คู่มือปฏิบัติงาน
(Work Instruction)

เรื่อง

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคโลหิตจางติดต่อในม้า (Equine Infectious Anemia) ด้วยวิธี Agar Gel immunodiffusion (AGID)

☐ จัดทำขึ้นใหม่ ☒ ปรับปรุง

พ.ศ. ๒๕๖๖

	กรมการสัตว์ทหารบก	รหัสเอกสาร -		
	สำนัก / กอง : กวก.กส.ทบ.	ประกาศใช้วันที่ -		
วิธีการปฏิบัติงาน (Work Instruction)		ฉบับที่	ปรับปรุงครั้งที่	หน้า
เรื่อง การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคโลหิตจางติดต่อในม้า (Equine Infectious Anemia) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID)		-	-	
ผู้อนุมัติ / ผู้บริหารสูงสุดด้านการจัดการความรู้ (CKO) : พล.ต. (รณรงค์ โรจนเสน) จก.กส.ทบ.				

1.วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อให้ กวก.กส.ทบ. มีคู่มือปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคโลหิตจางติดต่อในม้า (Equine Infectious Anemia) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID)

1.2 เพื่อใช้เป็นหลักฐานวิธีการทำงาน ที่สามารถถ่ายทอดให้ผู้ที่เข้ามาปฏิบัติงานใหม่และใช้ประกอบผลการพิจารณาการสร้างผลงานใหม่ พัฒนาการทำงานให้ง่าย และเป็นระบบมากยิ่งขึ้น

2. ขอบเขต

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคโลหิตจางติดต่อในม้า (Equine Infectious Anemia) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) จากตัวอย่างซีรัมม้า, ลา หรือล่อ

3. คำจำกัดความ

โรค Equine Infectious Anemia (EIA) หรือโรคโลหิตจางติดต่อในม้า เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งอยู่ใน family Retroviridae Genus Lentivirus ส่งผลกระทบต่อสุขภาพม้า โดยม้าจะมีอาการไข้ขึ้นๆ ลงๆ (intermittent fever) โลหิตจาง เกล็ดเลือดต่ำ น้ำหนักตัวลด บวมน้ำ และตายในที่สุด เชื้อไวรัสจะเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวตลอดช่วงชีวิตของม้า มีระยะฟักตัว 1-3 สัปดาห์ หรืออาจนานถึง 3 เดือน ในรายที่มีอาการเฉียบพลันอาจพบการขยายใหญ่ของอวัยวะ ได้แก่ ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และตับ

Equine Infectious Anemia (EIA) สามารถตรวจวินิจฉัยทางอาการ รอยโรคทางพยาธิสภาพ และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจทางซีรัมวิทยาและการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ม้าที่มีการติดเชื้อจะอยู่ในภาวะที่ไวรัสมีอยู่ในกระแสเลือดตลอดชีวิต และจะสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ โดยสัตว์ที่ตรวจพบแอนติบอดีในสัตว์ที่มีอายุมากกว่า 6-8 เดือน จะเป็นสัตว์พาหะ (virus carrier)

4. ระเบียบ/คำสั่ง/เอกสารอ้างอิง

4.1.1 World Organisation for Animal Health (OIE). 2013 Chapter 2.5.6. Equine infectious anemia. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals; OIE Paris, France, 2018; pp.1-6. OIE, Paris. Available at: www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/ (access on 13 August 2018)

4.1.2 Coggins, L., Norcross, N.L. and Nusbaum, S.R., 1972. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *American journal of veterinary research, 33(1),* pp.11.

4.1.3 Issel, C.J. and Cook, R.F., 1993. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 5(1),* pp.137-141.

5. วิธีการ/ขั้นตอนการปฏิบัติ

5.1 การเตรียมเจล 1% Nobel Agar in borate buffer

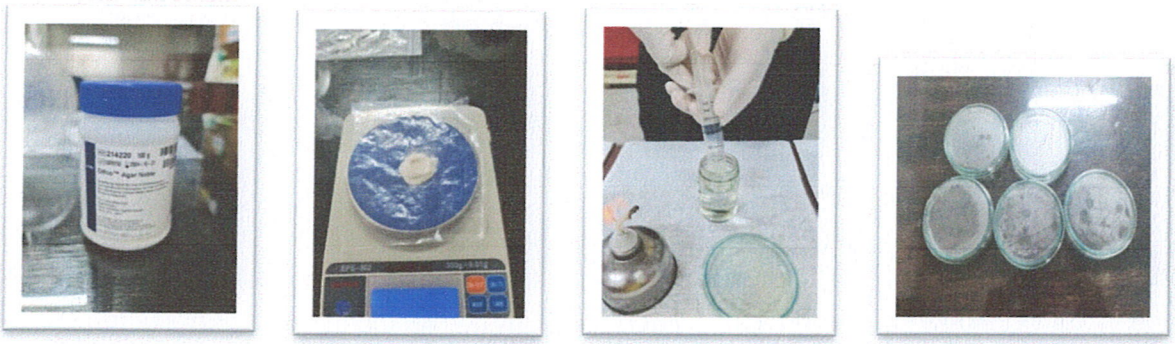
5.1.1 เตรียม borate buffer โดยใช้ NaoH 2 กรัม และ H_3BO_3 ผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร

5.1.2 ชั่ง Nobel Agar 1 กรัม เทใน Flask ขนาด 100 มล. จากนั้นเท borate buffer ที่เตรียมไว้ผสมกับ Noble Agar (จะได้ 1% Nobel Agar in borate buffer)

5.1.3 นำสารละลายเจล 1% Nobel Agar in borate buffer ไปอุ่นบน Hot plate Stirrer โดยใส่ magnetic stirrer ตั้งอุ่นประมาณ 7 นาที หรือจนสารละลายใส หรือนำสารละลายเจล 1% Nobel Agar in borate buffer ไปอุ่นในไมโครเวฟ ให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5.1.4 ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ให้สารละลายเจลคลายความร้อน

5.1.5 เทสารละลายเจลบนจานเพาะเลี้ยง petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100mm ปริมาตร 15-17 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนแผ่นเจลเซ็ตตัวเย็น จากนั้นนำเข้าตู้เย็น 2-8 °C (เก็บไว้ใช้งานไม่เกิน 2 สัปดาห์) 5.1.6 ใช้ AGID cutter เจาะแผ่นเจล แล้วใช้ปลายเข็มสะกิดเจลที่เจาะไว้ให้หลุดออกจากหลุม

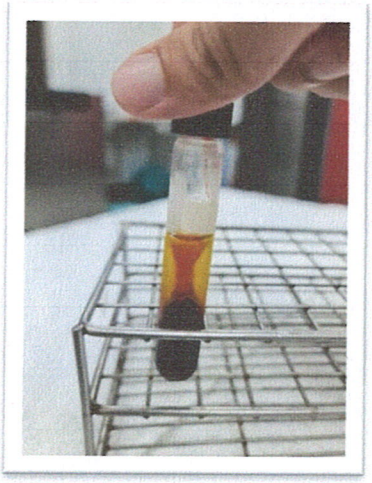


รูปที่ 1 การเตรียมเจล 1% Nobel Agar in borate buffer

5.2 การเตรียมตัวอย่างซีรัมม้า

5.2.1 รับตัวอย่างเป็นเลือด (Whole blood) จาก รพ.สัตว์ ทบ. กรณีที่ซีรัมยังไม่แยกจากก้อนเลือด ให้เก็บที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ซีรัมแยกตัวก่อน

5.2.2 ถ้าซีรัมแยกออกจากตัวเลือดที่แข็งตัว ระวังอย่าให้มีเม็ดเลือดปน หากมีเม็ดเลือดปนให้ใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) ปั่นที่ 1000 *g* นาน 10 นาที แยกเก็บซีรัมใส่หลอดทดลองใหม่



เซรั่มที่แยกจากตัวเลือด

เซรั่มที่ยังไม่ออกจากตัวเลือด

ทำการปั่นแยกเซรั่มเลือดที่ยังไม่ออกตัวจากเลือดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง

รูปที่ 2 การเตรียมตัวอย่างซีรัมม้า

5.3 การทดสอบ

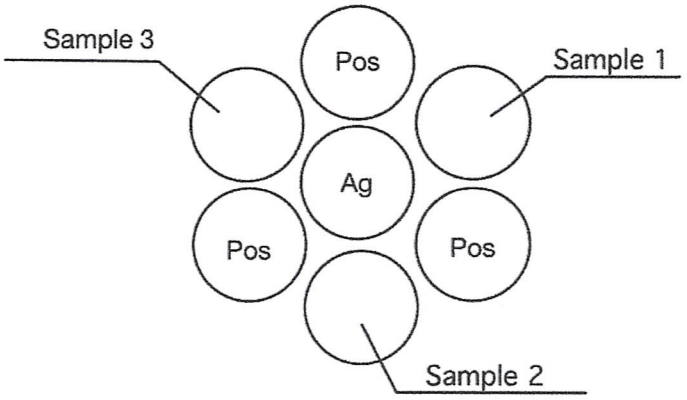
เป็นการตรวจหา antibody ใน test serum มีขั้นตอนดังนี้

5.3.1 นำชุดทดสอบ (Equine Infectious Anemia Antibody Test Kit) มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที พร้อมทั้งเช็คตัวอย่างซีรัม สี ปริมาตร การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง วันที่รับตัวอย่าง พร้อมทั้งจัดเรียงซีรัมตามลำดับการตรวจทดสอบ และเขียนแบบฟอร์มการบันทึกการตรวจแอนติบอดีโรค EIA

5.3.2 ดูดตัวอย่าง unknown serum จำนวนตัวอย่างละ 50 µL เติมลงไปในรูเจลที่เจาะแล้ว โดยใช้ Micropipette และเปลี่ยน Micropipette tip ใหม่ทุกครั้ง (ควรเติมสารให้อยู่ในระดับเดียวกัน และอย่าให้ serum ล้นออกมานอกรูเจล)

5.3.3 เติม EIA AGID Positive Control Antiserum จำนวน 50 µL ลงในรูเจลด้านนอกทั้ง 3 รูที่เหลือ

5.3.4 เติม EIA P26 AGID Antigen ลงไปตรงรูกลาง จำนวน 50 µL (ดังรูปที่ 3)



รูปที่ 3 Pos = EIA AGID Positive Control Antiserum

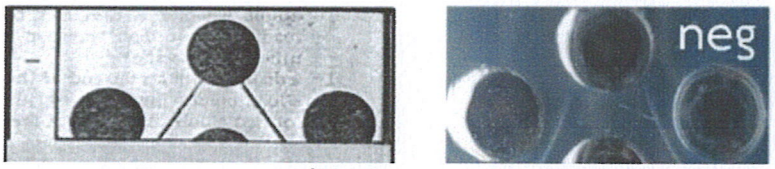
Ag = EIA P26 AGID Antigen

5.3.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27±5 °C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในภาชนะที่มีความชื้นพอเหมาะ และปิดฝาให้สนิท เพื่อป้องกันการระเหยของสาร และสามารถเห็นเส้นของปฏิกิริยาเกิดขึ้น เมื่อบ่มนานกว่า 48 ชั่วโมง

5.4 การอ่านผล การคำนวณผล การแปรผล การรายงานผล

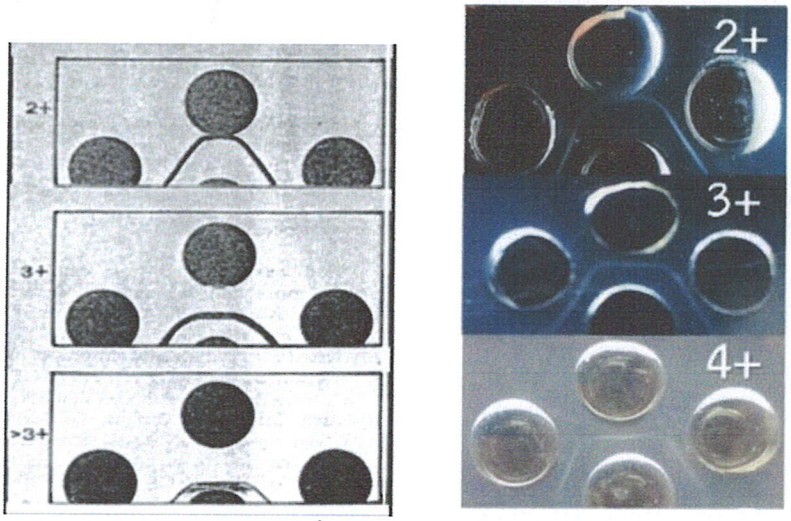
5.4.1 การอ่านผล หลังจากขั้นตอนการทดสอบเสร็จสิ้น เปิดฝา AGID Agar plates ออก แล้วอ่านผลโดยนำเจลไปส่องบนเครื่อง Light source box ที่มีฉากหลังมืดและความเข้มแสงที่พอเหมาะ สังเกตลักษณะเส้น Precipitin line ที่เกิดบนเจล

- **Negative reaction** (ผลเป็นลบ) เส้นควบคุมบวกวิ่งต่อไปยังหลุมตัวอย่างทดสอบซีรัม โดยไม่โค้งงอ หรืองอออกจากหลุมแอนติเจนเล็กน้อย ไปสู่หลุมควบคุมบวก (รูปที่ 4)



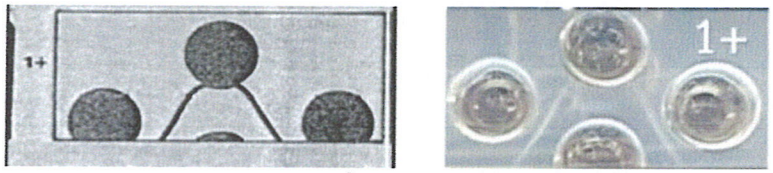
รูปที่ 4 Negative reaction (ผลเป็นลบ)

- **Positive reaction** (ผลเป็นบวก) เส้นควบคุมบวกเชื่อมกับเส้นที่อยู่ระหว่างหลุมตัวอย่างซีรัมและหลุมแอนติเจนอย่างต่อเนื่อง (line of identity) ตำแหน่งของเส้นขึ้นอยู่กับปริมาณของแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมต่อแอนติเจนของเชื้อไวรัสโลหิตจางติดเชื้อในม้า (รูปที่ 5)



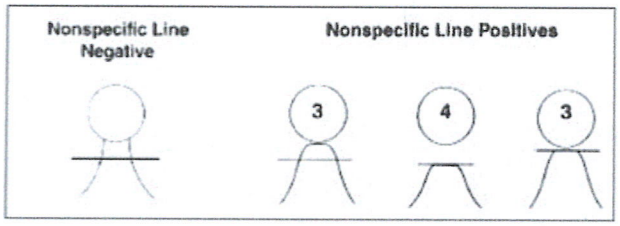
รูปที่ 5 Positive reaction (ผลเป็นบวก)

- **Weak positive reaction** อาจเกิดเส้นที่ไม่สมบูรณ์ ระหว่างหลุมตัวอย่างซีรัมและหลุมแอนติเจน แต่ปลายของเส้นควบคุมบวกจะงอเข้าหาหลุมตัวอย่างซีรัม (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 Weak positive reaction

- **Non-specific lines** เส้นนี้สามารถเกิดขึ้นที่ตำแหน่งระหว่างหลุมแอนติเจนกับตัวอย่างซีรัม โดยเส้นดังกล่าวจะวิ่งไม่ต่อเนื่องกับเส้นควบคุมบวก การทดสอบจะใช้ได้ก็ต่อเมื่อเส้นควบคุมจะต้องชัดเจนและสามารถแยกออกจากเส้น non-specific lines กรณีที่ไม่สามารถแยกเส้นควบคุมและ Non-specific lines ได้ให้ทำการทดสอบซ้ำ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 Non-specific lines

- **Haze around the well (Halo)** เกิดจากไขมันหรือเม็ดเลือดแดงแตกในซีรัมจะเกิดรอบๆ หลุมตัวอย่างซีรัม และอาจบดบังเส้น ทำให้ไม่สามารถอ่านผลได้ ให้ทำการขอตัวอย่างซีรัมมาทดสอบใหม่

5.4.2 การบันทึกผลการทดสอบ

- บันทึกผลเป็นเครื่องหมาย + หมายถึง Positive reaction หรือ ปฏิกิริยาบวก ผลบวก สามารถแบ่งเป็น 5 ระดับ ดังนี้

(1) "1+" หมายถึง Weak positive

(2) "2+" หมายถึง Positive

(3) "3+" หมายถึง Positive

(4) "4+" หมายถึง Strong positive

(5) "5+" หมายถึง Very strong positive

- บันทึกผลเป็นเครื่องหมาย - หมายถึง Negative reaction หรือ ปฏิกิริยาลบ
- บันทึกผลเป็นตัวอักษร I หมายถึง Inconclusive result หรือ ยังสรุปไม่ได้
- บันทึกผลเป็นตัวอักษร NSL หมายถึง Non-specific lines หรือ เส้นที่ไม่จำเพาะ

5.4.3 การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลการทดสอบเป็นบวก ตัวอย่างให้ปฏิกิริยาบวก หรือ Positive reaction

รายงานผลการทดสอบเป็นลบ ตัวอย่างให้ปฏิกิริยาลบ หรือ Negative reaction

5.4.4 รายงานผลให้ทาง รพ.สัตว์ ทบ. ทราบ เพื่อดำเนินการต่อไป

6. การควบคุมคุณภาพการทดสอบ

การเตรียม EIA AGID Positive Control Antiserum จะต้องทำพร้อมกับการทำการตรวจโดยวิธี AGID ทุกครั้ง หากซีรัมควบคุมบวกเกิดปฏิกิริยาไม่ชัดเจนถือว่าการทดสอบไม่สามารถใช้ได้ จำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ

7. การจัดการตัวอย่างหลังการทดสอบและความปลอดภัย

7.1 ตัวอย่างซีรัมที่อยู่ระหว่างการทดสอบหรือรอผลการตรวจ ให้เก็บในบริเวณที่เก็บตัวอย่างซีรัมทดสอบ ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลา 7 วัน

7.2 จานเพาะเชื้อ petri dish และ tip ที่ใช้แล้ว ให้แช่ในน้ำยาฆ่าเชื้ออย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำออกจากห้องปฏิบัติการ

7.3 ทำความสะอาดโต๊ะก่อนและหลังการทดสอบด้วย 70% แอลกอฮอล์

7.4 ผู้ปฏิบัติงานสวมเสื้อกาวน์และถุงมือขณะปฏิบัติงาน

7.5 ผู้ปฏิบัติงานล้างมือให้สะอาดทั้งก่อนและหลังการทดสอบ

8. ปัญหาอุปสรรคที่พบและแนวทางวิธีแก้ไข

ปัญหาและอุปสรรคที่พบ	แนวทางวิธีแก้ไข
ผลการทดสอบไม่ชัดเจน	1. ทำการทดสอบซ้ำ 2. ประสานทาง รพ.สัตว์ ทบ. ให้ส่งเลือดสัตว์มาตรวจใหม่อีกครั้ง

9. หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

- รพ.สัตว์ ทบ. โทร.ทบ. 50551

10. ผู้จัดทำ

- พ.ท.หญิง ปวีณ์ธิดา โตจินดา ประจำ ผวพ.กวก.กส.ทบ. โทร.ทบ. 50535

11. ผู้ประสานงานการจัดการความรู้

- พ.ท.หญิง ปวีณ์ธิดา โตจินดา ประจำ ผวพ.กวก.กส.ทบ. โทร.ทบ. 50535

12. ผู้ทบทวน

ผู้ทบทวน	ตำแหน่ง	ลงนาม
ท่านที่ 1	ประจำ ผวพ.กวก.กส.ทบ.	พ.ท.หญิง (ปวีณ์ธิดา โตจินดา)
ท่านที่ 2	รอง ผอ.กวก.กส.ทบ.	พ.อ. (ภากร สวัสดิ์สิงห์)
ท่านที่ 3	ผอ.กวก.กส.ทบ.	พ.อ. (วิสูตร เอี่ยมเรือง)

13. ภาคผนวก

-