

การเปรียบเทียบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโคโดยวิธี RBT EDTA-TAT และ ELISA

พรทิพย์ ชูเมฆ^{1*} และ นิตยา ศรีแก้วเขียว²

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ ต.ที่วัง อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

²สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้เขียนและรับผิดชอบบทความ 0-75363-423-4 , e-mail : ponthip@dld.go.th.

บทคัดย่อ

ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโคในภาคใต้ จำนวน 1,990 ตัวอย่าง โดยวิธี RBT (rose bengal test), EDTA-TAT (EDTA-tube agglutination test) และ ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) โดยเปรียบเทียบกับวิธี CFT (complement fixation test) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจโรค布鲁塞尔菌 พบว่า ซีรัมที่ให้ผลบวกโดยวิธี CFT 84 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA 83, 80 และ 84 ตัวอย่าง ส่วนซีรัมที่ให้ผลลบต่อวิธี CFT 1,906 ตัวอย่าง พบให้ผลลบต่อวิธี RBT, EDTA-TAT เท่ากันคือ 1,904 ตัวอย่างและให้ผลลบต่อวิธี ELISA 1,840 ตัวอย่าง ซึ่งได้ค่า Sensitivity (Sn) ของวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA เท่ากับ 98.81%, 95.24% และ 100% ค่า Specificity (Sp) ของวิธี RBT, EDTA-TAT เท่ากันคือ 99.90% และวิธี ELISA 96.54% ค่า Accuracy (Ac) ของวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA เท่ากับ 99.85%, 99.70% และ 96.68% ตามลำดับ สรุปได้ว่าวิธีทดสอบโรคทั้ง 3 วิธี มีประสิทธิภาพสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในหองปฏิบัติการได้อย่างดี

คำสำคัญ : *Brucella abortus*, ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ, RBT, EDTA-TAT, ELISA, CFT

บทนำ

โรค布鲁เซลโลซิส หรือโรคแท้งติดต่อในโค มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Brucella abortus* จัดเป็นโรคระบาดสัตว์ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ.2499 เป็นโรคติดต่อชนิดเรื้อรัง โดยเฉพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดที่สามารถติดต่อถึงคนได้ สัตว์ที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตลดลง เพราะทำให้สัตว์เป็นหมัน ผสมไม่ติด หรือผสมติดยาก ถ้าผสมติดอาจมีการแท้งลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดโรคในระหว่างการตั้งท้อง (Blood and Henderson, 1968) สัตว์ที่เป็นโรคสามารถแพร่เชื้อไปยังสัตว์อื่นๆ ได้ (Nielsen, 2002) ในทางระบาดวิทยาเมื่อพบสัตว์ที่เป็นโรคแล้วต้องทำลาย ไม่แนะนำให้รักษาเพราะไม่คุ้มทุน และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (มนยา, 2540) ในการชันสูตรโรคนี้จำเป็นต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมีการเปลี่ยนแปลงและเลือกวิธีทดสอบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทดสอบตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการในแต่ละประเทศ (Nielsen, 2002) ในประเทศไทยการควบคุมและกำจัดโรค布鲁เซลโลซิส ในโค กระบือ โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น rapid plate test (RPT) และ rose bengal test (RBT) เป็นการตรวจคัดกรองเบื้องต้นและใช้วิธี EDTA-tube agglutination test (EDTA-TAT) และ complement fixation test (CFT) เป็นการตรวจยืนยัน (วิวัฒน์ และคณะ, 2544) ในการตัดสินใจโรคนี้จำเป็นต้องใช้ประวัติสัตว์ เช่น อายุ และการฉีดวัคซีนร่วมด้วย

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบ ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโค โดยวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA ต่อวิธี CFT ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางซีรัมวิทยาตามมาตรฐานของ OIE (2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง : เป็นตัวอย่างซีรัมโคในภาคใต้ที่หน่วยงานราชการและเกษตรกรนำส่งตรวจโรค布鲁เซลโลซิส ที่กลุ่มงานอิมมูนและซีรัมวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ จำนวน 1,990 ตัวอย่าง แอนติเจนและซีวสาร

: แอนติเจนสำหรับทดสอบด้วยวิธี RBT ที่ผลิตโดย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

: แอนติเจนสำหรับทดสอบด้วยวิธี EDTA-TAT ที่ผลิตโดย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์
กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

: แอนติเจนสำหรับทดสอบด้วยวิธี ELISA เป็นแอนติเจนซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Brucella abortus* strain 99 biotype 1 ตามวิธีการของ Nielsen *et al.* (2002) และ OIE (2004) เป็น smooth lipopolysaccharide antigen ชนิดดูดแห้ง ผลิตโดย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

- : แอนติเจนสำหรับทดสอบด้วยวิธี CFT : Antifix "SYNBIOTICS" (commercial reagents)
- : ชุดทดสอบ ELISA ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ
- : Substrate ใช้ ABTS peroxidase substrate (KPL Product Code No. 50-66-01)
- : Complement and Hemolysin "DENKA SEIKEN" (commercial reagents)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. วิธี RBT

นำซีรัมและแอนติเจนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการทดสอบ ประมาณ 30 นาที หยดซีรัมและแอนติเจน อย่างละ 30 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระจก คนให้เข้ากันดีโดยใช้แผ่นพลาสติกหรือแท่งแก้ว ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร เอียงกระจกไปมาเพื่อให้ผสมกันดี อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี เมื่อครบ 4 นาที

ผลลบ (negative) คือ ไม่มีการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี (no agglutination)

ผลบวก (positive) คือ มีการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี (agglutination)

2. วิธี EDTA-TAT

เตรียมแอนติเจน 1:100 ด้วย EDTA-PBS (มนยาและคณะ, 2534) แจกแอนติเจนลงในหลอดทดสอบ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 และ 1 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 2-5 ใส่ซีรัม 0.08 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 ทำ two fold dilution นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมงและอ่านผล

การแปลผล : โคที่ได้รับวัคซีนบรูเซลโลซิส อ่านผลเป็นบวก ที่ระดับซีรัมเจือจาง (titer) 1:200

โคที่ไม่ได้รับวัคซีนบรูเซลโลซิส อ่านผลเป็นบวก ที่ระดับซีรัมเจือจาง (titer) 1:100

3. วิธี ELISA

ทำตามวิธีการของมนยาและสุริย์ (2547) ที่ประยุกต์และพัฒนาจาก Nielsen (2002)

วันที่ 1 นำชุดทดสอบออกจากตู้เย็น 4°C วางที่อุณหภูมิห้อง ก่อนการทดสอบประมาณ 30 นาที ยกเว้นคอนจูเกต นำแอนติเจนที่เจือจางแล้วด้วย coating buffer ใส่ใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม ปิดฝาแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C 1 คืน (หรือ อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง) เตรียมตัวอย่างทดสอบ และตัวอย่างควบคุม บวก/ลบ เจือจางด้วย EDTA/EGTA-PBS 1:200 ใน dilution plate 24 หลุม

วันที่ 2 ล้าง plate ที่เคลือบแอนติเจนไว้ ด้วย PBST 4 ครั้ง เคาะให้แห้ง ใส่ตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุม บวก/ลบ ที่เตรียมไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยตัวอย่างทดสอบทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ส่วนตัวอย่างควบคุม บวก/ลบ และ blank ทำตัวอย่างละ 4 ซ้ำ ปิดฝาแล้ววางที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้าง plate ด้วย PBST 4 ครั้ง เคาะให้แห้ง ใส่ conjugate ที่เจือจางด้วย PBST เป็น 1:1,000 จำนวน 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม ปิดฝาแล้ววางที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้าง plate ด้วย PBST 4 ครั้ง เคาะให้แห้ง ใส่ substrate จำนวน 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม ปิดฝาแล้ววางที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1% SDS 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม อ่านผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง ELISA reader

การแปลผล : พิจารณาจากค่า Percent Positivity (PP) ที่มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 40% ถือเป็นบวก

$$PP (\%) = \frac{\text{Replicate OD Value of test serum}}{\text{Median OD Value of } c^{++} \text{ control}} \times 100$$

เมื่อกำหนดให้ c^{++} คือ strong positive serum control

Median OD c^{++} คือค่ากลาง 2 ค่า ของ OD c^{++}

4. วิธี CFT ตามวิธีมาตรฐานของ OIE

วันที่ 1 เจือจางตัวอย่างซีรัมทดสอบและซีรัมควบคุมบวก/ลบ เป็น 1:5 ด้วยสารละลาย magnesium saline (MgS) และบ่มที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที ทำ serial two fold dilution จากความเข้มข้น 1:5 ถึง 1:80 ใน microplate ชนิด U-shape และทำ serial two fold dilution 1:10 และ 1:20 สำหรับควบคุม complement เติมนานติเจน 2 ยูนิต จำนวน 0.025 มิลลิลิตร ลงในหลุมซีรัมที่มีความเข้มข้น 1:5 ถึง 1:80 แล้วเติม สารละลาย MgS จำนวน 0.025 มิลลิลิตร ในหลุมซีรัมชุดควบคุม complement เก็บที่ อุณหภูมิ 4°C 2 ชั่วโมง เติมนานติเจน จำนวน 0.050 มิลลิลิตร ทุกหลุม เขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นาน 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเตรียม hemolytic system (ส่วนผสมระหว่าง hemolysin 2 ยูนิต กับเม็ดเลือดแดงแกะ 2.5% ใน อัตราส่วน 1:1) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน

วันที่ 2 นำ microplate ตัวอย่างจากตู้เย็นไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำ hemolytic system ไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37°C 10 นาที เติมนานติเจน จำนวน 0.050 มิลลิลิตร ทุกหลุม เขย่าให้สารละลายเข้ากัน นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C เขย่าทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปเก็บที่ 4°C 2 ชั่วโมง หรือค้างคืน และอ่านผลการเกิดปฏิกิริยา fixation

การอ่านผล : ปฏิกิริยา fixation คือลักษณะที่เม็ดเลือดแดงรวมกลุ่มกันที่ก้นหลุมและส่วนน้ำจะใส

การเกิดปฏิกิริยา fixation 100% ลักษณะที่เม็ดเลือดแดงทั้งหมดรวมกันที่ก้นหลุม

ส่วนน้ำใสไม่มีสีของเม็ดเลือดแดง ให้อ่านผล = 4

การเกิดปฏิกิริยา fixation 70-75% เม็ดเลือดแดงเกือบทั้งหมดรวมกันที่ก้นหลุม

ส่วนน้ำใสมีสีของเม็ดเลือดแดงเล็กน้อย ให้อ่านผล = 3

การเกิดปฏิกิริยา fixation 50% เม็ดเลือดแดงครึ่งหนึ่งรวมกันที่ก้นหลุม

ส่วนน้ำใสมีสีของเม็ดเลือดแดงปานกลาง ให้อ่านผล = 2

การเกิดปฏิกิริยา fixation 25% เม็ดเลือดแดงเล็กน้อยรวมกันที่ก้นหลุม

ส่วนน้ำใสมีสีของเม็ดเลือดแดงเข้มข้น ให้อ่านผล = 1

การแปลผล : ปฏิกิริยา fixation เกิดขึ้น 75-100% ที่ระดับซีรัมเจือจางมากกว่าหรือเท่ากับ 1:5 ตัดสินเป็นบวก

นำมาคำนวณหาค่าความใช้ได้ของวิธีทดสอบโดยใช้ตาราง two-way (2x2) (OIE, 2004) เพื่อหาค่า sensitivity (Sn), specificity (Sp) และ ค่า accuracy (Ac) ดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \text{Sn (\%)} &= \frac{\text{TP}}{\text{TP}+\text{FN}} \times 100 \\ \text{Sp (\%)} &= \frac{\text{TN}}{\text{TN}+\text{FP}} \times 100 \\ \text{Ac (\%)} &= \frac{\text{TP}+\text{TN}}{\text{TP}+\text{FP}+\text{FN}+\text{TN}} \times 100 \end{aligned}$$

กำหนดให้ TP = ค่าบวกจริง (true positive)

FP = ค่าบวกเทียม (false positive)

FN = ค่าลบเทียม (false negative)

TN = ค่าลบจริง (true negative)

ผล

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* จากซีรัมโคในภาคใต้ จำนวน 1,990 ตัวอย่างโดยให้ผลบวกด้วยวิธี CFT จำนวน 84 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี CFT มาตรวจโดยวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA พบให้ผลบวก 83, 80 และ 84 ตัวอย่างตามลำดับ ให้ผลลบ 1, 4 และ 0 ตัวอย่าง ตามลำดับ นำตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลลบด้วยวิธี CFT จำนวน 1,906 ตัวอย่าง มาตรวจโดยวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA พบให้ผลลบ 1,904, 1,904 และ 1,840 ตัวอย่าง ตามลำดับ ให้ผลบวก 2, 2 และ 66 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ผลการคำนวณพบว่า ค่าความไวของวิธี RBT กับ CFT, EDTA – TAT กับ CFT และ ELISA กับ CFT เท่ากับ 98.81, 95.24 และ 100% ตามลำดับ ค่าความจำเพาะเท่ากับ 99.90, 99.90 และ 96.54% ตามลำดับ ค่าความแม่นยำเท่ากับ 99.85, 99.70 และ 96.68% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* โดยวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA กับ วิธี CFT

วิธี	CFT			รวมจำนวน ตัวอย่าง
		ผลบวก	ผลลบ	
RBT	ผลบวก	83	2	85
	ผลลบ	1	1,904	1,905
	รวม	84	1,906	1,990
EDTA-TAT	ผลบวก	80	2	82
	ผลลบ	4	1,904	1,908
	รวม	84	1,906	1,990
ELISA	ผลบวก	84	66	150
	ผลลบ	0	1,840	1,840
	รวม	84	1,906	1,990

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไว ค่าความจำเพาะ และ ค่าความแม่นยำ ของวิธีทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับวิธี CFT

validation method	RBT	EDTA – TAT	ELISA
Sn (%)	98.81	95.24	100.00
Sp (%)	99.90	99.90	96.54
Ac (%)	99.85	99.70	96.68

วิจารณ์

ในปัจจุบันการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* มีหลายวิธีคือ RBT, RPT, EDTA-TAT, ELISA และ CFT (Corner and Bagust, 1993) แต่ละวิธีมีความแตกต่างกันจึงต้องอาศัยประวัติสัตว์ อายุ การฉีดวัคซีน ร่วมในการตัดสินโรค จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแต่ละวิธีที่ทำการศึกษเปรียบเทียบกับ CFT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้การยืนยันการเป็นโรค (WHO, 1986) ให้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความแม่นยำ อยู่ในระดับที่สูง วิธีที่ให้ค่าความไวสูงที่สุดคือ ELISA (100%) ซึ่งเท่ากับวิธีมาตรฐาน รองลงมาคือ RBT (98.81%) และ EDTA-TAT (95.24%) ตามลำดับ สำหรับวิธีที่ให้ค่าความจำเพาะมากที่สุดคือวิธี RBT

และ EDTA-TAT (99.90%) รองลงมาคือ ELISA (96.54%) ส่วนวิธีที่ให้ค่าความแม่นยำมากที่สุดคือ RBT (99.85%) รองลงมาคือ EDTA-TAT (99.70%) และ ELISA (96.68%) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับนิตยา และคณะ (2549) ที่ทำการเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโคโดยใช้วิธี RBT กับ CFT ผลพบว่า ค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความแม่นยำ เท่ากับ 99.11, 99.88 และ 99.84% ตามลำดับ ในภาคเหนือตอนบน นิตยา (2549) ได้ทำการตรวจแอนติบอดีต่อโรค布鲁เซลโลซิสด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับ CFT ผลพบว่า ค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความแม่นยำ เท่ากับ 100.00, 98.34 และ 98.42% ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นว่าแต่ละวิธีสามารถนำมาเลือกใช้ให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการเช่น ใช้วิธี RBT หรือ วิธี ELISA ในการคัดกรองการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโค เพราะทำได้ง่าย ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ได้จำนวนตัวอย่างทดสอบจำนวนมากและมีความน่าเชื่อถือ แต่เมื่อคำนึงถึงต้นทุนและความยุ่งยากในการตรวจแล้ว วิธี RBT จะดีกว่า วิธี ELISA และตรวจยืนยันโรคด้วยวิธี EDTA – TAT หรือ CFT พร้อมกันนี้ต้องใช้ ประวัติสัตว์ อายุ การฉีดวัคซีน ร่วมในการตัดสินใจโรคด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจดังกล่าวไม่ว่าจะเป็นวิธีใดก็ตาม ก็มีความจำเป็นในการเป็นส่วนหนึ่งของมาตรการ ควบคุมโรค布鲁เซลโลซิส โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิส เป็นระยะอย่างต่อเนื่อง เช่น 3 หรือ 6 เดือน ในฝูงโคที่ยังไม่ปลอดโรคและทำการทดสอบทุกปีในฝูงโคที่ปลอดโรค และคัดแยกตัวที่เป็นโรคออกจากฝูง และทำลายสัตว์ป่วยทิ้งเพื่อควบคุมให้เกิดประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์แก่เกษตรกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิงมนยา เอกทัตร์ สัตวแพทย์หญิงสุรีย์ ธรรมศาสตร์ และเจ้าหน้าที่กลุ่มภูมิคุ้มกันและซีรัมวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ให้การสนับสนุนทางด้านเทคนิค ซิวสารและแอนติเจนสำหรับทดสอบ และให้การช่วยเหลือในการทดสอบ ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์บุญเลิศ อ่าวเจริญ นายสัตวแพทย์ประสพพร ทองนุ่น และเจ้าหน้าที่กลุ่มภูมิคุ้มกันและซีรัมวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ทุกท่าน ที่สนับสนุนและแนะนำในการทดสอบ และให้การช่วยเหลือในการทดสอบครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- มนยา เอกทัตร์ ดิลก เกษมสมบัติ และสมชาย ช่างทอง. 2534. การใช้ อีดีทีเอ ช่วยในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในโค. สัตวแพทย์สาร 42(4) : 225-229.
- มนยา เอกทัตร์. 2540. โรค布鲁เซลโลซิสในโคและการชันสูตรโรค. หนังสือประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมโรค布鲁เซลโลซิส. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 19-28.

- มนยา เอกทัตร์ และสุริย์ ธรรมศาสตร์. 2547. การทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสด้วยวิธี Indirect ELISA. หนังสือประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสและโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 10-14.
- นิตยา วงศ์วงศ์. 2549. การตรวจแอนติบอดีต่อโรค布鲁เซลโลซิสด้วยวิธี อีไลซ่า. ข่าวสุขภาพสัตว์ภาคเหนือ. 14(4) : 50-55.
- นิตยา ศรีแก้วเขียว เรขา คณิตพันธ์ อุทิศ ตรีนันทวัน สุริย์ ธรรมศาสตร์ และมนยา เอกทัตร์. 2549. เปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโค โดยวิธี rose bengal test และ complement fixation test. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 1(1) : 37-42.
- วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา เรขา คณิตพันธ์ มนยา เอกทัตร์ สุริย์ ธรรมศาสตร์ และสุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์. 2544. การพัฒนาวิธีอีไลซ่าเพื่อการตรวจชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในโค. การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 27. โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัลพลาซา กรุงเทพฯ. หน้า 1-11.
- Blood, D.C. and Henderson, J.A. 1968. Veterinary medicine. Bailliere Tindal Cassel Ltd. London, England. p.368-374.
- Corner, L.A. and Bagust, T.J. 1993. Australian standard diagnostic techniques for animal disease : bovine brucellosis. CRIRO publications. East Melbourne, Victoria, Australia. p.8-16.
- Nielsen, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serological. Vet. Microbial. 90 : 447-459.
- Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health). 2004. Manual of standards test and vaccines for terrestrial animal (Mammals, birds and bees). 5th ed., Paris, France. p.21-27.
- World Health Organisation. 1986. Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis 6th report, technical report Series No.740. p.61-63.

Comparison of validation method in antibody detection against *Brucella abortus* in bovine serum by RBT, EDTA-TAT and ELISA

Pornthip Chumek^{1*} and Nittaya Srikawkheaw²

¹ Southern Veterinary Research and Development Center Tiwang Thungsong Nakhon Sri Thammarat 80110

² National Institute of Animal Health, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok, 10900

* Corresponding author 0-75363-423-4 , e-mail : ponthip@dld.go.th.

Abstract

Nineteen hundred and ninety bovine serum samples from southern part of Thailand were detected against *Brucella abortus* by RBT (rose bengal test), EDTA-TAT (EDTA-tube agglutination test), and ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) using CFT (complement fixation test) as the reference test. Eighty-four serum samples from positive by CFT of which 83, 80 and 84 samples were positive by RBT, EDTA-TAT, and ELISA respectively. Nineteen hundred and six samples negative by CFT of which 1,904, 1,904 , and 1,840 were negative by RBT EDTA-TAT, and ELISA, respectively. Sensitivities were estimated to be 98.81%, 95.24% and 100% for RBT, EDTA-TAT, ELISA, respectively. Specificities were estimated to be 99.90% for RBT, EDTA-TAT and 96.54% for ELISA, respectively. Accuracy were estimated to be 99.85%, 99.70% and 96.68% for RBT, EDTA-TAT, ELISA, respectively. As the results, RBT, EDTA-TAT and ELISA can be effective methods for detection antibodies against *Brucella abortus*.

Keywords : *Brucella abortus*, validation method, RBT, EDTA-TAT, ELISA, CFT