ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เรื่อง มาตรฐานการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujesky's disease)

พ.ศ. ๒๕๔๕

โดยที่เป็นการสมควรกำหนดมาตรฐานการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease) ของประเทศไทย เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัย การชันสูตรโรค และการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวกทางการค้าและการคุ้มครองผู้บริโภค รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease) ของประเทศไทยไว้ ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ ๒๕ เมษายน พ.ศ. ๒๕๔๕

ชูชีพ หาญสวัสดิ์

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

มาตรฐานการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease)

1. บทนำ

Pseudorabies หรือ Aujeszky's disease (AD) เป็นโรคระบาดติดเชื้อของสุกร ซึ่งสุกรจะป่วยด้วยอาการของสมองและไขสันหลังอักเสบ และมีอาการอักเสบของระบบทางเดินหายใจและปอดร่วมด้วย สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Pseudorabies ซึ่งอยู่ใน sub-family alpha-herpesvirinae ทั้งไวรัส AD และไฟไวรัส herpes simplex (HSV) ในมนุษย์มีบางส่วนที่คล้ายคลึงกันมาก เช่น การเรียงตัวกันของสารพันธุกรรม การทำให้เกิดการติดเชื้อที่ระบบประสาทและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และทำให้เกิดการติดเชื้อแบบแฝงเป็นเวลานาน จนในปี 1970 อุบัติการณ์ของโรค AD ในสุกรลดลงและไม่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากนัก แต่ในช่วง 20 ปี ที่ผ่านมาความรุนแรงและความชุกของโรค AD เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด ซึ่งอาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในเรื่องระบบการจัดการ หรืออาจเนื่องจากมีไวรัส AD สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงกว่าเดิม เชื้อ AD สามารถคงอยู่ในฝูงสุกรได้ โดยมีการเปลี่ยนแปลงระหว่าง latency และ reactivation ทำให้มีการแพร่ของเชื้อไวรัส และทำให้เกิดการติดเชื้อในสุกรที่ไวต่อการเกิดโรค อาการป่วยที่พบในลูกสุกรแรกคลอด คือความผิดปกติทางระบบประสาท พบอัตราการตายสูง ในสุกรหลังหย่านม สุกรขุนจะแคระแกร็น และป่วยด้วยอาการทางระบบหายใจ ในสุกรพ่อแม่พันธุ์ทำให้เกิดความล้มเหลวทางด้านระบบสืบพันธุ์ โรค AD ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก จึงมีการทำวัคซีนกันอย่างแพร่หลายเพื่อควบคุมการระบาดและลดความรุนแรงของโรค การทำวัคซีนทำให้สุกรมีความทนทานต่อการติดเชื้อมากขึ้น และลดการเกิดการติดเชื้อแบบแฝง (latency) การให้วัคซีนที่มี marker ทำให้สามารถแยกสุกรที่มีการติดเชื้อออกจากสุกรที่ทำวัคซีนได้ โดยการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของไวรัสนั้น ซึ่งยีนส์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนส่วนนี้ถูกตัดออกไปจากเชื้อไวรัสที่ใช้ทำวัคซีน

2. พยาธิกำเนิด

พยาธิกำเนิดของการเกิดโรค AD จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับ ปริมาณของเชื้อ ชนิดของเชื้อ อายุของสุกรในช่วงที่มีการติดเชื้อ สุขภาพของสัตว์ สุกรที่มีอายุมากขึ้นอาจไม่แสดงอาการป่วย ไวรัสเพิ่มจำนวนครั้งแรกในเยื่อเมือกของช่องจมูกและคอหอย เนื้อเยื่อทอนซิล ช่องทางเดินหายใจช่วงต้น ทางเดินหายใจตอนล่างและระบบประสาท การติดเชื้อแพร่จากตำแหน่งตั้งต้นที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไปสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง เชื้อ AD เพิ่มจำนวนในปอด โดยผ่านทางระบบน้ำเหลือง

3. การเก็บตัวอย่าง

3.1 ตัวอย่างสำหรับการแยกเชื้อไวรัส

สุกรมีชีวิต : น้ำในช่องทางเดินหายใจ ลูกสุกรแท้ง

ซากสุกร : สมอง ทอนซิล และปอด

สุกรที่มีการติดเชื้อแอบแฝง : trigeminal ganglion

การเก็บตัวอย่างควรเก็บโดยวิธีปลอดเชื้อในภาชนะที่สะอาดและแช่เย็น

3.2 ตัวอย่างตรวจทางซีรัมวิทยา

เก็บตัวอย่างโดยวิธีปลอดเชื้อ เจาะเลือด และแยกซีรัม นำซีรัมแช่เย็นส่งห้องปฏิบัติการ

4. การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการไวรัส

4.1 การตรวจหาเชื้อไวรัส

4.1.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัส

1. บดอวัยวะสัตว์ป่วย โดยทำให้เข้มข้น 10-20% ด้วย phosphate buffer saline (PBS)

2. ปั่น 8,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที แล้วเก็บส่วนใส ไว้แยกเชื้อไวรัส

3. นำส่วนใสที่ได้ หลังการปั่นมาเติมในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเชื้อ ADV สามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้หลายชนิด แต่โดยทั่ว ๆ ไป มักใช้เซลล์ไตสุกร เช่น PK-15 และนำไปบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง

4. ล้างเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย PBS 2 ครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 2% ซีรัมวัว และบ่มที่ 37°C

5. เชื้อ ADV ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (CPE) ภายใน 24-72 ชั่วโมง และยืนยันผลการตรวจโดยวิธี fluorescent antibody technique immunoperoxidase หรือ nuetralization โดยใช้ซีรัมที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ ADV ในกรณีผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง 1 ครั้ง แล้วไม่พบ CPE ควรทำซ้ำ ส่วนห้องปฏิบัติการที่ไม่พร้อมสำหรับงานเซลล์เพาะเลี้ยง อาจจะใช้วิธีฉีดตัวอย่างอวัยวะเข้ากล้ามเนื้อของกระต่าย เชื้อ ADV มีผลทำให้บริเวณที่ฉีดมีอาการคัน และกระต่ายจะตายหลังฉีดเชื้อ 2-5 วัน

4.1.2 การตรวจด้วยวิธี fluorescent antibody technique

1. ตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณที่มีวิการจากอวัยวะเป้าหมายเช่น สมอง ทอนซิล และปอด ให้มีขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ยึดติดกับแป้นยึดเนื้อเยื่อใน cryostat ที่เตรียมให้มีอุณหภูมิ -20°C โดย embedding medium

2. ตัดชิ้นเนื้อให้บางประมาณ 4 ไมครอน แล้วติดแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้บนสไลด์ที่เตรียมไว้ ให้แผ่นเนื้อเยื่อ ตึงเรียบ ไม่ซ้อนกัน ทิ้งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

3. ยึดตัวอย่างให้ติดกับสไลด์ (fixation) โดยแช่ใน acetone นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. หยด specific antibody conjugate ให้ท่วมบริเวณชิ้นเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ และวางในmoisture chamber

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

6. ล้างสไลด์ด้วย PBS 2 ครั้ง และน้ำกลั่น 1 ครั้ง

7. อ่านผลการตรวจด้วย fluorescent microscope กรณีให้ผลบวกจะเห็นการเรืองแสงสีเขียวแอปเปิ้ล กระจายในส่วน cytoplasm และ neucleus เช่นเดียวกับ positive control ส่วนเนื้อเยื่อตัวอย่างควบคุมจะไม่พบการเรืองแสง

4.1.3 Polymerase chain reaction (PCR) technique

สามารถใช้วิธี PCR ในการวินิจฉัยเชื้อ ADV ในตัวอย่างจากสารคัดหลั่งหรือจากตัวอย่างอวัยวะ ประโยชน์ของวิธีนี้คือ ให้ผลรวดเร็ว แต่ควรระวังการปนเปื้อนจากการทำ PCR ครั้งก่อนๆ ซึ่งทำให้เป็นข้อจำกัดในใช้วิธี PCR สำหรับงานวินิจฉัยโรค โดยทั่วไปมักใช้วิธีนี้สำหรับการตรวจโรค AD ชนิดแอบแฝง

4.2 การตรวจทางซีรัมวิทยา

4.2.1 Virus neutralization (VN)

เป็นวิธีอ้างอิงที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถจะเลือกใช้วิธีการบ่ม ส่วนผสมของไวรัสและซีรัม 1 ชั่วโมง ที่ 37°C หรือ 24 ชั่วโมง ที่ 4°C และเติมหรือไม่เติม complement ก็ได้ซึ่ง complement ในตัวอย่างซีรัม จะถูกทำลายโดยความร้อนที่ 56°C นาน 30 นาที แต่ส่วนใหญ่นิยมการบ่มส่วนผสมของไวรัสและซีรัม 1 ชั่วโมง ที่ 37°C โดยไม่เติม complement เนื่องจากเป็นการง่ายและรวดเร็ว แต่วิธีบ่มที่ 24 ชั่วโมงที่ 4°C จะให้ความไวมากกว่า 10-15 เท่า

วิธี VN ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไตสุกร PK-15 หรือ SK-6 โดยใช้ Eagle ·s minimum essential medium (MEM) ซึ่งมี 5% fetal bovine serum และ antibiotics (100 IU/ml penicillin และ 10 mg/ml streptomycin) เชื้อไวรัสใช้ Shope strain วิธี VN สามารถทำได้ 2 แบบ คือ qualitative และ quantitative technique ซึ่ง quantitative technique เป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. เติม 50 ไมโครลิตร ของ MEM หลุม A3 – A6 ใน tissue culture plate ชนิด 96 หลุม
2. เติมตัวอย่างซีรัมในหลุม A1 – A3 และทำเช่นเดียวกัน ในแถว B และ C สำหรับตัวอย่างซีรัมอื่น ๆ
3. Mix แถวที่ 3 โดยใช้ multichannel pipette และดูด 50 ไมโครลิตร ใส่ในแถวที่ 4 จนถึงแถวที่ 6 โดยไม่ต้องเปลี่ยน tip และดูดทิ้ง 50 ไมโครลิตร สำหรับแถวที่ 6
4. เติม 50 ไมโครลิตร ของเชื้อ ADV ในทุกหลุม ยกเว้นแถวที่ 1 ซึ่งจะเป็น control สำหรับซีรัม
5. การอ่านผล : neutralization titer คือ dilution สูงสุดของซีรัม ซึ่งเกิดการ neutralize ระหว่างซีรัมและไวรัส โดยไม่พบ CPE

4.2.2 Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

ใช้ ELISA kits ซึ่งอาจจะเป็นวิธี direct หรือ competitive ขึ้นอยู่กับบริษัทที่ผลิตจากต่างประเทศ ประโยชน์ของการใช้ ELISA ทำให้สามารถตรวจตัวอย่างได้ เป็นจำนวนมากในแต่ละครั้ง และสามารถแยกแอนติบอดีที่ตรวจพบว่าเป็นแอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อหรือจากการทำวัคซีน

ELISA จะมีความไวมากกว่า วิธี VN ที่ ใช้เวลา neutralize 1 ชั่วโมง ที่ไม่มี complement ซีรัมที่ให้ผล weak positive ด้วยวิธี VN ที่ neutralize 1 ชั่วโมง สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี VN ที่ neutralize 24 ชั่วโมง หรือวิธี ELISA

5. การเตรียม ADV conjugate

5.1 การเตรียม hyperimmune serum

1. สัตว์ทดลอง – ลูกสุกรขุน อายุ 3-4 สัปดาห์
2. แอนติเจน
   - 2.1 เติมเชื้อ ADV ในเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15
   - 2.2 เก็บไวรัสเมื่อพบ CPE 80-90%
   - 2.3 แช่แข็งและละลายไวรัส 2-3 ครั้ง

2.4 ปั่น 10,000 rpm 20 นาที

2.5 เก็บส่วนใส ที่ -70°C และใช้เป็นสารสร้างภูมิคุ้มกัน

3. การเตรียมแอนติบอดี

3.1 เจาะเลือดและฉีดวัคซีนเชื้อเป็นเข้ากล้ามลูกสุกร เก็บเลือดและตรวจหาระดับภูมิคุ้มกัน

3.2 หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ หยอดจมูกลูกสุกรด้วยเชื้อ ADV 5 ml

3.3 เก็บเลือด 3 สัปดาห์ ต่อมา

3.4 ตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ ADV โดยวิธี VN (quantitative technique)

5.2 การตกตะกอน

มีหลายวิธีในการตกตะกอนแอนติบอดี การใช้ ammonium sulfate ในการตกตะกอน เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันแพร่หลาย ในการแยกโปรตีนออกจากสารละลาย โปรตีนในสารละลายจะฟอร์ม hydrogen bond กับน้ำ โดยการจับของขั้วเปิดกับ ionic groups เมื่อมีการเติมสารที่มีขั้วประจุสูงที่ความเข้มข้นมากๆ เช่น ammonium sulfate ประจุเหล่านี้จะแข่งกับโปรตีนในการรวมตัวกับน้ำ ซึ่งจะทำให้มีการย้ายโมเลกุลของน้ำออกจากโปรตีนและความสามารถในการละลายน้ำลดลงทำให้เกิดการตกตะกอน ความเข้มข้นที่แอนติบอดีจะตกตะกอนจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติบอดี แต่ที่ความอิ่มตัว 50% จะเป็นระดับที่พอเหมาะสำหรับการตกตะกอนแอนติบอดีชนิดต่างๆ

วิธีการ

1. วัดปริมาณของซีรัม นำไปปั่นที่ 3000 ×g นาน 30 นาที

2. นำส่วนใสไปใส่ในบีคเกอร์ใส่แท่งแม่เหล็กและนำไปวางบน magnetic stirrer

3. ค่อยๆ เติม สารละลาย ammonium sulfate อิ่มตัว ในปริมาณที่เท่ากับซีรัม เพื่อให้เป็นสารละลายเข้มข้น 50% กวนที่ 4°C 1 คืน

4. ปั่นที่ 3000 ×g 30 นาที

5. ส่วนใสเททิ้ง และละลายตะกอนด้วย PBS ในปริมาณตั้งต้นที่ 0.3-0.5 เท่า

6. นำ antibody solution ใส่ใน dialysis bag และ dialize ด้วย PBS 3 ครั้ง ที่ 4°C 1 คืน

7. นำ antibody solution ออกจาก dialysis bag นำไปปั่นหรือขจัดตะกอนที่เหลืออยู่

8. วัดความเข้มข้นของ protein ของ antibody solution

5.3 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC)

1. เตรียมแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำเกลือ 0.85%

2. ละลาย FITC ใน carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

3. เติม 50 ไมโครลิตร ของ FITC solution ต่อ 1 มิลลิลิตร ของ antibody solution กวนตลอดเวลาในระหว่างที่เติมสี

4. ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

ชุดที่ 16

1

5. แยกสีที่ไม่ทำปฏิกิริยาจาก conjugate โดยใช้ gel filtration (Sephadex G25 และ DEAE-25)

6. เก็บ conjugate ที่ 4°C ไม่ให้โดนแสง อาจเติม sodium azide ที่ความเข้มข้น 0.02% เป็น preservative

7. เช็ค working dilution ของ conjugate ที่เตรียมในแต่ละครั้ง โดยการทำ dilution ของ conjugate และย้อมกับตัวอย่างที่ให้ผลบวก และตัวอย่างควบคุม

6. ภาคผนวก

6.1 การเตรียมสารละลาย

Stock 10 x PBS

NaCl	80.0	g
KCl	2.0	g
$NaHPO_4$	11.5	g
KH_2PO_4	2.0	g

Add Distilled water (D.W.) to 1000 ml, adjust to pH 7.2

Autoclave, keep at 4°C.

PBS ×1

Stock 10× PBS	100	ml
Add D.W. to	1000	ml

Autoclave, keep at room temperature

0.5 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5)

0.5 M Na_2CO_3 solution	1	volume
0.5 M $NaHCO_3$ solution	3	volumes

(Mixed)

6.2 แผนผังการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าเทียม