การใช้ อีดีทีเอ ช่วยในการชันสูตรโรคบรูเซลโลซีสในโค

มนยา เอกทัตร์
ดิลก เกษรสมบัติ
สมชาย ช่างทอง
สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ บางเขน กทม. 10900

Abstract **The Addition of EDTA for Brucellosis Diagnosis in Cattle**

Monaya Ekgatat, Dilok Gesornsombat and Somchai Changthong
National Animal Health and Production Institute,
Department of Livestock Development, Bangkhen, Bangkok 10900.

Cattle sera 1,421 samples were tested, using 3 methods of agglutination; Tube Agglutination Test (TAT), 2-Mercaptoethanol test (2-ME) and EDTA-Agglutination Test (EDTA). The results of EDTA and 2-ME at the level of 25, 50 and 200 i.u. were not statistically significant ($P>0.05$). The EDTA and 2-ME showed highly statistically significant ($P<0.001$) from TAT. The level of agglutination titer at 100 i.u. of 3 methods showed no significant difference ($P>0.05$). 2-ME can be replaced with EDTA for reducing non-specific reaction.

บทคัดย่อ ซีรั่มโคจำนวน 1,421 ตัวอย่าง นำมาทดสอบโดยวิธีแอกกลูติเนชั่น 3 วิธี คือ Tube Agglutination Test (TAT), 2-Mercaptoethanol Test (2-ME) และ EDTA-Agglutination Test (EDTA) พบว่าที่ระดับไตเตอร์ 25, 50 และ 200 i.u. วิธี EDTA และ 2-ME แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และทั้ง 2 วิธีจะแตกต่างจากวิธี TAT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) และที่ระดับไตเตอร์ 100 i.u. พบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธี EDTA แทน 2-ME เพื่อช่วยลดปฏิกิริยาไม่จำเพาะได้

คำนำ

ปัจจุบันการชันสูตรโรคบรูเซลโลซิสด้วยวิธี Tube Agglutination นั้น มี 2 วิธี คือ Tube Agglutination Test (TAT) แบบธรรมดาและ 2-Mercaptoethanol Test (2-ME) ซึ่งการตรวจด้วยวิธี 2-ME ให้ผลดี สามารถลด non-specific reaction ได้ แต่ใช้เวลาในการชันสูตรประมาณ 3 วัน และการใช้ 2-ME นั้นมีกลิ่นเหม็น ส่วนการตรวจโรคบรูเซลโลซิสโดยวิธี Serum Agglutination จะพบว่ามี false agglutination reaction อันเนื่องมาจาก non-specific antibody ที่เป็นผลมาจากการกระตุ้นของ microbial flora ในระบบหายใจ และระบบทางเดินอาหาร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้การชันสูตรโรคทางอิมมูนและซีรั่มวิทยาผิดพลาดได้ ในการแก้ไขปัญหานี้ ได้มีผู้แนะนำให้ใช้ Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA) โดย EDTA จะไปจับตรงส่วน Fc ของอิมมูนโนโกลบูลินเอ็ม (IgM) เพื่อกำจัด non-specific antibody การใช้ EDTA ช่วยในการชันสูตรจะให้ผลในการทดสอบเร็วกว่าวิธี 2-ME ไม่มีกลิ่นเหม็น และสามารถลด non-specific reaction

การปรับปรุงวิธีการชันสูตรเพื่อควบคุมและจำกัดโรคบรูเซลโลซิสโดยใช้ EDTA ช่วยจะทำให้ลด false positive reaction ได้อีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ซีรั่มโคจำนวน 1,421 ตัวอย่าง เป็นซีรั่มโคซึ่งทางหน่วยงานของรัฐบาลและเอกชนได้ส่งมาชันสูตรโรคบรูเซลโลซิส ที่สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

2. บรูเซลลาแอนติเจนชนิด Tube Agglutination Test ผลิตโดยกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

3. Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA)

4. อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ตรวจทางซีรั่มวิทยาในห้องปฏิบัติการ

5. 2-Mercaptoethanol

วิธีการ

ตรวจซีรั่ม จำนวน 1,421 ตัวอย่าง โดยวิธี

1. วิธี Tube Agglutination Test (TAT) โดยใช้ 0.5% phenol saline เป็น diluent

2. วิธี 2-Mercaptoethanol Test (2-ME) โดยการ treat ซีรั่มด้วย 0.2 M 2-ME แล้วดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับ Tube Agglutination Test.

3. วิธี modified EDTA-Serum Agglutination Test (EDTA-SAT) ทำการทดสอบโดยการเตรียม 10 mM-EDTA-PBS-saline pH 7.2 เพื่อใช้เป็น diluent แล้วดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับ Tube Agglutination Test

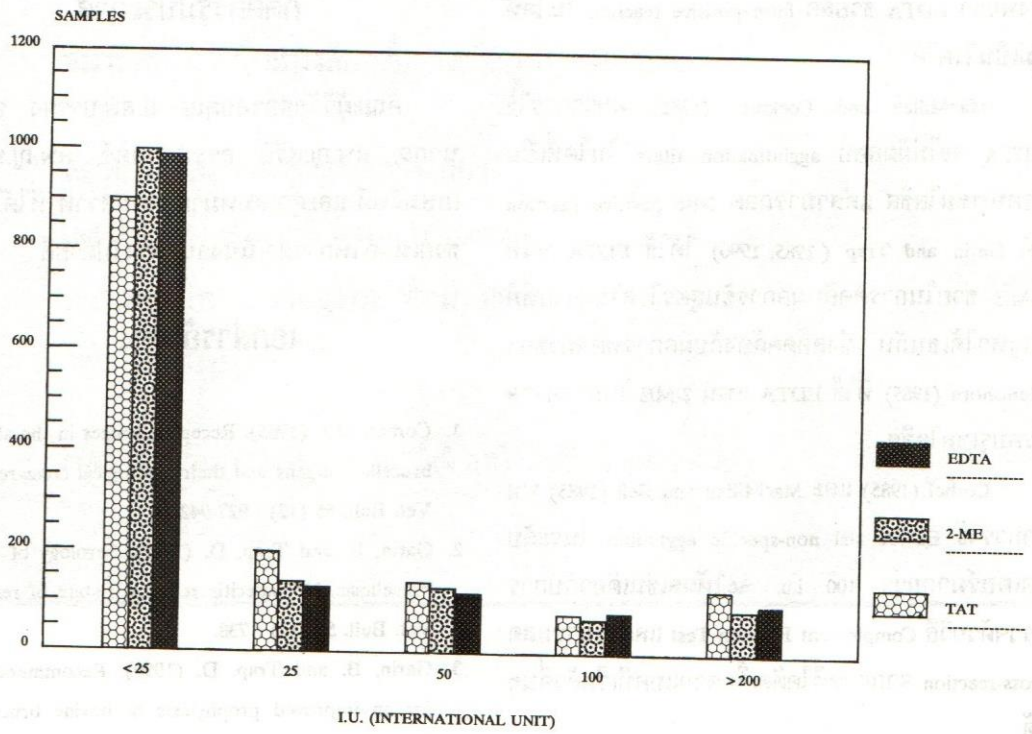
ผลการทดลอง

ผลการตรวจซีรั่มจำนวน 1,421 ตัวอย่าง ด้วยวิธีแอกกลูติเนชั่นทั้ง 3 วิธี นั้นพบว่าที่ระดับไตเตอร์ <25 และ 50 i.u. วิธี EDTA-SAT และ 2-ME จะแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่ทั้ง 2 วิธีจะแตกต่างจากวิธี TAT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) ส่วนที่ระดับไตเตอร์ 100 i.u. นั้น การตรวจด้วยวิธี EDTA-SAT, 2-ME และ TAT จะให้ผลบวก 5.91%, 5.14% และ 5.42% ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และกราฟที่ 1) ซึ่งจะให้ผลแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ที่ระดับไตเตอร์ >200 i.u. วิธี EDTA-SAT จะให้ผลบวก 7.11% (ตารางที่ 1) ซึ่งจะแตกต่างจากวิธี 2-ME อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่วิธี EDTA-SAT กับวิธี TAT จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

METHOD	SERUM TITERS (I.U.)					TOTAL
	< 25	25	50	100	> 200	
TAT	897	195	141	77	129	1,421
	61.86%	13.72%	9.92%	5.42%	9.08%	100%
2-ME	999	135	131	73	84	1,421
	70.23%	9.50%	9.22%	5.14%	5.91%	100%
EDTA	993	132	111	84	101	1,421
	69.88%	9.29%	7.81%	5.91%	7.11%	100%

ตารางที่ 1 : แสดงจำนวนซีรั่มและระดับแอนติบอดีย์ไตเตอร์ โดยวิธีแอกกลูติเนชั่น 3 วิธี



กราฟที่ 1 : แสดงจำนวนซีรั่มและระดับแอนติบอดีย์ไตเตอร์

วิจารณ์

การเกิด agglutination activity นั้นสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น แอนติบอดีย์ที่เกิดจากการตอบสนองของการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อบรูเซลลา ซึ่งกรณีเช่นนี้จะทำให้มีแอนติบอดีย์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับแอนติบอดีย์ที่เกิดจากการติดเชื้อบรูเซลลา และนอกจากนี้อาจจะเป็นแอนติบอดีย์ที่เรียกว่า natural (non-specific) antibodies ซึ่งเป็น non-specific agglutinin มักจะพบเสมอในซีรั่มโค สุกร และม้า ดังนั้นในโคที่ไม่เป็นโรคมักพบว่าจะมีมาก ตามรายงานของ WHO (1986) ได้เสนอแนะให้ใช้ EDTA ในซีรั่ม เช่นเดียวกับ Nowland and Geus (1985) ซึ่งพบว่า EDTA ช่วยลด false positive reaction ในโคที่ไม่เป็นโรคได้

MacMillan and Cockrem (1985) พบว่าการใช้ EDTA จะไม่มีผลต่อ agglutination titers ในโคที่เป็นโรคบรูเซลโลซิส แต่สามารถลด false positive reaction ได้ Garin and Trap (1985, 1990) ได้ใช้ EDTA หรือ 2-ME ช่วยในการตัดสินผลการชันสูตรโรคในฝูงโคที่มีปัญหาได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Stemshorn (1985) ที่ใช้ EDTA แทน 2-ME ในการตรวจโรคบรูเซลโลซิส

Corbel (1985) และ MacMillan and Bell (1985) พบว่าการใช้ EDTA ลด non-specific agglutinin ในระดับไตเตอร์มากกว่า 100 i.u. จะให้ผลเช่นเดียวกับการตรวจด้วยวิธี Complement Fixation Test และสามารถลด cross-reaction จากการที่โคติดเชื้อจากแบคทีเรียตัวอื่นๆ ได้

Gaumont (1985) ใช้ EDTA และความร้อนที่ 56° c พบว่าสามารถลด false positive reaction ได้

สรุป

การใช้ EDTA นี้สามารถลด non-specific reaction ได้เช่นเดียวกับ 2-ME โดยเฉพาะในระดับที่แอนติบอดีย์ไตเตอร์ต่ำกว่า 100 i.u. และสูงกว่า 100 i.u. ให้ผลน้อยกว่าการตรวจด้วยวิธี TAT ธรรมดา เพราะการตัดสินการเป็นโรคบรูเซลโลซิสนั้นจะตัดสินที่ 100 i.u. และ 200 i.u. ในโคที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนและฉีดวัคซีนตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถใช้ EDTA ช่วยในการชันสูตรโรคบรูเซลโลซิสได้ ซึ่งการใช้ EDTA และ 2-ME เพื่อลด false positive reaction สามารถจะใช้ทดแทนกันได้ ทั้งนี้ขึ้นกับความสะดวกของห้องปฏิบัติการในท้องที่

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ น.สพ.บรรจง อภิวัฒน์นากร, สพ.ญ.สุรีย์ ธรรมศาสตร์, สพ.ญ.ม.ล.นฤดี เกษมสันต์ และคุณสมหมาย หอมสวาท ที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้การดำเนินงานลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Corbel, M.J. (1985). Recent advances in the study of brucella antigens and their serological cross-reaction. Vet. Bull. 55 (12) : 927-942.
2. Garin, B. and Trap, D. (1985). Serology of bovine brucellosis. Non-specific reaction : state of research. Vet. Bull. 55 (10) : 738.
3. Garin, B. and Trap, D. (1990). Recommendations for an improved prophylaxis of bovine brucellosis. Vet. Bull. 60 (1) : 7.
4. Gaumont, R. (1985). Bovine brucellosis : Elimination of non-specific seroagglutination by using EDTA

and agglutination at 56° c. Vet. Bull. 55 (10) : 842.

5. Macmillan, A.P. and Bell, R.A. (1985) : Non-specific reaction to the Brucessa abortus SAT. Vet. Rec. Feb. (2) : 139.
6. MacMillan, A.P. and Cockrem, D.S. (1985). Reduction of non-specific reactions to the Brucells abortus serum agglutination test by the addition of EDTA. Res. in Vet. Sci. 38 : 288-291.
7. Nowland, P.F. and Geus. H.D. (1985). Use of EDTA modified antigen in the serodiagnosis of bovine brucellosis. Vet. Bull. 55 (4) : 228.
8. Stemshorn, B.W. (1985). Bovine brucellosis-diagnosis and eradication. Can. Vet.J. 26 : 35-39.
9. WHO Technical Report Series, No. 740 (1986) : Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis (Sixth Report) : 31-32.

สัตวแพทยสาร เป็นของสมาชิกสัตวแพทยสมาคมฯ ทุกๆ ท่าน

สมาชิกที่ไม่ได้รับหนังสือ หรือย้ายที่อยู่ โปรดแจ้งโดยตรงที่

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยฯ
เลขที่ 69/26 ซอยโรงภาพยนตร์เอเธนส์
ถนนพญาไท เขตพญาไท กทม. 10400
โทร. 252-8773

ติดต่อตามวัน เวลาราชการ มีเจ้าหน้าที่ประจำตลอดเวลา