ำเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมมาทดสอบ
2. เซลล์ที่ให้ผลบวกในครั้งแรก ให้ทดสอบอีกครั้งในวันต่อมาด้วยวิธี ELISA เช่นเดิม ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกในครั้งที่ 2 จะลดลง
3. ใช้ประมาณ 10% ของเซลล์ที่ให้ผลบวกในครั้งที่ 2 ไปเพิ่มจำนวนใน 24 wells plate
4. เมื่อเซลล์ใน 24 wells plate โตเต็มที่นำไปตรวจสอบด้วยวิธี ELISA อีกครั้ง ทำการเพิ่มจำนวนอีกในขวดขนาด 25 cm^2 (ใช้ medium 5 ml/ขวด) โดยคัดเฉพาะเซลล์ที่ให้ค่า O.D. สูงๆ เท่านั้น

5. เมื่อเซลล์ในขวดโตเต็มที ทำการเก็บน้ำเลี้ยงและตัวเซลล์โดยการปั่นแยกน้ำเลี้ยงและตัวเซลล์ ตัวเซลล์เก็บไว้ใน Liquid Nitrogen ส่วนน้ำเลี้ยงจะเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อนำไปทดสอบหาคุณสมบัติของชนิด Immunoglobulin ที่ hybridoma cells นั้นผลิต

ผลการทำ screening hybridoma cell ด้วยวิธี ELISA จากแอนติเจน *Trypanosoma evansi*

- การ screening ครั้งที่ 1 จากการ fusion 4 ครั้ง ได้จำนวนเซลล์ที่ให้ผล positive ดังนี้

fusion 1 positive cell จำนวน 595 cells

fusion 2 positive cell จำนวน 845 cells

fusion 3 positive cell จำนวน 672 cells

fusion 4 positive cell จำนวน 693 cells

- การ screening ครั้งที่ 2 positive cell ดังนี้

fusion 1 positive cell จำนวน 265 cells

fusion 2 positive cell จำนวน 378 cells

fusion 3 positive cell จำนวน 334 cells

fusion 4 positive cell จำนวน 330 cells

นำเซลล์ประมาณ 10% ที่ fusion แต่ละครั้งหลังการ screening ครั้งที่ 2 มาเพาะเลี้ยงใน 24 wells plate จะได้เซลล์ที่จะเก็บไว้ในถัง Liquid Nitrogen และจำนวนประมาณ 50% ของการ screening ครั้งที่ 3 ด้วยวิธี ELISA จาก 24 well plate ซึ่งจะได้เซลล์ที่เก็บไว้ทั้งหมด 93 cells เป็นเซลล์ที่ให้ผลบวกและมีค่า O.D. สูง

4.3 การทดสอบคุณสมบัติ hybridoma clones จากน้ำเลี้ยงเซลล์

1. การทดสอบทำ 2 แบบ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป คือ Serotec isotyping kit (ของบริษัท Serotec) และ ELISA kit ของ Zymed

2. การทดสอบด้วย Serotec isotyping kit จะเป็นแบบ Haemagglutination test ซึ่ง kit 1 ชุดจะทดสอบได้ 24 ตัวอย่าง จะใช้ในการทดสอบเมื่อได้เป็น Monoclonal antibody แล้ว

3. สำหรับการทดสอบ โดยใช้ kit ของ Zymed ด้วยวิธี ELISA จะใช้แอนติเจนที่เตรียมขึ้นเองในการเคลือบเพลท ส่วนสารละลายอื่นๆ จะใช้ของชุดสำเร็จรูปทั้งหมด ซึ่ง kit 1 ชุดจะสามารถตรวจได้ 80 ตัวอย่าง จะใช้ในการทดสอบ screening hybridoma cells ที่ให้ผลบวกและมีค่า O.D. สูงๆ

ผลการทำ Immunoglobulin isotyping เพื่อหา subclass ของ Immunoglobulin ต่อแอนติเจน Trypanosome

จากการทำ Isotyping ทั้งหมด 64 cells (จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บไว้) ได้ผลดังนี้ คือ

- IgG₁ + M = 10 cells (ค่า O.D. ของ IgG₁ จะสูงกว่า IgM)

- IgG_{2a} + M = 3 cells

- IgM = 51 cells

4.4 การทำ cloning จาก poly hybridoma clones เป็น single clone

การทำ cloning จะใช้วิธี limited dilution ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์ Hybridoma ที่เก็บไว้ในถัง Liquid Nitrogen ที่มี Immunoglobulin subclass IgG₁+M มาละลายแล้วทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย OPI - HT medium นำตะกอน (cell) มา culture ในขวดต่อไป
2. เมื่อเซลล์โตเต็มที่ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาดกลาง ทำการนับจำนวนเซลล์ โดยคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร 1 ml
3. เมื่อทราบจำนวนเซลล์/มิลลิลิตร ให้คำนวณว่าต้องทำการเพาะเลี้ยงกี่เพลท (ใช้ 200 μ l/well) และคำนวณให้ได้ 1 cell ต่อ 200 μ l ของ medium (OPI - HT)
4. นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ตามจำนวนที่คำนวณได้มาผสมกับ medium ใหม่ตามปริมาตรที่ต้องการทำการแจกแจงเพลท (tissue culture plate) หลุมละ 200 μ l
5. เก็บเพลทที่มีเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C ที่มีก๊าซ CO₂ 5 - 10% อยู่
6. หลังเก็บเพลทไว้ 5 - 7 วัน ตรวจสอบเซลล์ที่มีในแต่ละหลุม เลือกเฉพาะหลุมที่มีเพียงเซลล์เดียวยาวบันทึกไว้
7. เมื่อเซลล์ที่บันทึกไว้โตเต็มที่ (1-2 วันหลังการตรวจ) ทำการตรวจดูว่า เซลล์นั้นให้ผลบวกต่อแอนติเจน Trypanosome หรือไม่ โดยดูจากน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมตรวจสอบด้วยวิธี ELISA แล้วเติม medium ใหม่ลงไปแทน
8. เซลล์ที่ให้ผลบวกและมีค่า O.D. สูงๆ นำไปเพาะต่อใน 24 well โดยเลือกเซลล์บวกมาประมาณ 30 เซลล์ ซึ่งเซลล์ที่เลือกมาเพาะต่อในขวดเพาะเซลล์ อาจจะได้ไม่ครบ 30 เซลล์ หลังเพาะเซลล์ในขวดแล้ว เก็บตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงที่ได้ นำไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ จะได้เป็น monoclonal antibody (McAb)

4.5 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างชนิดของ Immunoglobulin ของ single clone (Monoclonal)

1. ใช้น้ำเลี้ยงเซลล์จำนวน 8 cells นำมาทำ dilution ด้วย PBS เป็น 1:50 แล้วหยอดลงในเพลท 96 หลุมชนิด U-shape โดย 1 เพลทจะได้ 8 ตัวอย่าง โดยหยอดทุกหลุมๆ ละ 50 μ l ยกเว้น column ที่ 11, 12 (ใช้ Serotec kit)
2. ละลาย Immunoglobulin แต่ละ subclass ซึ่งอยู่ในสภาพ Lyophilized ด้วย buffer ที่มาพร้อม kit ในปริมาตร 1 ml/1 ขวด ซึ่ง Immunoglobulin จะมีทั้งหมด 8 ชนิดคือ IgG₁ , IgG_{2a} , IgG_{2b} , IgG₃ , IgA , IgM , Kappa chain และ Lamda chain (8 ขวด) และมี negative และ positive control 2 ขวด
3. หยด Immunoglobulin ที่ละลายแล้วตามลำดับลงในแต่ละ column ของเพลท
4. เขย่าเพลทเบาๆ ให้สารละลายเข้ากัน
5. ตั้งเพลททิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผล

ผล การทำ Isotyping ของ McAb ต่อแอนติเจน Trypanosome ที่ได้จากการ cloning มีดังนี้

จากการทำ cloning เซลล์ hybridoma (ผลิต IgG₁ + M) จำนวน 5 cells (origin cells) ได้ hybridoma cell ซึ่งเป็น single cell 235 เซลล์ เลือกเซลล์ที่มีค่า O.D. สูงมาทำ Isotyping จำนวน 10 เซลล์ต่อ cell origin 1 cell จากนั้นเลือกเก็บเฉพาะเซลล์ที่ผลิต IgG₁ ไว้เป็นต้นแบบ พบว่า 8 ใน 10 เซลล์ จะให้ IgG₁ โดยจะมีการทดสอบคุณสมบัติด้านอื่นของ McAb ที่เก็บไว้ต่อไป

4.6 การทดสอบคุณสมบัติของ Monoclonal antibody (McAb) โดยวิธี Western blot โดยใช้ Homologous antigen และการทำ ELISA

การทำ Western blot จะใช้วิธีการที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยใช้ Tryp.lysate เป็นแอนติเจนในการแยก protein และใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เป็น McAb ที่ผลิต IgG₁ ที่เก็บไว้เป็น Primary antibodies และใช้ α -mouse peroxidase เป็นคอนจูเกต

ผล การทำ Western blot พบว่า McAb ที่ทดสอบจะได้ band เพียง band เดียวตรงกันในเซลล์ที่เลือกมาต่าง origin โดย band ที่ตรงกันมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57 kdal (Fig. 5)

4.7 การทดสอบ specificity ของ McAb กับ Heterogenous antigens ด้วยวิธี ELISA (cross - reaction test)

การทดสอบ specificity ของ McAb ต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ ทำโดยวิธี indirect ELISA ซึ่งแอนติเจนที่ใช้มีดังนี้

1. whole parasite extract Liver fluke (*Fasciola gigantica*)
2. whole parasite extract *Shistosoma spindale*
3. whole parasite extract *Seteria* spp
4. whole parasite extract *Theileria* spp
5. Trypanosome lysate
6. Babesia parasite extract
7. Anaplasma parasite extract
8. Wbc
9. Rbc

ผล ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบเพลทจะอยู่ระหว่าง 10 - 30 ug/ml และขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี ELISA จะเหมือนที่กล่าวไว้ข้างต้น ผลการทดสอบ Specificity ของ McAb ต่อแอนติเจน Trypanosome และแอนติเจนอื่นๆ (cross reactivity test) ดังแสดงไว้ใน Table 1

Table 1 Cross reactivity of *Trypanosoma evansi* McAb, Babesia McAb and Anaplasma McAb against various antigens

McAb	X O.D.								
	Tryp	Babe	Ana	L.F	S.S	Sete	Thei	Wbc	Rbc
McAb (Tryp)	2.096	-0.011	-0.020	0.043	-0.015	-0.018	0.017	-0.052	-0.088
McAb (Babe)	-0.026	1.215	0.196	0.019	-0.027	-0.029	0.173	0.223	0.072
McAb (Ana)	0.032	0.066	0.579	0.066	0.039	0.015	0.298	0.293	0.302

- Tryp = Trypanosome Ag - Sete = Seteria Ag - Babe = Babesia Ag
- Thei = Theileria Ag - Ana = Anaplasma Ag - Wbc = White blood cell Ag
- L.F. = Liver fluke Ag - Rbc = Red blood cell Ag - S.S. = Shistosoma Ag

4.8 การหา sensitivity ของ McAb ต่อแอนติเจน Trypanosome

การหา sensitivity ของ Trypanosome McAb ทำโดยใช้วิธี ELISA ผลพบว่าแอนติเจนของ Trypanosome ที่ใช้ McAb ในการตรวจจับสามารถวัดได้น้อยที่สุดที่ 10 nanogram และ 5×10^5 parasite/ml และค่า activity ของ McAb ที่ผลิต วัดได้ 512 ELISA unit (ใช้ culture medium ในการตรวจสอบ)

5. การผลิต McAb ในหนู mice

เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณ Immunoglobulin

5.1 การผลิต McAb

McAb ที่ได้ผ่านการทดสอบคุณสมบัติแล้วว่า ผลิต IgG₁ เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณของ McAb ให้ได้ปริมาณมาก จึงได้มีการเพิ่มโดยการฉีดเข้าหนู bulb/c mice มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียม Monoclonal antibody (McAb) จาก ascites fluid

1. ฉีดกระตุ้นหนูไมซ์ bulb/c (หนูเพศเมีย อายุอย่างน้อย 6 สัปดาห์) ด้วย pristane (2,6,10,14-tetramethyldecanoic acid) จำนวน 0.5 มล. เข้าช่องท้อง
2. หลังจากนั้น 7 วัน ให้ฉีดเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (McAb cell ซึ่งเป็น hybridoma cells) นับจำนวนให้ได้ 5×10^5 - 5×10^6 เซลล์ เข้าช่องท้องหนูจากข้อ 1. โดยเซลล์ที่นำมาจะต้องผ่านการเพาะเลี้ยงให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว นำมาปั่นและล้างด้วย PBS เอาเฉพาะตัวเซลล์ ฉีดเข้าช่องท้องหนูในปริมาณที่เมื่อรวมกับ PBS แล้วไม่เกิน 1 มล.
3. หนูจะเกิดอาการท้องมาน คือมีของเหลวในช่องท้อง (Ascites fluid) ประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ หลังการฉีด เมื่อท้องหนูมีขนาดใหญ่มาก แต่หนูยังเคลื่อนไหวได้สะดวกให้ทำการเก็บของเหลวในช่องท้อง โดยใช้เข็มเบอร์ 18 (ไม่ต้องมี syringe) เจาะเข้าบริเวณช่องท้องส่วนล่างและปล่อยให้ของเหลวไหลตามเข็มลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง
4. หลังจากเจาะเสร็จ นำหนูเก็บเข้ากรงตามเดิม หนูจะสามารถผลิตของเหลว ซึ่งจะเก็บได้ใหม่ 2-3 ครั้ง หลังจากเจาะครั้งแรก 2 - 3 วัน
5. ของเหลวที่เจาะได้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไปเก็บไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C
6. จากข้อ 5. นำของเหลวมาปั่นที่ $3000 \times g$ นาน 10 นาที พยายามดูของเหลวที่ได้อย่างระมัดระวัง อย่าให้มีเซลล์ตกตะกอนปนออกมา ถ้ามีเซลล์ให้ปั่นใหม่อีกครั้ง
7. ของเหลวที่ได้จะมี McAb ซึ่งจะเป็น immunoglobulin เฉพาะ subclass ที่เกิดจาก Hybridoma cells ที่ฉีดเข้าไป
8. หนูไมซ์ 1 ตัว อาจะเก็บของเหลวได้ประมาณ 10 มล. ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้จะอยู่ระหว่าง 1 - 10 mg/ml

5.2 การ purified McAb จาก ascites fluid

การ purified McAb ที่ได้มาจาก ascites fluid โดยใช้การตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (saturated ammonium sulphate) และ amion exchange column มีขั้นตอนดังนี้

1. นำ ascites fluid ที่แช่เย็นใน flask ที่วางบน magnetic stirrer แล้วค่อยๆ หยด saturated ammonium sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่แช่เย็นโดยให้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 33% ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แล้วกวนตลอดเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
2. หลังจากนั้นนำสารละลายไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที
3. นำตะกอนมาล้างด้วย 33% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และปั่นแยกตะกอนเหมือนข้อ 2.
4. ตะกอนที่ได้นำมาละลายด้วย 0.01 M Phosphate (PO_4) pH 7.2 แล้วทำการ dialyse สารละลายที่ได้ด้วย 0.01 M PO_4 pH 7.2
5. เตรียม column DE 52 โดยการ equilibrated column ด้วย 0.01 M PBS และล้าง column ด้วย buffer เดิม เมื่อเตรียม column เสร็จแล้วก็ทำการ load สารละลายจากข้อ 4. ผ่าน column เมื่อสารละลายที่ต้องการผ่านลงใน matrix หมดแล้วก็เติม buffer ลงไปอีกพร้อมกับเริ่มใช้ tube รองรับ eluate ที่ลงมา
6. เก็บ eluate ที่ลงมาหลอดละ 5 ml แล้วจึงวัด purified IgG peak ที่รองได้โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 280 nm
7. รวบรวม eluate ที่ได้แล้วทำการ concentrate และวัดหา protein concentration
8. column ที่ใช้เสร็จแล้วล้างด้วย PBS และ equilibrated ด้วย 0.01 M PO_4 สามารถใช้ซ้ำได้

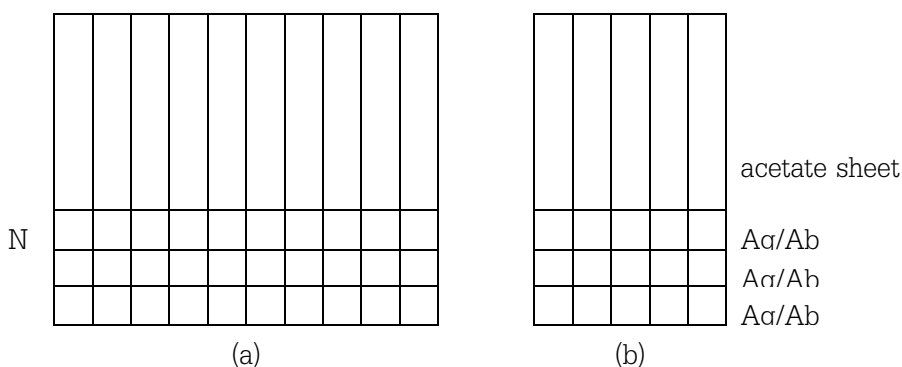
5.3 การวัดหาปริมาณความเข้มข้นของ McAb ที่ได้

การวัดหาปริมาณโปรตีนทำได้โดยวิธี Coomassie blue method ปริมาณโปรตีนที่วัดได้นำมาปรับให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml

6. การกำหนดระบบการทดสอบซีรัมด้วย Dipstick colloidal dye immunoassay (DIA)

6.1 การเตรียม Nitrocellulose strip

1. ตัดแผ่น Nitrocellulose (NC) membrane (Schleicher and Schull, Dassel, Germany) กว้างขนาด 2.4 cm × ยาว 15.0 cm
2. ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสขนาดกว้าง 7.5 cm
3. ใช้เทปกาว 2 หน้า ยึดแผ่น NC กับแผ่นใสในข้อ 2.
4. ตัดแผ่น dipstick ในข้อ 3 ให้ได้ขนาด 0.6 × 7.5 cm และแบ่ง NC (2.4 cm) เป็น 3 ช่องโดยใช้ปากกาขีดเส้นแบ่ง (ตามรูป a) เพื่อหยดแอนติเจน/แอนติบอดีตามต้องการ



5. หยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีหรือ mouse IgG, Rabbit IgG และ PcAb 2.5–3.0 μ l ของ dilution ที่เหมาะสมตามต้องการ ลงบนช่อง NC membrane ที่ไว้ให้แห้งในที่เย็น (ตู้เย็น 4°C)

6. กำจัด non - specific protein binding site ที่เหลืออยู่บน NC ด้วยการจุ่ม strip (จากข้อ 5.) ใน PBS และ block แอนติบอดี ด้วย 0.5–1 % BSA ใน PBS หรือ block แอนติเจนด้วย 0.5–1 % skim milk ใน PBS pH 7.4 นาน 30 นาที ที่ 4°C ทำการล้าง strip ด้วย PBS ที่แช่เย็น ที่ไว้ให้แห้งที่ 4°C และเก็บที่ 4°C เพื่อรอการทดสอบ

6.2 การเตรียม Dye-Antibody Reagent

การเตรียม Dye conjugate จะทำตามวิธีของ Snowden and Hommel (1991) และ Kashiwazaki et al (1994) สีที่ใช้คือ Palanil Red BF และ Samaron blue ซึ่งเป็นสีย้อมผ้า dye conjugated ประกอบด้วย dye และ antibodies ซึ่งในการตรวจโรคที่เกิดจากเชื้อ Trypanosome จะใช้ anti-Trypanosome antibodies (Polyclonal antibodies) ซึ่งเป็น antibodies ที่ได้จากการ purified Hyperimmune serum ของกระต่ายที่ฉีด แอนติเจน Trypanosome

การเตรียม Dye-Antibody Reagent มีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. การเตรียมสีที่จะใช้

a. Dye stock

- 1) เตรียม 5% Dye ในน้ำกลั่น (w/w) (เช่น สี 1 กรัม + น้ำกลั่น 20 ml)
- 2) ล้าง 4 ครั้งด้วยน้ำกลั่น โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 x g นาน 30 นาที ใช้ pasteur pipette สำหรับ resuspend สี
- 3) Resuspend สีในน้ำกลั่น 10 ml และเติม thimerosal 0.01% (w/v)
- 4) ละลาย dye stock ในปริมาณน้อยๆ ใน ethanol และทำ dilution ตั้งแต่ 1:700 ถึง 1:1200 เพื่อนำมาหา dilution ที่เหมาะสม มีค่า absorbance เท่ากับ 1 ใช้ wavelength ที่เหมาะสม (ตามชนิดของสี)

ตัวอย่าง

Dye stock	100 μ l	} Dilution 1:100 และทำ serial dilution ด้วยน้ำกลั่น
Ethanol	10 μ l	

Dilution	Dye stock (1:100)	Distilled water
1:700	500 μ l	3.0 ml
1:800	500 μ l	3.5 ml
1:900	400 μ l	3.2 ml
1:1000	400 μ l	3.6 ml
1:1100	300 μ l	3.0 ml
1:1200	300 μ l	3.3 ml

Wavelength : Samaron Blue 605 nm., Palanil red 535 nm.

b. การเตรียม Dye - Antibody

การเตรียมจะประกอบด้วยสารละลาย ดังต่อไปนี้

- Stock dye suspension Palanil Red $A\lambda_{\max} = 850$ dye particles (ได้จากการวัดหาค่าจาก stock dye ที่เตรียมได้)
- 0.1 M phosphate buffer
- 5 M NaCl
- Phosphate buffered saline pH 7.4
- Affinity purified antibodies

วิธีเตรียม

1. เตรียม 3.3 mM sodium phosphate/125 mM NaCl buffer ปริมาตร 10 ml โดยการเติม 3.3 ml 0.1 M sodium phosphate buffered และ 5M NaCl ในปริมาตร 125 μ l ในน้ำกลั่น 6.6 ml
2. หาปริมาตรสีที่ต้องการใน 10 ml โดยมี dye particles ตามต้องการ เช่น การคำนวณที่ $A\lambda_{\max} = 30$ dye particle คือ ปริมาตรสี stock ที่ต้องใช้ เท่ากับ 10 ml. หาร 850 (stock dye ที่เตรียมได้) คูณด้วย 30 = 353 μ l
3. ปริมาตรของ antibody (Ab) ที่ต้องการคือ 30 μ g/ml ดังนั้นปริมาตรของ Ab มีค่า

$$= 30 \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml} \div 2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \text{ (ความเข้มข้นของ antibodies stock)}$$

$$= 120 \mu\text{l}$$
4. ปริมาตรของสีที่ต้องการ = 353 μ l
 ปริมาตรของ Ab ที่ต้องการ = 120 μ l
 รวมปริมาตร = 473 μ l
5. Buffer ที่เตรียมในข้อ 1. ดูดออก 473 μ l แล้วเติมสีและแอนติบอดี ตามที่ต้องการ
6. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมง
- 7.ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg 30 นาที ดูด supernatant ที่
8. Resuspend dye - Ab ใน 3.3 mM phosphate buffered / 125 mM NaCl และเติม thimerosal 0.01%
9. Dye Antibody Reagent ที่เตรียมได้ แบ่งใส่หลอดๆละ 5 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และ 4°C

6.3 การทดสอบ

Positive and Negative control serum

- Positive control serum ใช้ซีรัมโคที่ตรวจพบ parasite ในเลือด ด้วยวิธี thin blood smear

- Negative control serum ใช้ซีรัมที่ตรวจไม่พบ parasite ในเลือด ด้วยวิธี thin blood smear และตรวจสุขภาพทั่วไปว่าปกติ และใช้ fetal calf serum เปรียบเทียบในการทดสอบ

วิธีการทดสอบ

1. การหาปริมาณ McAb ที่เหมาะสม โดยทำการเจือจาง McAb เป็น 200 µg/ml, 100 µg/ml และ 50 µg/ml
2. ซีรัมจะเจือจางเป็น 1:5, 1:10 และ 1:20 ตามลำดับ
3. Dye Antibody Reagent จะใช้ค่าความเข้มข้น $A = 25$, $A = 30$ และ $A = 40$

การทดสอบโรค Trypanosomosis โดยวิธี DIA ทำโดย

1. เจือจางซีรัมด้วย PBS
2. นำ strips ที่ dot McAb เรียบร้อยมาทำให้เปียกด้วยน้ำกลั่น จุ่ม strips ลงในตัวอย่างซีรัมที่เจือจางด้วย PBS ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ล้าง strips ด้วยน้ำก๊อกอย่างรวดเร็ว จุ่ม strips ลงในสี (dye - conjugated) แช่ทิ้งไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
4. ทำการล้าง strips จากข้อ 3. ด้วยน้ำก๊อกที่ไหลเบาๆ สังเกตดูสีที่เกิดขึ้นในตำแหน่งต่างๆที่หยด McAb หรือ antibodies อื่นๆไว้ จดบันทึกข้อมูล

7. การประเมินผล

จากการทดสอบโรค Trypanosomosis ด้วยวิธี DIA โดยใช้ซีรัมควบคุมบวกและลบ และการหาปริมาณต่างๆตามขบวนการ พบว่า มีการเกิด non-specific reaction ขึ้น ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง ค่าบวกและค่าลบได้ และสีที่เกิดขึ้นมีความเข้มใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่า McAb ที่ผลิตได้ ยังไม่ specific พอ หรือไม่บริสุทธิ์เพียงพอในการนำมาทดสอบ (Fig. 8)

การแยกเชื้อ *Anaplasma marginale* และ *Babesia bigemina*

1. การเตรียมสัตว์ทดลองและการฉีดเชื้อ

นำลูกโคอายุประมาณ 8 - 9 เดือนที่มีสุขภาพแข็งแรง ตรวจสุขภาพไม่พบปรสิตทั้งภายนอก ภายในและในเม็ดเลือด จำนวนรวม 12 ตัว โดยใช้ 6 ตัวต่อเชื้อ *Anaplasma* spp. และ 6 ตัวต่อเชื้อ *Babesia* spp. นำลูกโคมาวางยาสลบแล้วผ่าตัดนำม้ามของโคแต่ละตัวออก (ทำครั้งละ 2 ตัว จำนวน 6 ครั้ง) โคที่ทำการผ่าตัดม้ามออกแล้ว เมื่อมีสุขภาพแข็งแรงและแผลผ่าตัดหายดี จะทำการตรวจดูเชื้อ blood parasite อีกครั้งเป็นเวลา 1 เดือน โดยตรวจทุกสัปดาห์ ถ้าโคตัวใดมีเชื้อ blood parasite อยู่ในกระแสโลหิต จะทำการรักษาให้เชื้อมอดก่อน จากนั้นนำเลือดโคที่เก็บได้จากสัตว์ป่วยในห้องที่มีเชื้อมาฉีดเข้าเส้นเลือดโคที่ตัดม้ามแล้ว ตัวละ 1 ml. หลังจากฉีดเชื้อแล้วตรวจเลือดโคโดยวิธีการทำ blood smear บนสไลด์แก้ว ย้อมด้วยสี Giemsa นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า ตรวจดูว่ามีเชื้อจำนวนน้อยแค่ไหน การทำ blood smear จะทำหลังการฉีดเชื้อ 3 วัน จากนั้นทำทุกวันพร้อมกับการตรวจวัดค่า hemoglobin ด้วยวิธี Sahli Adam และตรวจวัดค่า pack cell volume (PCV) ด้วยวิธี capillary Haematocrit

ในการเตรียมแอนติเจนจากเชื้อใดจะฉีดเชื้อชนิดนั้น เช่น เตรียมจากเชื้อ *Anaplasma marginale* ก็ฉีดเลือดที่มีเชื้อ *Anaplasma marginale* เข้าลูกโคที่ตัดม้าม เมื่อนับเชื้อในเลือดโคจากสไลด์พบมี parasitaemia 40% หรือค่า PCV ประมาณ 10% จะทำการเก็บเลือดโคจากเส้น jugular vein จนหมดตัวโค โดยใช้ Sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็งตัวในขนาด 5 g / 1 ลิตรของเลือด โคหนึ่งตัวจะได้เลือดประมาณ 2 - 2.5 ลิตร

2. การแยกเชื้อออกจากเลือดโค มีขั้นตอนดังนี้

- 2.1 นำเลือดที่มี Sodium citrate มาปั่นที่ความเร็ว 4,800 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C แยกเอาเม็ดเลือดแดงออก
- 2.2 ล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้งด้วย PBS หรือ 0.85% NaCl โดยการปั่นด้วยความเร็ว 4,800 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C การปั่นแต่ละครั้งจะดูด supernatant ทิ้งไป โดยพยายามดูดเม็ดเลือดขาวออกด้วยทุกครั้ง หลังล้างครั้งสุดท้าย เติม PBS เพื่อให้ได้เม็ดเลือดแดงเข้มข้น 20%
- 2.3 นำเม็ดเลือดแดงจาก 2.2 ไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ Nitrogen decompression ซึ่งใช้ความดันของก๊าซ N_2 ที่แรงดัน 1000 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 นาที สารแขวนลอยที่เกิดหลังการ bomb แล้วจะเป็นฟองและสปีจะเปลี่ยนเป็นสีดำ
- 2.4 นำ suspension ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็ว 750 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C เก็บส่วน supernatant
- 2.5 นำ supernatant จากข้อ 2.4 มาปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 750 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C แล้วเก็บ supernatant
- 2.6 จากข้อ 2.5 นำ supernatant มาปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 4,800 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C แล้วเก็บส่วนที่เป็น sediment (ส่วนนี้จะมีเชื้อ Protozoa อยู่)
- 2.7 ล้างส่วน sediment 2 ครั้งด้วย PBS โดยปั่นที่ความเร็ว 4,800 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C และในการปั่นครั้งสุดท้ายใช้ความเร็ว 9,000 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C แยกส่วน sediment ซึ่งมีจำนวนเล็กน้อยนำมาเติม PBS ในปริมาณที่เท่ากันนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป

3. การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Anaplasma marginale* และ *Babesia bigemina*

- 3.1 นำ parasite pellet ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20°C มาเติมด้วย 4% triton x -100 ใน PBS แล้วตั้งทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C
- 3.2 จากข้อ 3.1 นำไปปั่นที่ 15,000 - 30,000 xg นาน 30 นาที ในกรณีของเชื้อ *Babesia* spp และถ้าเป็นเชื้อ *Anaplasma* spp. จะปั่นที่ความเร็วสูงกว่า แยกส่วนของ supernatant ไว้ ซึ่งจะใช้เป็นแอนติเจนในการทำ ELISA, Antigen ที่ได้จะแบ่งเก็บไว้ในหลอดเล็กๆ เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20°C

4. การวัดหาปริมาณโปรตีนใน crude antigen

จะใช้ขั้นตอนเหมือนในการหาโปรตีนจาก antigen ของเชื้อ Trypanosome ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้จาก crude extract ของเชื้อ *Anaplasma* จะได้ 9.8 mg/ml จำนวน 6.0 ml และ *Babesia* ได้ความเข้มข้นของโปรตีน = 15.5 mg/ml จำนวน 5.5 ml

5. การ purified antigen จาก crude extract antigen ของเชื้อ Anaplasma และ Babesia

5.1 การ purified antigen เพื่อใช้ในการทำ Western blot และสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง โดย

1. Extract parasites pellets ด้วย 4% triton x -100 ค้างคืน แล้วปั่นแยกส่วนใสจะได้ crude extract
2. นำส่วน crude extract มาผ่าน column ของ Sepharose 6B ใช้ Tris - HCl pH 8.0 ในการ equilibrate column
3. ใช้ 37 mM NaCl + PBS เป็นตัว elute ซึ่ง eluate ที่ได้จะนำไป dialysis ต่อ
4. Dialysis ส่วน eluate ด้วยน้ำกลั่น
5. Concentrate ส่วนของ eluate ที่ dialysis แล้ว
6. วัดค่าปริมาณโปรตีน

ผล การหาค่าปริมาณ purified โปรตีนของ Anaplasma antigen ได้ 2.97 mg/ml มีปริมาตรทั้งหมด 4.2 ml ส่วน Babesia antigen ได้ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน 3.95 mg/ml และมีปริมาตรทั้งหมด 2.8 ml

5.2 การทำ SDS - PAGE และ Western blot จะใช้วิธีการเหมือนการทำ SDS - PAGE และ Western blot ของแอนติเจน Trypanosome โดยใช้ purified antigen ปริมาณ 20 μ g ต่อ lane ในการแยก protein จากแอนติเจนและใช้ serum dilution ที่ 1:10 ของ positive และ negative control serum

ผล การทำ SDS - PAGE ของ Antigen จากเชื้อ Anaplasma และ Babesia พบว่ามี Protein band จำนวนมาก (Fig. 3) และการทำ Western blot พบว่าทั้ง antigen จากเชื้อ Anaplasma และ Babesia มี band ตรงกันและคล้ายกันหลายตำแหน่ง โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง 55 - 70 และ 39 kdal ดังแสดงในรูป Fig. 4

6. การฉีดแอนติเจนเข้าสู่สัตว์ทดลอง

- 6.1 การฉีดแอนติเจนเข้าหนู mice เพื่อเตรียม Monoclonal antibodies สำหรับโรค Anaplasmosis และ Babesiosis จะฉีดแอนติเจนที่ purified แล้วจำนวน 0.1 ml/ตัว โดยใช้แอนติเจน 30 μ g/ตัว ใช้หนูจำนวน 3 ตัว ขั้นตอนการฉีด และ booster จะทำเหมือนกับเชื้อ Trypanosome
- 6.2 การฉีดแอนติเจนเข้ากระต่าย ใช้ purified antigen Anaplasma และ Babesia ฉีดเข้ากระต่าย ตัวละ 500 μ g/ml ใช้กระต่าย 6 ตัวต่อ 1 แอนติเจน ขั้นตอนและวิธีการเหมือนการทำ hyperimmune serum ในกระต่ายที่ฉีดแอนติเจน Trypanosome
- 6.3 การทดสอบหาระดับ titre ทั้งในหนู mice และกระต่าย จะตรวจสอบโดยวิธี ELISA เหมือนขั้นตอนในการตรวจสอบการฉีดแอนติเจน Trypanosome

ผล การตรวจหาระดับ titre ของหนู mice ที่เตรียมทำ Monoclonal antibody สำหรับแอนติเจน Anaplasma และ Babesia พบระดับ titre อยู่ระหว่าง 10^5 - 10^6 ส่วนระดับ titre ของกระต่ายที่ฉีดแอนติเจน Anaplasma และ Babesia (เฉลี่ยจากกระต่าย 10 ตัว เนื่องจากตายระหว่างทดลอง 4 ตัว) อยู่ระหว่าง 10^4 - 10^5

7. การ purified Hyperimmune serum ของกระต่าย และการตรวจวัดหาปริมาณโปรตีน

การ purified Hyperimmune serum ของกระต่ายจะใช้ Affinity column purification โดยแต่ละชนิดของซีรัมจะใช้ column ต่างๆกัน คือ

7.1 purified Hyperimmune serum จากการฉีดแอนติเจน Anaplasma ใช้ Affinity column 4 ชนิด คือ

- a. Rbc Affinity column
- b. Wbc Affinity column
- c. Babesia Affinity column
- d. Anaplasma Affinity column

โดย Anaplasma Affinity column จะอยู่สุดท้ายในการ purified

7.2 การ purified Hyperimmune serum จากการฉีดแอนติเจน Babesia ใช้ Affinity column 4 ชนิดเหมือนกับ Hyperimmune serum จาก Antigen Anaplasma แต่เปลี่ยน column สุดท้ายเป็น Babesia Affinity column

สำหรับขั้นตอนการเตรียม Affinity column และการ purified จะเหมือนกับของ Trypanosome

ผล การ purified Hyperimmune serum ของกระต่ายฉีดแอนติเจน Anaplasma ได้ปริมาณโปรตีน ซึ่งวัดโดยวิธี Coomassie blue ได้ค่าเฉลี่ย 4.95 mg/ml มีปริมาณทั้งหมด 2.5 ml (จากซีรัม 60 ml) และปริมาณ โปรตีนของซีรัมกระต่ายที่ฉีดแอนติเจน Babesia ที่ purified แล้ว ได้ค่าเฉลี่ย 6.21 mg/ml มีปริมาณทั้งหมด 2.3 ml (จากซีรัม 80 ml)

8. การเตรียม Monoclonal antibodies และการทดสอบ

สำหรับการเตรียม Monoclonal antibodies ต่อเชื้อ Anaplasma และ Babesia มีวิธีการขั้นตอนและการทดสอบเหมือนการเตรียมในเชื้อ Trypanosome

ผลการทดสอบ Monoclonal antibodies ของ Anaplasma และ Babesia ได้ผลดังนี้

8.1 การ screening positive cells ด้วยวิธี ELISA

- จำนวน hybridoma cells ของ Anaplasma ครั้งแรกได้ 450 cells ครั้งที่ 2 ได้ 250 cells
- จำนวน hybridoma cells ของ Babesia ครั้งแรกได้ 687 cells ครั้งที่ 2 ได้ 265 cells

8.2 การเลือก positive hybridoma cells เพื่อทดสอบคุณสมบัติการผลิต Immunoglobulin โดยวิธี ELISA isotyping kit

- จำนวน hybridoma cells ของ Anaplasma ที่ทดสอบ 48 cells
- จำนวน hybridoma cells ของ Babesia ที่ทดสอบ 48 cells

ผล การทดสอบ hybridoma cells ของ Anaplasma มี Immunoglobulin class คือ IgM 47 cells และ IgG₁ + M จำนวน 1 cells ส่วน hybridoma cells ของ Babesia มี Immunoglobulin class คือ IgM 41 cells และมี IgG₁ + M จำนวน 7 cells

8.3 การทำ cloning ใช้วิธีการเหมือนใน Trypanosome

ผล การทำ cloning hybridoma cells ที่ผลิต Immunoglobulin G₁ + M จาก hybridoma ของ Anaplasma 1 clone ได้ single clone positive โดยวิธี ELISA จำนวน 230 clone และเมื่อนำไปทำ isotyping จำนวน 24 clone ได้ single cells ที่ผลิต IgG₁ 18 cells ส่วน Babesia ทำ cloning จำนวน 2 cells ได้ single

clone positive โดยวิธี ELISA จำนวน 225 และ 234 cells และเมื่อนำมาทำ isotyping ทั้งหมด 32 cells ได้ IgG₁ 24 cells ที่เหลือเป็น IgM

8.4 การทดสอบคุณสมบัติของ McAb ของแอนติเจน Anaplasma และ Babesia โดยการทำให้ Western blot โดยใช้ purified antigen Anaplasma และ Babesia และใช้ culture medium ของ McAb ที่เป็น IgG₁ มาทดสอบ

ผล การทดสอบ McAb ของทั้ง Anaplasma และ Babesia ได้ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลที่ 39 และ 58 kdal (Fig.6, 7)

8.5 การทดสอบ specificity ของ McAb ของ Anaplasma และ Babesia ต่อแอนติเจนที่เตรียมได้จาก parasite หลายชนิด โดยทดสอบด้วยวิธี ELISA ซึ่งแอนติเจนที่ใช้ทั้งหมดเป็น crude extract รวมทั้งแอนติเจนจากเม็ดเลือดแดง (Rbc) และเม็ดเลือดขาว (Wbc) โดยแอนติเจนแต่ละชนิดที่ใช้เคลือบเพลทจะมีปริมาณความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 10 – 30 ug/ml

ผล การทดสอบหา specificity (cross-reaction test) ได้ผลดังแสดงใน Table ที่ 1

9. การผลิตและการ purified McAb สำหรับ McAb ของ Anaplasma และ Babesia

มีขั้นตอนเหมือนใน McAb ของ Trypanosome

10. การกำหนดระบบการทดสอบซีรัมด้วยวิธี Dipstick colloidal dye immunoassay (DIA)

1. การเตรียม strip จะมีขั้นตอนเหมือนใน Trypanosome
2. การเตรียม Dye-Antibody Reagent

การเตรียม Dye-Antibody Reagent ต่อโรค Anaplasmosis และ Babesiosis จะใช้ anti - antibodies ต่อเชื้อทั้ง 2 มารวมกัน โดยใช้สี Samaron blue และปริมาณของ anti - antibodies ที่ใช้ของแต่ละเชื้อจะมีปริมาณ 2 เท่า ของปริมาณที่ใช้จริง เช่นต้องการ dye - conjugated ต่อทั้ง 2 แอนติบอดี ดังข้างต้น 10 ml ที่มีความเข้มข้นของ conjugate $A\lambda_{\max} = 20$ จะต้องเตรียม dye - conjugated ต่อ Anaplasmosis 5 ml โดยมี $A\lambda_{\max} = 40$ (40 $\mu\text{g/ml}$) และ dye-conjugate ต่อ Babesia 5 ml $A\lambda_{\max} = 40$ (40 $\mu\text{g/ml}$) หลังจากนั้นจึงนำ dye-conjugate ทั้งสองที่เตรียมได้มารวมให้มีปริมาตร 10 ml โดยจะมีค่า $A\lambda_{\max} = 20$

11. การทดสอบ

การทดสอบระบบ DIA ใช้ positive serum และ negative serum control โดยทำ serum dilution ตั้งแต่ undilution, dilution 1:5, 1:10 และ 1:20 ส่วน McAb ทั้งของ Anaplasma และ Babesia ที่ใช้ dot ลงบน strip ความเข้มข้นที่ใช้คือ 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ โดยหยด 2.5 $\mu\text{l/dot}$

ผล จากการทดสอบพบว่าเกิด non - specific reaction เมื่อทดสอบกับ serum control ทั้งบวกและลบ คือไม่สามารถแยกความแตกต่างของสี dot ที่เกิดขึ้นได้ (Fig. 9)

สรุป

สำหรับการศึกษา การพัฒนา dipstick colloidal dye ในการทดสอบทางด้านอิมมูโนวิทยาในห้องที่สำหรับโรคที่เกิดจากโปรโตซัว เมื่อศึกษาถึงขั้นตอนการทดสอบโดยใช้ Dipstick พบว่าให้ผลเกิด non - specific reaction ทำให้ไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ แม้จะได้พยายามปรับเปลี่ยนการทดสอบในหลายลักษณะแล้วก็ตาม สาเหตุที่เกิดขึ้นอาจเป็นไปได้ว่า McAb ที่ผลิตยังมีความจำเพาะไม่พอ โดยเฉพาะการผลิต McAb ของ Trypanosome ให้มีความจำเพาะนั้น เป็นสิ่งที่ทำได้ยากเพราะตัวเชื้อเองมีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนที่ผิวตลอดเวลา คือมี antigenic variation เกิดขึ้นทุกครั้งที่สภาพแวดล้อมในร่างกายเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะเมื่อเชื้อสัมผัสกับแอนติบอดีในร่างกาย ส่วน McAb ของ Anaplasma และ Babesia พบว่ายังมี cross-reaction กับเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวค่อนข้างสูง จึงเป็นไปได้ที่ความจำเพาะอาจจะยังไม่ดี ทำให้เกิด non-specific reaction ขึ้น

ผลกระทบที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าการวิจัยครั้งนี้จะไม่ประสบผลสำเร็จตามเป้าหมาย แต่ทางผู้วิจัยได้รับประโยชน์มากมายในแง่ของการได้รับองค์ความรู้ใหม่ๆและประสบการณ์ในงานวิจัยเพิ่มขึ้นทั้งด้านเทคนิคและวิธีการ อันจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนางานของผู้วิจัยให้มีประสิทธิภาพและประสิทธิผลต่อไป

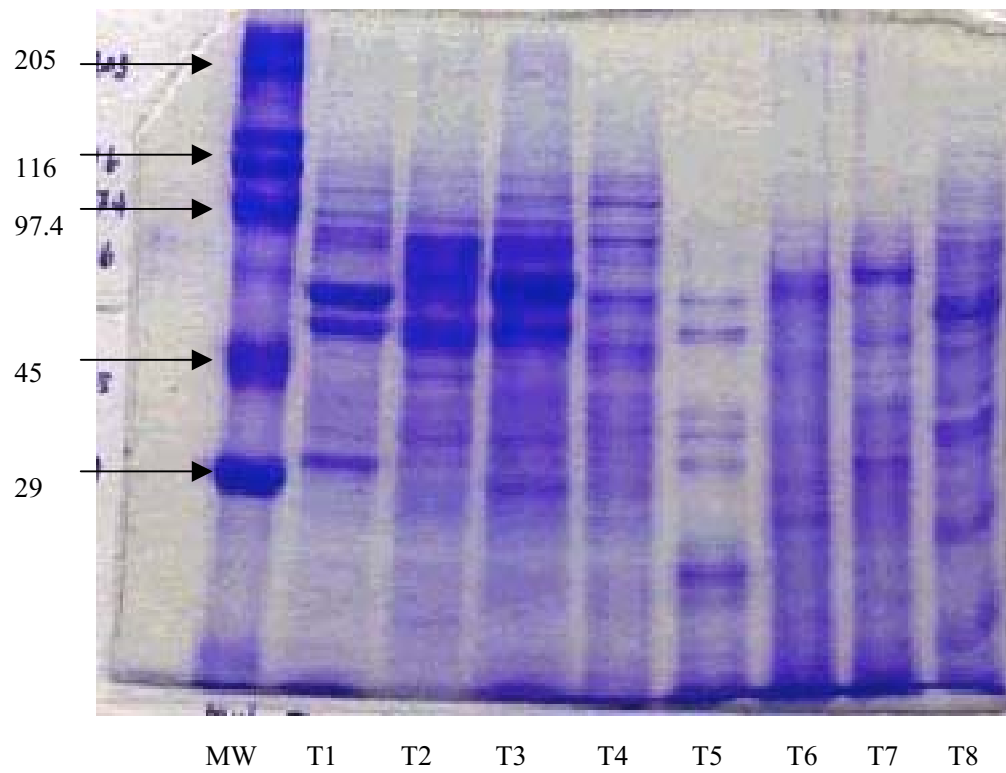


Fig. 1 SDS – PAGE ¹⁰⁰ *Trypanosoma* spp.

T1-T8 = Trypanosoma Ag

MW = Molecular weight marker

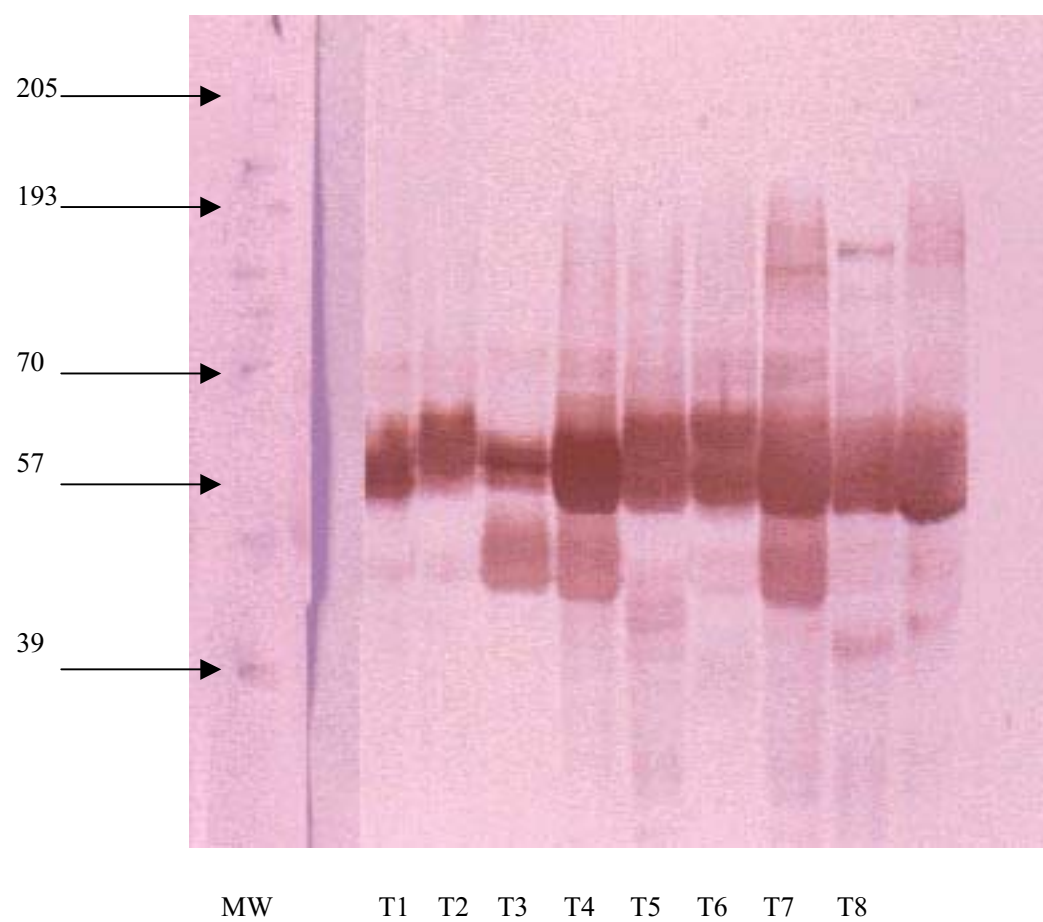


Fig. 2 Western Blot of Trypanosoma PcAb.

T1 – T9 = Trypanosoma Ag 9 isolates

MW = Molecular weight marker

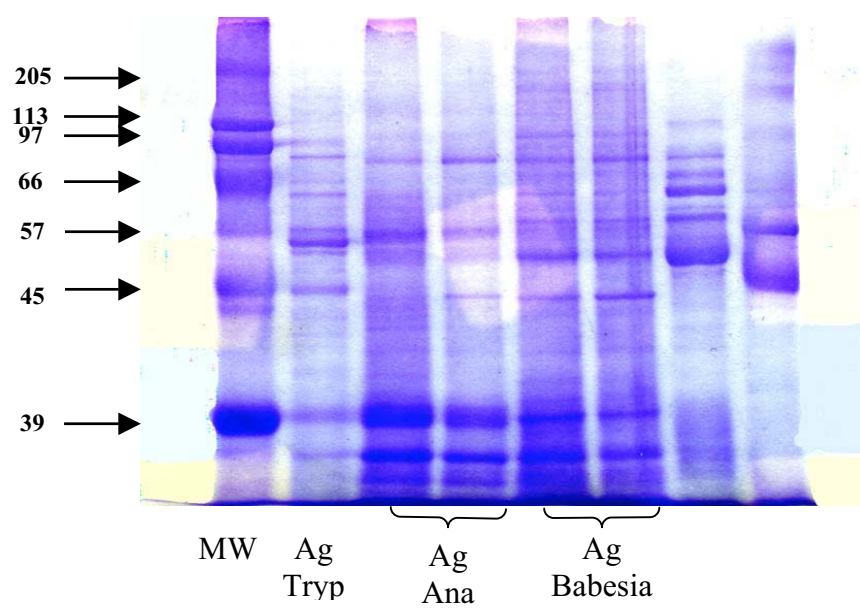


Fig.3 SDS-PAGE of Trypanosome Ag, Anaplasma Ag and Babesia Ag

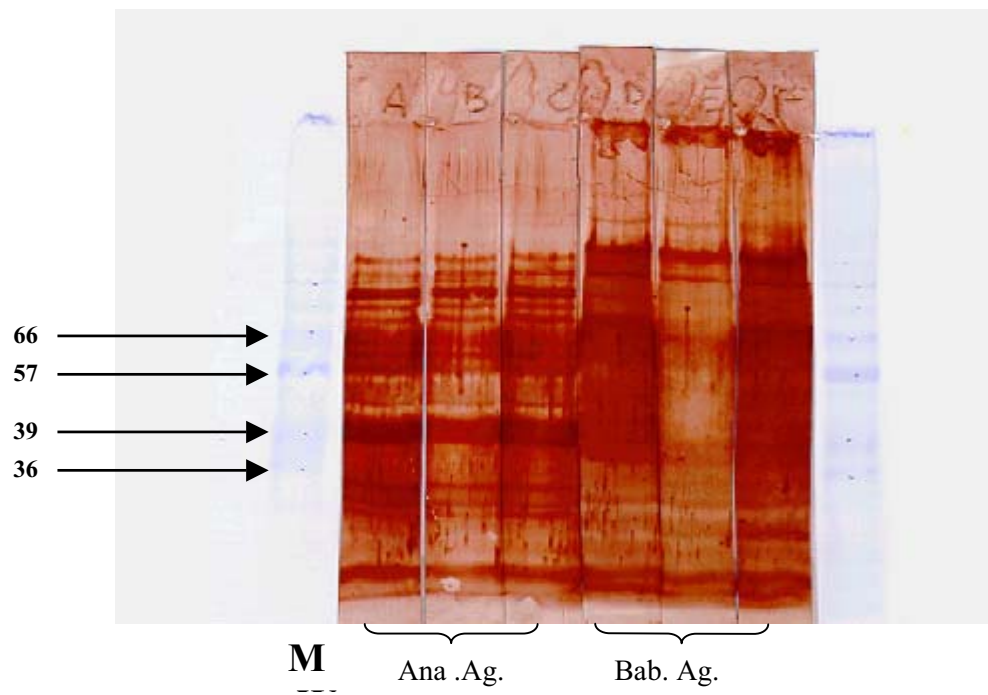


Fig.4 Western blot of Anaplasma and Babesia PcAb.

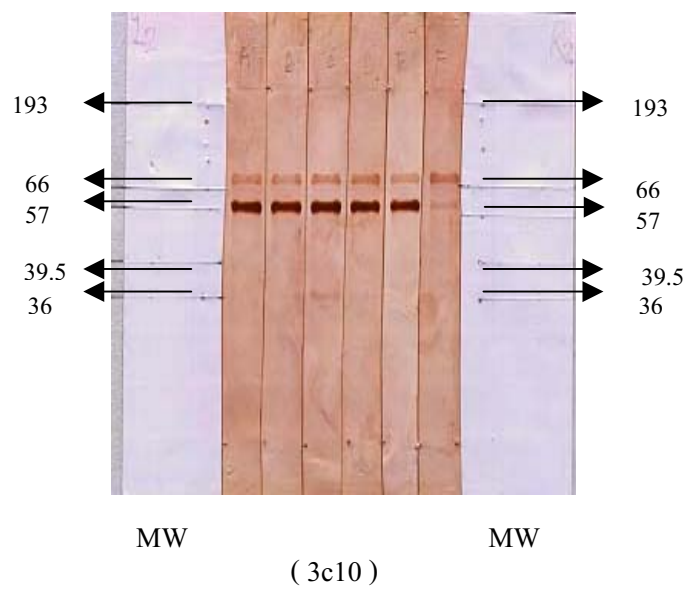
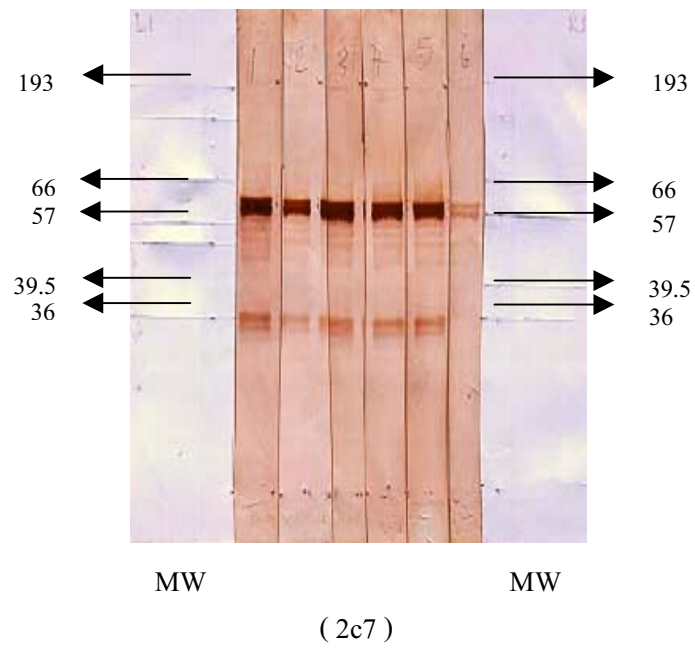


Fig. 5 Western Blot of *Trypanosoma* spp.

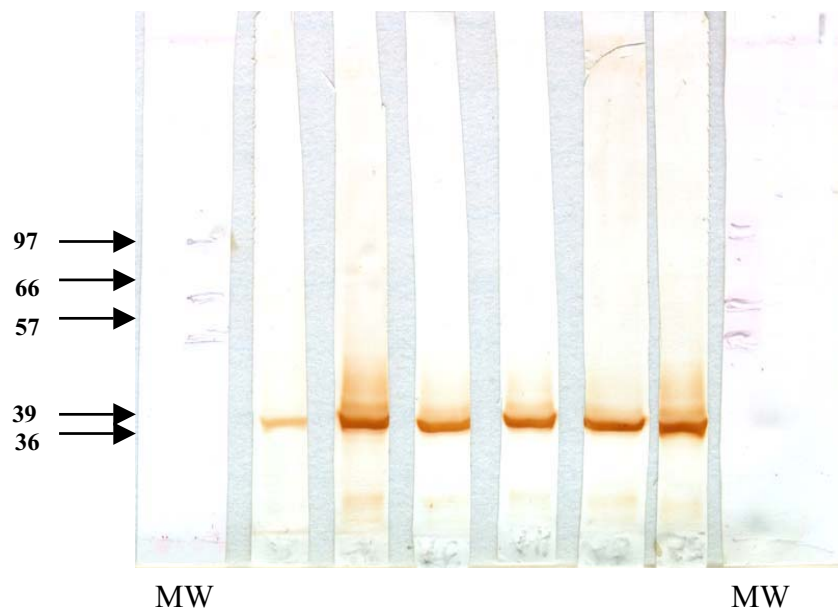


Fig 6. Western blot of Anaplasma McAb.

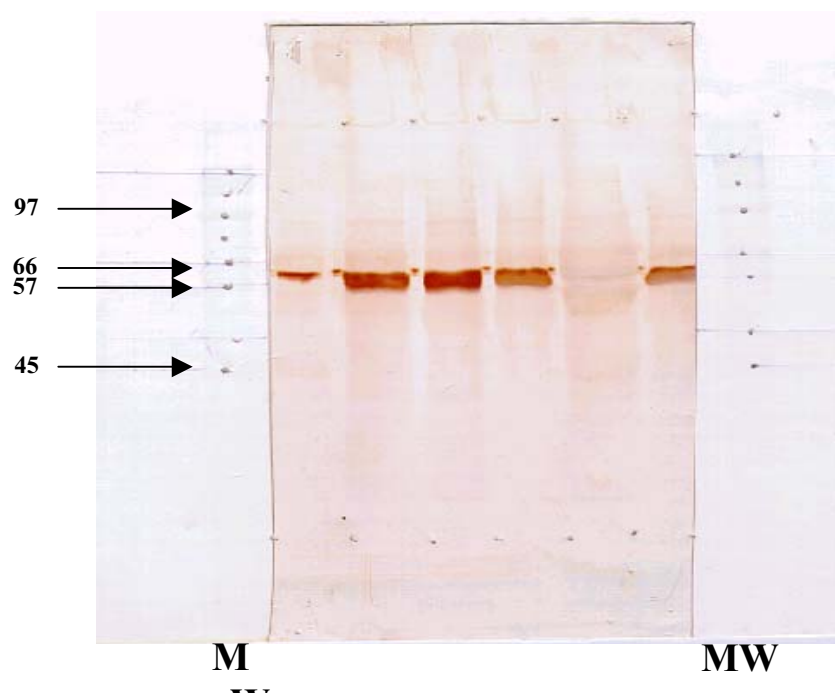
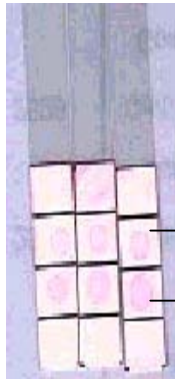


Fig.7 Western blot of Babesia McAb.

Pos. Pos. Neg.



Serum dilution 1:10

Neg. = FCS

Mc. = 1:5

Neg. Pos. Neg.



Serum dilution 1:10

M = Mouse Ig G

R = Rat IgG

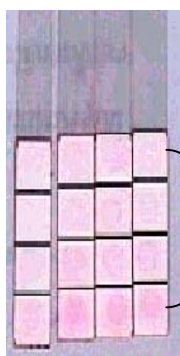
Mc = McAb

Mc = McAb

McAb from ascites fluid

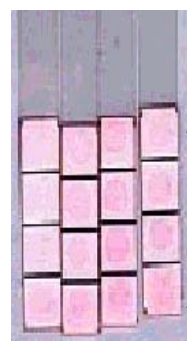
Negative Serum

1 : 10



Positive Serum

1:10



x10 x50 x100 x200

McAb from culture medium

Fig. 8 DIA – McAb. of *Trypanosoma* spp.

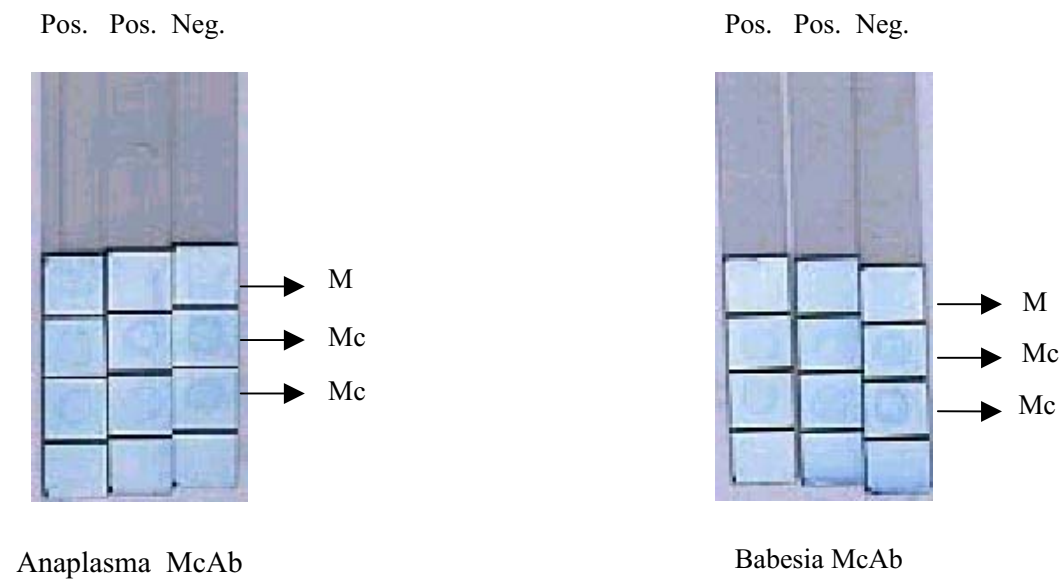


Fig. 9 DIA – McAb. Of *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp.

Serum Dilution = 1:5

Mc → McAb = undilute

M → mouse IgG= undilute

Pos → Postive serum

Neg → Negative serum

การพัฒนา Dipstick colloidal dye ในการทดสอบทางด้านอิมมูโนวิทยาในห้องที่สำหรับโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาทางด้านแบคทีเรีย (Brucellosis, Tuberculosis and Paratuberculosis)

1. การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย - *Brucella abortus* strain 125 biotype 1

- *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18

แอนติเจน *Brucella*

เพาะเชื้อ *Brucella abortus* สเตรน 125 biotype 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Tryptosoy agar + 5% horse serum) ประมาณ 40 ขวด บ่มเชื้อที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อ *Brucella* และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 (w/v) นึ่งที่ 121°C นาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสและกรองผ่าน 0.45 μm เติม 4 M NaOH ลงในส่วนใส (1:15) ต้มที่ 56°C นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นและปรับ pH 7.0 ด้วย glacial acetic acid และตกตะกอนด้วย ethanol (1:4) เก็บไว้ที่ 4°C นาน 24 - 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนตะกอนแล้วละลายส่วนตะกอนด้วยน้ำกลั่นนำไป dialyze แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเก็บส่วนใส และนำไปดูดแห้งเก็บไว้ที่ 4°C ปริมาณของแอนติเจนที่ดูดแห้งแล้วได้ 15 mg/ขวด จำนวน 12 ขวด

แอนติเจน *Tuberculosis*

ใช้ Purified protein derivative (PPD) extraction เป็น antigen มีความเข้มข้น 1 mg/ml

แอนติเจน *Paratuberculosis*

เพาะเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* สเตรน 18 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ T - ogawa ประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ จำนวน 4 ขวด เมื่อเชื้อเจริญเติบโตพอสมควรแล้ว จึง subculture ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Watson - Reid liquid medium ในขวด Roux Flask จำนวน 40 ขวด และบ่มเชื้อที่ 37°C นาน 6-8 สัปดาห์ สังเกตลักษณะของเชื้อที่เจริญเติบโตพบว่า เชื้อบางส่วนเริ่มจะจมลง จึงเก็บเชื้อและปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบ/นาที ที่ 4°C นาน 30 นาที เชื้อ *M. paratuberculosis* ที่ได้นำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตีเซลล์ด้วย bead beater และนำมาผ่าน French Pressure Cell Press อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสแล้วนำมาตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เก็บส่วนตะกอนละลายด้วยน้ำกลั่น ทำการ dialyze และกรองผ่าน 0.22 μm ดูดแห้งเก็บไว้ที่ 4°C แอนติเจนที่ดูดแห้งมีปริมาณ 187 mg/ขวด จำนวน 3 ขวด

การตรวจสอบแอนติเจนจากเชื้อแบคทีเรีย

แอนติเจนจากเชื้อ *B. abortus* และ *M. paratuberculosis* หลังจากทำการดูดแห้งแล้วนำมาทดสอบโดยวิธี ELISA ส่วนแอนติเจน PPD นำมาทำ dilution และทดสอบโดยวิธี ELISA เช่นเดียวกันแอนติเจนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. abortus*, *M. paratuberculosis* และ Bovine PPD ให้ผลดีต่อการทดสอบโดยวิธี ELISA ตามวิธีการที่พัฒนาเพื่อใช้ทดสอบโรค布鲁เซลโลซิส และพาราทูเบอร์คิวโลซิส ในห้องปฏิบัติการ (มณฑลและคณะ, 2544 และ วิวัฒน์และคณะ, 2544)

2. การเตรียม polyclonal antibodies

การเตรียม polyclonal antibody จาก Bovine IgG และจากเชื้อ *Brucella abortus*, *Mycobacterium paratuberculosis* และ *M. bovis* (BCG) โดยนำแอนติเจนฉีดกระตุ้น 5 ตัว/แอนติเจน adjuvant ที่ใช้กับแอนติเจนของเชื้อ *Mycobacterium* spp. นั้น ใช้เฉพาะ Incomplete Freund adjuvant และ booster 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ เจาะเลือดตรวจหาระดับ titre เช่นเดียวกับข้อ 1 แล้วแยกเก็บ hyperimmune serum ไว้ นำมา purified ด้วย affinity chromatography column ตรวจหาปริมาณโปรตีน และแบ่ง aliquot เก็บที่ -20°C ในปริมาณที่ต้องการ

การเตรียม Affinity column (CNBr-sepharose 4B) เพื่อแยก Immunoglobulin

1. ใส่ CNBr-sepharose 4B ซึ่งเป็นผงจำนวน 1 กรัมลงในกรวยแก้วที่มีแผ่นกรอง ซึ่งมีสารละลาย 1 mM HCl อยู่ 35 มล. แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
2. ล้างเจลด้วยสารละลาย 1 mM HCl จำนวน 35 มล. 4-5 ครั้ง
3. ครั้งสุดท้ายล้างด้วย coupling buffer (0.1 M NaHCO_3 / 0.5 M NaHCl , pH 8.3)
4. ใส่ coupling buffer 6.5 มล. ลงในหลอดกันแหลมที่มีความจุ 50 มล. แล้วเติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการให้จับกับเจลลงไป ปริมาณความเข้มข้นเท่ากับ 20 มก.
5. ถ่ายเจลจากข้อ 3. ลงในหลอดข้อ 4. โดยใช้ซ็อนตักสารเคมีช่วย ล้างเจลให้หมดจากในกรวยกรองด้วยบัฟเฟอร์จำนวน 5 มล. พยายามให้เจลลงมาในหลอดให้มากที่สุด ปริมาตรสุดท้ายของเจลทั้งหมดรวมบัฟเฟอร์โดยประมาณจะเท่ากับ 20 มล.
6. นำหลอดที่มีเจล + แอนติบอดีไปเข้าเครื่อง Rotate เพื่อให้หมุนเบาๆ ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งค้างคืนหรือใช้เวลา 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้โปรตีนจับกับเจลได้ดี และห้ามใช้ magnetic กวน
7. นำหลอดเจลจากข้อ 6. มาปั่นด้วยความเร็วต่ำๆ (1,000 รอบ/นาที หรือน้อยกว่า) นำส่วนใบบางส่วนไปวัดหาค่าโปรตีน ซึ่งจะต้องมีค่าเกือบเท่าศูนย์
8. จากข้อ 7. ตูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 1M ethanolamine pH 8.0 จำนวน 16.5 มล. ลงในเจล นำไปเข้าเครื่องหมุนเบาๆ อีกครั้ง เพื่อกำจัดส่วนที่เหลือของ active group ของโปรตีนออก (จากข้อ 1-8 ต้องทำในห้องที่เย็นและสารละลายทุกชนิดต้องอยู่ในสภาพแช่เย็นก่อนใช้)
9. ใช้ syringe พลาสติกปริมาตร 10 มล. ที่มีปลายสำหรับใส่เข็มฉีดยาตรงกลาง แล้วนำใยแก้วใส่ลงตรงปลายของ syringe เพื่อกันเจลไหลออก แล้วเทเจลลงไปอย่างเบาๆ ใน syringe เมื่อเจล pack ดีแล้ว ล้างเจลอีกครั้งด้วย coupling buffer จำนวน 35 มล.
10. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20-30 มล. ลงใน column ปล่อน้ำกลั่นทิ้งแล้วล้างด้วย 0.1 M acetate buffer / 0.5 M NaCl, pH 4 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง เมื่อปล่อน้ำกลั่นหมด เติม coupling buffer ล้างอีกครั้ง
11. ทำซ้ำ ตามข้อ 10.
12. Column ที่ได้พร้อมที่จะใช้งาน โดยเจลที่อยู่ใน column ถ้าไม่ใช้จะต้องเติม 0.05% Sodium azide หรือ 0.02% thimerosal in PBS เพื่อช่วยเก็บรักษาแล้วนำ column เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

การแยก Immunoglobulin ด้วย Affinity column

1. ล้าง Affinity column ที่เตรียมไว้ด้วย binding buffer จำนวนปริมาตร 5 เท่าของเจลใน column (อาจใช้น้ำกลั่นได้)
2. ปรับ column ให้มีสภาพเหมาะสมด้วย binding buffer อีกครั้งโดยใช้ binding buffer อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตรเจล
3. ปั่นหรือกรองซีรัม ที่จะแยกโดยซีรัมจะต้องเจือจางด้วย binding buffer 2-3 เท่า ก่อนกรอง เพื่อแยกสิ่งปนเปื้อนออกก่อน จากนั้นค่อยๆ เทซีรัมลงใน column ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.
4. ล้าง column ด้วย binding buffer จำนวนปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล (ถ้าล้าง column ด้วย binding buffer จำนวนมาก จะทำให้แอนติบอดี(โปรตีน) ที่เกาะกับเจลแบบหลวมๆ หลุดออกได้)
5. ก่อนนำ eluting buffer ไปใช้จะต้องวัด pH ของ eluting buffer ให้ได้ pH 2.7 ก่อนเสมอ ถ้า pH สูงกว่านี้จะต้องปรับ pH ด้วย HCl
6. Elute อิมมูโนโกลบูลินด้วย eluting buffer โดยปล่อยให้หยดลงในหลอดกันแหลมที่มีปริมาตร 15-50 มล. โดยในหลอดนี้จะมี neutralizing buffer อยู่ หลังจากได้ eluate ในปริมาตรที่ต้องการแล้ว จะต้องรีบปรับ pH ของ eluate ที่ได้ให้เป็น pH 7.0 ด้วย neutralizing buffer อีกครั้ง ควรวัดหาปริมาณโปรตีนใน eluate ด้วย UV spectrophotometer เป็นระยะๆเท่าที่จะทำได้
7. เมื่อได้ eluate แล้ว ก็ล้าง column ด้วย binding buffer
8. column เมื่อไม่ใช้ต่อ ถ้าจะเก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป จะต้องล้างด้วย 0.02% thimerosal in PBS จำนวน 2-3 ครั้งก่อนนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4°C

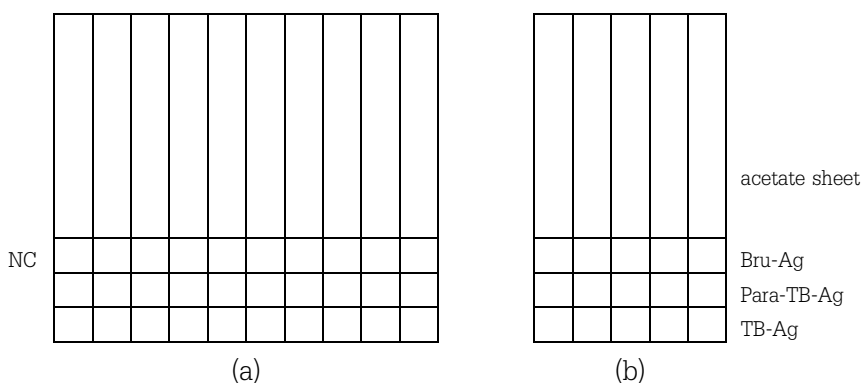
3. การกำหนดระบบการทดสอบซีรัมด้วยวิธี Dipstick colloidal dye immunoassay (DIA)

3.1 อุปกรณ์

- Nitrocellulose (NC) membrane (Schleicher and Schull, Dassel, Germany)
- สี Palanil Red BF (BASF, UK)
- แผ่นไนส
- กระดาษเทป 2 หน้า
- แอนติเจนของเชื้อ *B. abortus*, *M. bovis* (Bovine PPD) และ *M. paratuberculosis*

3.2 การเตรียม Nitrocellulose strip

- 1) ตัดแผ่น nitrocellulose (NC) membrane (Schleicher and Schull, Dassel, Germany) กว้างขนาด 2.4 cm × ยาว 15.0 cm
- 2) ตัดแผ่นไนส ขนาดกว้าง 7.5 cm
- 3) ใช้เทป 2 หน้า ยึดแผ่น NC กับแผ่นไนสในข้อ (2)
- 4) ตัดแผ่น dipstick ในข้อ (3) ให้ได้ขนาด 0.6 × 7.5 cm และแบ่ง NC (2.4 cm) เป็น 3 ช่อง โดยใช้ปากกาขีดเส้นแบ่ง (ตามรูป a) เพื่อหยดแอนติเจนตามต้องการ (ดังรูป b)



- 5) หยดแอนติเจน 2.5 – 3.0 μl ของ dilution ที่เหมาะสมตามต้องการ ลงบนช่อง NC membrane ที่แห้งให้แห้งในที่เย็น (ตู้เย็น 4°C)
- 6) กำจัด non-specific protein binding site ที่เหลืออยู่บน NC ด้วยการจุ่ม strip (จากข้อ 5) ใน PBS และ block แอนติเจนด้วย 0.5 – 1% skim milk ใน PBS pH 7.4 นาน 30 นาที ที่ 4°C และล้าง strip ด้วย PBS ที่แช่เย็น ที่แห้งให้แห้งที่ 4°C และเก็บที่ 4°C เพื่อรอการทดสอบ

3.3 การเตรียม Dye – Antibody Reagent

การเตรียมสีและ DIA system จะเตรียมตามวิธีของ Snowden and Hommel (1991) และ Kashiwazaki et al (1994) โดยใช้สี Palanil Red BF (BASF, UK) ซึ่งเป็นสีย้อมผ้า ส่วนแอนติบอดีที่ใช้สำหรับตรวจโรค Brucellosis, Tuberculosis และ Paratuberculosis เป็น anti bovine IgG ที่เตรียมขึ้นมาด้วยการฉีด Bovine IgG ในกระต่ายและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity-purified column chromatography

สีที่ใช้จะนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นมีค่า $A\lambda_{\text{max}} = 30$ dye particles รวมกับแอนติบอดี anti-bovine IgG ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสุดท้าย โดยให้สีทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในสารละลาย 10 mM/L ของ phosphate ที่มี 2.7 mM/L ของ NaCl pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอุณหภูมิห้องและนำเข้าตู้เย็น (4°C) อีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้แอนติบอดีเกาะติดสีได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นนำสีที่ได้ไปปั่นที่ 12000 x g นาน 30 นาที ที่ 4°C ดึงน้ำใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนสีในสารละลาย 10 mM/L ของ phosphate 2.7 mM/L NaCl ที่มี 5% bovine serum albumin กับ 0.01% Thimerosal ซึ่งสีที่เตรียมได้นี้ คือ Palanil Red + antibodies จะเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C หรือแช่แข็งที่ -20°C

ขั้นตอนการเตรียม Dye – Antibody Reagent มีดังนี้

การเตรียม Dye stock สำหรับ DIA

- 1) เตรียม 5% Dye ในน้ำกลั่น (w/v) เช่น สี 1 กรัม + น้ำกลั่น 20 ml
- 2) ล้าง 4 ครั้งด้วยน้ำกลั่น โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 x g นาน 30 นาที ใช้ pasteur pipette สำหรับ resuspend สี
- 3) resuspend สีในน้ำกลั่น 10 ml และเติม thimerosal 0.01% (w/v)
- 4) ละลาย dye stock ปริมาณน้อยๆใน ethanol และทำ dilution ตั้งแต่ 1:700 ถึง 1:1200 เพื่อหา dilution ที่เหมาะสมและมีค่า absorbance เท่ากับ 1 ที่ wavelength ที่เหมาะสม (ตามชนิดของสี)

ตัวอย่าง

Dye stock 100 μ l }
 Ethanol 10 μ l } Dilution 1 : 100

และทำ serial dilution ด้วยน้ำกลั่น

Dilution	Dye stock (1:100)	Distilled water
1 : 700	500 μ l	3.0 ml
1 : 800	500 μ l	3.5 ml
1 : 900	400 μ l	3.2 ml
1 : 1000	400 μ l	3.6 ml
1 : 1100	300 μ l	3.0 ml
1 : 1200	300 μ l	3.3 ml

wavelength : Samaron Blue 605 nm

Palanil Red 535 nm

การเตรียม Dye - Antibody

อุปกรณ์

- Stock dye suspension Palanil Red $A_{535} = 850$ dye particles (จากการเตรียมในข้อ 1)
- 0.1M phosphate buffer
- 5 M NaCl
- phosphate buffered saline pH 7.4
- Affinity purified IgG

วิธีเตรียม

- 1) เตรียม 3.3 mM sodium phosphate / 125 mM NaCl buffer ปริมาตร 10 ml โดยการเติม 3.3 ml 0.1 M Sodium phosphate buffered และ 5 M NaCl ในปริมาตร 125 μ l ในน้ำกลั่น 6.6 ml
- 2) หาปริมาตรสีที่ต้องการใน 10 ml โดยมี dye particles ตามต้องการ เช่น
 การคำนวณที่ $A_{\lambda_{max}} = 30$ dye particle คือ ปริมาตรสี stock ที่ต้องใช้ = $10 \times 1,000 \div 850 / 30$
 = 353 μ l
- 3) ปริมาณของ Antibody (Ab) ที่ต้องการคือ 30 μ g/ml ดังนั้นปริมาตรของ Ab ควรจะเป็น
 = $30 \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml} \div 2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l (stock)}$
 = 120 μ l
- 4) ปริมาตรของสีที่ต้องการ = 353 μ l
 ปริมาตรของ Ab ที่ต้องการ = 120 μ l
 $\therefore$ รวมปริมาตร = 473 μ l
- 5) buffer ที่เตรียมในข้อ (1) ดูดออก 473 μ l แล้วเติมสีและแอนติบอดี ตามที่ต้องการ

- 6) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมง
- 7) ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g นาน 30 นาที ดูด supernatant ที่
- 8) Resuspend dye - Ab ใน 3.3 mM phosphate buffered / 125 mM NaCl และเติม 0.01% thimerosal
- 9) เก็บ Dye - Antibody Reagent ที่ -20°C

3.4 การพัฒนาระบบ DIA

การหาปริมาณแอนติเจนและ dilution ของซีรัมที่เหมาะสมในการทดสอบ

การหาปริมาณ Brucella แอนติเจนที่เหมาะสม โดยการทำ dilution ของแอนติเจน จากความเข้มข้น 1 µg/3 µl (dot), 0.5 µg/3 µl, 0.25 µg/3 µl และ 0.125 µg/3 µl ตามลำดับ ส่วนซีรัมทำ dilution จากซีรัมไม่เจือจาง, 1:5, 1:10, 1:20 และ 1:40 ตามลำดับ

สำหรับ Bovine PPD แอนติเจนทำการเจือจางแอนติเจนเป็น 3 µg/3 µl (dot), 1.5 µg/3 µl, 1 µg/3 µl และ 0.5 µg/3 µl ซีรัมเจือจางเช่นเดียวกับ Brucellosis

Paratuberculosis แอนติเจนเจือจางเป็น 3 µg/3 µl (dot), 1.5 µg/3 µl, 1 µg/3 µl (dot), 0.5 µg/3 µl และการเจือจางซีรัมในการทดสอบ ทำเช่นเดียวกับ Brucellosis

วิธีทำ

1. ซีรัมที่ใช้เป็นซีรัมโคนมที่เก็บจากห้องที่เจือจางซีรัมด้วย PBS โดยเตรียมจำนวน 2 ชุด
2. นำ strips ที่ dot แอนติเจน (ตามรูป b) เรียบร้อยแล้วมาใช้ในการทดสอบจำนวน 2 ชุด ทำให้เปียกด้วยน้ำกลั่น จุ่ม strip ลงในตัวอย่างซีรัมที่เจือจางด้วย PBS ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง
3. ล้าง dipsticks ด้วยน้ำก๊อกอย่างรวดเร็ว แล้วจุ่ม strips ลงใน Dye - Antibody Reagent แช่ทิ้งไว้ 30 นาที และ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
4. ล้าง dipsticks จากข้อ 3 ด้วยน้ำก๊อกที่ไหลเบาๆ แล้วสังเกตดูสีที่เกิดขึ้นในตำแหน่งต่างๆที่หยดแอนติเจนไว้และบันทึกข้อมูล

Positive and Negative control sera

ทดสอบ DIA กับซีรัมที่ให้ผลบวกต่อโรค Brucellosis, Tuberculosis และ Paratuberculosis (ซีรัมควบคุมบวก) ซึ่งเป็นซีรัมควบคุมบวกที่ได้จากการยืนยันโดยการเพาะเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบผลของ DIA กับการแยกเชื้อและหาปริมาณที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างของแอนติเจน-แอนติบอดี ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป ส่วนซีรัมควบคุมลบเป็นซีรัมที่ทราบประวัติและทดสอบทางซีรัมวิทยาแล้วว่าไม่พบแอนติบอดีต่อโรค Brucellosis Tuberculosis และ Paratuberculosis ทุกตัวอย่าง

3.5 ผลการศึกษาระบบการทดสอบโรคโดยวิธี DIA

การตรวจ Brucellosis, Tuberculosis และ Paratuberculosis โดยวิธี DIA (Fig.1)

แอนติเจนที่เหมาะสมใช้ในชุดทดสอบ คือ

Bru - Ag	=	0.5	μg/ 3 μl
Ptb - Ag	=	1.5	μg/ 3 μl
Bovine PPD - Ag	=	3	μg/ 3 μl
ปริมาณ Dye A ₅₃₅	=	30	dye particles
Affinity-purified rabbit Anti-Bovine IgG	=	30	μg/ml
ซีรัม dilution ที่ใช้ทดสอบ	=	1 : 5	

วิธีทดสอบที่เหมาะสม คือ

- 1) เจือจางซีรัมที่ต้องการทดสอบด้วย PBS ที่ dilution 1:5
- 2) จุ่ม strip แอนติเจนให้เปียกชุ่มด้วยน้ำกลั่นหรือ PBS
- 3) นำ strip (จากข้อ 2) จุ่มในตัวอย่างซีรัมที่ต้องการทดสอบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
- 4) ล้าง strip ด้วยน้ำก๊อกอย่างรวดเร็ว แล้วจุ่ม strip ลงใน Dye - Antibody Reagent แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- 5) ล้าง strip (ข้อ 4) โดยผ่านน้ำก๊อกไหลช้าๆ
- 6) อ่านและบันทึกผล

4. การศึกษา Diagnostic Sensitivity (DSn) และ Diagnostic Specificity (DSp) ของวิธี DIA

Brucellosis

ซีรัมที่ใช้ในการศึกษา DSn และ DSp แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1) กลุ่มลบ (negative) จำนวน 130 ตัวอย่าง
เป็นซีรัมจากฝูงโคที่มีประวัติไม่พบโรคมานานไม่น้อยกว่า 5 ปี และสุ่มตรวจ น้มนม / เลือด ไม่พบ *B. abortus* เก็บตัวอย่างไว้ที่ -34°C
- 2) กลุ่มบวก (positive) จำนวน 42 ตัวอย่าง
เป็นซีรัมที่ได้จากโคที่เป็นโรค Brucellosis ซึ่งสามารถแยกเชื้อ *B. abortus* ได้จาก น้มนม / เลือด / ต่อมน้ำเหลือง จากโคที่มีการผ่าซากและตัวอย่างซีรัมเก็บไว้ที่ -34°C

Tuberculosis

ซีรัมที่ใช้ในการศึกษา DSn และ DSp แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1) กลุ่มลบ (negative) จำนวน 130 ตัวอย่าง
เป็นซีรัมจากฟาร์มที่มีประวัติไม่เป็น Tuberculosis ไม่น้อยกว่า 5 ปี เก็บตัวอย่างไว้ที่ -34°C
- 2) กลุ่มบวก (positive) จำนวน 28 ตัวอย่าง
เป็นซีรัมโคที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบทางผิวหนัง (single intradermal test) และพบรอยโรคจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา หรือ พบเชื้อ *M. bovis*

Paratuberculosis

ซีรัมที่ใช้ในการศึกษา DSn และ DSp คือ

- 1) กลุ่มลบ (negative) จำนวน 130 ตัวอย่าง เป็นซีรัมจากฟาร์มที่มีประวัติไม่เป็น Paratuberculosis ไม่น้อยกว่า 5 ปีเก็บตัวอย่างไว้ที่ -34°C
- 2) กลุ่มบวก (positive) จำนวน 16 ตัวอย่าง เป็นซีรัมโคที่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยา และพบรอยโรคจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา หรือพบเชื้อ *M. paratuberculosis*

ผลการศึกษา Diagnostic Sensitivity (DSn) และ Diagnostic Specificity (DSp) ของการทดสอบโรค โดยวิธี DIA

1) Brucellosis

ศึกษา Diagnostic Sensitivity (DSn) และ Diagnostic Specificity (DSp) ดำเนินการโดยใช้ ซีรัมโคที่เป็นโรค 42 ตัวอย่าง และซีรัมโคที่ไม่เป็นโรคจำนวน 130 ตัวอย่าง พบว่า มี DSn 92.9% และ DSp 97.7% ซึ่งในการหาค่า DSn และ DSp ครั้งนี้ ใช้ gold standard คือ การเพาะแยกเชื้อ *Brucella abortus*

		Isolation	
		+	-
DIA	+	39 A	3 B
	-	3 C	127 D
		42	130

$$\text{Diagnostic Sensitivity (DSn)} = \frac{39}{39 + 3} \times 100 = 92.9\%$$

$$\text{Diagnostic Specificity (DSp)} = \frac{127}{127 + 3} \times 100 = 97.7\%$$

2) Tuberculosis และ Paratuberculosis

การทดสอบโดยวิธี DIA ของ Tuberculosis และ Paratuberculosis ให้ผลสอดคล้องกับผลบวกจริงน้อยมากซึ่งพบว่ามี DSn ค่อนข้างต่ำคือ 7.1% และ 31.25% ตามลำดับ จึงได้ดำเนินการพัฒนา Dot-ELISA บนแผ่น nitrocellulose membrane เพื่อศึกษาเพิ่มเติม

5. การทดสอบตัวอย่างซีรัมโคนมในพื้นที่โดยวิธี DIA

ตัวอย่างซีรัม: เก็บตัวอย่างซีรัมจากโคนมในพื้นที่ต่างๆ ดังนี้

จังหวัดลพบุรี	จำนวน	300	ตัวอย่าง
จังหวัดสุพรรณบุรี	จำนวน	158	ตัวอย่าง
จังหวัดสระบุรี	จำนวน	159	ตัวอย่าง
จังหวัดราชบุรี	จำนวน	2,190	ตัวอย่าง
จังหวัดกาญจนบุรี	จำนวน	2,256	ตัวอย่าง
จังหวัดนครราชสีมา	จำนวน	306	ตัวอย่าง
รวม	จำนวน	5,369	ตัวอย่าง

วิธีการทดสอบโรค

- 1.1 ทดสอบโรค Brucellosis ด้วยวิธี rapid plate test (RPT) และ EDTA - tube agglutination test (EDTA-TAT) (มนยาและคณะ, 2534) ซึ่งเป็นวิธีการชันสูตรโรคทางซีรั่มวิทยาที่ใช้เป็น routine diagnosis
- 1.2 ทดสอบโรค Paratuberculosis ทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธีคอมพลีเมนต์ฟักเซชันเทสต์
- 1.3 ทดสอบโรค Tuberculosis ด้วยวิธี single intradermal test (SID) ที่โคนหางของโคนม
- 1.4 ทดสอบ Brucellosis, Tuberculosis และ Paratuberculosis ทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี DIA

ผลการทดสอบ

1) การตรวจโรค Brucellosis

การชันสูตรโรค Brucellosis ทางซีรั่มวิทยาซึ่งเป็น routine diagnosis ผลพบว่า จาก 5369 ตัวอย่าง พบให้ผลบวก 48 ตัวอย่างและเมื่อตรวจโดยวิธี DIA พบให้ผลบวก 69 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1 และ Fig.2) เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้วิธี routine diagnosis เป็นหลัก พบว่ามี DS_n 91.7% และมี DS_p 99.5% DIA-strip ที่ใช้ในการทดสอบสามารถจะเก็บได้นาน 1 ปี ส่วน Dye antibody reagent เก็บใน freezer สามารถจะใช้ได้นาน 6 เดือน (Fig.3)

		Routine diagnosis (abbot)	
		+	-
DIA	+	44	25
	-	4	5296
		48	5321

2) การตรวจโรค Tuberculosis และ Paratuberculosis

จากผลการทดสอบ Tuberculosis และ Paratuberculosis ในห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างควบคุมบวกทั้ง 2 โรค ด้วยวิธี DIA นั้น ให้ผลบวกจริงสอดคล้องกันน้อยมาก และเมื่อตรวจซีรั่มจากพื้นที่พบว่า การตรวจ Tuberculosis ด้วยวิธีการทดสอบทางผิวหนังไม่พบ reactor ส่วนการตรวจ Paratuberculosis ด้วยวิธี CFT นั้น พบให้ผลบวกจำนวน 12 ตัวอย่าง จากซีรั่มโคทั้งหมด 5,369 ตัวอย่าง (ซีรั่มเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2543 ตารางที่ 1) คิดเป็น 0.22% และผลการตรวจซีรั่มจากท้องที่ด้วยวิธี DIA ให้ผลเป็นลบหมดทั้ง 2 โรค

6. การศึกษาวิธี Dot-ELISA

เนื่องจากการทดสอบโดยวิธี DIA พบว่า การตอบสนองของแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ได้จากเชื้อ *M. paratuberculosis* และแอนติเจนจาก Bovine PPD ได้ผลไม่สม่ำเสมอและไม่ชัดเจน จึงได้มีการพัฒนาใช้วิธี Dot-ELISA มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม Dipstick

ขั้นตอนจะเหมือนการทำ DIA และปริมาณแอนติเจนของทั้ง 3 โรคก็ใช้ในปริมาณเท่ากับใน DIA

รวมทั้งมีการกำจัด non-specific protein binding site ใน strips ด้วย 1% skim milk ใน PBS ที่ 4°C ก่อนนำไปใช้เช่นเดียวกัน

2. Positive and Negative control sera

ใช้ซีรัมโคที่ยืนยันผลบวกด้วยการเพาะแยกเชื้อเป็นซีรัมควบคุมบวกในการหาปริมาณที่เหมาะสมก่อนจะนำไปใช้ในการทดสอบกับซีรัมที่เก็บจากห้องที่ ส่วนซีรัมที่ให้ผลลบเป็นซีรัมจากโคที่ทดสอบทางซีรัมวิทยาที่ให้ผลลบทุกวิธี รวมทั้งมีประวัติที่แน่นอนว่าไม่เป็นโรคและไม่พบแอนติบอดีทั้ง 3 โรคทุกตัวอย่าง

3. การหาปริมาณคอนจูเกตและซีรัมที่เหมาะสม

ปริมาณของแอนติเจนทั้ง 3 ชนิดและซีรัม ใช้เหมือนกับการทำ DIA แต่ปริมาณของคอนจูเกตที่เหมาะสมในการทดสอบโดยวิธี dot ELISA นั้น หาได้จากการเจือจางคอนจูเกตตั้งแต่ 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2,000 และ 1 : 4,000

4. การทดสอบด้วยวิธี Dot ELISA

- 4.1 นำ strips ที่ได้มาทำให้เปียกด้วย PBS แล้วนำไปจุ่มลงในซีรัมโคที่จะทดสอบที่เจือจางด้วย PBS pH 7.2 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 4.2 ล้าง strips ด้วย washing buffer (PBS + 0.2% Tween 20)
- 4.3 นำ strips ที่ล้างแล้วจุ่มลงใน Goat anti-bovine IgG horseradish peroxidase conjugate (KPL) ที่เจือจางด้วย washing buffer ที่อุณหภูมิห้อง
- 4.4 ล้าง strips จาก 4.3 ด้วย washing buffer
- 4.5 นำ strips แต่ละอันจุ่มลงใน substrate solution ที่มี 3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 12 mg ละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 7.6 จำนวน 10 ml + 30% H₂O₂ 20 µl แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ถ้าซีรัมโคที่ให้ผลบวกจะปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาลตรงกับแอนติเจนที่หยดไว้

ผลการทดสอบระบบการทดสอบโรคโดยวิธี Dot-ELISA

แอนติเจนเหมาะสมที่ใช้ในชุดทดสอบ (Fig. 9, 10)

Bru - Ag	=	0.5	µg / 3 µl
Ptb - Ag	=	1.5	µg / 3 µl
Bovine PPD - Ag	=	3	µg / 3 µl

Conjugate ที่ใช้ทดสอบ : Goat anti-bovine IgG horseradish peroxidase : dilution 1:2000

Chromogen/Substrate ที่ใช้ทดสอบ : 3, 3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) / H₂O₂

ซีรัมที่ใช้ทดสอบ : dilution 1:10

วิธีทดสอบที่เหมาะสม คือ

1. นำ strip แอนติเจนทำให้เปียกด้วย PBS
2. เจือจางซีรัมที่ต้องการทดสอบเป็น 1:10 ด้วย PBS pH 7.2
3. นำ strip (ข้อ 1) จุ่มในซีรัมที่เจือจาง (ข้อ 2) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

4. ล้าง strip ด้วย washing buffer (PBS + 0.2% Tween20)
5. จุ่ม strip ลงใน Goat anti-bovine IgG horseradish peroxidase conjugate (KPL) ที่เจือจาง 1 : 2000 (washing buffer) วางที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
6. ล้างด้วย washing buffer
7. จุ่ม strip ลงใน chromogen/substrate solution (3, 3' diaminobenzidine tetrahydro - chloride (DAB) ละลายใน 50 mM Tris - HCl pH 7.6 + 30% H₂O₂) นาน 1 - 2 นาที
8. อ่านและบันทึกผล

7. การศึกษา Diagnostic Sensitivity (DSn) และ Diagnostic Specificity (DSp) ของวิธี Dot - ELISA

Brucellosis

ซีรัมควบคุม	- กลุ่มบวก จำนวน	57	ตัวอย่าง
	- กลุ่มลบ จำนวน	200	ตัวอย่าง

Tuberculosis

ซีรัมควบคุม	- กลุ่มบวก จำนวน	28	ตัวอย่าง
	- กลุ่มลบ จำนวน	200	ตัวอย่าง

Paratuberculosis

ซีรัมควบคุม	- กลุ่มบวก จำนวน	16	ตัวอย่าง
	- กลุ่มลบ จำนวน	200	ตัวอย่าง

ผลการศึกษา

1. Brucellosis

ซีรัมที่ใช้ในการศึกษา DSn และ DSp มีซีรัมควบคุมบวก (positive control serum) จำนวน 57 ตัวอย่าง และซีรัมควบคุมลบ (negative control serum) จำนวน 200 ตัวอย่าง มีผลดังนี้คือ

		Isolation	
		Disease	No disease
Dot-ELISA	+	55	1
	-	2	199
		57	200

Diagnostic Sensitivity (DSn) = 96.5%

Diagnostic Specificity (DSp) = 99.5%

Efficiency = 98.8%

Positive predictive value = 98.2%

Negative predictive value = 99.0%

2. Tuberculosis

ซีรัมที่ใช้ในการศึกษา DS_n และ DS_p มีซีรัมควบคุมบวกจำนวน 28 ตัวอย่าง เก็บจากโคที่ให้ผลบวกทางการทดสอบทางผิวหนัง (single intradermal test, SID) และพบรอยโรคจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาหรือเพาะแยกเชื้อ *M. bovis* และซีรัมควบคุมลบมีจำนวน 200 ตัวอย่าง มีผลดังนี้คือ

	SID/histopathologiccal examination	
	Disease	No disease
Dot-ELISA	+ 7	0
	- 21	200
	28	200
DS _n	= 25%	
DS _p	= 100%	
Efficiency	= 90.8%	
Positive predictive value	= 100%	
Negative predictive value	= 90.5%	

3. Paratuberculosis

ซีรัมที่ใช้ในการศึกษา DS_n และ DS_p มีซีรัมควบคุมบวก จำนวน 16 ตัวอย่าง และซีรัมควบคุมลบจำนวน 200 ตัวอย่าง มีผลดังนี้คือ

	Isolation / histopathologiccal examination	
	Disease	No disease
Dot-ELISA	+ 14	0
	- 2	200
	16	200
DS _n	= 87.5%	
DS _p	= 100%	
Efficiency	= 99.1%	
Positive predictive value	= 100%	
Negative predictive value	= 99.0%	

8. การทดสอบตัวอย่างซีรัมโคนมในพื้นที่โดยวิธี Dot-ELISA

- 1) ตัวอย่างซีรัม: ตัวอย่างซีรัมโคนมเก็บจากพื้นที่ต่างๆ ดังนี้

โคนมในจังหวัดสุพรรณบุรี	802	ตัวอย่าง
โคนมในจังหวัดกาญจนบุรี	613	ตัวอย่าง
โคนมในจังหวัดราชบุรี	1,576	ตัวอย่าง
โคนมในจังหวัดเพชรบุรี	191	ตัวอย่าง
โคนมในจังหวัดนครราชสีมา	219	ตัวอย่าง
โคนมในจังหวัดอ่างทอง	38	ตัวอย่าง
โคนมในจังหวัดสระบุรี	104	ตัวอย่าง
โคนมในจังหวัดลพบุรี	39	ตัวอย่าง
รวมตัวอย่างชีวมทั้งหมด	3,582	ตัวอย่าง

2) การทดสอบโรค

- 1.1 ทดสอบโรค Brucellosis ด้วยวิธี rapid plate test (RPT) และ EDTA-tube agglutination test (EDTA-TAT) ซึ่งเป็นวิธีการชันสูตรโรคทางชีวมวิทยาที่ใช้เป็น routine diagnosis
- 1.2 ทดสอบโรค Paratuberculosis ทางชีวมวิทยาด้วยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิเคชันเทสต์
- 1.3 ทดสอบโรค Tuberculosis ด้วยวิธี single intradermal test ที่โคนทาง
- 1.4 ทดสอบ Brucellosis, Paratuberculosis และ Tuberculosis ด้วยวิธี Dot-ELISA

ผลการศึกษา

การชันสูตรโรค Brucellosis โดยเป็น routine diagnosis ผลพบว่าจากชีวมทั้งหมด 3,582 ตัวอย่าง เป็นชีวมที่เก็บในช่วงปี พ.ศ. 2544 พบให้ผลบวกต่อโรค Brucellosis จำนวน 29 ตัวอย่าง และ โรค Paratuberculosis 2 ตัวอย่าง สำหรับโรค Tuberculosis ใช้การทดสอบทางผิวหนัง (Single Intradermal test, SID) เป็นวิธีการชันสูตรโรคนั้น พบให้ผลบวก 5 ตัวอย่าง ส่วนผลการทดสอบโดยวิธี Dot-ELISA พบว่าให้ผลบวก ต่อ Brucellosis จำนวน 31 ตัวอย่าง Tuberculosis 2 ตัวอย่าง และ Paratuberculosis 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2 และ Fig.11)

1) Brucellosis

Routine diagnosis (abbot)		
	Disease	No disease
Dot-ELISA	+	26
	-	3
		29
		3,553
DSn	= 89.7%	
DSp	= 99.9%	
Efficiency	= 99.8%	
Positive predictive Value	= 83.9%	
Negative predictive Value	= 99.9%	

2) Tuberculosis

		SID (abbot)	
		Routine diagnosis	
		Disease	No disease
Dot-ELISA	+	1	1
	-	4	3,576
		5	3,577
DSn	= 20.0%		
DSp	= 99.97%		
Efficiency	= 99.9%		
Positive predictive Value	= 50%		
Negative predictive Value	= 99.9%		

3) Paratuberculosis

		Routine diagnosis complement fixation test (abbot)	
		Disease	No disease
Dot-ELISA	+	1	2
	-	1	3,578
		2	3,580
DSn	= 50%		
DSp	= 99.9%		
Efficiency	= 99.9%		
Positive predictive Value	= 33.3%		
Negative predictive Value	= 99.97%		

9. การศึกษา cross reaction ในการตรวจ Tuberculosis และ Paratuberculosis โดยวิธี

Western Blotting

แอนติบอดีและแอนติเจนที่ใช้ทดสอบ

- Tuberculosis** - แอนติเจนที่ใช้เป็น Bovine PPD (purified protein derivative เตรียมจากเชื้อ *Mycobacterium bovis*) มีความเข้มข้น 1 mg/ml เป็น commercial antigen (Netherlands)
- Paratuberculosis** - แอนติเจนที่นำมาศึกษาเป็น lipopolysaccharide (LPS) โดยสกัดจากเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* strain P-18 เป็นแอนติเจนของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ชนิดดูดแห้ง เมื่อละลายแล้วจะมีความเข้มข้น 5 mg/ml.

สำหรับแอนติเจนทั้ง 2 ชนิด (Tuberculosis และ Paratuberculosis) นำมาใช้ในการศึกษา เพื่อดูแบบแผนของ LPS ว่ามีลักษณะเหมือนหรือต่างกันอย่างไร เมื่อนำมาศึกษาด้วยวิธี electrophoresis โดยขั้นแรกทำใน SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ดำเนินการตามวิธีของ Laemmli (1970) จากนั้นทำตามวิธีที่เรียกว่า Western Blotting โดยการถ่ายแบบ protein ลงในแผ่น membrane และดำเนินการต่อจนได้แถบ protein เห็นชัดในแผ่น membrane เมื่อดูด้วยตาเปล่า ซึ่งวิธีทั้งหมดมีรายละเอียดดังนี้

1. SDS-PAGE

1.1 การเตรียม gel

- gel ที่ใช้คือ 10% separating gel และ 5% stacking gel ใน minigel apparatus ของ Bio-rad

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

- Paratuberculosis antigen ใช้ antigen ที่ความเข้มข้น 30 µg/lane
- Tuberculosis antigen (PPD) ใช้ antigen ที่ความเข้มข้น 20 µg/lane

1.3 การหยอด sample ลงใน stacking gel ที่ทำเป็นช่องไว้ ใช้ micropipette tip ที่มีปลายเรียว เล็กยาวดูด sample ให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการ คือ Paratuberculosis antigen 10 µl/lane และ Bovine PPD 20 µl/lane โดย lane ที่อยู่ริมทั้ง 2 ข้างหยอด sample buffer และ lane ที่ถัดเข้ามาหยอด Molecular weight marker (MWM) ซึ่งเป็น prestained (Sigma product) ทั้ง sample buffer และ Molecular weight marker หยอด lane ละ 10 µl แล้วเติม running buffer (Tris.glycine + SDS-pH 8.3) ลงในถาดบรรจุเจลจนได้ระดับพอดีก่อนที่จะเริ่มขบวนการต่อไป

1.4 running condition

ครั้งแรกเมื่อเปิดเครื่องให้ปรับความต่างศักย์ไว้ที่ 50 volt เมื่อ sample วิ่งผ่าน stacking gel แล้วจึงเปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 100 volt และปล่อยให้จนกว่า sample จะวิ่งลงไปถึงสุดขอบของ gel จึงปิดเครื่อง

2. Western blotting and immunostains

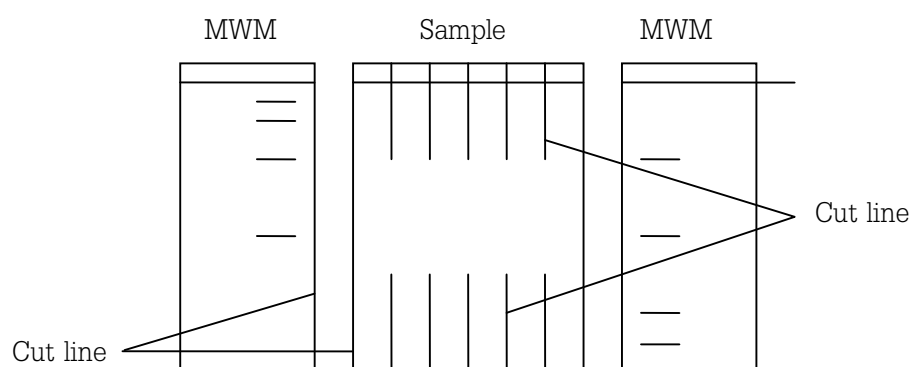
2.1 แยก gel ออกจากแผ่นแก้วที่ประกอบอยู่ โดยแช่แผ่น gel ลงใน transfer buffer (Tris-glycine pH 7.8)

2.2 ตัดแผ่นกระดาษกรอง 4 แผ่น ขนาดเท่ากับแผ่นกระจกแต่กว้างกว่า membrane 0.5 mm. และตัดกระดาษ immobilion P membrane (PVDF = Polyvinylidene difluoride) ให้มีขนาดใหญ่กว่า gel 0.5 cm. จำนวน 2 แผ่น

2.3 ประกอบแผ่น gel immobilion P, กระดาษกรอง และแผ่น fiber ในลักษณะซ้อนกันเป็นชั้นในชั้นของ plastic lock ซึ่งเมื่อนำไปใส่ลงในถาดที่มี transfer buffer แล้วด้านที่เป็น gel จะอยู่ในด้านที่เป็นขั้วลบของกระแสไฟฟ้าและอยู่เหนือแผ่น immobilion P membrane เพื่อ

ให้ประจุลบตันแถบ protein ที่อยู่ใน gel ลงสู่ membrane เป็นการถ่ายแถบโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

- 2.4 ปลอ่ยกระแสไฟฟ้าให้ผ่าน transfer buffer ที่เติมจนพอดีในกล่องซึ่งจะท่วมแผ่นพลาสติกที่ใส่ไว้ โดยใช้ constant current 100 mA. โดยปลอ่ยทิ้งค้างคืนไว้ในที่เย็น 4°C
- 2.5 หลังจากการ transfer หรือถ่ายแถบ protein ลงสู่ immobilon P membrane แล้ว ถอดส่วนประกอบออกเหลือแต่ membrane ให้นำไปย้อมสี Ponceau S นาน 2 นาที เพื่อดูแถบ protein บน membrane และทำเครื่องหมายของ MWM ไว้ รวมทั้งเครื่องหมายที่แบ่งแยกแต่ละ lane ของ sample ไว้ แล้วตัดแผ่น membrane ตามรูปข้างล่าง



แยก MWM ไว้ให้แห้ง ส่วนแผ่น membrane ที่มี sample อยู่นำไป block ใน 7% skim milk in PBS นาน 2 ชม. บนเครื่องเขย่า

- 2.6 ล้างแผ่น membrane 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บนเครื่องเขย่า ด้วย washing buffer (PBS+0.2% Tween 20)
- 2.7 ตัดแผ่น membrane ตามรอยที่ตัดไว้จากข้อ 2.5 ให้เป็น strip แล้วแยกแต่ละ strip ใส่ลงใน positive และ negative serum ที่เจือจางเป็น 1:20 ด้วย PBS และวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1.5 ชม.
- 2.8 ล้างแผ่น strip จากข้อ 2.7 ด้วย washing buffer 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 2.9 นำแผ่น strip ทั้งหมดจากข้อ 2.8 แช่ลงใน horseradish peroxidase conjugate rabbit anti cow immunoglobulin (Dako) ละลาย 1:1000 ด้วย washing buffer แช่ไว้ 1 ชม. บนเครื่องเขย่า
- 2.10 จากข้อ 2.9 ล้าง 3 ครั้งเหมือนเดิม
- 2.11 เตรียม substrate โดยใช้ 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ละลายใน 50 mM tri-HCl pH 7.6 และ 30% H_2O_2 แล้วนำ strip แต่ละอันจุ่มลงไป substrate รอจนแถบสีน้ำตาลปรากฏขึ้น จึงนำ strip นั้นแช่ลงใน PBS เมื่อทำเสร็จหมด แล้วจึงเท PBS ที่แช่ใน DW 2-3 นาที แล้วเปลี่ยน DW ใหม่แช่ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นก็ทำให้ strip แห้งในอุณหภูมิห้อง เมื่อ strip ทั้งหมดแล้วก็นำมาเรียงต่อกับ MWM ของแต่ละ membrane ตาม

ที่ได้ บันทึกไว้ก่อน ก็จะได้แถบของ protein ที่มี ปฏิกริยาเฉพาะระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดี ของโรคแต่ละโรค

ผลการศึกษา Cross reaction โดยวิธี Western Blotting

แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ เชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* และ Bovine PPD ของเชื้อ *M. bovis* เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากซีรัมที่พบว่า ให้ผลบวกต่อโรค Paratuberculosis และ Tuberculosis (ซีรัมของโคที่เป็นโรค Paratuberculosis 15 ตัวอย่าง เป็นโรค Tuberculosis 36 ตัวอย่าง โดยเป็นซีรัมที่ให้ผลบวก มีการยืนยันโดยการเพาะเชื้อและ/หรือพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา) พบว่า เมื่อใช้ Bovine-PPD แอนติเจน พบแถบ protein มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกันจำนวน 3 แถบ ที่ตำแหน่ง 55, 66 และ 70 kdal เป็นจำนวน 34 ตัวอย่างจากซีรัมบวกต่อ Tuberculosis 36 ตัวอย่าง และพบแถบ protein ในซีรัมบวกต่อ Paratuberculosis 5 ตัวอย่าง (Fig. 7, 8) แต่ถ้าใช้แอนติเจนที่เตรียมจาก *M. paratuberculosis* จะได้แถบ protein ตรงตำแหน่งที่ 38 kdal ชัดเจนจำนวน 10 ตัวอย่าง จากซีรัมบวกต่อ Paratuberculosis 15 ตัวอย่าง และพบแถบโปรตีนที่ 55 - 66 - 70 และ 38 kdal จำนวน 5 ตัวอย่าง (Fig.9, 10, 11) ส่วนซีรัมบวกต่อ Tuberculosis พบแถบโปรตีนที่ 38 kdal จำนวน 19 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่างและไม่พบแถบโปรตีนที่ 55, 66 และ 70 kdal จากการทดสอบแอนติเจนทั้งสองชนิดทำ Western blotting พบเกิด cross reaction ได้ในการตรวจทางซีรัมวิทยา

วิจารณ์

การชันสูตรโรคทางแบคทีเรียวิทยานั้นมีความจำเป็นต้องเพาะแยกเชื้อเพื่อหาสาเหตุของโรค ซึ่งเป็นวิธีที่แน่นอนและเป็น gold standard ของการวินิจฉัยและชันสูตรโรค แต่ในการเพาะแยกเชื้อเพื่อหาสาเหตุนั้นบางครั้งไม่สามารถจะเพาะเชื้อได้ทุกตัวอย่างจากสัตว์ที่เป็นโรคจริง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรค Brucellosis, Tuberculosis และ Paratuberculosis ซึ่งเป็นโรคเรื้อรัง มีลักษณะที่เป็น seroconvert และการเก็บตัวอย่างมาเพาะแยกเชื้อมีข้อจำกัดที่ทำให้ผลการเพาะเชื้อเพื่อยืนยันโรคนั้นดำเนินการได้ยากและล่าช้า ดังนั้นวิธีตรวจทางซีรัมวิทยาจึงได้มีการพัฒนามากยิ่งขึ้น เพื่อช่วยให้การคัดกรองและชันสูตรโรคสามารถดำเนินการได้รวดเร็วยิ่งขึ้น สำหรับการตรวจโรคนั้นบางครั้งมีความจำเป็นต้องตรวจหลายวิธีร่วมกันเพื่อให้ได้ผลถูกต้องและแม่นยำ วิธี dipstick colloidal dye immunoassay (DIA) ได้พัฒนาและนำมาใช้ในการทดสอบโรคมากยิ่งขึ้น เนื่องจากสะดวก ง่าย และไม่ต้องใช้เครื่องมืออุปกรณ์ราคาแพงในการทดสอบ

จากการศึกษาครั้งนี้ การตรวจโรค Brucellosis โดยวิธี DIA พบว่ามี DS_n 92.9% และ DS_p 97.7% และเมื่อได้ทดสอบจากตัวอย่างซีรัมจากท้องที่จำนวน 5369 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี routine diagnosis (RPT และ EDTA-TAT) เป็นเกณฑ์ในการตัดสิน พบว่า วิธี DIA มี DS_n 91.7% และ DS_p 99.5% ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นวิธี DIA จึงสามารถใช้เป็นวิธีเลือกได้อีกวิธีหนึ่ง และในปัจจุบันได้นำวิธี DIA มาใช้ตรวจโรคเรื้อรังเพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาสำหรับกำหนด/ระบุพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของโรค (Buhrer et al., 1998) และโรคเลปโตสไปรียใน ระยะแรกและเฉียบพลัน พบให้ผลดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่สัตว์มีตัวอย่างซีรัมครั้งเดียว (Gussenhoven et al., 1997) ส่วนการศึกษา DS_n และ DS_p ของโรค Tuberculosis และ Paratuberculosis นั้น พบว่าให้ผล

สอดคล้องกับผลบวกจริงน้อยมากและพบว่า มี DS_n ต่ำมาก ส่วนการทดสอบโรค Tuberculosis และ Paratuberculosis โดยวิธี DIA นั้นให้ผลไม่ดี จึงได้พัฒนาวิธี dot-ELISA มาใช้ศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทดสอบโรค Brucellosis, Tuberculosis และ Paratuberculosis ได้พร้อมกัน

การศึกษา dot-ELISA ทดสอบโรค Brucellosis ในโคพบว่า DS_n 96.5% และ DS_p 99.5% ซึ่งให้ผลดี และสอดคล้องกับการศึกษาของ Farid et al (1995) ที่มี DS_n 94.9% นอกจากนี้ยังพบว่า วิธี dot-ELISA ให้ผลดี เทียบเท่ากับวิธี complement fixation test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่ง และมีความไวกว่าวิธี standard tube agglutination และ rose bengal plate test (Chand et al., 1989, Nielsen et al., 1985 และ Gorturk et al., 1999) ปัจจุบันยังมีการพัฒนา dot-ELISA เพื่อทดสอบโรค Brucellosis ในคน และพบว่า มี DS_n และ DS_p ค่อนข้างสูง (Smits et al., 1999) และได้มีการแนะนำให้ใช้วิธี dot - ELISA ซึ่งเป็นวิธีง่ายในการตรวจ IgM แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรค Brucellosis ในระยะเฉียบพลัน (Marrodan et al., 2001) และจากผลการศึกษาโรค Brucellosis ครั้งนี้โดยทดสอบซีรัมจากพื้นที่จำนวน 3,582 ตัวอย่าง พบว่า มี DS_n 89.7% และ DS_p 99.9% และพบว่า การใช้วิธี DIA และ dot-ELISA ในการทดสอบซีรัมในพื้นที่ให้ผลใกล้เคียงกัน

สำหรับผลของการทดสอบโรค Tuberculosis โดยวิธี dot-ELISA พบว่า มี DS_n และ DS_p เป็น 25% และ 100% ตามลำดับ และในการทดสอบโรคในพื้นที่โดยวิธี dot-ELISA โดยใช้วิธี SID เป็นวิธีมาตรฐานเปรียบเทียบนั้น พบมี DS_n 20.0%, DS_p 99.97% และค่า positive predictive 50% จากการประเมินค่าโดยประมาณของ DS_n ในการชันสูตรโรคโดยวิธี SID ในท้องที่ภาคกลาง ระหว่างปี พ.ศ. 2543 - 2544 เป็น 66.7 - 77.8 % (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) แต่จากการศึกษาของ USDA, 1994 การทดสอบโดยวิธี SID ที่ caudal fold มี DS_n 82% และ DS_p 96% และจากการประเมินของ Monaghan et al (1994) วิธี SID ได้ค่า DS_n 68 - 95% ซึ่งค่า DS_n และ DS_p ในแต่ละพื้นที่นั้น อาจขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น สภาพพื้นที่ของแต่ละประเทศ ระยะเวลาในการทำ Tuberculin test การแปลผล ปฏิกริยาข้ามกับเชื้อไมโคแบคทีเรียหรือเชื้อแบคทีเรียอื่นๆในสิ่งแวดล้อม การดำเนินของโรคในฝูงสัตว์และความชำนาญของผู้ทดสอบ

การศึกษาโรค Paratuberculosis จากซีรัมควบคุมครั้งนี้ได้ค่า DS_n 87.5% และ DS_p 100% แต่พบว่า เมื่อทดสอบซีรัมจากพื้นที่โดยวิธี Dot-ELISA ได้ค่า DS_n 50.0% และ DS_p 99.90% ซึ่งค่า DS_n มีผลแตกต่างกันมาก เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้จำนวนสัตว์ที่เป็นโรคจริงนั้นมีจำนวนน้อยมาก ดังนั้นในการประเมินค่า DS_n และ DS_p จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป และในการศึกษาครั้งนี้ได้ผลใกล้เคียงกับรายงานของ Tsai et al (1989) ที่ได้ศึกษาวิธี ELISA และ dot-ELISA ในการชันสูตรโรค Paratuberculosis พบว่า มี DS_n 65% DS_p 86% และ DS_n 68% และ DS_p 84% ตามลำดับ

สำหรับโรค Tuberculosis และ Paratuberculosis จากการทดสอบโดยวิธี dot-ELISA นั้น พบว่าในบางตัวอย่างให้ผลบวกทั้ง 2 โรค เนื่องจากแอนติเจนมี cross antigenicity เช่นเดียวกับการศึกษาของ Olsen et al (2001) และพบว่าหากใช้แอนติเจนบริสุทธิ์ที่จำเพาะด้วยวิธี ELISA จะสามารถแยกโรค Tuberculosis ออกจากโรค Paratuberculosis ได้อย่างชัดเจน ส่วนผลการทดสอบเพื่อประเมินค่า DS_n และ DS_p ในพื้นที่นั้นได้ดำเนินการโดยเปรียบเทียบกับวิธีการชันสูตรพื้นฐานของห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการติดตามสัตว์ที่ให้ผลบวก เพื่อนำตัวอย่างมาเพาะแยกเชื้อหาสาเหตุของโรคนั้น ไม่สามารถจะดำเนินการได้อย่างต่อเนื่อง เพราะมีการเคลื่อนย้ายสัตว์และ

คัดออกจากฝูงทันที ดังนั้นการประเมินค่า DS_n และ DS_p จึงจำเป็นต้องใช้การเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในการชันสูตรโรค

ผลการศึกษา Western blotting ของ Tuberculosis-antigen พบแถบ protein ที่ชัดเจนที่ 55 - 66 - 70 kdal เช่นเดียวกับการศึกษาของ Cataldi et al (1994) พบว่าแถบ protein ที่ 66 kdal มี sensitivity 48% และ specificity 92% จากการศึกษาของ O' Loan et al (1994) พบว่ามี high sensitivity 9 / 10 ตัวอย่าง ที่แถบ protein 26 kdal ซึ่งควรจะได้มีการศึกษาแอนติเจน 26 kdal เพิ่มเติม เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค Tuberculosis สำหรับการตรวจ Paratuberculosis ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า มี cross reaction กับโรค Tuberculosis ที่แถบ protein 55 - 66 - 70 kdal และ 38 kdal แต่จะพบแถบ protein ที่ 38 kdal จะชัดเจนกว่าที่อื่น ดังนั้นควรจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติม หาแถบโปรตีนที่จำเพาะต่อโรค Paratuberculosis หรือจำเพาะต่อโรค Tuberculosis เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบที่เหมาะสมต่อไป

จากการศึกษาค้นคว้าได้พบว่า การใช้วิธี DIA สามารถตรวจได้เฉพาะโรค Brucellosis ส่วนวิธี dot - ELISA สามารถทดสอบโรคได้พร้อมกันทั้ง 3 โรค ซึ่งให้ความสะดวก รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตามผลการทดสอบครั้งนี้เป็นเพียงเชิงคุณภาพ มิใช่ตรวจเชิงปริมาณ การแปลผลจึงเป็นผลบวกและผลลบเท่านั้นเพื่อความสะดวกในการทดสอบในพื้นที่ ควรจะศึกษาความจำเพาะของแอนติเจนโดยการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทดสอบของวิธี Dot ELISA อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า sensitivity ในการตรวจทางซีรัมวิทยาจะไม่สูงนัก เพราะโรคติดเชื้อไม่โคแบคทีเรียจะมีการตอบสนองแบบชนิด cellular immune response มากกว่า humoral immune response จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาแอนติเจนของโรค Tuberculosis และ Paratuberculosis ให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้นต่อไป เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทดสอบโรคในพื้นที่

ตารางและรูปภาพ

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจ บรูเซลโลซิส ทุเบอร์คูโลซิส และพาราทุเบอร์คูโลซิส ด้วยวิธี DIA ในสัตว์มีโคนม

จังหวัด	จำนวน (ตัวอย่าง)	ผลบวก		
		บรูเซลโลซิส	ทุเบอร์คูโลซิส	พาราทุเบอร์คูโลซิส
ลพบุรี	300	0	0	0
สุพรรณบุรี	158	6	0	0
สระบุรี	159	0	0	0
ราชบุรี	2,190	7	0	0
กาญจนบุรี	2,256	55	0	0
นครราชสีมา	306	1	0	0
รวมทั้งหมด	5,369	69	0	0

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจ บรูเซลโลซิส ทุเบอร์คูโลซิส และพาราทุเบอร์คูโลซิส ด้วยวิธี Dot-ELISA

จังหวัด	จำนวน (ตัวอย่าง)	ผลบวก		
		บรูเซลโลซิส	ทุเบอร์คูโลซิส	พาราทุเบอร์คูโลซิส
ลพบุรี	39	0	0	0
สุพรรณบุรี	802	26	0	0
กาญจนบุรี	613	0	0	0
ราชบุรี	1,576	0	2	3
สระบุรี	104	0	0	0
เพชรบุรี	191	1	0	0
อ่างทอง	38	4	0	0
นครราชสีมา	219	0	0	0
รวมทั้งหมด	3,582	31	2	3

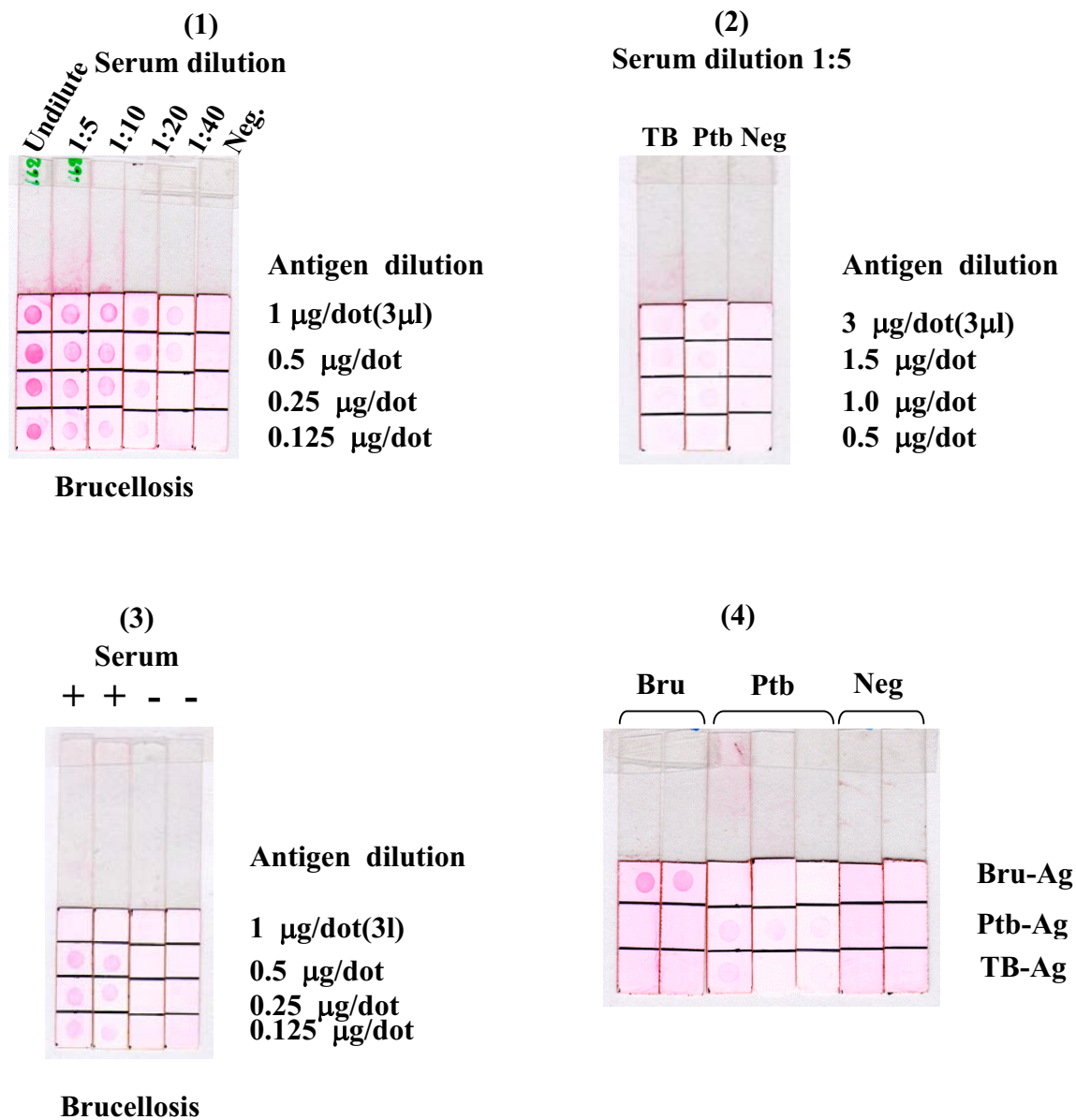


Fig. 1 Titration of Bru, Ptb and TB antigen in DIA system (1,2,3) and DIA test (4)

Ag = Antigen

Neg = Negative

Pos = Positive

Bru = Brucellosis

TB = Tuberculosis

Ptb = Paratuberculosis