

การพัฒนา Dot-ELISA สำหรับตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus*

มนยา เอกทัตร์ เรขา คณิตพันธ์* นิตยา ศรีแก้วเขียว สุรีย์ ธรรมศาสตร์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้เขียนและรับผิดชอบบทความ 0-2579-8908-14 , e-mail : re_aker@yahoo.com

บทคัดย่อ

วิธี dot Enzyme-linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA) ได้พัฒนาเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* โดยใช้แอนติเจนสกัดจาก *Brucella abortus* strain 125 biotype1 เคลือบบนแผ่น Nitrocellulose ทำการทดสอบกับซีรัมควบคุมจำนวน 257 ตัวอย่าง เป็นซีรัมควบคุมบวกจำนวน 57 ตัวอย่างจากสัตว์ที่ยืนยันผลจากการเพาะแยกเชื้อ และซีรัมควบคุมลบจำนวน 200 ตัวอย่าง เป็นซีรัมจากโคที่ทดสอบทางซีรัมวิทยาให้ผลลบทุกวิธี ผลการประเมินวิธี dot-ELISA พบว่ามีค่า Diagnostic Sensitivity (DSn) เท่ากับ 96.5% และ Diagnostic Specificity (DSp) เท่ากับ 99.5% เมื่อนำซีรัมจากพื้นที่ที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Rapid plate test (RPT) และ EDTA-Tube agglutination test (EDTA-TAT) ให้ผลบวก 29 ตัวอย่าง ผลลบ 4,353 ตัวอย่างทั้งสองวิธี นำมาทดสอบโดยวิธี dot-ELISA พบมีค่า DSn เท่ากับ 89.7% และ DSp เท่ากับ 99.9% และ ค่า kappa value คือ 0.85 วิธี dot-ELISA เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องได้รับการฝึกเฉพาะทาง หรือใช้อุปกรณ์พิเศษ ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองโรคในพื้นที่ได้

คำสำคัญ: Dot-ELISA, *Brucella abortus* แอนติบอดี

บทนำ

โรค布鲁เซลโลซิสเป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่สำคัญในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีสาเหตุจากเชื้อ *Brucella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดกรัมลบ โรคนี้มีการระบาดทั่วโลกและสามารถติดต่อสู่คนได้ โดยคนจะแสดงอาการคล้ายไข้หวัด แต่ในรายที่รุนแรงจะมีผลกับระบบประสาทและหัวใจ ซึ่งการรักษาต้องต่อเนื่องและใช้เวลานาน โดยมีโอกาสที่จะกลับมาแสดงอาการของโรคอีก (Pellicer, et al., 1988) สำหรับในสัตว์จะแสดงอาการเด่นชัดในสัตว์ที่ดัดท้อง โดยสัตว์มักจะแท้งในระยะสุดท้ายของการดัดท้อง แต่ในรายที่ไม่เกิดการแท้งสัตว์จะปล่อยเชื้อมาพร้อมกับน้ำนม รก หรือน้ำคร่ำเวลาที่คลอด สัตว์ที่ไม่แสดงอาการจะเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อที่สำคัญ (Robertson, 1971) ดังนั้นการควบคุมโรคจึงต้องมีการตรวจและคัดกรองโรคในฝูงอย่างสม่ำเสมอทุกปี และปัจจุบันการเลี้ยงปศุสัตว์โดยเฉพาะโคนมมีการเลี้ยงอยู่ทั่วประเทศ แม้จะมีการให้บริการตรวจวินิจฉัยโรคอยู่แต่ไม่อาจครอบคลุมได้ การทดสอบโรคโดยวิธี ELISA (Enzyme – linked immunosorbent assay) (Corner and Alton, 1993 ; Nielsen, et al., 1996) เป็นวิธีหนึ่งที่มีความไวในการทดสอบซึ่งมีการใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน แต่เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาและมีหลายขั้นตอน รวมถึงต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีหลายชนิดซึ่งในท้องที่ไม่สามารถหาได้ วิธี dot-ELISA เป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธี ELISA โดยใช้แผ่น nitrocellulose สำหรับจับแอนติเจน ทำให้ง่ายต่อการใช้นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เพื่อตรวจหาแอนติบอดีโดยมีความไวและแม่นยำสูง (Batra, et al., 2003) ดังนั้นจึงได้พัฒนาวิธีทดสอบนี้ซึ่งทำได้ง่ายและสะดวกอีกวิธีหนึ่งขึ้นสำหรับใช้เป็นเครื่องมือในศึกษาทางด้านระบาดวิทยา เพื่อควบคุมและป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

แอนติเจน

การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเชื้อ *B. abortus* สเตรน 125 biotype1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (trypticase soy agar + 5% horse serum) บ่มเชื้อที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อ *Brucella* และล้างด้วย สารละลาย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 (w/v) นึ่งที่ 121°C นาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสและกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μ m เติมสารละลาย 4 M NaOH ลงในส่วนใส (1:15) ต้มที่ 56°C นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นและปรับ pH 7.0 ด้วย glacial acetic acid และตกตะกอนด้วย 25% ethanol (1:4) เก็บไว้ที่ 4°C นาน 24 – 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนตะกอน ละลายส่วนตะกอนด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไป dialyze และปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที อีกครั้งเก็บเฉพาะส่วนใส ใช้เป็นแอนติเจน โดยทำการดูดแห้งให้ได้ 15 มิลลิกรัม ต่อขวด และเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

การทดสอบคุณสมบัติทางซีรัมวิทยา

แอนติเจนจากเชื้อ *B. abortus* หลังจากทำการดูดแห้งแล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยทำ dilution ของแอนติเจน และทดสอบด้วยวิธี ELISA ตามวิธีการที่พัฒนาเพื่อใช้ทดสอบโรค布鲁เซลโลซิส ในห้องปฏิบัติการ (วิวัฒน์และคณะ, 2544)

การพัฒนาวิธี dot-ELISA

การหาปริมาณแอนติเจนและ dilution ของซีรัมที่เหมาะสมในการทดสอบ

นำแอนติเจนที่เตรียมได้และทดสอบคุณสมบัติแล้วมาเจือจางด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 1 µg, 0.5 µg, 0.25 µg และ 0.125 µg ต่อ 1 หยด (จำนวน 3µl) ตามลำดับ แล้วหยดลงบนแผ่น nitrocellulose (NC) membrane (Schleicher and Schull, Dassel, Germany) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับซีรัมบวกและลบมาตรฐาน (Synbiotics, San Diego, CA, USA) ที่เจือจางด้วย PBS ในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 1:5, 1:10, 1:20 และ 1:40 ตามลำดับ

การเตรียม และการเคลือบแอนติเจนบน Nitrocellulose strip

ตัดแผ่น NC ใช้เทป 2 หน้า ยึดแผ่น NC กับแผ่นใส แล้วแบ่งช่องแผ่น NC เป็นช่องเล็กขนาด 0.6 X 0.6 ซม. (รูปที่ 1) เพื่อหยดแอนติเจน 1 หยด ประมาณ 3 µl ของแต่ละ dilution ลงบนช่อง NC ทั้งไว้ให้แห้งในที่เย็น (4°C) จากนั้นจึงตัดแยกเป็นแผ่นตามขนาดดังกล่าว จุ่ม strip ใน 1% skim milk ใน PBS pH 7.4 นาน 30 นาที ที่ 4°C เพื่อกำจัด non-specific protein binding site ที่เหลืออยู่บนแผ่น NC แล้วจึงล้าง strip ด้วย PBS ที่แช่เย็น ทั้งไว้ให้แห้งที่ 4°C และเก็บที่ 4°C เพื่อรอการทดสอบ

ซีรัมควบคุม

ใช้ซีรัมโคมนที่ยืนยันผลบวกด้วยการเพาะแยกเชื้อเป็นซีรัมควบคุมบวกจำนวน 57 ตัวอย่าง ส่วนซีรัมควบคุมลบเป็นซีรัมจากโคที่ทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสทางซีรัมวิทยาที่ให้ผลลบทุกวิธีจำนวน 200 ตัวอย่าง ซีรัมโคมนในห้องที่

ตัวอย่างซีรัมโคมนเก็บจากจังหวัดต่างๆ 8 จังหวัด มีจำนวน 4,382 ตัวอย่าง (ตารางที่1) ซึ่งซีรัมทั้งหมดผ่านการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิส ด้วยวิธี Rapid plate test (RPT) และ EDTA-Tube agglutination test (EDTA-TAT) ซึ่งเป็นวิธีการขั้นสูงโรคทางซีรัมวิทยาที่ใช้เป็นการทดสอบประจำห้องปฏิบัติการ (routine diagnosis) พบให้ผลบวกต่อโรค布鲁เซลโลซิสจำนวน 29 ตัวอย่างทั้งสองวิธี (ตารางที่3) จากซีรัมทั้งหมด 4,382 ตัวอย่าง

การหาปริมาณ คอนจูเกตที่เหมาะสม

การหาปริมาณของคอนจูเกตที่เหมาะสมในการทำสอบโดยวิธี dot-ELISA นั้น หาได้จากการเจือจาง Goat anti-bovine IgG horseradish peroxidase conjugate (KPL, Maryland, USA) ตั้งแต่ 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2,000 และ 1 : 4,000 แล้วนำไปทดสอบกับ แอนติเจนที่เตรียมไว้บนแผ่น NC และซีรัมควบคุมในแต่ละความเข้มข้น

การทดสอบด้วยวิธี Dot-ELISA

นำ strip แอนติเจนที่เตรียมไว้แล้วทำให้เปียกด้วย PBS จุ่มในซีรัมที่เจือจาง ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วล้าง strip ด้วย washing buffer (PBS + 0.2% polyoxyethylene sorbitan monolaurate) 1 ครั้ง จุ่ม strip ที่ล้าง ลงใน Goat anti-bovine IgG horseradish peroxidase conjugate (KPL, Maryland, USA) ที่เจือจางด้วย washing buffer วางที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงจุ่ม strip ลงใน chromogen/substrate solution (สารละลาย 3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride 12 mg ใน 50 mM Tris – HCl (pH 7.6) 10 ml ที่มี 30% H₂O₂ 20 µl) นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วปล่อยให้แห้ง

การอ่านผลโดยดูการปรากฏสีบนแผ่น NC ผลบวกจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลตรงตำแหน่งที่หยด แอนติเจนไว้ ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นไม่ว่าจะสีเข้ม หรือจางให้ถือว่าเป็นผลบวก ส่วนผลลบจะไม่สีเกิดขึ้น

การคำนวณค่าทางระบาดวิทยา

นำผลการทดสอบมาคำนวณหาค่าทางระบาดวิทยา Diagnostic Sensitivity (DSn) และ Diagnostic Specificity (DSp) ทั้งในกรณีที่ใช้การเพาะแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน และวิธีที่ตรวจใน ห้องปฏิบัติการ มาใช้เป็นวิธีหลักในการคำนวณตามวิธีของ OIE (2004) และ Pouillot, et al., (2002) และ คำนวณค่า kappa value เพื่อเปรียบเทียบวิธี dot-ELISA กับวิธีที่ตรวจใน ห้องปฏิบัติการ (Nielsen, et al., 1996)

ผล

จากการทดสอบหาปริมาณแอนติเจน ซีรัม และคอนจูเกตที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วย วิธี dot-ELISA ผลที่ได้คือ ความเข้มข้นของแอนติเจนเท่ากับ 0.5 µg ต่อ 1 หยด (3 µl) ซีรัมเจือจางเป็น 1:10 และคอนจูเกตเจือจางเท่ากับ 1:2000 ซึ่งผลบวกที่ปรากฏจะเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มชัดเจนตรงตำแหน่ง ของแอนติเจน ผลการทดสอบด้วยวิธี dot-ELISA กับซีรัมควบคุม ซึ่งเป็นตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกยืนยันจาก การเพาะเชื้อ 57 ตัวอย่าง วิธี dot-ELISA ได้ผลบวก 55 ตัวอย่าง และตัวอย่างซีรัมที่มีผลลบจากการเพาะ เชื้อ จำนวน 200 ตัวอย่าง วิธี dot-ELISA ได้ผลลบจำนวน 199 ตัวอย่าง (ตารางที่2) และเมื่อนำผลมา คำนวณพบว่าวิธี dot ELISA ให้ค่า DSn และ DSp ของวิธี ได้เท่ากับ 96.5% และ 99.5% ตามลำดับ

ผลการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมโคนมในพื้นที่ พบว่าจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยทางซีรัมวิทยา จำนวน 29 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบโดย วิธี dot-ELISA ได้ผลบวก 26 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลลบโดย ทางซีรัมวิทยา จำนวน 4,353 ตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี dot-ELISA ได้ผลลบจำนวน 4,348 ตัวอย่าง (ตาราง ที่ 3) นำมาคำนวณค่า DSn และ DSp มีค่าเท่ากับ 89.7% และ 99.9% ตามลำดับ และ คำนวณค่า kappa value ได้เท่ากับ 0.85

วิจารณ์

การชันสูตรเพื่อหาสาเหตุของโรค เช่น โรคทางแบคทีเรียวิทยานั้นจำเป็นต้องเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและถือเป็น gold standard method ของการวินิจฉัยและชันสูตรโรค แต่ในการเพาะแยกเชื่อนั้นบางครั้งไม่สามารถทำได้ทุกตัวอย่างจากสัตว์ที่มีชีวิตที่เป็นโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรค布鲁เซลโลซิสซึ่งเป็นโรคเรื้อรัง ทำให้การเก็บตัวอย่างมาเพาะแยกเชื้อมีข้อจำกัด อีกทั้งการเพาะเชื้อเพื่อยืนยันโรคดำเนินการได้ยากและต้องใช้เวลาช้านาน ดังนั้นวิธีตรวจทางซีรัมวิทยาจึงยังจำเป็น โดยเฉพาะเพื่อการคัดกรองโรคที่ต้องการความรวดเร็วและถูกต้อง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธี dot-ELISA เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. abortus* และหาสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของวิธี ซึ่งจะใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการทดสอบครั้งต่อไป โดยแอนติเจนที่ใช้สกัดจาก *B. abortus* สเตรน 125 biotype1 ทำการทดสอบกับ ซีรัมมาตรฐาน ซีรัมควบคุม และ ซีรัมจากท้องที่ ผลที่ได้นำมาประเมินค่าความไวและความจำเพาะของวิธี จากการประเมินผลการทดสอบกับซีรัมควบคุมพบว่าวิธี dot-ELISA มีค่า DS_n เท่ากับ 96.5% และ DS_p เท่ากับ 99.5% ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ให้ความไวและความจำเพาะในระดับสูง ซึ่งเป็นการประเมินวิธีทดสอบที่เป็นมาตรฐาน แต่การจะนำวิธี ELISA ไปใช้ในท้องที่ได้นั้น จะต้องทำการประเมินตัวอย่างที่ได้มาจากท้องที่จำนวนมาก เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสทางซีรัมวิทยา และหาความสอดคล้องของการทดสอบเพื่อเป็นข้อมูลในเบื้องต้นก่อนนำไปใช้จริงในท้องที่ ซึ่งเมื่อทดสอบกับซีรัมโคจากพื้นที่จำนวน 4,382 ตัวอย่าง พบว่าวิธี dot-ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี rapid plate test ร่วมกับ EDTA-TAT มี DS_n เท่ากับ 89.7% และ DS_p เท่ากับ 99.9% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้เนื่องจากมีความจำเพาะ และ มีความไวอยู่ในเกณฑ์ที่สูง รวมทั้งมีค่า kappa value เท่ากับ 0.85 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ 1.0 เป็นการยืนยันว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้ได้เช่นเดียวกัน จากรายงานการทดสอบและเปรียบเทียบวิธี dot-ELISA และวิธีทดสอบทางซีรัมวิทยาอื่นๆ นั้น พบว่าวิธี dot-ELISA ให้ค่าความไวมากกว่า หรือใกล้เคียงวิธี complement fixation test, standard tube agglutination และ rose bengal test (Tsai, et al., 1989; Chand, et al., 1989; Singh, et al., 2000) นอกจากนี้มีการแนะนำให้ใช้วิธี dot – ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายในการตรวจ IgM แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรค布鲁เซลโลซิสในคน ในระยะเฉียบพลัน (Gad El-Rab and Kambal, 1989; Marrodan, et al., 2001)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. abortus* ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการคัดกรองโรค布鲁เซลโลซิสได้ เพราะเป็นวิธีที่ง่ายต่อการปฏิบัติ และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่มีราคาแพง ให้ผลรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง โดยเฉพาะการปฏิบัติงานในท้องที่ อย่างไรก็ตามผลการทดสอบครั้งนี้เป็นเพียงเชิงคุณภาพ มิใช่ตรวจเชิงปริมาณ ดังนั้นการแปลผลจึงได้เป็นผลบวกและผลลบเท่านั้น ซึ่งใช้เพื่อความสะดวกในการทดสอบในพื้นที่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับความจำเพาะของแอนติเจน เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพใน

การทดสอบของวิธี และที่สำคัญวิธี dot-ELISA ยังสามารถประยุกต์สำหรับใช้ทดสอบโรคได้มากกว่าหนึ่งโรคใน 1 แผ่น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความสะดวก รวดเร็วมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และ ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการกลุ่มภูมิคุ้มกันและชีววิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบครั้งนี้ล่วงหน้าด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา เรขา คณิตพันธ์ มนยา เอกทัต สร้อย ธรรมศาสตร์ และ สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์. 2544.

การพัฒนาวิธีไลซ่าเพื่อการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในโค : ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 27. หน้า 1-11

Batra, H.V., Agarwal, G.S. and Rao,P.V. 2003. Evaluation of a newly developed DOT-ELISA kit for the diagnosis of human brucellosis. J. Commun. Dis. 35: 71-73.

Chand, P., Sadana, J.R., Batra, H.V., and Khanna, R.N. 1989. Comparison of dot enzyme – linked immunosorbent assay (dot-ELISA) with other serological tests for the detection of Brucella antibodies in bovine sera. Zentralbl Vetrinarmed B. 36: 346-352.

Corner, L.A. and Alton, G.G. 1993. Bovine brucellosis: Bacteriology. In : Australian standard diagnostic techniques for animal disease. CSIRO Publications, Australia. 9 p.

Gad El-Rab, M.O. and Kambal, A.M. 1998. Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. J. Infect. 36: 197-201.

Marrodan, T., Nenova-Poliakova, R., Rubio, M., Ariza, J., Clavijo, E., Smits, H.L. and Diaz, R. 2001. Evaluation of three methods to measure anti-Brucella IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan – based tests. J. Med. Microbiol. 50: 663-666.

Nielsen, K., Gall, D., Kelly, W., Viglicco, A., Henning D. and Garcia., M. 1996. Immuno-assay development application to enzyme immunoassay for the diagnosis for brucellosis. Agriculture and Agri-Food monograph. A 62-45/1996 E. ISBN 0-662-24163-0.

Office International Des Epizooties (World Organisation for Animal Health). 2004. Principles of validation of diagnostic assays for infection diseases. In : Manual of standards tests and vaccines for terrestrial animal (mammals, birds and bees). 5th ed., Paris, France. p. 21-29.

- Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., Pallares, R. and Gudiol, F.1988. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 157: 918-924.
- Pouillot, R., Gerbier, G. and Gardner, I. A. 2002. "TAGS", a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 53(1-2):67-81.
- Robertson, F.J. 1971. Brucellosis: a possible symptomless carrier. *Vet. Rec.* 88: 313-314.
- Tsai, S.J., Hutchinson, L.J. and Zarkower, A.1989. Comparison of dot immunobinding assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 53: 405-410.
- Singh, S.V., Gupta, V.K. and Singh, N. 2000. Comparative evaluation of a field-based dot-ELISA kit with three other serological tests for the detection of *Brucella* antibodies in goats. *Trop. Anim. Health. Prod.* 32: 155-16.

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างซีรัมโครัมเก็บจากสัตว์ในพื้นที่จังหวัดต่างๆ

จังหวัด	ตัวอย่าง
สุพรรณบุรี	1,602
กาญจนบุรี	613
ราชบุรี	1,576
เพชรบุรี	191
นครราชสีมา	219
อ่างทอง	38
สระบุรี	104
ลพบุรี	39
รวมตัวอย่างทั้งหมด	4,382

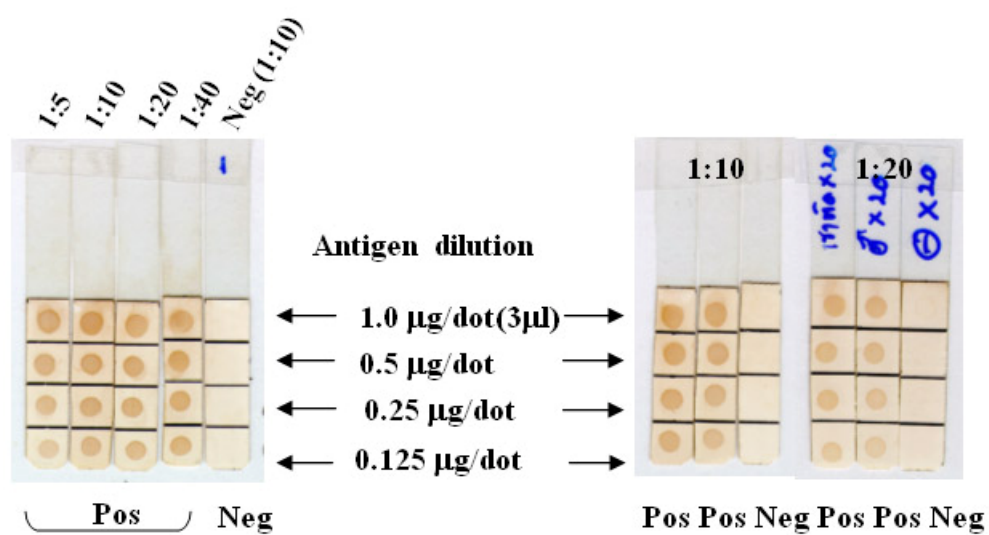
ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบกับซีรัมควบคุม

		isolation	
		disease	no disease
dot-ELISA	+	55	1
	-	2	199
		57	200

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบกับซีรัมโครัมในพื้นที่

		Routine diagnosis (RBT& EDTA-TAT)	
		+	-
dot-ELISA	+	26	5
	-	3	4,348
		29	4,353

รูปที่ 1 การหาปริมาณแอนติเจน และ dilution ของซีรัมที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ



Development of Dot-ELISA for detection of antibody against *Brucella abortus*

Monaya Ekgatat Reka Kanitpun* Nittaya Srikawkheaw Suree Thammasart

National Institute of Animal Health , Department of Livestock Development ,
Kasetklang , Jatujak , Bangkok 10900

* Corresponding author 0-2579-8908-14, e-mail : re_aker@yahoo.com

Abstract

A dot Enzyme-linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA) was developed for the detection of *Brucella* antibodies in bovine sera using soluble antigens extracted from *Brucella abortus* strain 125 biotype1 dotted on the nitrocellulose membrane (NC). The dot-ELISA was performed using 257 control sera collected from 57 *Brucella abortus* culture positive and 200 seronegative sera. The evaluation revealed 96.5% Diagnostic Sensitivity (DSn) and 99.5% Diagnostic Specificity (DSp). The assay also gave 89.7% DSn and 99.5% DSp with 29 positive and 4,353 negative field serum samples as previously tested by both rapid plate test (RPT) and EDTA-Tube agglutination test (EDTA-TAT). This test gave the kappa value 0.85. The dot-ELISA was easy, rapid and not require specialized training or equipments, therefore it was suitable as a test of choice for the screening test in animal in the field.

Keywords: Dot-ELISA, *Brucella abortus*, antibody