การศึกษาวิธีการตรวจซีรั่ม โดย agar gel immunodiffusion test เพื่อใช้ในการตรวจโรควัณโรคเทียมในแพะ

พิพล สุขสายไทยชะนะ มาลี พันธุ์ยานุกูล

ปกรณ์ เอกปณิธานพงศ์

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาโรควัณโรคเทียมโดยวิธีการตรวจซีรั่มแพะด้วย agar gel immunodiffusion test เพื่อตรวจหาภูมิคุ้มโรคต่อท็อกซิน ซึ่งมีการติดเชื้อ *Corynebacterium pseudotuberculosis (C.ovis)* การศึกษาแรกเป็นการเปรียบเทียบผลการตรวจซีรั่มแพะกับผลการชันสูตรซากแพะป่วยจำนวน 14 ตัว พบว่าผลซีรั่มบวกและพบก้อนฝีวัณโรคเทียมในอวัยวะภายในแพะ 85.71% (12/14) ผลซีรั่มลบและไม่พบก้อนฝี 7.14% (1/14) และผลซีรั่มลบแต่พบก้อนฝี 7.14% (1/14) การทดลองที่สองเปรียบเทียบการใช้ซีรั่มแพะและ exotoxin antigen ในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ในซีรั่มแพะป่วยจำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าการใช้ซีรั่มที่ระดับ 100 ไมโครลิตรจะให้ผลดีที่สุด 79.17% (19/24) การศึกษาที่สามเปรียบเทียบผลการอ่าน immuno-precipitating line ที่เกิดขึ้น โดยอ่านผลด้วยตาเปล่ากับวิธีการย้อมสีพิเศษ amidoblack พบว่า การย้อมสีพิเศษสามารถอ่านผลได้ถูกต้องมากกว่าอ่านผลด้วยตาเปล่า ซีรั่มปริมาณ 100 ไมโครลิตรจะสามารถอ่านผลได้เท่ากันทั้ง 2 วิธีคือ 79.17% (19/24) และให้ดีกว่าปริมาณ 25 และ 2 ไมโครลิตรที่อ่านได้เพิ่มขึ้นเป็น 70.83% (17/24) และ 50.00% (12/24) ตามลำดับ นำผลการศึกษาและทดลองที่ได้ไปทำการตรวจซีรั่มแพะ 162 ตัวอย่างจากฝูงที่ป่วย พบว่าให้ผลบวก 35.17% (57/162)

นำผลการศึกษาทดลองที่ได้ไปคัดแยกแพะที่ให้ผลซีรั่มบวกออกจากฝูงแล้วทำลาย รวมทั้งมีมาตรการอื่น ๆ ได้แก่ ให้ยาปฏิชีวนะ ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อโรค หมั่นตรวจแพะในฝูง สามารถหยุดยั้งการระบาดแพร่กระจายของโรคได้เป็นผลสำเร็จ

คำสำคัญ : วัณโรคเทียม แพะ ซีรั่ม

ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

บทนำ

โรควัณโรคเทียม (Caseous lymphadenitis or Pseudotuberculosis) เป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Corynebacterium pseudotuberculosis (C.ovis) ทำให้เกิดโรคในแกะและแพะ ระบาดมากในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ สำหรับประเทศไทยมีการระบาดของโรคครั้งแรกในแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนที่นำเข้าจากออสเตรเลีย (วิชิตและคณะ 2527, พิพลและปกรณ์ 2529) เชื้อ C.ovis สามารถที่จะสร้างท็อกซิน (Lovell and Zaki, 1966) ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มการซึมผ่านของเส้นเลือดหนูตะเภาและหนูขาว (Jolly, 1965) จะยับยั้งการเคลื่อนที่ไปหรือการแบ่งตัวของเชื้อในต่อมน้ำเหลืองของแกะ (Jolly, 1965) ท็อกซินนี้จะกระตุ้นให้ร่างกายแพะสร้างภูมิคุ้มโรค ซึ่งภูมิคุ้มโรคนี้จะมีผลน้อยมากในการที่จะก่อให้เกิดความต้านทานต่อการติดเชื้อชนิดเรื้อรังตามธรรมชาติ (Cameron and Smit, 1970) และได้มีการพัฒนา exotoxia เพื่อใช้เป็นแอนติเจน โดยการนำเชื้อมาจากแกะ (Robertson, 1980) เพื่อนำมาใช้ตรวจโดยวิธี agar gel immunodiffusion test

การวินิจฉัยโรคสามารถทำได้หลายวิธี โดยการผ่าชันสูตรซากและนำหนองฝีไปทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค กรณีแพะที่ไม่แสดงอาการป่วยที่ต่อมน้ำเหลืองใกล้ผิวหนัง เป็นการยากที่จะวินิจฉัยโรค วิธีการตรวจซีรั่มนี้จึงเป็นประโยชน์ในการทดสอบโรค เพื่อควบคุมโรคและกำจัดโรคให้หมดไป

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อควบคุมโรคและกำจัดโรควัณโรคเทียมที่เกิดขึ้นโดยการนำผลการตรวจด้วย agar gel immunodiffusion test ไปคัดแยกแพะป่วยที่ไม่แสดงอาการ เพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของโรคและควบคุมโรคให้สงบลง

อุปกรณ์และวิธีการ

ซีรั่ม

แพะพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ผสม 50/75% แองโกลนูเบียน และพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 14 ตัว เป็นแพะป่วยจากฝูงที่มีการวินิจฉัยแล้วว่าเชื้อ *C.ovis* เป็นสาเหตุสำหรับการศึกษาที่หนึ่ง ซีรั่มแพะจำนวน 24 ตัวอย่างจากแพะป่วยที่แสดงและไม่แสดงอาการจากฝูงที่ป่วยที่ผ่านการชันสูตรซากสำหรับการศึกษาที่สองและสาม และซีรั่มจำนวน 162 ตัวอย่างจากฝูงแพะที่เกิดโรคสำหรับการศึกษาที่สี่

แอนติเจน

แอนติเจนที่ใช้เป็น exotoxin ของเชื้อ *C.ovis* ซึ่งพัฒนามาจากแกะโดยวิธีการของ Robertson, 1980.

อุปกรณ์

อุปกรณ์ จานแก้ว (petridish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซ.ม. สูง 2 ซ.ม. สำหรับบรรจุ 1% agar ปริมาณ 25 มล. แผ่นกระจกสไลด์ขนาด 8.6 x 6.3 ซ.ม. สำหรับ 1% agar 10 มล. และแผ่นกระจกสไลด์ขนาด 25.4 x 76.2 มม. สำหรับ 1% agar 2 มล. ใช้ agarose หลอมเหลว 1% ทำให้ปราศจากเชื้อ เทลงบนภาชนะดังกล่าวข้างต้น ปล่อยทิ้งให้เย็น หลังจากนั้นแช่ในตู้เย็นข้ามคืนเพื่อให้แข็งตัวขึ้น นำมาเจาะรูบน agar ชนิดจานแก้วบรรจุให้หลุมละ 100 μl ชนิดแผ่นกระจกบรรจุได้หลุมละ 25 μl ชนิดแผ่นสไลด์บรรจุได้หลุมละ 2 μl การย้อมสี immuno-precipitating line

วิธีการทดลอง

1. ทำในซีรั่มแพะป่วยจำนวน 14 ตัว มาตรวจด้วยวิธี agar gel immunodiffusion test ชันสูตรซากแพะทั้งหมด เปรียบเทียบผลการชันสูตรซากกับผลการตรวจซีรั่ม
2. เปรียบเทียบศึกษาใช้ซีรั่มและแอนติเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับคือ 100 μl (petridish

type), 25 μl (glass plate type) และ 2 μl (microscopic slide type)

3. ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจซีรั่ม โดยการอ่านผล immuno-precipitating line ที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่ากับการย้อมสีพิเศษ amidoblack ตามวิธี Axelsen et al. (1973)

4. ผลที่ได้จากการศึกษา นำมาตรวจซีรั่มแพะในฝูงที่เกิดโรคจำนวน 162 ตัวอย่าง

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจซีรั่มแพะป่วยด้วยวิธี agar gel immunodiffusion test กับผลการชันสูตรซากตรวจหารอยโรคฝีวัณโรคเทียมในอวัยวะภายในและต่อมน้ำเหลือง พบว่าซีรั่มให้ผลบวกสอดคล้องกับการพบก้อนฝีจำนวน 85.72% (12/14) ซีรั่มผลลบและไม่พบก้อนฝี 7.14% (1/14) และซีรั่มผลลบแต่พบก้อนฝี 7.14% (1/14) (ตารางที่ 1)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ซีรั่มปริมาณต่างกัน 3 ระดับ พบว่าที่ 100 μl, 25 μl และ 2 μl ให้ผลบวก 79.17% (19/24), 66.67% (16/24) และ 25.00% (12/24) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลศึกษาเปรียบเทียบการอ่าน immuno-precipitating line ที่เกิดจากซีรั่มและแอนติเจน 3 ระดับ พบว่าการย้อมสีสามารถอ่านผลได้ดีกว่าอ่านผลด้วยตาเปล่า ในระดับ 100 μl อ่านผลได้เท่ากันทั้ง 2 วิธี คือ 79.17% (19/24) ที่ปริมาณ 25 μl และ 2 μl การย้อมสีสามารถอ่านผลได้ดีกว่าตาเปล่าเพิ่มเป็น 70.83% (16/24) และ 50.00% (12/24) ตามลำดับ แต่ผลบวกที่ตรวจได้ยังคงต่ำกว่าที่ปริมาณ 100 μl (ตารางที่ 3)

ผลการตรวจซีรั่มแพะทั้งหมดในฝูงที่เกิดโรค (ตารางที่ 4) ให้ผลบวก 35.17% (57/162)

วิจารณ์

การศึกษาทดลองตรวจซีรั่มแพะด้วยวิธี agar gel immunodiffusion test ผลสอดคล้องกันคือเมื่อผลซีรั่มเป็นบวกจะพบก้อนฝีในอวัยวะภายในเช่นปอด ตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือกกหู ต่อน้ำเหลืองใต้คาง ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ ต่อมน้ำเหลืองหน้าสะบัก ต่อมน้ำเหลืองหน้าขาหลัง หน้าอกเป็นต้น ถ้าผลซีรั่มเป็นลบก็ไม่พบก้อนฝีในแพะ แต่มีแพะ 7.14% (1/14) ที่ผลซีรั่มลบแต่พบก้อนฝีที่ต่อมน้ำเหลืองที่คอ ซึ่งต้องระวังโดยเฉพาะเมื่อมีการนำแพะจากต่างประเทศที่มีโรควัณโรคเทียมเกิดอยู่ ตัวที่ให้ผลซีรั่มลบอาจเป็นโรคและนำโรคมาเผยแพร่ได้ (Omar et al, 1981)

เนื่องจากแอนติเจนยังไม่มีในประเทศไทย จึงทำการศึกษาปริมาณที่น้อยกว่า 100 μl ซึ่งผลการตรวจด้วยตาเปล่าได้ผลต่ำกว่าเมื่อย้อมสี immuno-precipitating line และผลก็ต่ำกว่าที่ระดับ 100 μl ดังนั้น 100 μl จึงให้ผลที่ถูกต้องไม่สามารถลดปริมาณที่ต่ำกว่านี้ ระดับ 100 μl ก็ใช้กันอยู่ในประเทศมาเลเซีย (Omar et al., 1981) วิธีการตรวจซีรั่มด้วย agar gel immunodiffusion test ทำได้สะดวก รวดเร็ว ผล false positive ไม่พบ (Burrell, 1980a) นอกจากวิธีการดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีวิธีอื่นๆ ได้แก่ Agglutination test (Cameron et al, 1971) Antihemolysin inhibition test โดย exotoxin จากเชื้อ *C.ovis* จะทำให้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ß hemolysin ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Burrell, 1980a) วิธีการเหล่านี้ใช้กันน้อย เนื่องจากให้ผลผิดพลาด false positive มากในการตรวจแบบ Agglutination test (Awad, 1960) การตรวจด้วย Antihemolysin test ก็ให้ผล false positive มาก (Zaki and Abdel-Hamid, 1974) นอกจากนี้แล้วภูมิคุ้มโรคต่อเชื้อ *C.ovis* เป็นชนิด cell mediated immunity ทำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ชนิด delayed hypersensity test เมื่อทดสอบ ที่ผิวหนังโดยฉีดเข้าชั้นผิวหนัง (intradermal injection) ได้ (Cameron and Engelbrecht, 1971)

อย่างไรก็ดีลูกแพะหรือลูกแกะที่ดูดนมน้ำเหลืองจากแม่ในฝูงที่มีวัณโรคเทียม สามารถตรวจซีรั่มให้ผลบวกได้

(Burrell, 1980b)

วิธีตรวจซีรั่มแพะด้วย agar gel immunodiffusion test เป็นประโยชน์อย่างมากในการทดสอบแพะฝูงที่ป่วย เนื่องจากไม่มีวิธีการอื่นที่ดีกว่านี้ในการที่จะจำแนกตัวป่วยไม่แสดงอาการจึงใช้วิธีนี้ แพะที่อมโรคไม่แสดงอาการจะเป็นตัวแพร่กระจายโรคออกไปในฝูงระหว่างแพะด้วยกัน จึงมีความจำเป็นที่ต้องกำจัดแพะที่อมโรคเหล่านี้ ผลการศึกษาครั้งนี้จึงอำนวยประโยชน์ในการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อโรคล้างคอกแพะเพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ออกจากก้อนฝีแล้วปนเปื้อนบนผนังคอด ให้ยาปฏิชีวนะที่ทดสอบว่าติดเชื้อ ละลายน้ำให้แพะกิน ตรวจร่างกายแพะทั้งหมดประจำทุกเดือน เมื่อพบแพะป่วยก็แยกออกทำลาย มาตรการหลายอย่างที่ได้ทำร่วมกันทำให้โรคสงบลง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Abdul Rahim Mutalib และ Mr. Mohd. Hajaraih Bin Sacama ที่ให้ความช่วยเหลือแอนติเจนและแนะนำเทคนิคการตรวจ สพ.ญ. สมหมาย ชิน ให้ความช่วยเหลือในการติดต่อและประสานงานเรื่องแอนติเจน น.สพ. สุทธิพงศ์ พลังสังเกตุ, สพ.ญ. ทัศนีย์ ยิ่งชูตระกูล และคุณพิภพ วงศ์เกิดเมฆ ที่ช่วยเหลือในการตรวจแพะ ดูแลแพะและส่งตัวอย่าง.

Table 1 Comparison of agar gel immunodiffusion test (AG) for exotoxin antibody of *C.ovis* with necropsy findings in 14 goats affected by caseous lymphadenitis (CL),

	Goats													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
- AG to CL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
- Abscesses in														
Parotid lymph node	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Mandibular lymph node	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Prescapular lymph node	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Prefemoral lymph node	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cervical lymph node	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Bronchial lymph node	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver and bile duct	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lung	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mammary gland	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Brisket	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

AG to CL	CL's abscesses	Goats	
		No.	%
Positive	Positive	12	85.72
Negative	Positive	1	7.14
Negative	Negative	1	7.14
	Total	**14**	**100.00**

Table 2 Comparative study of 3 different level of sera and exotoxin antigen, 100 μl, (petridish type), 25 μl, (glass plate type) and 2 μl, (microscopic slide type), for agar gel immunodiffusion test of caseous lymphadenitis.

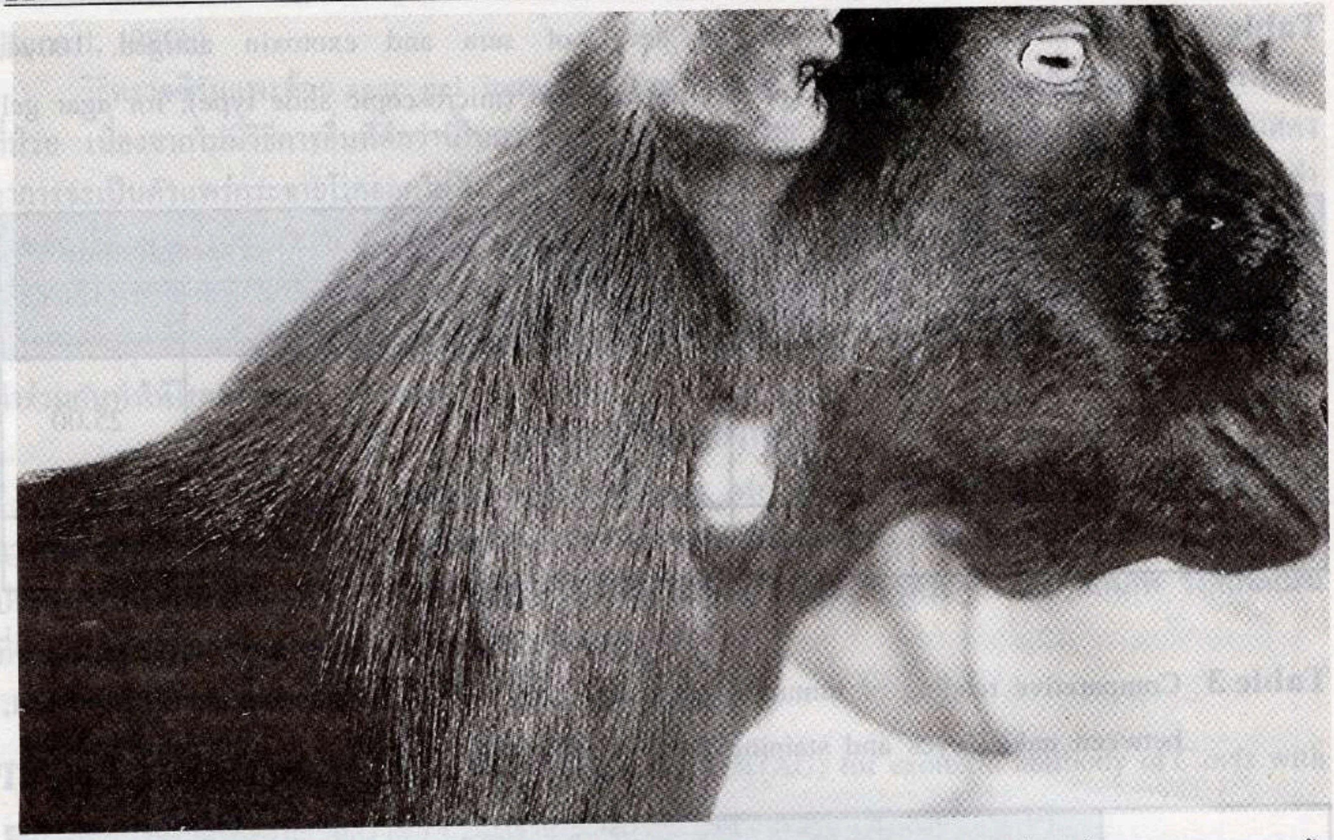
AG to CL	Petridish		Glass plate		Microscopic slide	
	No.	%	No.	%	No.	%
Positive	19	79.17	16	66.67	6	25.00
Negative	5	20.83	8	33.33	18	75.00
Total	**24**	**100.00**	**24**	**100.00**	**24**	**100.00**

Table 3 Comparative reading of immunoprecipitating line from agar gel immunodiffusion test, between naked eyes and staining the line with amidoblack.

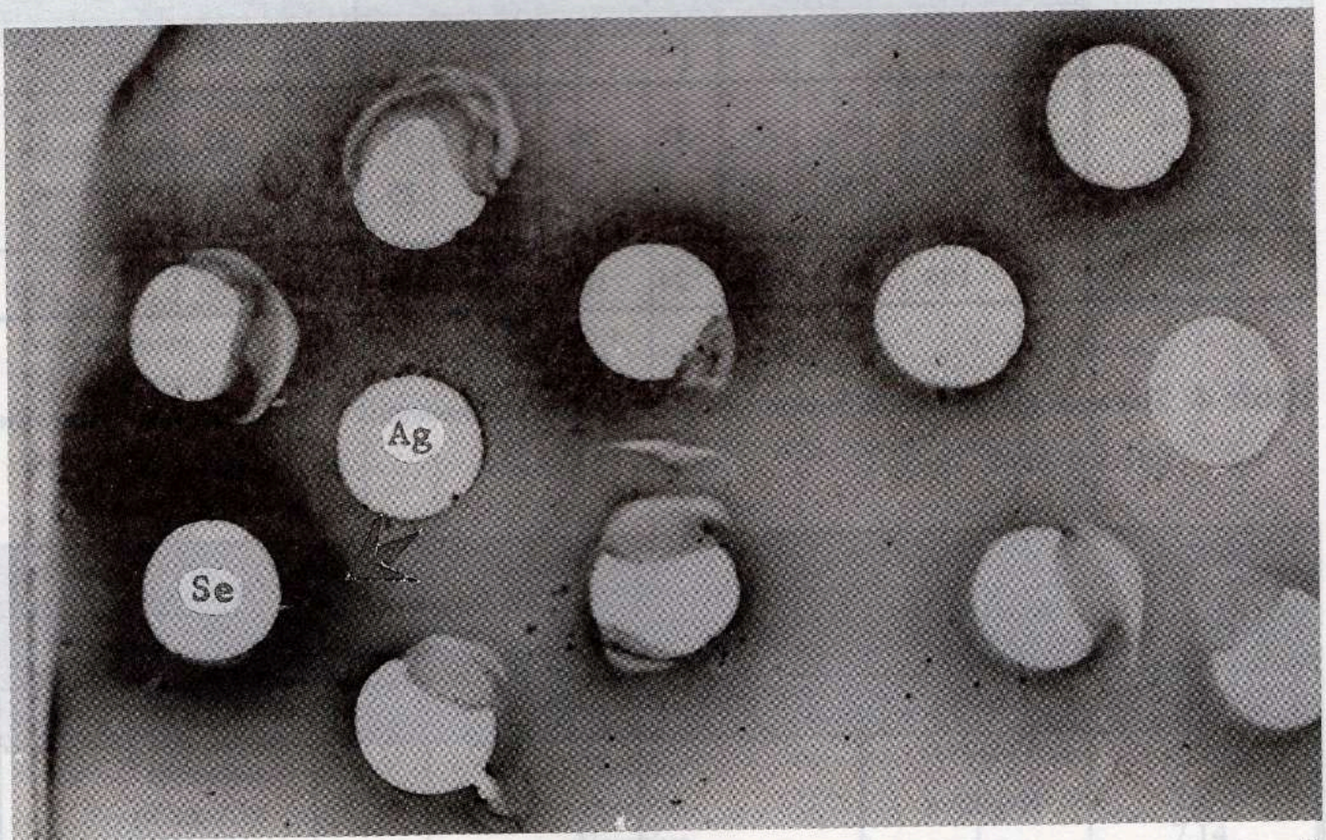
AG to CL	Petridish				Glass plate				Microscopic slide			
	eye		amidoblack		eye		amidoblack		eye		amidoblack	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Positive	19	79	19	79	16	66	17	70	6	25	12	50
Negative	5	20	5	20	8	33	7	29	18	75	12	50
Total	**24**	**100**	**24**	**100**	**24**	**100**	**24**	**100**	**24**	**100**	**24**	**100**

Table 4 The agar gel immunodiffusion test for caseous lymphadenitis in 162 goat's sera from the infected herd.

AG to CL	Goat's sera	
	No.	%
Positive	57	35.17
Negative	105	64.81
Total	**162**	**100.00**



รูปที่ 1 แสดงแพะป่วยที่พบก้อนฝีของวัณโรคเทียม (Caseous lymphadenitis abscess) ที่ต่อมน้ำเหลือง เพาะแยกเชื้อ *C.ovis* ได้จากหนอง และผลการตรวจซีรั่มก็ให้ผลบวกกับภูมิคุ้มโรค exotoxin



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจซีรั่มแพะด้วยวิธี agar gel immunodiffusion test เพื่อตรวจหาภูมิคุ้มโรคต่อ exotoxin ของเชื้อ *C.ovis* ผลบวกคือเส้น immuno-precipitating line (⬇) (Ag = ท็อกซินแอนติเจนของเชื้อ *C.ovis*, Se = ซีรั่มแพะ)

เอกสารอ้างอิง

วิชิต วงศ์วัชรดำรง วาสนา บุญญานุรักษ์ สนอง ศรีนันทพันธุ์ และปกรณ์ เอกปณิธานพงศ์ 2527. รายงานการเกิดโรควัณโรคเทียมในแพะ บทคัดย่อในที่ประชุมทางวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 3 ปี 2527.

พิพล สุขสายไทยชะนะ และปกรณ์ เอกปณิธานพงศ์ 2529. การศึกษาทางพยาธิวิทยาของโรควัณโรคเทียม (Caseous lymphadenitis) ที่เกิดการระบาดในแพะ. สัตวแพทยสาร 37 (1) : 29-32.

Awad, F.I. 1960. Serological investigation of Pseudotuberculosis in sheep I. Agglutination test. Am. J. Vet. Res. 21 : 251-253.

Axelsen, N.H., Kroll, J. and Weeke, B. 1973. A manual of quantitative immunoelectrophoresis method and application. Scandinavian J. of Immunology Vol. 2, Supplement No. 1.

Burrell, D.H. 1980a. A hemolysin inhibition test for detection of antibody of Corynebacterium ovis antitoxin. Res. Vet. Sci. 28 : 190-194.

Burrell, D.H. 1980b. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Cerynebacterium ovis* antitoxin. Res. Vet. Sci. 28 : 234-237.

Cameron, C.M. and Engelbrecht, M.M. 1971. Mechanism of immunity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Buchannan, 1911) in mice using inactivated vaccine. Onderstepoort J. Vet. Res. 38 : 73-82.

Cameron, C.M. and Smit, M.C. 1970. Relationship of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Protoplasmic toxins to the antitoxin. Onderstepoort J. Vet. Res. 37 : 97-104.

Jolly, P.D. 1965. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis.* J. Comp. Path. 75 : 417-431.

Lovell, R. and Zaki, M.M. 1966. Studies on growth products of *Corynebacterium ovis*, I. The exotoxin and its lethal action on white mouse. Res. Vet. Sci. 7 : 302-306.

Omar, A.R., Mahmood, Z., Sjamsul, B.S. and Vincent, N.G. 1981. Caseous lymphadenitis in goats. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University Pertanian, Malaysia.

Robertson, J.B. 1980. Studies on the diagnosis, epidemiology and immunity of Caseous lymphadenitis in sheep. M. Phil. Thesis, Murdoch University, Western Australia.

Zaki, M.M. and Abdel-Hamid, Y.M. 1974. Comparative study of in vitro and in vivo tests for Caseous lymphadenitis. Res. Vet. Sci. 16 : 167-170.

The study of agar gel immunodiffusion test for diagnosis of caseous lymphadenitis in goats

Pipol Suksaithaichana Malee Panyanukul

Pakorn Eakpanitarnpong

Abstract

Using agar gel immunodiffusion test on goat sera for detecting exotoxin antibody to *Corynebacterium pseudotuberculosis (C.ovis)*. The first study was carried out in 14 goats from caseous lymphadenitis (CL) infected herd. The comparative study between agar gel immunodiffusion of goat sera and necropsy results of CL's abscesses in visceral organs and lymph nodes. The sere-positive goats with CL's abscesses were 85.72% (12/14), sere-negative without abscess 7.14% (1/14) and sere-negative with abscess 7.14% (1/14). The second comparative study of 3 different level sera, 100 μl (Petridish type), 25 μl (Glass plate type) and 2 μl (Microscopic slide type) in 24 goat sera from the infected herd. The positive rate of 100 μl was, 79.17% (19/24), better than 25 μl and 2 μl. The third study was the comparative reading the immuno-precipitating line between naked eyes and amidoblack staining method. The staining method was better than naked eyes. The 162 goats' sera on infected herd were tested on CL using agar gel immunodiffusion test. The positive rate was 35.17% (57/162). The results of study was brought to eradicate the sero-positive goats from infected herd and the control of CL was success.

Key words : Caseous lymphadenitis, goat, serodiagnosis.

The Southern Veterinary Research and Diagnostic Center, Thungsong, Nakhon Si Thammarat, 80110.